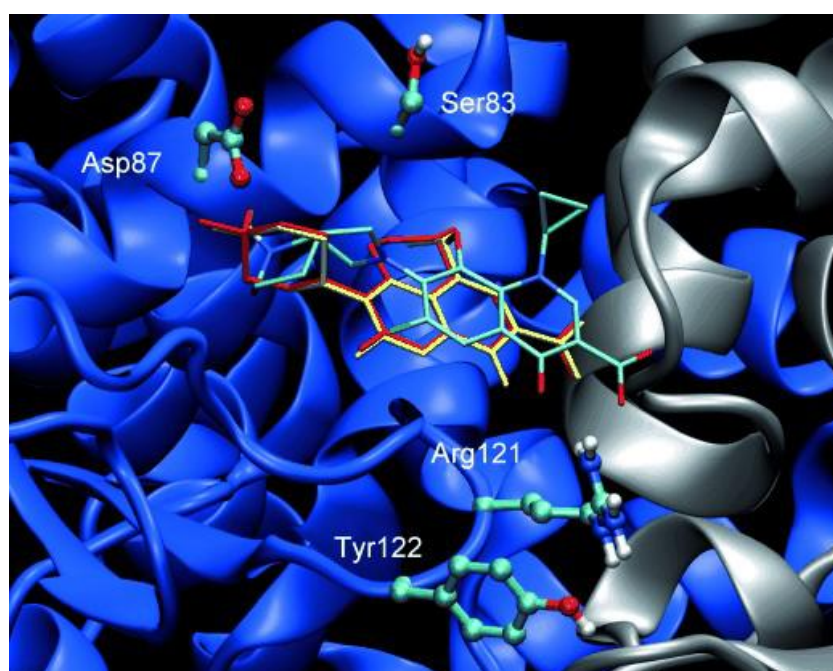


**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**Facultad de Medicina**

**Implicación de diversos mecanismos de  
resistencia a quinolonas en bacilos Gram-  
negativos: Diseño de una nueva  
fluoroquinolona**



**TESIS DOCTORAL**

**Javier Sánchez Céspedes**

**Barcelona 2008**





UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultad de Medicina**

Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y

Microbiología

Programa 2000-2002 - Microbiología Médica

**“Implicación de diversos mecanismos de  
resistencia a quinolonas en bacilos Gram-  
negativos: Diseño de una nueva  
fluoroquinolona”**

Memoria presentada por Javier Sánchez Céspedes

para optar al grado de Doctor en Biología

Bajo la dirección del Dr. Jordi Vila Estapé





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Jordi Vila Estapé, Catedrático del Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología de la Universidad de Barcelona y Jefe de Bacteriología del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“IMPLICACIÓN DE DIVERSOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS EN BACILOS GRAM-NEGATIVOS: DISEÑO DE UNA NUEVA FLUOROQUINOLONA”**, presentado por Javier Sánchez Céspedes, ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, bajo su dirección y cumple todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa frente al Tribunal correspondiente.

Firmada: Dr. Jordi Vila Estapé

Director de la tesis doctoral

Barcelona, Septiembre de 2008



## AGRADECIMIENTOS

Ya han pasado once años desde que un buen día aterricé en Barcelona. Para hacer un balance resumido de lo que han supuesto todos estos años para mí, he de decir en primer lugar que Barcelona se ha convertido sin lugar a dudas en mi casa, mi otra casa. La experiencia que me llevo de todos estos años no podría ser mejor. Creo que he aprendido muchas cosas, pero aún más importante es que he conocido a grandes amigos y a grandes personas, algunas de las cuales las llevaré conmigo para siempre.

Me gustaría agradecer a Jordi Vila la confianza que depositó en mí desde el primer momento para llevar a cabo este proyecto que desde el primer momento me entusiasmó. Gracias también por la experiencia profesional que me ha transmitido, por haberme hecho sentir parte de un grupo y, sobre todo, por haberme aguantado durante todo este tiempo.

También me gustaría agradecer a todo el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic, encabezado por la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Jiménez de Anta, la ayuda y el apoyo que incondicionalmente me han demostrado a lo largo de estos años.

Gracias al Departamentos de Química Orgánica de la UB, al Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Virgen del Rocío y al de Microbiología del Hospital Virgen de la Macarena, porque su participación ha sido indispensable para la realización de este trabajo.

Como no me gustaría extender mi agradecimiento al grupo con el que he trabajado todos estos años. Quim, que siempre tiene un hueco para echarte una mano, Marga y Mati que te miman desde el primer momento. Josep, Anna, Vicky, Sara S, todos me han enseñado algo. Marc y Roberto, o Roberto y Marc, no se me enfaden, qué habría hecho yo sin ellos, guardo su amistad como un tesoro, ¡qué buenos ratos hemos

pasado!, en el lab, en la cancha, en el bar, son todoterrenos. Vero es un soplo de aire fresco, su sola presencia te anima, y si es con una cervecita en la mano ni te cuento. Con Sara M son muchos los momentos en que nos hemos consolado, animado y ayudado, ya fuera con cervecita o sin ella, con una compañera así no hay tesis que se resista.

A Nacho y Lourdes me une algo especial, son para toda la vida. Yodi es un pedazo de mujer, ha sido mi sustento en muchos momentos, espero que algún día, aunque sólo sea por un segundo pueda ver lo grande que es. Dani es perico, y con eso no habría nada más que decir, todo corazón. Pepe y sus “batallitas estelares”, es como un niño y además perico. Ellos y muchos otros han compartido conmigo todos estos años, gracias por vuestra amistad, me la quedo, para mí para siempre.

Gracias a mi familia de El Masnou, gracias por cuidar de mí, ha sido una suerte haberos tenido a mi lado y un placer haber pasado con vosotros tantos buenos momentos, espero que no os olvidéis del *manqui*.

Gracias a mis hermanos, Juan y Alfonso, porque siempre puedo contar con ellos y gracias a mis padres por todo. Porque me lo han dado todo sin esperar nada a cambio, a pesar de que no siempre habré sabido agradecerse como debiera. A ellos les dedico este trabajo.

Y como no, por último, mil gracias a María, mi compañera y mi amiga. Por su paciencia y comprensión. Por su cariño y su apoyo incondicionales. Siempre ha estado ahí, incluso antes de haberla conocido. Por todo lo que nos queda por vivir... gracias.

Redactando estas líneas son muchas las vivencias que me han pasado por la cabeza. Queda claro que no sólo han sido años de trabajo, ésta ha sido una etapa muy valiosa en mi vida. Si la vida son experiencias creo que aquí he vivido mucho. Si alguien me pregunta “¿cómo fue la experiencia de tu tesis?” yo no podré más que responder, “inolvidable”.



*"La ciencia se compone de errores, que a su vez,  
son los pasos hacia la verdad."*

Julio Verne

*"En realidad, prefiero la ciencia a la religión.  
Si me dan a escoger entre Dios y el aire acondicionado,  
me quedo con el aire."*

Woody Allen







ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1.1	<b>Antecedentes históricos</b> .....	19
1.2	<b>Características generales de las quinolonas</b> .....	22
<b>2</b>	<b>QUINOLONAS</b> .....	23
2.1	<b>Estructura y clasificación</b> .....	23
2.2	<b>Farmacocinética</b> .....	31
2.2.1	Absorción .....	31
2.2.2	Distribución .....	32
2.2.3	Eliminación.....	33
2.3	<b>Farmacodinamia</b> .....	35
2.4	<b>Penetración intracelular de las quinolonas</b> .....	37
2.5	<b>Aplicaciones clínicas</b> .....	39
2.6	<b>Toxicidad</b> .....	41
<b>3</b>	<b>MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS</b> .....	43
3.1	<b>Enzimas diana</b> .....	44
3.1.1	ADN girasa.....	44
3.1.2	Topoisomerasa IV.....	46
3.2	<b>Modelos de interacción</b> .....	46
3.3	<b>Criterios de sensibilidad</b> .....	49
<b>4</b>	<b>MECANISMO DE RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS</b> .....	50
4.1	<b>Mutaciones en las enzimas diana</b> .....	50
4.1.1	Mutaciones en la ADN girasa.....	51
4.1.2	Mutaciones en el gen <i>gyrA</i> .....	51
4.1.3	Mutaciones en el gen <i>gyrB</i> .....	53

4.1.4	Mutaciones en la topoisomerasa IV.....	53
4.1.5	Mutaciones en el gen <i>parC</i> .....	53
4.1.6	Mutaciones en el gen <i>parE</i> .....	54
4.2	<b>Disminución de la acumulación de quinolona</b> .....	54
4.2.1	Porinas.....	54
4.2.2	Bombas de expulsión activa.....	55
4.2.3	Artículo II. Sistemas d'expulsió activa i llur relació amb la resistència als agents antibacterians.....	59
4.3	<b>Resistencia mediada por plásmidos</b> .....	73
4.3.1	Qnr.....	73
4.3.2	AAC(6')-Ib-cr.....	75
4.3.3	Qep.....	76
4.4	<b>Expresión de las dianas</b> .....	76
4.5	<b>Transferencia de fragmentos de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i></b> .....	77
5	<b>DESARROLLO DE NUEVAS QUINOLONAS</b> .....	77
5.1	Artículo III. Old and new strategies for discovery of antibacterial agents.....	79
6	<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	101
7	<b>RESULTADOS</b> .....	105
7.1	<b>Mecanismos de Resistencia a Quinolonas</b> .....	105
7.1.1	Resultados adicionales.....	105
7.1.2	Cambios en la expresión de sistemas de expulsión activa y porinas asociados con la resistencia a quinolonas en dos cepas isogénicas de <i>E. coli</i> .....	105
7.1.3	Artículo I. Clonal dissemination of a <i>Yersinia enterocolitica</i> strains, with various susceptibilities to nalidixic acid.....	111

7.1.4	<b>Artículo V.</b> Characterization of the AcrAB locus in two <i>Citrobacter freundii</i> clinical isolates.....	117
7.1.5	<b>Artículo VIII.</b> Two chromosomally located <i>qnrB</i> variants, <i>qnrB6</i> and the new <i>qnrB16</i> , in <i>Citrobacter</i> spp. isolates causing bacteraemia.....	125
7.1.6	<b>Artículo VI.</b> Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical <i>Aeromonas veronii</i> isolate .....	151
7.2	<b>Interacción ADN girasa/Fluoroquinolonas</b> .....	155
7.2.1	<b>Artículo VII.</b> Binding mechanism of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA Gyrase: Towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance .....	155
7.3	<b>Desarrollo de nuevas quinolonas</b> .....	163
7.3.1	<b>Artículo IV.</b> Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria.....	163
7.3.2	<b>Resultados adicionales</b> .....	171
7.3.3	Ensayo de superenrollamiento de la ADN girasa en presencia de ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902.....	171
7.3.4	Ensayo de acumulación de ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902 en <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	175
7.3.5	Acumulación y actividad intracelular de la fluoroquinolona UB-8902 en leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) .....	181
7.3.6	Optimización y estudios pre-clínicos de un derivado del ciprofloxacino (UB-8902).....	187
7.4	<b>Potenciadores de la actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas</b> ...	197
7.4.1	Búsqueda de inhibidores de bombas de expulsión activa a partir de extractos vegetales de plantas de origen Chino .....	197

7.4.2	Análisis de la actividad antibacteriana del péptido (VRLPPP) <sub>3</sub> .....	200
8	<b>DISCUSIÓN</b> .....	207
8.1	<b>Mecanismos de resistencia a quinolonas en bacterias Gram-negativas.</b>	207
8.1.1	Mecanismos de resistencia a quinolonas en <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	208
8.1.2	Mecanismos de resistencia a quinolonas en <i>Citrobacter freundii</i> .....	209
8.1.3	Mecanismos de resistencia a quinolonas de transmisión plasmídica .....	212
8.2	<b>Bases moleculares de los mecanismos de unión de las fluoroquinolonas a la región determinante de la resistencia a quinolonas de la ADN girasa</b> .....	217
8.3	<b>Desarrollo de una nueva fluoroquinolona (UB-8902)</b> .....	219
8.3.1	Penetración intracelular de UB-8902 en linfocitos polimorfonucleares humanos.....	226
8.3.2	Optimización y estudios pre-clínicos de UB-8902.....	229
8.4	<b>Búsqueda de potenciadores de la actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas</b> .....	234
9	<b>CONCLUSIONES</b> .....	239
10	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	245



## **INTRODUCCIÓN**

---



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos

#### **Los Cazadores de Microbios (“Microbe Hunters” de Paul de Kruif) (43)**

Poco se podría imaginar Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), un comerciante de sedas holandés del siglo XVII, que las observaciones realizadas a través de sus rudimentarios microscopios iban a desvelar un mundo tan complejo y fascinante como el de los microorganismos. Desde entonces los avances técnicos se han ido sucediendo sin descanso e innumerables descubrimientos no han parado de sucederse. Sin embargo, no fue hasta los trabajos de Louis Pasteur (1822-1895) cuando se comenzaron a asociar a los microorganismos con enfermedades en plantas y animales. En 1813 se apuntaba que ciertos hongos podían ser la causa de enfermedades del trigo y el centeno y en 1845, M. J. Berkeley demostró que la plaga de la patata en Irlanda, una catástrofe natural que influyó profundamente en la historia irlandesa, estaba causada por un hongo. La primera vez que se admitió que un hongo podía estar asociado específicamente a una enfermedad de los animales fue en 1836, gracias a los trabajos de A. Bassi sobre una enfermedad fúngica de los gusanos de seda. Pocos años después, J. L. Schölein demostró que ciertas enfermedades de la piel estaban causada por infecciones fúngicas. Pese a todas estas indicaciones eran pocos los médicos que estaban dispuestos a admitir la idea de que las principales enfermedades infecciosas del hombre podrían estar causadas por microorganismos.

La introducción de la anestesia, hacia 1840, hizo posible un rápido desarrollo de los métodos quirúrgicos. Ya no importaba tanto el tiempo, y el cirujano podía realizar operaciones de una duración y complejidad impensables anteriormente. Pero con este perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas un problema que siempre había existido cobró aun mayor importancia: la sepsia quirúrgica, es decir, las infecciones que

seguían a la intervención quirúrgica y que con frecuencia causaban la muerte del paciente. Fue un joven cirujano británico, Joseph Lister quien, impresionado por los trabajos de Louis Pasteur acerca de la teoría de la “generación espontánea” en los que se demostraba la existencia de microorganismos en el aire, pensó que la sepsis quirúrgica podía ser el resultado de la infección microbiana de los tejidos humanos expuestos al aire durante la operación. Así pues, decidió desarrollar métodos para evitar el acceso de los microorganismos a las heridas quirúrgicas. Estos procedimientos de cirugía antiséptica, desarrollados hacia 1864, fueron recibidos inicialmente con profundo escepticismo, pero, a medida que sus notables éxitos contra las sepsis quirúrgicas se fueron conociendo, se fueron incorporando gradualmente a la práctica clínica común. Este trabajo proporcionó una poderosa prueba indirecta de la teoría de que las enfermedades eran producidas por gérmenes, aun cuando no aportó luz sobre el posible origen microbiano de enfermedades específicas del hombre.

El descubrimiento de que las bacterias podían actuar como agentes específicos de las enfermedades infecciosas en animales fue realizado a través del estudio del carbunco, infección grave de los animales domésticos que es transmisible al hombre. Fue Robert Koch, un médico rural alemán, quién en 1876 aportó los estudios concluyentes mediante los cuales se demostraba que ratones sanos podían ser infectados con material procedente de un animal doméstico enfermo. Al mismo tiempo, Pasteur había encontrado un colaborador, J. Joubert, que conocía los problemas médicos. Sin tener noticia de los trabajos de Koch, Pasteur y Joubert emprendieron el estudio del carbunco. Pese a no añadir nada realmente nuevo a las conclusiones a las que había llegado Koch, confirmaron su trabajo y proporcionaron demostraciones adicionales acerca de que la causa específica de la enfermedad era el bacilo de Koch y no otro agente cualquiera.

Este trabajo sobre el carbunco condujo rápidamente a la edad de oro de la bacteriología, durante la cual los institutos creados en París y Berlín por Pasteur y Koch respectivamente, se convirtieron en los centros mundiales de la ciencia bacteriológica. En veinticinco años, la mayoría de los agentes bacterianos de las principales enfermedades humanas habían sido descubiertos y descritos y se habían desarrollado métodos encaminados a evitar muchas de estas enfermedades, tanto mediante la inmunización artificial como por la aplicación de medidas higiénicas. Fue, con gran diferencia, la mayor revolución médica de toda la historia de la humanidad.

Es un poco difícil definir cuando comienza la historia de los antibióticos, o mejor aún, de los quimioterápicos. Sin embargo, podemos citar que en los primeros años del siglo XX, cuando Paul Ehrlich anunció la eficacia del salvarsán para el tratamiento de la sífilis, muchos pensaron que la lucha contra las enfermedades infecciosas había sido ganada. Lo prometedor de este hallazgo, sin embargo, no sirvió como estimulante de la investigación y el descubrimiento, ya que, en el año 1914 estalla la primera gran guerra y, durante seis largos años, las urgencias impiden que se piense en desarrollos futuros. Años después, en 1936, los diarios atraían al lector con la noticia de la enfermedad de Franklin Delano Roosevelt. El joven se salvó, y fue así como el público conoció el Prontosyl, la primera sulfamida.

En ese momento se pensaba que el siglo XX iba a ser conocido como el siglo de las sulfamidas. Sin embargo, se ignoraba lo que desde hacía tiempo estaba ocurriendo en el Hospital St. Mary de Londres. Allí, Alexander Fleming trabajaba multiplicando diversas variedades de gérmenes causantes de infecciones supuradas. En el curso de su investigación, una observación fortuita, no carente de espíritu crítico y enorme base científica, produjo el inicio de un proceso que culminó con la obtención de la penicilina. La aparición de nuevos y diferentes quimioterápicos se sucedió en los años

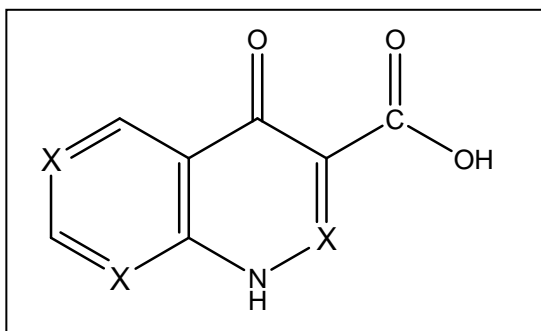
siguientes de manera constante. Así, en la década de los 40 se introdujo en la práctica clínica la estreptomicina, los primeros macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol llegarían en la década de los 50, en los 60 las cefalosporinas, los aminoglicósidos y las primeras quinolonas. Ya en los 70 aparecen los glicopéptidos y en los 80 las fluoroquinolonas y los carbapenemes.

## 1.2 Características generales de las quinolonas

En 1949 se obtuvo mediante degradación de alcaloides una molécula carente de actividad biológica, la cual recibió nombre de “quinolona” (149). Con el nombre de quinolonas se conoce a un grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos de acción bactericida que derivan de una estructura básica idéntica, el ácido 4-quinolín, 3-carboxílico (4-quinolona) (Figura 1.1).

La estructura básica de las quinolonas antibacterianas es el núcleo quinolónico, que es el ácido nalidíxico, primera quinolona de origen sintético y que ya poseía el grupo cetónico. Por ello, se denominan 4-quinolonas. Pero esta estructura básica origina cuatro grupos diferentes, según el número y la posición de los átomos de nitrógeno de la molécula, todos ellos incluidos bajo la denominación de quinolonas. Estos grupos son los siguientes:

- A. BENZOPIRIDONAS: Contienen un único átomo de nitrógeno en la posición 1. Es, con mucho, el núcleo más utilizado en la síntesis de quinolonas.
- B. NAFTIRIDINAS: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 8.
- C. PIRIDOPIRIMIDINAS: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1, 6 y 8.
- D. CINOLINAS: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 2.

Estructura básica de las 4-quinolonas: Ácido 4-quinolín, 3-carboxílico.

X: posiciones que pueden  
contener también un átomo  
de N

Figura 1.1. Estructura general de las quinolonas.

## 2 QUINOLONAS

### 2.1 Estructura y clasificación

La primera quinolona propiamente dicha aparece en 1962 cuando se encontró actividad antibacteriana en un compuesto intermediario de la síntesis de la cloroquina (compuesto antipalúdico) (100). Este compuesto era el ácido nalidíxico (Figura 2.1), el cual fue introducido en la práctica clínica 2 años después (49). La utilidad clínica del ácido nalidíxico resultó muy limitada ya que por sus características farmacocinéticas sólo alcanzaba concentraciones terapéuticas a nivel de la orina, por lo que se destinó al tratamiento de infecciones urinarias (ITU) y además, presentaba una alta incidencia de efectos secundarios y una rápida aparición de resistencias bacterianas todo lo cual llevó al desarrollo de nuevos compuestos, como el ácido oxolínico, el ácido piromídico, el ácido pipemídico, el cinoxacino (170, 171, 183, 197) y el flumequino.

La introducción del radical piperazinil en la posición 7 (generando el ácido pipemídico) mejoró su actividad frente a Gram-negativos, ampliando su espectro de acción incluyendo a *Pseudomonas* spp. Así mismo, el ácido pipemídico también mostraba cierta actividad frente a Gram-positivos. Este anillo de piperazina en posición

7 incrementaba también la habilidad de las quinolonas para atravesar la pared celular bacteriana, aumentando así su actividad (9).

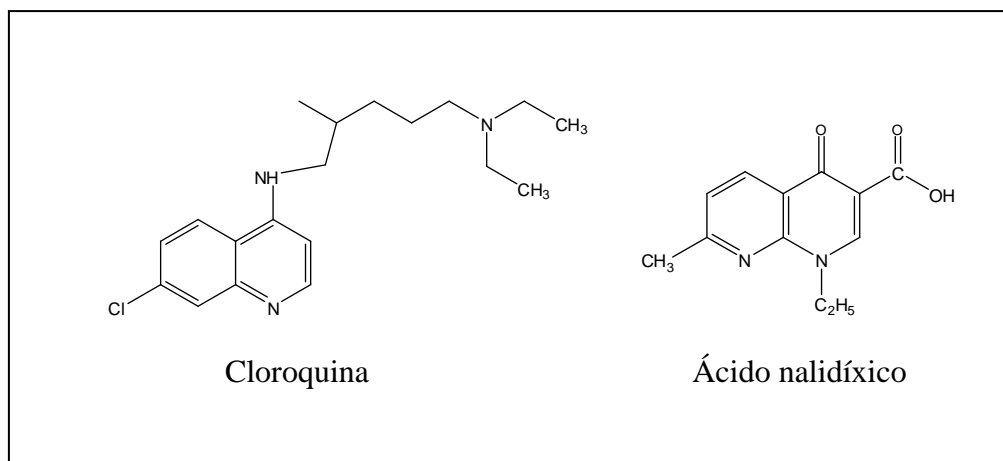


Figura 2.1 Estructura de la cloroquina y del ácido nalidíxico.

El flumequino, sintetizado en 1973, es la primera quinolona que contiene un átomo de flúor en su estructura, pero que no llega a gozar de las características farmacocinéticas de las nuevas fluoroquinolonas, si bien debido a la presencia de ese átomo de flúor su potencia es diez veces superior frente a los microorganismos Gram positivos (49, 157). A excepción del flumequino y el ácido pipemídico, estos derivados, no difieren mucho del ácido nalidíxico, ni en su espectro de acción, ni en su farmacocinética. Las quinolonas mencionadas hasta el momento constituyen el grupo conocido como **quinolonas clásicas o quinolonas de primera generación**. Su uso clínico se extendió hasta finales de los años 70, momento en el cual se llevaron a cabo diversas modificaciones en el anillo básico con la intención de aumentar su potencia y su espectro de acción.



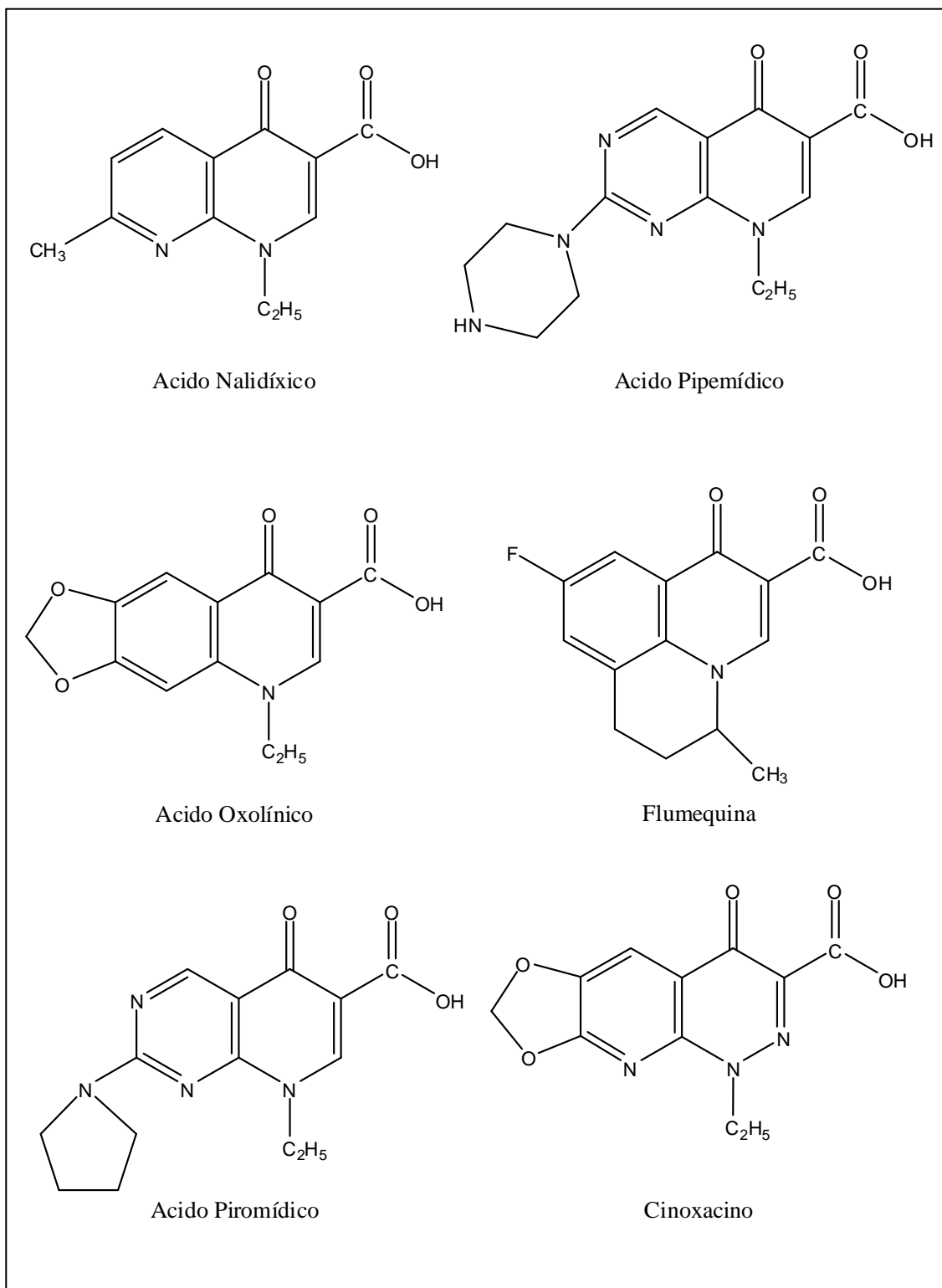


Figura 2.2 Quinolonas de 1ª Generación (quinolonas clásicas).

A finales de los años 70 tuvo lugar un hecho clave con el desarrollo del norfloxacin, combinando la adición del grupo piperazina en la posición 7 y del átomo

de flúor en la posición 6 de la molécula de ácido nalidíxico. Nacían así las **quinolonas monofluoradas o quinolonas de segunda generación** (Figura 2.3). El norfloxacinó presentaba una actividad mejorada frente a organismos Gram-negativos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* (96). Sin embargo, seguían sin conseguirse concentraciones adecuadas en suero, por lo que el norfloxacinó fue limitado al tratamiento de ITUs (21). A partir de este momento y a partir de modificaciones de la estructura del ácido nalidíxico se comenzaron a sintetizar gran cantidad de nuevas quinolonas, las cuales se fueron incorporando al arsenal de antibacterianos usados en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Rápídamente se desarrollaron, de manera más o menos simultánea nuevas fluoroquinolonas como pefloxacinó, enoxacinó, lomefloxacinó, fleroxacinó, ciprofloxacino y ofloxacinó. Estas nuevas fluoroquinolonas presentaban un mayor espectro de actividad, ampliado a organismos Gram-positivos y con una mayor actividad sobre Gram-negativos, hasta 1000 veces más que su antecesor, el ácido nalidíxico. Con estas nuevas moléculas se ampliaba el espectro de acción y las posibles aplicaciones de las quinolonas, mejorando sus parámetros farmacocinéticos y aumentando su actividad bactericida, permitiendo así su uso en el tratamiento de infecciones sistémicas. El ciprofloxacino fue la primera fluoroquinolona indicada para infecciones fuera del tracto urinario (42, 71). El ciprofloxacino poseía un amplio espectro de actividad antibacteriana, manteniendo la potente actividad frente a Gram-negativos de los compuestos previos, pero con una mejorada actividad frente a bacterias Gram-positivas. Además poseía una farmacocinética mejorada, la cual permitía una administración dosificada de dos veces al día, así como unos efectos adversos potencialmente bajos (42). No obstante, todas las quinolonas de segunda generación presentaban una limitación importante: eran poco activas frente a cocos Gram positivos aerobios tales como *Streptococcus pneumoniae*, limitando su uso en infecciones

respiratorias y apenas eran eficaces frente a bacterias anaerobias (3). En dos décadas, las quinolonas pasaron de constituir un grupo pequeño de fármacos de relativa poca importancia, usados fundamentalmente en el tratamiento de ITUs, a constituir un grupo de antibióticos que generaban unas ventas en todo el mundo de aproximadamente 3,04 billones de dólares en 1997 (9). A finales del siglo XX el ciprofloxacino, posiblemente el miembro más popular de este grupo de antibacterianos, era el agente antibacteriano más empleado en todo el mundo (3).

Posteriormente se han generado las **quinolonas de tercera generación** (Figura 2.4), compuestos bi- o trifluorados con mayor semi-vida plasmática y superior potencia antibacteriana *in vitro* sobre cocos Gram positivos y las **quinolonas de cuarta generación** (Figura 2.5) que además presentan actividad anaerobicida. Son quinolonas muy bien toleradas y parecen destinadas a ocupar un lugar importante en terapéutica antiinfecciosa, fundamentalmente en procesos graves o producidos por bacterias con resistencia a otros antimicrobianos (92).

La tercera generación de quinolonas incluía compuestos con mayor complejidad estructural que los predecesores. Nuevas modificaciones en la molécula de quinolona llevaron al descubrimiento de nuevos compuestos como esparfloxacino, temafloxacino, tosufloxacino, grepafloxacino y levofloxacino, que presentaban una potente actividad tanto frente a Gram-negativos como Gram-positivos. Asimismo, presentan algunas ventajas farmacocinéticas respecto a las quinolonas de la segunda generación, como semi-vidas de eliminación más prolongadas y mayor penetración tisular (94, 174). Sin embargo, no todas estas moléculas han llegado a usarse en la práctica clínica diaria ya que, muchas de ellas, fueron retiradas del mercado debido a los efectos adversos derivados de su uso, como fue el caso de grepafloxacino entre otros (160).

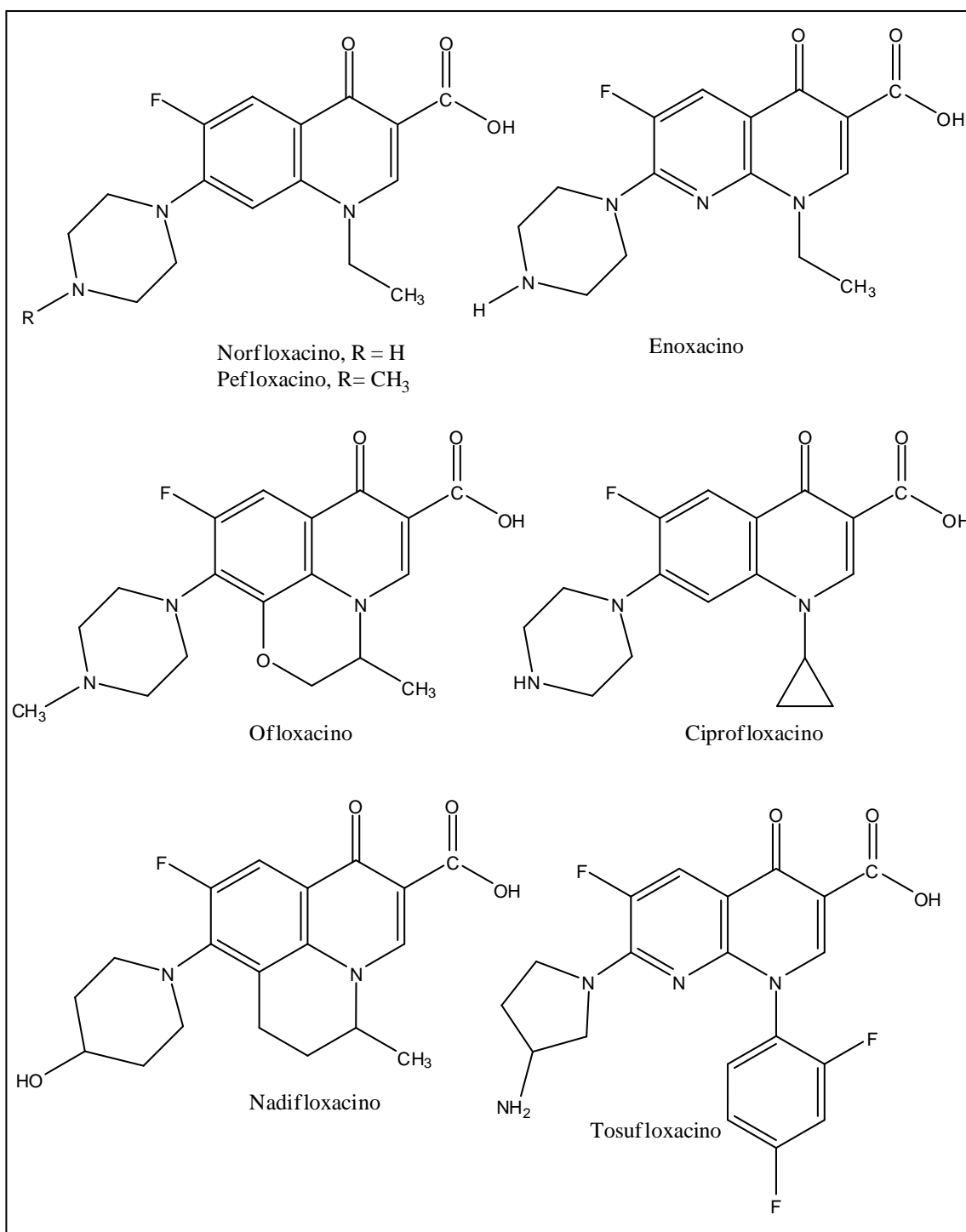


Figura 2.3 Quinolonas de 2ª Generación (monofluoradas).

Entre las quinolonas de cuarta generación aparecen compuestos con una potencia similar a las quinolonas de tercera generación frente a microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos y atípicos. Además, algunos de estos compuestos, en

particular sitafloxacin, clinafloxacin y trovafloxacin, presentaban una actividad mejorada frente a organismos anaerobios (9, 161). Desde el punto de vista farmacocinético presentan las mismas ventajas que sus predecesoras (278). Además de los arriba mencionados, pertenecen a este grupo el gatifloxacin, moxifloxacin, y gemifloxacin.

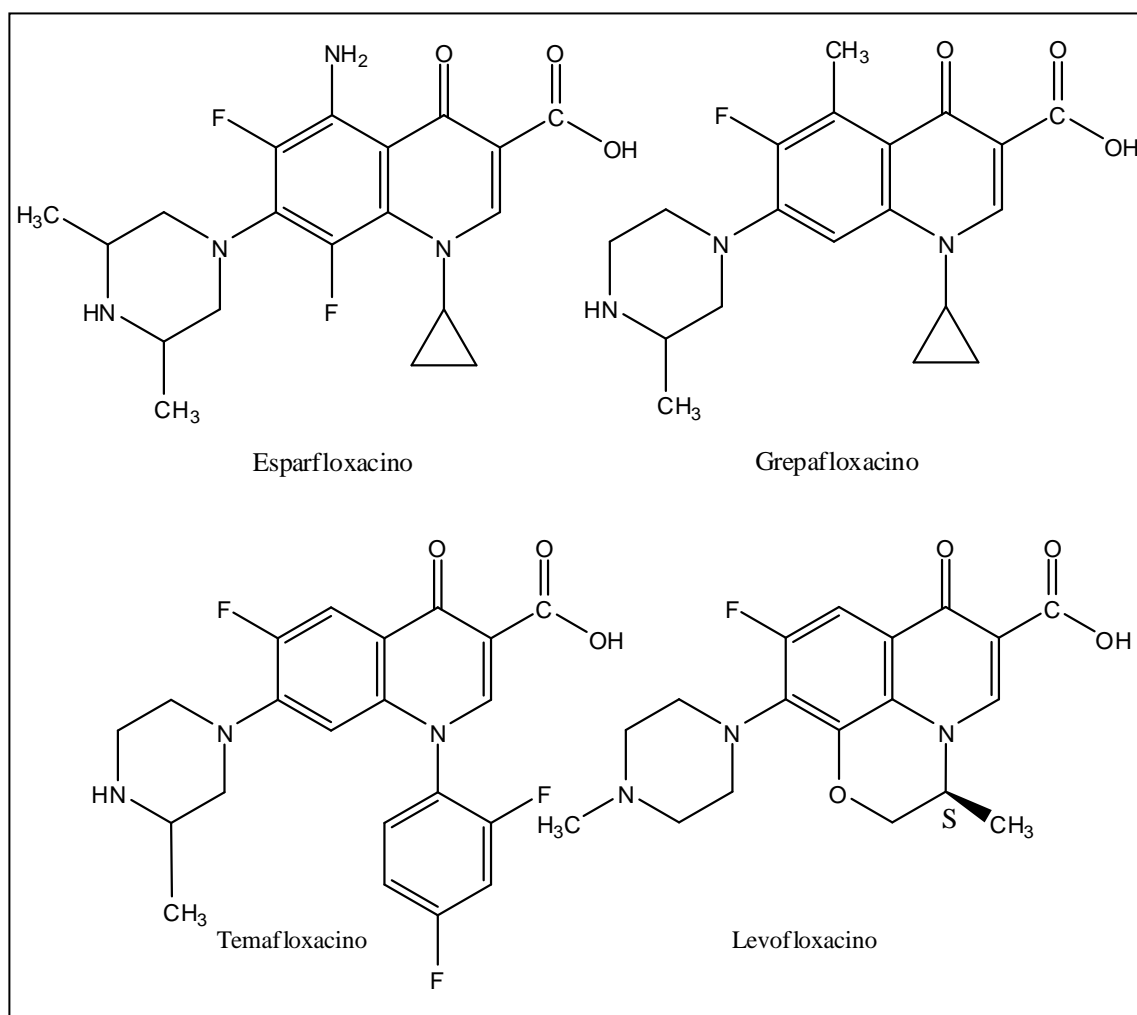


Figura 2.4 Quinolonas de 3ª Generación (multifluoradas).

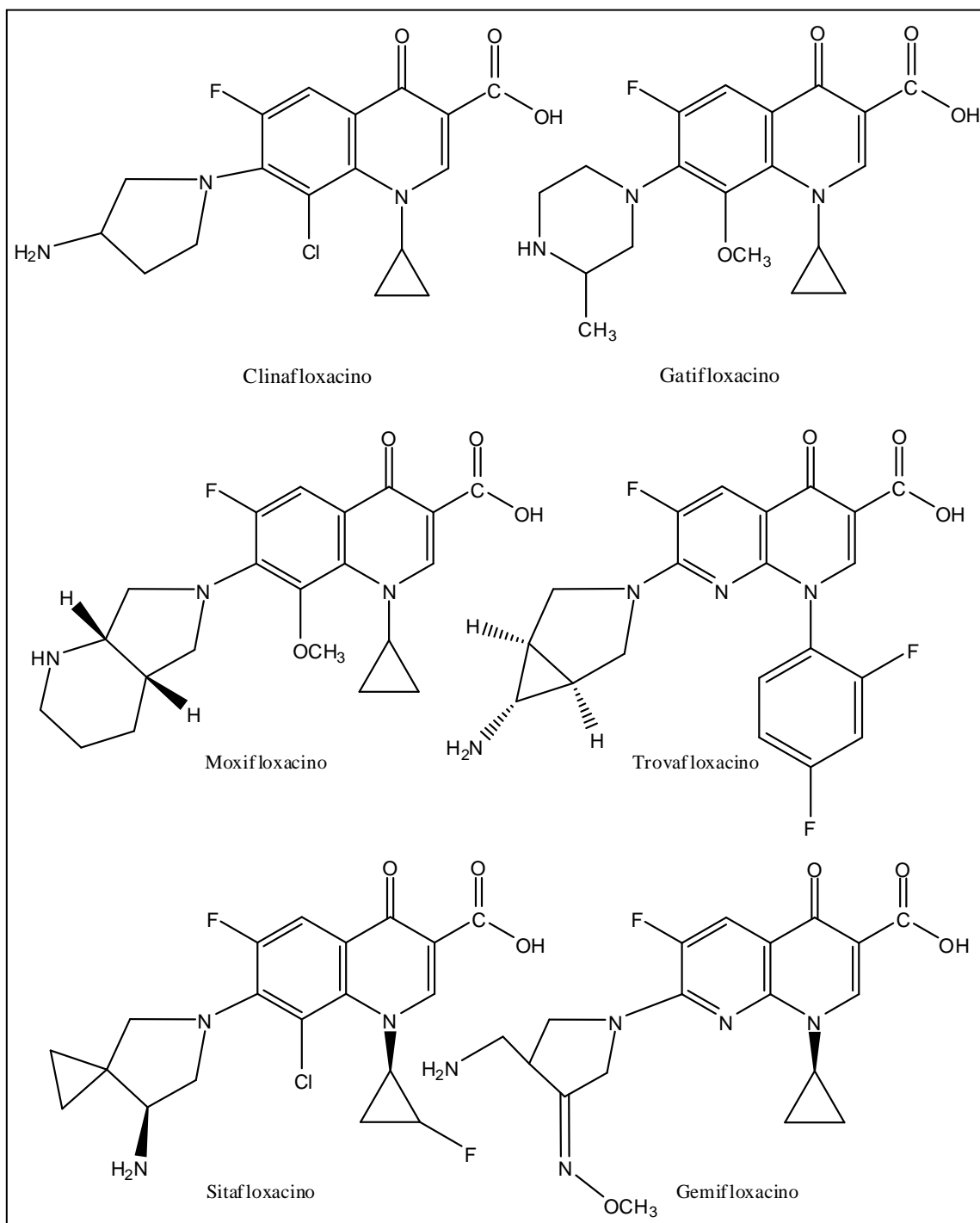


Figura 2.5 Quinolonas de 4ª Generación.

## 2.2 Farmacocinética

La eficacia terapéutica de las quinolonas está determinada tanto por su actividad antimicrobiana como también por el perfil farmacocinético que presentan (85), que determina la concentración que se alcanzará en el foco infeccioso. Un buen antibiótico debe caracterizarse por una fácil absorción, una buena biodisponibilidad, un elevado volumen de distribución y una larga vida media.

### 2.2.1 Absorción

La absorción de las quinolonas se da prácticamente en su totalidad a nivel del tracto gastrointestinal después de la administración oral y sufren un efecto de primer paso poco importante. Esta absorción genera una biodisponibilidad comprendida entre el 12 y el 93%, es decir, desde escasa a eficiente. La velocidad de absorción varía según la fluoroquinolona pero, en general, es rápida y el máximo en plasma ( $t_{max}$ ) se alcanza entre 0,5 y 2 horas.

Quinolonas como norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino y trovafloxacino presentan una farmacocinética lineal (58, 98, 101, 176, 179), de tal manera que los valores de concentración en el pico ( $C_{max}$ ) y área bajo la curva (AUC) aumentan de forma proporcional a la dosis. Por otro lado, quinolonas como pefloxacino y esparfloxacino presentan farmacocinéticas no lineales (16, 70). En estos casos, al aumentar la dosis de fármaco disminuye la fracción absorbida del mismo.

Mientras el ciprofloxacino presentaba una biodisponibilidad oral entre 56 y el 77% en adultos sanos, las nuevas fluoroquinolonas como el pefloxacino, mejoraban radicalmente esta biodisponibilidad, situándola próxima al 100% (19). Además se ha visto que la adición de un sustituyente como el cloro o el flúor en la posición 8 también mejoraba notablemente la biodisponibilidad (26). Así mismo, se ha observado que la

administración conjunta de fluoroquinolonas y compuestos que contengan metales catiónicos ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), como preparados antiácidos o polivitamínicos, provocan una disminución en la absorción intestinal de las primeras (45). Por otro lado, se ha comprobado que la administración simultánea con alimentos parece favorable para disminuir la incidencia de efectos adversos gastrointestinales (45).

En lo que al mecanismo de absorción se refiere, se ha visto que la absorción de las fluoroquinolonas como ciprofloxacino, norfloxacino, levofloxacino, grepafloxacino y esparfloxacino (paso de la membrana apical a la basal), resulta pequeña en comparación con el paso de los mismos desde la membrana basal a la membrana apical (74). Por otro lado, se ha observado que un cierto número de 4-quinolonas y fluoroquinolonas, son capaces de inhibir la secreción del ciprofloxacino y la acumulación a lo largo de la superficie de las células basal-laterales. Estos estudios de competición sugieren que las fluoroquinolonas deben utilizar un transportador común en la membrana basal-lateral lo que explica la eliminación transintestinal del ciprofloxacino (75). Esclarecer los mecanismos implicados en este proceso es un punto de vital importancia a tener en cuenta en el diseño de nuevas moléculas.

### **2.2.2 Distribución**

Después de la administración oral o intravenosa, las fluoroquinolonas tienen una distribución rápida y amplia en los tejidos y fluidos corporales (80). Se distribuyen en vesícula biliar, hígado, pulmones, útero, fluido seminal, tejido prostático, ovarios, trompas de Falopio, riñón, amígdalas y saliva (174). Tienen la capacidad de atravesar la barrera placentaria y acceder al líquido amniótico y también algunos compuestos pueden excretarse a la leche materna (69). Algunas quinolonas pueden alcanzar el hueso así como conseguir niveles terapéuticos en el líquido cefalorraquídeo (81). Además,



presentan una buena penetración intracelular, alcanzando dentro de las células niveles superiores a los que presentan en el medio circundante, como ocurre en los macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares (200).

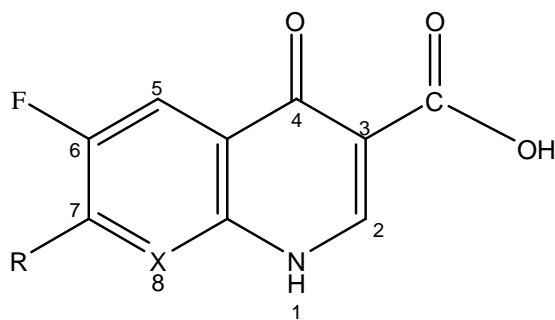
Las fluoroquinolonas se distribuyen rápidamente y de forma amplia a los tejidos y fluidos corporales después de administración oral. Presentan un volumen de distribución que supera el volumen corporal: entre 1,5 y 3,1 l/kg (80), lo que es indicativo del acceso de las mismas a compartimentos profundos del organismo (80).

### **2.2.3 Eliminación**

Las fluoroquinolonas se eliminan por vía renal, transintestinal y, además se metabolizan. El proceso de metabolización tiene lugar en el hígado y su acción recae fundamentalmente sobre el anillo piperazínico en posición 7, dando lugar a distintos metabolitos por hidrólisis, oxidación o sulfonación de este último (Figura 2.6) (80), algunos de los cuales siguen teniendo cierta actividad bactericida (42).

Las fluoroquinolonas y sus metabolitos se excretan, en su mayor parte, mediante filtración glomerular y secreción tubular activa en la orina y además, en heces y sólo una pequeña cantidad del fármaco aparece en bilis. El porcentaje de fármaco excretado por cada vía varía mucho según la quinolona.

La tasa de biotransformación, es muy variable y se produce en mayor porcentaje para los derivados más lipófilos. La saturación del metabolismo hepático parece ser la causa de la aparición de fenómenos de no linealidad en algunos de estos compuestos (107).



Estructura básica

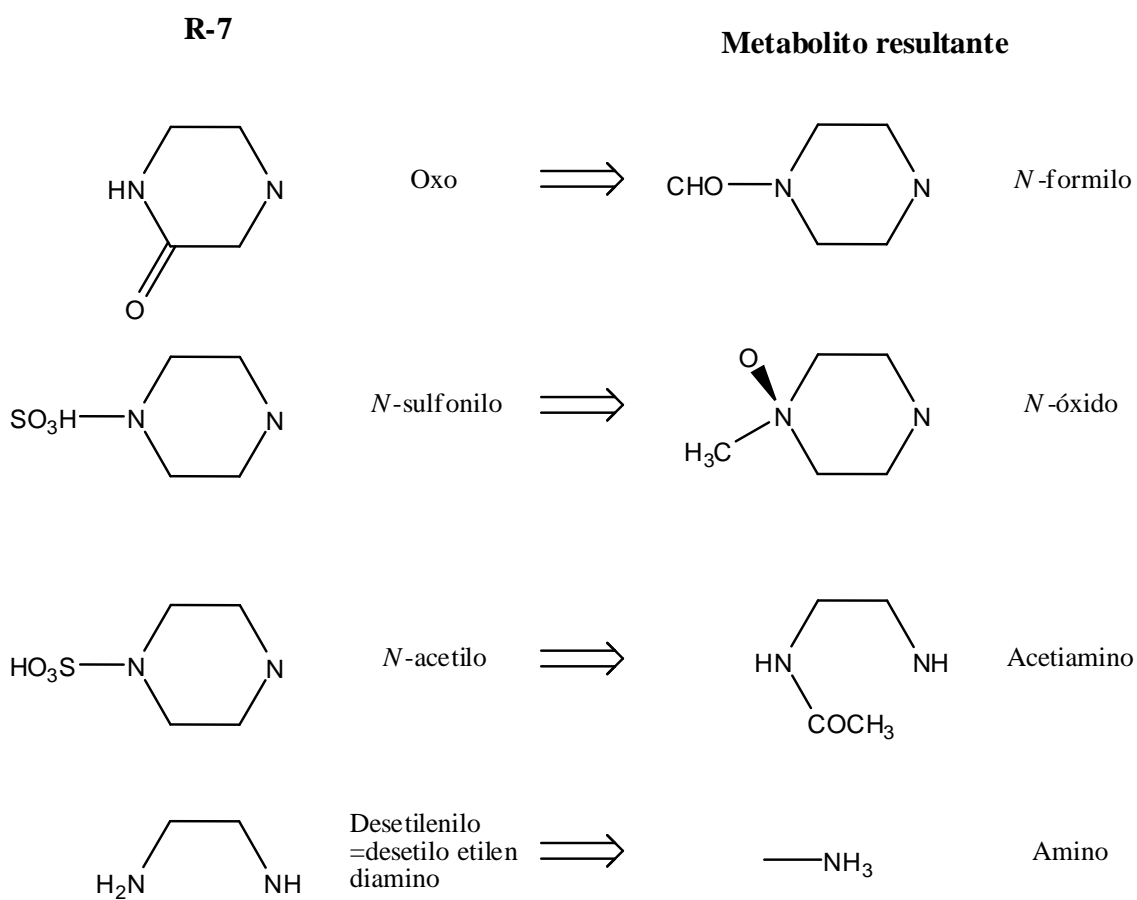


Figura 2.6 Estructura química de los principales metabolitos de ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, pefloxacino y ácido nalidíxico.

### 2.3 Farmacodinamia

La farmacodinamia describe la compleja interrelación que se establece entre el perfil farmacocinético del antimicrobiano y la susceptibilidad *in vitro* de la bacteria. La curva concentración tiempo del antibacteriano se determina en función de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la bacteria que es la concentración del antimicrobiano a la cual se logra inhibir el crecimiento bacteriano (Figura 2.7), y de la concentración mínima bactericida (CMB) que es la concentración a la cual se

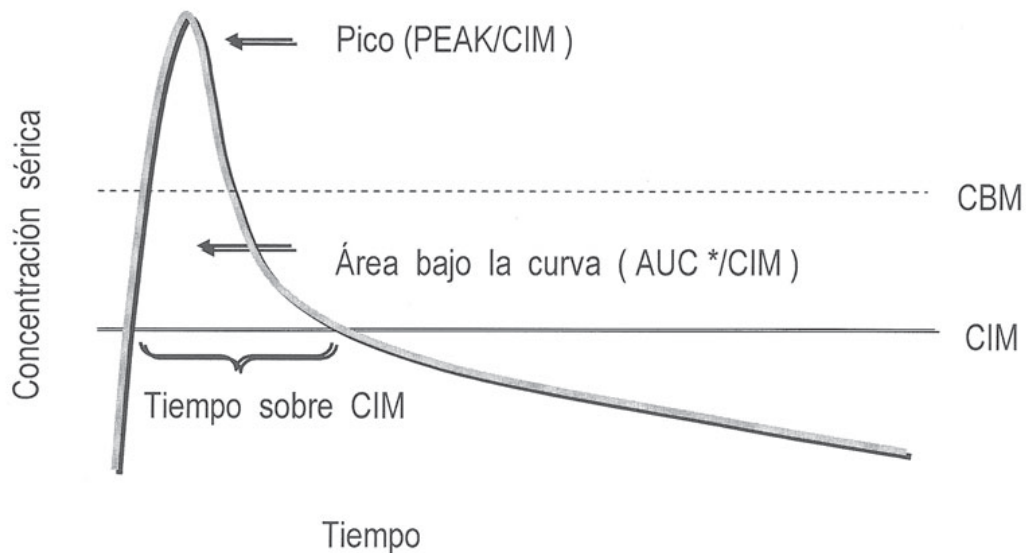


Figura 2.7 Farmacodinamia: farmacocinética *versus* CMI.

obtiene la lisis de la bacteria. Los parámetros farmacodinámicos de los antibióticos describen la relación entre la concentración sérica del agente antimicrobiano y sus efectos farmacológicos y toxicológicos (36). Es importante correlacionar todos los datos obtenidos a través de estudios con modelos animales, estudios farmacodinámicos *in vitro* así como ensayos clínicos para garantizar que el agente antibacteriano presentará una eficacia clínica óptima y una toxicidad mínima. El estudio *in vitro* de las quinolonas, así como de otros fármacos se realiza normalmente mediante el cálculo de

las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), y menos frecuentemente calculando las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) (36, 40).

Para que un antibacteriano sea efectivo, debe lograr concentraciones superiores a la CMI o, dicho de otra manera, para que una bacteria se considere susceptible tiene que tener una CMI alcanzable por el antimicrobiano en su perfil farmacocinético en humanos. El éxito clínico depende de una adecuada interacción farmacodinámica entre el antimicrobiano y la bacteria, lo que permite establecer ciertos objetivos farmacodinámicos en el tratamiento antiinfeccioso tales como  $C_{max}/CMI$  ( $C_{max}$  = concentración máxima del antimicrobiano alcanzada en suero),  $AUC/CMI$  ( $AUC$  = área bajo la curva) o  $T > CMI$  que constituyen demostradamente parámetros predictores de éxito (115).

La actividad bactericida de los antibióticos puede ser tiempo-dependiente o bien concentración-dependiente (192). En aquellos que presentan una actividad tiempo-dependiente (o concentración-independiente), una vez que la concentración del antimicrobiano supera en entre dos y cinco veces su CMI para un microorganismo en particular, su actividad bactericida se satura y posteriores aumentos en la concentración del antibiótico no la incrementan (6, 36). Las quinolonas tienen una acción bactericida concentración-dependiente, es decir su acción bactericida es más rápida con  $C_{max}$  más alta, especialmente con inóculos bacterianos altos. El pico obtenido y secundariamente el AUC tienen relación directa con el éxito clínico, independientemente de que las concentraciones caigan posteriormente por debajo de la CMI, por cuanto no se alcanza a producir recrecimiento bacteriano significativo, fenómeno conocido como efecto post-antibiótico (Figura 2.8). El objetivo farmacodinámico al utilizar quinolonas es lograr  $C_{max}/CMI$  o bien  $AUC/CMI$  muy altas, por lo que se recomienda en general el uso de dosis altas espaciadas. La velocidad de erradicación bacteriológica también se ha

asociado a la AUC/CMI en el caso de quinolonas en que razones de AUC/CMI iguales a 125 ó 250 logran erradicación en aproximadamente 7 días, mientras que razones de AUC/CMI mayores de 250 logran una lisis bacteriana extremadamente rápida con erradicación en 1,9 días (59).

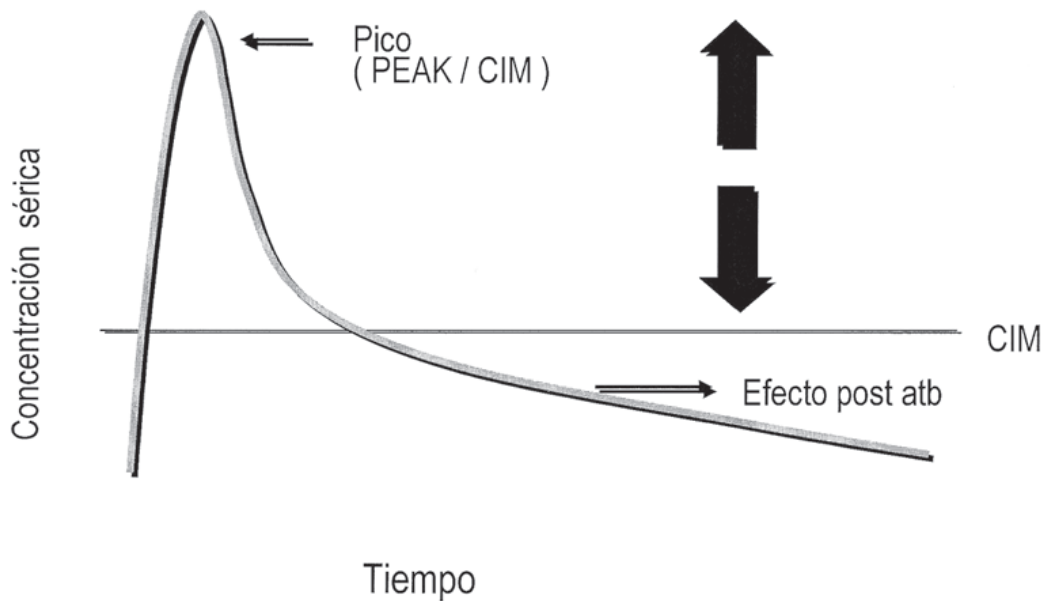


Figura 2.8 Farmacodinamia de antibacterianos con acción concentración-dependiente

#### 2.4 Penetración intracelular de las quinolonas

Existe un interés creciente por establecer las implicaciones clínicas de la relación entre el sistema inmunitario y el agente antimicrobiano. La penetración, la acumulación y la localización de los antimicrobianos en el interior celular son nuevos parámetros farmacocinéticos que han adquirido gran importancia en el estudio de los antimicrobianos.

Para cuantificar el grado de penetración de un antimicrobiano se usa la relación entre la concentración intracelular y la extracelular del mismo (I/E). En las quinolonas

este cociente puede variar entre 2 y 28 dependiendo de varios factores, tales como el tipo de célula y la quinolona.

Existen cuatro mecanismos a través de los cuales los antimicrobianos pueden pasar al interior de las células fagocíticas: fagocitosis, difusión, por gradiente de pH y mediante transporte activo dependiente de energía. Quinolonas como ofloxacino y levofloxacino penetran en los leucocitos polimorfonucleares mediante transporte activo relacionado con los aminoácidos, el cual requiere viabilidad celular, temperatura alta (37°C) y energía (141). Por otro lado, otras quinolonas como cirpofloxacino o esparfloxacino no requieren viabilidad celular, atravesando la membrana celular mediante un transporte pasivo (47, 63). Otros factores a tener en cuenta en la acumulación intrafagocítica es la estimulación previa mediante la ingestión de microorganismos, partículas de zimosán opsonizadas, o bien con un activador de membrana de los polimorfonucleares como el acetato de forbol miristato (PMA). En el caso de ciprofloxacino, su penetración se ve favorecida al estimular las células polimorfonucleares con partículas de zimosán opsonizadas (64). El pH del medio no tiene influencia significativa en el cociente I/E, aunque hay una tendencia a obtener concentraciones más elevadas a pH ácido.

La penetración de las quinolonas es, por lo general, un proceso rápido, no saturable y reversible, ya que son rápidamente liberadas cuando transferimos las células a un medio sin la quinolona. En la mayoría de casos, la retención intracelular de quinolona es de entre un 5% y un 40% tras ser transferidas las células a un medio sin antibiótico (47). Se ha descrito también la acumulación en fibroblastos y células epiteliales humanas (41, 83).

## 2.5 Aplicaciones clínicas

El perfil farmacocinético que presentan las fluoroquinolonas, así como su elevada actividad antibacteriana y su amplio espectro de acción, hace que sus indicaciones terapéuticas sean muy variadas. Las quinolonas actualmente se utilizan en el tratamiento de gran número de infecciones, tanto en el ámbito hospitalario como en la práctica clínica ambulatoria (81). Las principales indicaciones clínicas de las quinolonas son: i) **infecciones del tracto urinario**, ii) **enfermedades de transmisión sexual (ETS)**, iii) **infecciones gastrointestinales** e iv) **infecciones respiratorias**, y en menor medida v) **infecciones osteoarticulares**, vi) **infecciones de la piel y tejidos blandos** e vii) **infecciones intraabdominales y pélvicas**.

Dada su excelente actividad frente a patógenos del tracto urinario, tanto Gram-positivos como Gram-negativos, y a las elevadas concentraciones que alcanzan en orina (50% y 90% de la dosis en el caso de ciprofloxacino y ofloxacino, respectivamente), las quinolonas, principalmente de primera y segunda generación, son efectivas en el tratamiento de estas infecciones urinarias. Esparfloxacino presenta niveles en orina mucho más bajos (<15%), pero mantiene valores de CMI eficaces durante un período de tiempo prolongado. Ciprofloxacino, pefloxacino, ofloxacino y levofloxacino están indicados en el tratamiento de infecciones urinarias crónicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos, incluyendo infecciones como pielitis, pielonefritis, cistitis, colecistitis y aquellas propias de pacientes que siguen diálisis peritoneal (158, 159).

En general, todas las fluoroquinolonas pueden utilizarse en la terapia de infecciones del tracto urinario no complicadas. Estos fármacos se utilizan normalmente en infecciones recurrentes, en especial si el riñón está afectado, y/o en ancianos, cuando la terapia con antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y trimetoprim ha fracasado (54).

Los microorganismos causantes de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* y del chancro blando, *Haemophilus ducreyi*, son extremadamente sensibles a las fluoroquinolonas. Algunos compuestos presentan además actividad frente a otros patógenos genitales como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, aunque carecen de actividad frente al agente causante de la sífilis (*Treponema pallidum*) (151). En general, las quinolonas se utilizan en el tratamiento de uretritis gonocócica no complicada y cervicitis, uretritis no gonocócica e infecciones por *Chlamydia* y chancro blando o cancroide (167, 199, 208).

Las quinolonas son potentes inhibidores de la mayoría de las bacterias patógenas conocidas del tracto gastrointestinal incluyendo *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* spp. y *E. coli* enterotoxigénica (4, 199). Algunas fluoroquinolonas como norfloxacin o ciprofloxacino alcanzan buenas concentraciones en el intestino (de 5 a 10 veces superiores a las plasmáticas), se eliminan parcialmente por la bilis y tienen una excelente actividad sobre los enteropatógenos más comunes (4).

Norfloxacin, ciprofloxacino, pefloxacino y ofloxacino, presentan la capacidad de inhibir de forma selectiva la flora bacteriana aerobia Gram-negativa con poco efecto sobre el número de anaerobios intestinales, de manera que previenen infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Este uso de las quinolonas como profilaxis en pacientes neutropénicos y oncológicos debe llevarse a cabo con precaución debido a la aparición de resistencias asociadas a su uso continuado (97).

Las características farmacodinámicas de las fluoroquinolonas confieren utilidad a estos fármacos en el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por gran variedad de bacterias tanto Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) como Gram-negativas (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*,



*Klebsiella pneumoniae*) ya que penetran bien en el parénquima pulmonar, fluidos bronquiales y macrófagos alveolares, alcanzando concentraciones similares o superiores a las halladas en suero (20, 125). En el caso de infecciones de vías respiratorias superiores, se utilizan generalmente ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino (20). En el caso de las infecciones en vías respiratorias inferiores se utilizan esas mismas quinolonas y también trovafloxacino, en el caso de infecciones graves, antes de su retirada del mercado.

## **2.6 Toxicidad**

El uso de las quinolonas se ve limitado por la aparición de efectos adversos que, en ocasiones se pueden presentar de forma leve aunque frecuente, mientras que en otras pueden generar efectos más severos. Entre estos efectos adversos, algunos son clase-dependientes, esto es, que no están asociados a ninguna característica estructural en particular, sino que vienen dados por las características farmacológicas propias de las quinolonas. Se han descrito efectos adversos ligados a todas las moléculas de ésta familia; los más frecuentes son alteraciones gastrointestinales seguidas de síntomas neuropsiquiátricos y de reacciones de hipersensibilidad (207). Algunos efectos son dosis-dependientes.

A nivel gastrointestinal pueden observarse náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de apetito y malestar abdominal. Entre las manifestaciones adversas neurológicas más frecuentes se describen los mareos y las cefaleas. Destacan por su gravedad las convulsiones y las reacciones maníacas o psicóticas, sobre todo en personas con enfermedades previas del SNC como epilepsia, tumores cerebrales, arterioesclerosis, hipoxemia cerebral o alteraciones metabólicas. La capacidad de las quinolonas para producir convulsiones está relacionada con el antagonismo que ejercen sobre los

receptores pre y postsinápticos del ácido gammaaminobutírico (GABA). Tratamientos con ácido nalidíxico pueden provocar casos de hipertensión intracraneal y de alteraciones visuales, sobre todo visión borrosa, disminución de la agudeza visual, diplopía y alteración en la visión de los colores.

Pueden aparecer reacciones cutáneas de hipersensibilidad, fundamentalmente rash y prurito durante el tratamiento con quinolonas (105). En general son reacciones leves o moderadas, que cesan al suspender el tratamiento. Se han descrito otras muchas manifestaciones de hipersensibilidad como urticaria, angioedema, enfermedad del suero, vasculitis, eritema exudativo multiforme y reacciones anafilácticas, aunque los cuadros más graves tienen una incidencia muy baja. La hipersensibilidad es cruzada entre las diferentes quinolonas.

Hay que destacar la posibilidad de producción de fotosensibilidad, tanto en forma de erupción eritematosa como fotodermatosis bullosa, principalmente con lomefloxacino, enoxacino y esparfloxacino (55, 207). En algunos casos se ha descrito la aparición de taquicardia e hipertensión durante el tratamiento con quinolonas (14), probablemente por liberación de histamina (efecto dosis-dependiente). Así mismo, se ha observado incremento de enzimas hepáticas, aumento de creatinina o alteraciones hematológicas: leucopenia, eosinofilia o trombocitopenia. Se han descrito además, casos aislados de alteraciones articulares en niños, que han mejorado al suspender el tratamiento. Por esto, dichos fármacos están contraindicados durante la etapa de crecimiento, el embarazo y la lactancia (173).

### 3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

El mecanismo de acción de las quinolonas se basa fundamentalmente en la formación de complejos ternarios entre el ADN y las topoisomerasas tipo II (enzimas diana), conocidas como ADN girasa y topoisomerasa IV, enzimas que desempeñan un papel fundamental en la topología del ADN (82, 198). Así pues, la acumulación intracelular de las quinolonas es fundamental para su actividad antibacteriana. Las quinolonas penetran en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembrana de las porinas, o de la capa de los lipopolisacáridos (147).

Se han descrito cuatro mecanismos de acción atendiendo a los factores fisiológicos que se requieren en las quinolonas para que éstas ejerzan su acción bactericida: A, B, B<sub>1</sub> y C, los cuales varían según la quinolona y el microorganismo considerados.

El mecanismo A, común a todas las quinolonas, requiere para actuar, que la bacteria esté multiplicándose y que presente síntesis de ARN y proteínas. Este mecanismo es el único que se manifiesta en las quinolonas clásicas, como el ácido nalidíxico (44).

Las fluoroquinolonas, además del mecanismo A, pueden presentar los mecanismos B y C. El mecanismo B no requiere que se produzca síntesis de proteínas o de ARN en la bacteria para ejercer su efecto bactericida (104). La existencia de este último mecanismo, independiente de la síntesis de proteínas, se basa en que algunas quinolonas como el ciprofloxacino y el ofloxacino, administradas a dosis elevadas o en presencia de sustancias que inhiben la síntesis proteica o del ARN (rifampicina, cloranfenicol), e incluso en condiciones anaerobias, apenas alteran su efecto bactericida.

Se ha identificado un mecanismo relacionado únicamente con clinafloxacino. Este mecanismo, conocido como B<sub>1</sub>, no precisa la síntesis de proteínas o ARN, pero necesita que la bacteria se esté multiplicando (102).

Por último, el mecanismo C requiere que haya síntesis de proteínas y ARN para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando (103). Este mecanismo se ha encontrado en norfloxacino y enoxacino (103).

Las quinolonas, a elevadas concentraciones, muestran una disminución notable en su capacidad bactericida comparada a cuando se utilizan concentraciones moderadas. Cuando se evalúa la actividad bactericida de las quinolonas a diferentes concentraciones en un período dado de tiempo, se ha observado, con frecuencia, que la proporción de bacterias supervivientes sigue una respuesta bifásica: en una primera fase, al aumentar la concentración de fármaco, aumenta su actividad bactericida hasta alcanzar un máximo a partir del cual, su actividad disminuye con el incremento de la concentración. A este hecho se le conoce como “efecto paradójico” y es uno de los mayores dilemas que existen sobre la actividad de las quinolonas (37).

### **3.1 Enzimas diana**

#### **3.1.1 ADN girasa**

La ADN girasa es una proteína tetramérica (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) formada por dos subunidades A (GyrA) y dos subunidades B (GyrB) codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Las subunidades GyrA y GyrB de *E. coli*, son proteínas de 97 y 90 kDa, respectivamente. Para que la ADN girasa pueda ejercer su acción requiere la presencia de ambas subunidades y de ATP. La ADN girasa es la enzima responsable de, entre otros procesos, el superenrollamiento negativo del ADN (Figura 3.1). Las subunidades A llevan a cabo cortes en determinados puntos de la molécula de ADN.

Posteriormente la ADN girasa se uniría a los extremos fosfato 5' que quedan libres, mediante sus residuos Tyr-122 de la subunidad A. Finalmente, se introduce el giro negativo (por las subunidades B), el ADN se vuelve a soldar y la ADN girasa queda libre (84). Las quinolonas, al actuar sobre la subunidad A, impiden el cierre de los cortes producidos en el ADN, por lo que se inhibe la replicación del ADN. Este mecanismo sería suficiente para explicar por sí solo el poder bacteriostático de estos antibióticos pero no su capacidad bactericida, la cual es además notable. El mecanismo de acción bactericida se ha explicado en base a que la inhibición de las subunidades A deja dos roturas permanentes en el ADN. Estas roturas o interrupciones actúan como señales para la exonucleosis. La exonucleosis es un proceso de degradación del ADN mediado por unas enzimas, las exonucleasas, que introducen roturas permanentes a lo largo de todo el ADN, lo que llevaría a la muerte celular.

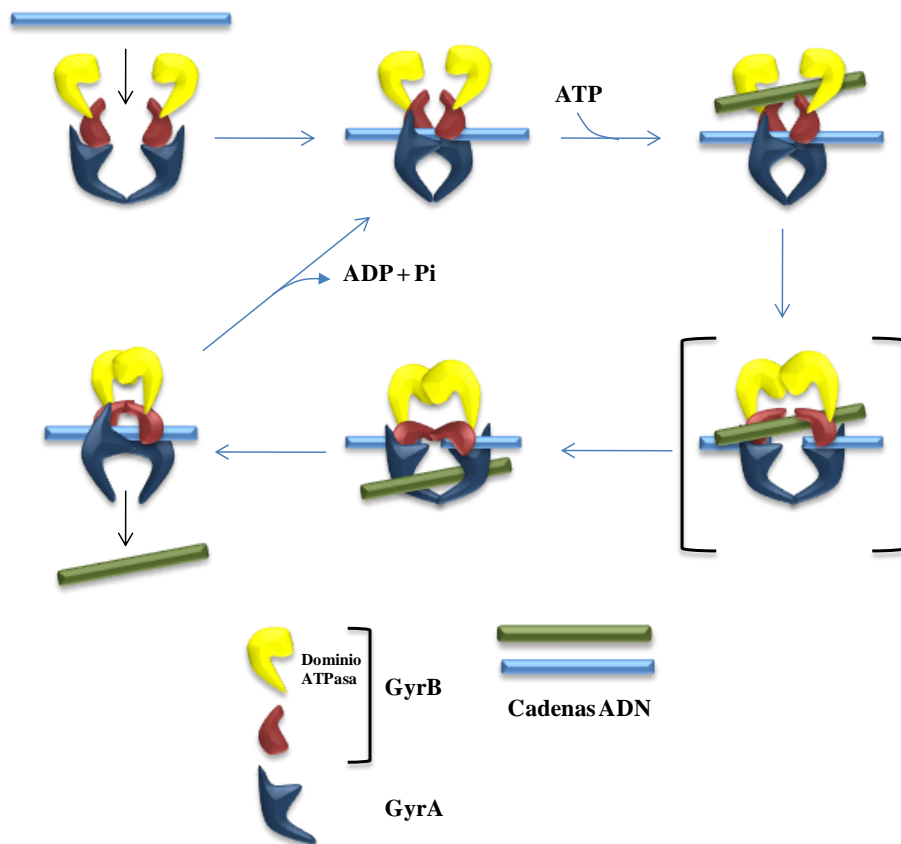


Figura 3.1 Modelo de acción de la ADN girasa (Gore J *et al.*, Nature, 2006, 439: 100-104).

### 3.1.2 Topoisomerasa IV

La topoisomerasa IV es también un tetrámero ( $C_2E_2$ ) formado por dos subunidades C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE*. Para ejercer su acción, al igual que la ADN girasa, también precisa la presencia de las dos subunidades y de energía en forma de ATP. Entre sus funciones destaca la de permitir la escisión, al final de la replicación, de los dos cromosomas, permitiendo así que cada una de las bacterias resultantes tenga su genóforo bacteriano (46).

Resulta interesante que la secuencia de aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los codificados por *gyrA* y *gyrB* (las dos subunidades de la ADN girasa), respectivamente. Secuencias similares se sitúan especialmente alrededor de la región de la ADN girasa conocida como región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR, del inglés “quinolone resistance-determining region”). Esta similitud en la secuencia de aminoácidos entre la ADN girasa y la topoisomerasa IV, especialmente en las posiciones productoras de resistencias a quinolonas del gen *gyrA* de la ADN girasa, implica que las quinolonas pueden ser capaces de inhibir tanto la actividad de la topoisomerasa IV como la de la ADN girasa (204).

### 3.2 Modelos de interacción

La manera precisa mediante la cual tiene lugar la interacción entre la quinolona, su enzima diana y el ADN no ha sido aún completamente elucidada. Existen varios modelos propuestos como explicación de tal interacción. Dado que en un principio se consideraba a la ADN girasa como única topoisomerasa implicada en la adquisición y desarrollo de resistencias a quinolonas, todos los modelos que surgieron se elaboraron tomando el modelo ADN-ADN girasa-quinolona. No obstante, y teniendo

en cuenta el alto grado de homología entre ambas moléculas, cabría suponer la validez del mismo modelo de interacción aplicado al caso de la Topoisomerasa IV.

En 1989, Shen *et al.* (169) postularon un modelo en el que proponían la unión cooperativa de las quinolonas a fragmentos de ADN monocatenarios. En este modelo se distinguirían tres dominios funcionales en la molécula de quinolona (Figura 3.2).

Por un lado, una región de unión al ADN, mediante puentes de hidrógeno, que estaría conformada por los radicales ceto y carboxilo de las posiciones 3 y 4. Por otro lado, la región del radical en N1, que estaría implicada en los procesos de autoagregación entre las moléculas de quinolona. Y finalmente, el radical situado en la posición 7 que interaccionaría con la subunidad B de la ADN girasa.

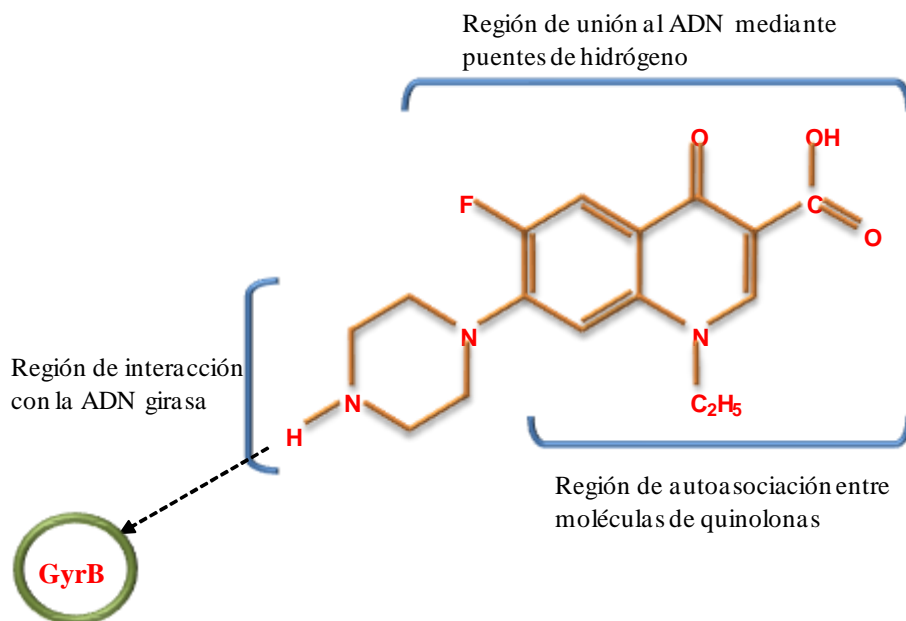


Figura 3.2 Modelo de Shen

Maxwell, en 1993 (113), propuso un modelo en el cual, las moléculas de quinolona se unirían a la ADN girasa mediante los radicales ceto y carboxilo de las posiciones 3 y 4. Sugería además, que uno de estos puntos de unión en la ADN girasa sería la Ser-83.

En 1993, Yoshida *et al.* (206), proponen un modelo en el que las quinolonas llevaría a cabo su acción en la cavidad que aparecería en el complejo ADN-ADN girasa. Además, el  $Mg^{2+}$ , que se supone existe en esta cavidad, sería un punto de unión a las quinolonas, por medio de sus radicales ceto y carboxilo de las posiciones 3 y 4.

Hasta hoy día, el modelo de interacción más aceptado ha sido el propuesto por Palumbo *et al.* en 1993 (137). Este modelo propone que la interacción con el ADN no se produce a través de puentes de hidrógeno, sino a través de puentes mediados por un átomo de  $Mg^{2+}$  entre los grupos fosfato del ADN y los radicales 3 y 4 de la quinolona (Figura 3.3). Por otro lado, se produciría el apilamiento (estabilizado por la presencia del  $Mg^{2+}$ ) entre una base, procedente de una región monocatenaria del ADN, y el anillo plano que conforma el núcleo de las quinolonas. Sugiere además, que los radicales en las posiciones 1 y 7 serían los puntos de unión directa al enzima diana.

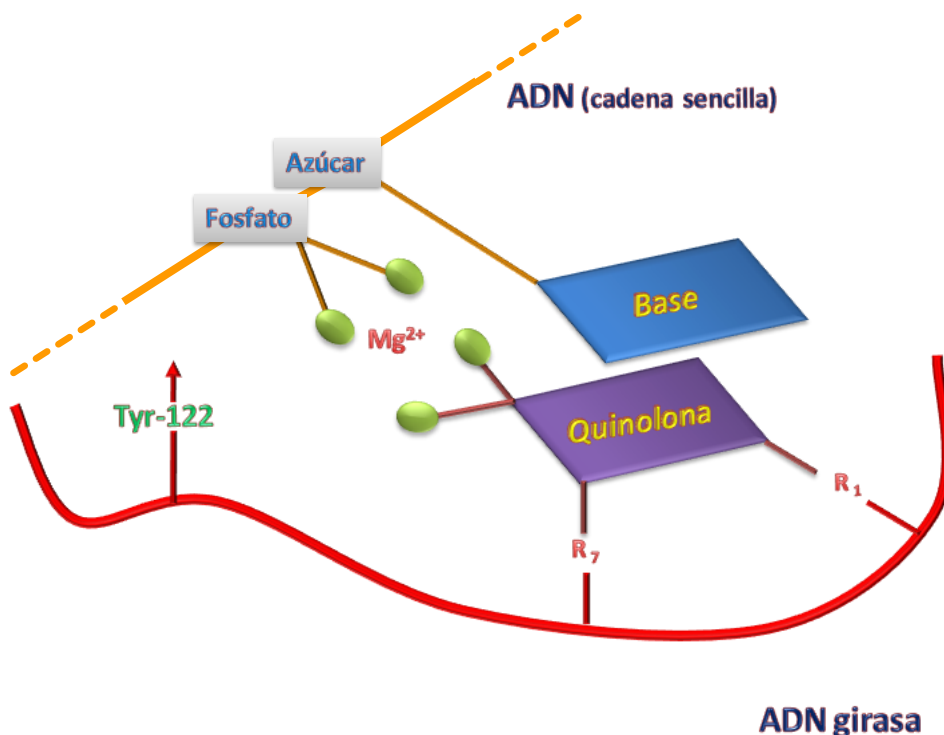


Figura 3.3 Modelo de Palumbo



### 3.3 Criterios de sensibilidad

La elección de un antimicrobiano u otro a utilizar en el tratamiento de una infección viene dada por varios factores. Además de factores farmacocinéticos y farmacodinámicos, así como las características de la infección (localización, microorganismo...), un factor determinante en esta elección es la sensibilidad/resistencia que presente el microorganismo en cuestión frente al fármaco que vayamos a utilizar.

El concepto de resistencia se puede definir desde el punto de vista farmacológico, como la capacidad que posee un determinado microorganismo de tolerar una concentración de fármaco superior a la que, en condiciones normales, se alcanza tras la administración del mismo. Sin embargo, y desde un punto de vista microbiológico, esta resistencia podría definirse como la capacidad de un microorganismo determinado para tolerar una concentración de fármaco mayor que la que en condiciones normales inhibe a la mayoría de bacterias de su misma especie.

El criterio estándar para establecer el punto de corte entre sensibilidad y resistencia se basa en la concentración máxima del agente antibacteriano en sangre ( $C_{max}$ ), teniendo en cuenta la unión a proteínas plasmáticas que presenta ( $f$ ), la vida media del fármaco ( $t$ ), el factor que consideremos que la  $C_{max}$  debe exceder la CMI ( $e$ ) y por último, un factor ( $s$ ) para corregir los resultados y ajustarlos a la distribución de las CMIs así como a las características particulares de algunos microorganismos (2).

En función de la CMI respecto de un agente antibacteriano una bacteria puede clasificarse en tres categorías: i) sensible, cuando su CMI es inferior a un valor dado o “punto de corte”, ii) intermedia o con sensibilidad moderada, que tienen una respuesta impredecible al tratamiento con este antibacteriano y, iii) resistente, cuando presenta una CMI superior a un valor dado. Este “punto de corte” corresponde al punto de corte

establecido para cada antimicrobiano y se define, para cada antibiótico y bacteria en particular, como el valor de concentración del antimicrobiano a partir del cual la bacteria es resistente al antimicrobiano y por debajo del cual es sensible. Por consenso internacional estos valores de corte son definidos por el CLSI (del inglés, “Clinical and Laboratory Standards Institute”) (33).

Un hecho que resulta curioso es que cuando una bacteria se muestra resistente a una quinolona, por norma general será resistente a cualquier otra, o al menos presentará una sensibilidad reducida al resto. Este fenómeno se conoce con el nombre de resistencia cruzada.

#### **4 MECANISMO DE RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS**

El elevado uso que se ha hecho de las quinolonas en los últimos años ha llevado consigo un incremento constante en las resistencias bacterianas a estos fármacos. Existen cuatro mecanismos principales de resistencia a quinolonas:

- 1- Mutaciones en los genes que codifican las enzimas diana: ADN girasa y Topoisomerasa IV.
- 2- Disminución de la acumulación de quinolona por expresión disminuida de porinas y/o sobreexpresión de sistemas de expulsión activa.
- 3- Resistencia mediada por plásmidos: Qnr, AAC(6’)-Ib-cr, QepA, “slow growth”.
- 4- Transferencia de fragmentos de los genes *gyrA* y/o *parC*.

##### **4.1 Mutaciones en las enzimas diana**

Se han descrito sustituciones aminoacídicas en las proteínas GyrA/GyrB y ParC/ParE involucradas en el desarrollo de la resistencia a quinolonas (Tabla 4.1). La

prevalencia de las mutaciones en sus respectivos genes codificantes está asociada con el origen (*in vivo* o *in vitro*) de las cepas. Curiosamente, se ha observado que, al comparar la presencia de mutaciones en la ADN girasa de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas obtenidas *in vitro*, se obtienen de manera proporcional mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, mientras que cuando analizamos la presencia de estas mutaciones en cepas clínicas, se obtiene una prevalencia casi exclusiva de las mutaciones en el gen *gyrA* (53, 121, 189).

El que GyrA o ParC sean o no la diana primaria de las quinolonas depende del microorganismo en cuestión y de la quinolona específica. Así pues, se considera de manera general que en microorganismos Gram-negativos GyrA es considerada como la diana principal, mientras que en Gram-positivos sería ParC (GrlA en *Staphylococcus aureus*). Sin embargo, algunas quinolonas (moxifloxacino) presentan la misma afinidad por ambas enzimas (177).

#### **4.1.1 Mutaciones en la ADN girasa**

#### **4.1.2 Mutaciones en el gen *gyrA***

Las alteraciones descritas en la proteína GyrA de *E. coli* y otras enterobacterias se encuentran situadas fundamentalmente en la llamada “Región Determinante de la Resistencia a Quinolonas” (RDRQ), localizada entre las posiciones 67 y 106 de la proteína GyrA (204). Esta región se sitúa cerca de la Tyr-122, donde se postula que la ADN girasa se une al ADN. Se han descrito hasta la fecha numerosas mutaciones (Tabla 4.1) como responsables del desarrollo de la resistencia a quinolonas en *E. coli*, algunas de ellas (codones 51, 67, 82 y 106) sólo han sido detectadas en mutantes generados en el laboratorio, mientras que otras se han encontrado tanto a nivel de laboratorio como en aislamientos clínicos (codones 81, 83, 84 y 87) (190). La

Tabla 4.1. Mutaciones asociadas a la resistencia a quinolonas en GyrA, GyrB, ParC y ParE.

Codón	Aminoácido salvaje	Aminoácidos mutados
<b>GyrA</b>		
51	Ala	Val
67	Ala	Ser
81	Gly	Cys , Asp
82	Asp	G ly
83	Ser	Leu, Trp , Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn , gly , val, tyr, His
106	Gln	Arg , His
<b>GyrB</b>		
426	Asp	Asn
447	Lys	G lu
<b>ParC</b>		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile , Arg
84	Glu	Lys , Val, G ly
<b>ParE</b>		
445	Leu	His
458	Ser	Ala

mutación más frecuente es la localizada en la posición Ser-83, la cual se asocia a una moderada resistencia frente a fluoroquinolonas (CMI a ciprofloxacino de entre 0,125-0,25 mg/L) y una resistencia de alto nivel frente al ácido nalidíxico (164, 189). Se ha descrito una resistencia moderada a fluoroquinolonas (CMI 1–4 mg/L) con la presencia de dos mutaciones, una en el gen *gyrA* y otra en el gen *parC*. La resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas se asocia a la presencia de dos mutaciones en el gen *gyrA* más una mutación adicional en el gen *parC*, generando una CMI frente a ciprofloxacino de entre 8–64 mg/L y finalmente, una cuarta mutación, la segunda en *parC* generaría la resistencia de mayor nivel frente a ciprofloxacino (128 mg/L) (163, 189).

### 4.1.3 Mutaciones en el gen *gyrB*

Las mutaciones en el gen *gyrB* también se han asociado con la resistencia a quinolonas tanto en aislamientos clínicos como en cepas de laboratorio (205). En *E. coli* sólo se han detectado dos mutaciones responsables de este tipo de resistencia, en las posiciones Asp-426 y Lys-447 (Tabla 4.1).

Las sustituciones observadas en la posición Asp-426 parecen conferir resistencia a todas las quinolonas, mientras que en la posición Lys-447 generan, por un lado un incremento del nivel de resistencia al ácido nalidíxico, y por el otro, una mayor sensibilidad frente a fluoroquinolonas (205). La frecuencia de mutaciones en el gen *gyrB* en aislamientos clínicos es mucho menor que para las mutaciones en el gen *gyrA*.

### 4.1.4 Mutaciones en la topoisomerasa IV

#### 4.1.5 Mutaciones en el gen *parC*

En aislamientos clínicos de *E. coli* se han encontrado mutaciones en la región de *parC* equivalente a la región determinante de la resistencia a quinolonas del gen *gyrA*. Las mutaciones más frecuentes en enterobacterias se han descrito en los codones 80 y 84 (161), aunque en *E. coli* además, también se ha descrito un cambio en la posición 78, tanto en cepas clínicas como de laboratorio (77) (Tabla 4.1). Como ya se ha mencionado, el desarrollo de una resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas en *E. coli* requiere de una o dos mutaciones en el gen *parC* además de una doble mutación en el gen *gyrA*, mientras que la presencia de una mutación en el gen *gyrA* y otra en el gen *parC* son suficientes para generar alto nivel de resistencia frente al ácido nalidíxico y resistencia moderada frente a ciprofloxacino. Tres sustituciones aminoacídicas (dos en *gyrA* y una en *parC* o una en *gyrA* y dos en *parC*) se asocian a alto nivel de resistencia frente a ciprofloxacino, y cuatro sustituciones (dos en *gyrA* y dos en *parC*) generan el mayor nivel de resistencia (190).

#### **4.1.6 Mutaciones en el gen *parE***

El papel del gen *parE* en el desarrollo de la resistencia a quinolonas parece ser irrelevante (162). Hasta la fecha, sólo se ha descrito una sustitución, en la posición 445, en una cepa mutante de *E. coli* generada *in vitro*, implicada en la resistencia a quinolonas (Tabla 4.1). Además, este cambio parece afectar a la resistencia sólo cuando va acompañado de otra mutación en el gen *gyrA* (25). Se han encontrado otras sustituciones en este gen y en diferentes especies, pero todo y así, algunos autores sugieren que no tienen ningún papel en la resistencia a quinolonas (91). Sin embargo, recientemente se ha descrito una nueva mutación en la posición 458 que estaría implicada en la resistencia a quinolonas (172).

#### **4.2 Disminución de la acumulación de quinolona**

La disminución de la concentración de quinolona que encontramos en el interior de la bacteria viene dada por dos factores: i) un incremento en la permeabilidad bacteriana a las quinolonas y ii) una sobreexpresión de los sistemas de expulsión activa.

##### **4.2.1 Porinas**

En este caso, la alteración de la permeabilidad tiene su origen en alteraciones de los genes que codifican para las porinas, lo que impide la entrada del quimioterápico en la bacteria. El papel fundamental que ejercen los canales de las porinas en la difusión de la quinolona a través de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas según el tamaño y la carga característica de las quinolonas hidrofílicas ha quedado patente en varios trabajos en los que se ponía de manifiesto la adquisición de resistencia a quinolonas cuando ocurría una reducción en la expresión de la porina OmpF, la

principal y mayor de las porinas de la membrana externa de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas (34, 116, 190), lo que demuestra que las quinolonas hidrofílicas deben de entrar en la bacteria, al menos en parte, a través del canal de la porina OmpF.

El grado de difusión de una quinolona depende en gran parte de su nivel de hidrofobicidad; sólo aquellas quinolonas con una elevada hidrofobicidad atravesarán la bicapa fosfolipídica de la membrana (38). Así, alteraciones en la composición del patrón de porinas y/o del lipopolisacárido pueden alterar los patrones de susceptibilidad.

La membrana externa de *E. coli* presenta tres porinas mayoritarias: OmpA, OmpC y OmpF. Se ha descrito que un descenso en la expresión de OmpF se relaciona con un aumento de la resistencia frente a algunas quinolonas (8, 34), aunque se presentan algunas excepciones donde no se ha encontrado una diferencia en la CMI, como es el caso de tosufloxacino o esparfloxacino (116). Además, la expresión reducida de OmpF también se ha relacionado con una mayor susceptibilidad frente a  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas y cloranfenicol (34).

Otro ejemplo de porina relacionada con la resistencia a antibióticos es la porina OprD de *Pseudomonas aeruginosa*. En un principio esta porina fue identificada como una proteína que se perdía cuando aislados clínicos de *P. aeruginosa* se volvían resistentes a imipenem. Trias *et al.* (182) demostraron que OprD era una porina específica que unía aminoácidos básicos, dipéptidos con un residuo básico e imipenem y carbapenemas zwitteriónicas relacionadas, incluyendo meropenem.

#### **4.2.2 Bombas de expulsión activa**

Parece obvio que la disminución de la permeabilidad no es suficiente para contrarrestar la acumulación del agente antibacteriano en el interior de la bacteria, sino que sólo proporciona un retraso en su entrada (128). Hoy día, la función natural de los

sistemas de expulsión activa aun es una incógnita, aunque se ha especulado sobre su posible implicación en mecanismos de detoxificación, siendo la expulsión de fármacos un efecto colateral. Actualmente se ha llegado a la conclusión de que estos sistemas son comunes a la mayoría de bacterias patógenas y son responsables de la expulsión de antibióticos y otras toxinas fuera de la célula permitiendo así la supervivencia celular (124).

En general, en bacterias Gram-negativas, la mayoría de sistemas de expulsión activa que afectan a agentes antibacterianos están acoplados al potencial de membrana y están constituidos por tres proteínas, aunque hay excepciones.

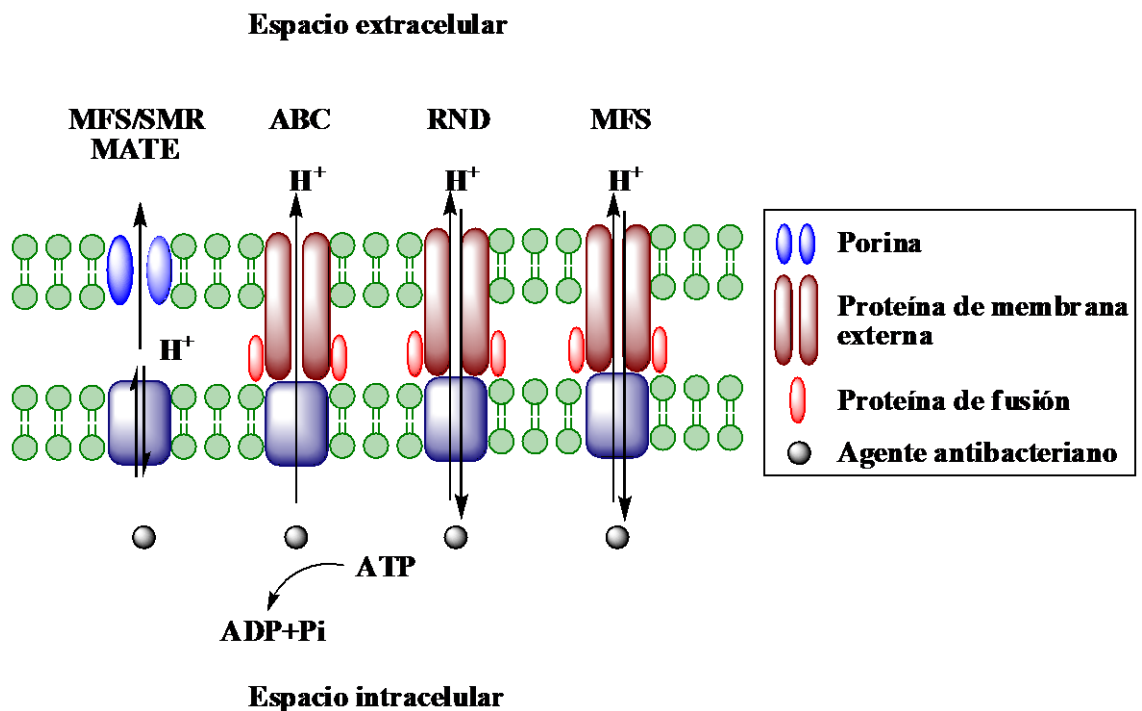


Figura 4.1. Principales familias de sistemas de expulsión activa

Estas tres proteínas son: i) una proteína transportadora integrada en la membrana interna, ii) una porina situada en la membrana externa (llamada “factor de membrana externa”) y iii) una proteína de fusión que actúa como nexo de unión entre estas dos y que se sitúa en el espacio periplásmico. Existen diferentes tipos de sistemas



de expulsión activa: a) Familia MFS (del inglés *major facilitator superfamily*), específicas de sustrato, b) Familia RND (del inglés *resistance-nodulation cell division*), inespecíficas de sustrato y por lo tanto transportadoras de múltiples antibióticos, c) Familia SMR (del inglés *small multidrug resistance*) que sólo presentan un transportador en la membrana externa, d) Familia MATE (del inglés *multidrug and toxic compound extrusion*) presente tanto en Gram-negativos como en Gram-positivos, e) Familia ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) que utilizan ATP como fuente de energía, y f) Familia PET (del inglés *putative efflux transporter*). En la Figura 4.1 se presentan las principales familias de sistemas de expulsión activa.

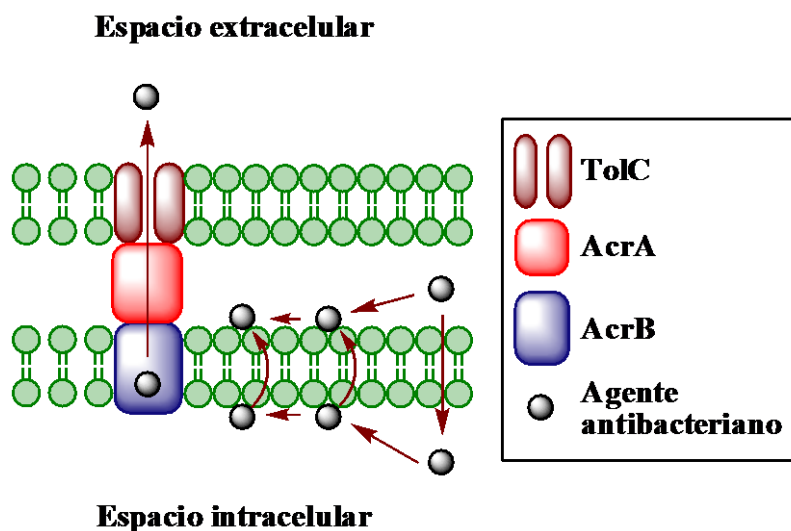


Figura 4.2. Sistema de expulsión activa AcrAB-TolC

En *E. coli* el sistema de transporte denominado AcrAB (Familia RND) (Figura 4.2) es una bomba de expulsión activa multifármaco que extrae de la célula una amplia variedad de antibióticos, incluidas las quinolonas y otras sustancias (126). Este sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrB y la proteína periplásmica accesoria AcrA. Se cree que AcrA, de forma alargada, aproxima las membranas externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero AcrB, bombeando así una

amplia variedad de sustancias, presumiblemente a través del canal TolC de la membrana externa (129). Se han descrito mutaciones en *acrR* (represor de *acrAB*) que incrementan la actividad de este sistema de expulsión activa (194).

En *E. coli*, los operones MarRAB y SoxRS regulan los niveles de expresión tanto de la porina OmpF como de algunas bombas de expulsión activa como AcrAB-TolC (133). MarRAB controla la expresión del gen *micF*, el cual codifica para un ARN antisentido que reprime post-transcripcionalmente la síntesis de la porina OmpF (127). La transcripción de *micF* puede, además estar inducida por el sistema SoxRS (otro sistema de regulación en condiciones de estrés), el cual se relaciona con el sistema MarRAB (39). Mutaciones que inactivan MarR (proteína represora del operón MarRAB) inducen la expresión constitutiva de este operón, dando lugar a un fenotipo de multiresistencia (5), por medio de la inducción de los genes *acrAB* y *tolC*, y la represión del gen *ompF* (5, 34).

### **4.2.3 Artículo II. Sistemas d'expulsió activa i llur relació amb la resistència als agents antibacterians**

Jordi Vila, Javier Sánchez-Céspedes i Anna Ribera

*Treballs de la SCB. Vol. 55 (2004) 49-60*

Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para resistir los efectos tóxicos de los agentes antibacterianos. Entre estos mecanismos encontramos la disminución de la acumulación del agente antibacteriano en el interior de la bacteria, lo cual puede venir dado por una disminución de la permeabilidad de la membrana externa en las bacterias Gram-negativas o bien, por la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. En bacterias Gram-negativas lo que probablemente se da con mayor frecuencia es la interacción de estos dos mecanismos. Los sistemas de expulsión activa se han dividido en diferentes familias según su estructura molecular, mecanismo de acción, requerimientos energéticos y especificidad de sustrato. Estos sistemas de expulsión activa se han de considerar como potenciales dianas terapéuticas, ya que su inhibición restauraría la actividad antibacteriana. Así pues, una posible nueva estrategia terapéutica sería el desarrollo de inhibidores de estos sistemas de expulsión activa, los cuales serían administrados conjuntamente con el agente antibacteriano que se viera afectado por el sistema de expulsión.



## **SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA I LLUR RELACIÓ AMB LA RESISTÈNCIA ALS AGENTS ANTIBACTERIANS**

JORDI VILA, JAVIER SÁNCHEZ-CÉSPEDES I ANNA RIBERA

*Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic,  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Jordi Vila. Servei de Microbiologia, Hospital Clínic,  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Villarroel, 170. 08036 Barcelona.  
Adreça electrònica: [jvila@ub.edu](mailto:jvila@ub.edu).

### **RESUM**

Els microorganismes han desenvolupat diversos mecanismes per resistir els efectes tòxics dels agents antibacterians. Entre aquests es troba la disminució de l'acumulació de l'agent antibacterià a l'interior del bacteri, la qual cosa pot ésser deguda a la disminució de la permeabilitat de la membrana externa en els bacteris gramnegatius i a la sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa en ambdós tipus de bacteris, gramnegatius i positius. En bacteris gramnegatius la interacció entre aquests dos mecanismes és el que probablement es dona amb més freqüència. Els sistemes d'expulsió activa s'han dividit en diferents famílies segons llur arquitectura molecular, mecanisme d'acció, requeriments energètics i especificitat de substrat. Aquests sistemes d'expulsió activa s'han de considerar com a potencials dianes terapèutiques, ja que llur inhibició restauraria l'activitat antibacteriana. Així doncs, una possible nova estratègia terapèutica seria el desenvolupament d'inhibidors d'aquests sistemes d'expulsió activa, que serien administrats conjuntament amb l'agent antibacterià que es veuria afectat pel sistema d'expulsió.

**Paraules clau:** bombes d'expulsió, resistència, agents antibacterians.

### **SUMMARY**

Microorganisms have developed several mechanisms to resist toxic effects from antibacterial agents; among them we found decrease in drug accumulation, which can be due to a decrease of permeability in Gram-negative bacteria or/and to an increased expression of one or more efflux pumps in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Among Gram-negative bacteria the interplay between both mechanisms is frequently found. Active efflux systems can be distributed in several families, depending on their molecular architecture, mechanism of action, energetic requirements and substrate specificity. Those active efflux systems have been considered as potential therapeutic targets, since their inhibition can restore antibacterial agent

activity. Therefore, a possible new therapeutic strategy would be found in development of efflux pumps inhibitors, which would be administered together with the antibacterial agent.

**Keywords:** Efflux pumps, resistance, antibacterial agents.

## INTRODUCCIÓ

La coberta celular bacteriana proporciona al bacteri la forma i rigidesa necessàries per resistir la pressió osmòtica generada per l'elevada concentració intracel·lular de ions, metabòlits i macromolècules. A més, constitueix una barrera enfront de certes substàncies tòxiques i biològiques. A les figures 1a i 1b s'observa l'estructura de la coberta celular d'un bacteri grampositiu i d'un gramnegatiu. En un bacteri grampositiu la coberta celular està constituïda fonamentalment pel peptidoglicà, mentre que la coberta d'un bacteri gramnegatiu es caracteritza per la presència d'una membrana externa i un espai periplasmàtic, que es troba delimitat per la membrana citoplasmàtica i la membrana externa. El peptidoglicà està immers en aquest espai. La membrana externa és una bicapa lipídica molt asimètrica. A la monocapa externa hi ha proteïnes i lipopolisacàrid, mentre que a la monocapa interna el lipopolisacàrid és substituït per fosfolípids i lipoproteïnes. El resultat és una membrana amb una fluïdesa menor que la membrana citoplasmàtica. Entre altres components de la membrana externa dels bacteris gramnegatius destaquen unes proteïnes anomenades *porines*. Es tracta de trímers que generen canals que permeten el pas de substàncies, regulades per un complex mecanisme genètic que respon a la concentració de soluts al medi. En bacteris grampositius, a part del peptidoglicà un altre component de la coberta celular és l'àcid teicoïc, que és un polímer de glicerol fosfat o ribitol fosfat amb diversos sucres o aminoàcids com a substituents. Aquest sembla estar unit al peptidoglicà o bé a un glicolípid de la membrana citoplasmàtica.

Finalment, la membrana citoplasmàtica dels bacteris és molt semblant a la típica bicapa li-

pídica d'altres cèl·lules. No obstant això, hi ha diferències importants: per exemple, la membrana citoplasmàtica bacteriana és excepcionalment rica en proteïnes, el cromosoma bacterià s'hi troba unit, i desenvolupa un paper important en la segregació de cromosomes naixents durant la divisió cel·lular. Conté, també, el sistema complet de transport d'electrons de la cèl·lula i proteïnes involucrades en el transport actiu i selectiu de soluts i en l'excreció de proteïnes i altres compostos a l'exterior.

## QUÈ ÉS UN SISTEMA D'EXPULSIÓ ACTIVA?

Els microorganismes han desenvolupat diversos mecanismes per resistir els efectes tòxics dels antimicrobians (vegeu la figura 2), entre els quals es troba la disminució de l'acumulació de l'antibiòtic a l'interior bacterià, la qual cosa pot ésser deguda a diferents factors, tals com una disminució en la permeabilitat de la membrana externa a l'agent antibacterià en el cas dels bacteris gramnegatius i la sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa en ambdós tipus de bacteris, gramnegatius i positius. No obstant això, sembla que per si sola la disminució de la permeabilitat no és suficient perquè l'agent antibacterià no assoleixi l'acumulació a l'interior del bacteri, sinó que només hi ha un retard en l'entrada d'aquest (Nikaido, 1994). Avui dia, la funció natural d'aquests sistemes d'expulsió activa encara és una incògnita, i entre altres hipòtesis s'ha especulat que podrien estar implicats en mecanismes de destoxicació i que l'expulsió de fàrmacs seria un efecte col·lateral. Hom coneix que aquests sistemes eviten sobretot l'acció d'aquells antimicrobians que actuen al cito-

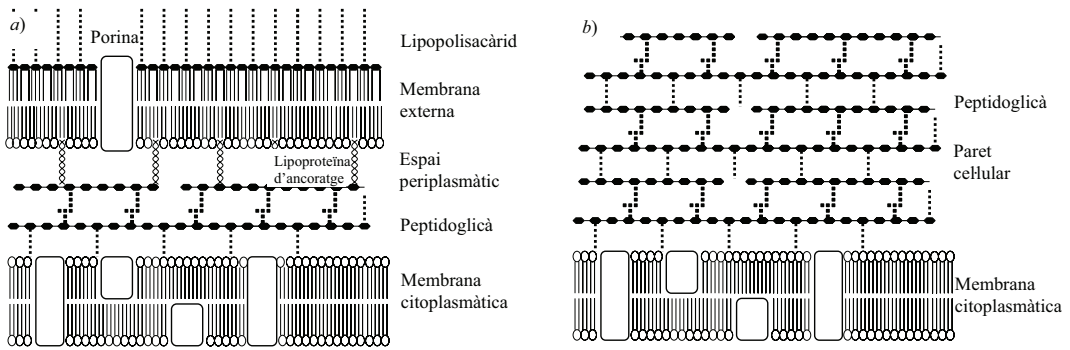


FIGURA 1. a) Coberta cel·lular d'un bacteri gramnegatiu. b) Envoltat cel·lular d'un bacteri grampositiu.

plasma bacterià, i ho fan expulsant l'antibiòtic fora de la cèl·lula abans que aquest pugui exercir la seva funció. El 1978 va sorgir una primera hipòtesi de l'existència d'aquests mecanismes amb la descripció de proteïnes de transport en bacteris gramnegatius als quals s'unien els antimicrobians (proteïnes descrites en *E. coli* capaces d'expulsar tetraciclina fora del citoplasma cel·lular). Des d'aquest descobriment el paper dels sistemes d'expulsió com a mecanisme de resistència als diversos antimicrobians ha estat explorat i caracteritzat, i s'ha arribat a la conclusió que aquests sistemes són comuns a la majoria de bacteris patògens i que són responsables de l'expulsió d'antibiòtics i altres toxines fora de les cèl·lules bacterianes, i asseguren així llur supervivència (Nelson, 2002). Mentre les propietats moleculars d'aquestes proteïnes d'expulsió i llur especificitat de substrat estan tot just començant a comprendre's en la majoria de gèneres bacterians, incloent-hi *E. coli* i *P. aeruginosa*, podem assumir raonablement que la majoria d'antimicrobians i xenobiòtics poden veure's afectats per aquests sistemes, i això els comporta certa inutilitat per al tractament de malalties infeccioses.

Alternativament, podem considerar aquestes bombes d'expulsió com atractives dianes terapèutiques, ja que llur inhibició restauraria l'activitat antibacteriana als substrats expulsats.

En general, el sistema d'expulsió activa en bacteris grampositius consta d'una única proteïna situada a la membrana citoplasmàtica que es troba acoblada al potencial de membrana o obtenint l'energia mitjançant la hidròlisi de l'ATP. En bacteris gramnegatius la majoria de sistemes d'expulsió activa que afecten agents antibacterians estan acoblats al potencial de membrana i estan constituïts per tres proteïnes, tot i que hi ha excepcions, com hom veurà a la següent secció. Aquestes tres proteïnes són: una proteïna transportadora integrada a la membrana citoplasmàtica, una porina situada a la membrana externa i una altra proteïna que actua com a nexa d'unió entre les altres dues i que es troba situada a l'espai periplasmàtic.

### TIPUS DE SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA I LLUR RELACIÓ AMB LA RESISTÈNCIA A DIVERSOS AGENTS ANTIMICROBIANS

Les proteïnes d'expulsió activa han estat subdividides en diferents famílies, segons llur arquitectura molecular, els mecanismes d'acció, els requeriments energètics i la constitució bioquímica. Aquestes proteïnes es troben en quasi tots els microorganismes i llur paper com a mecanisme de resistència a antimicrobians està tot just essent elucidat. Així, per

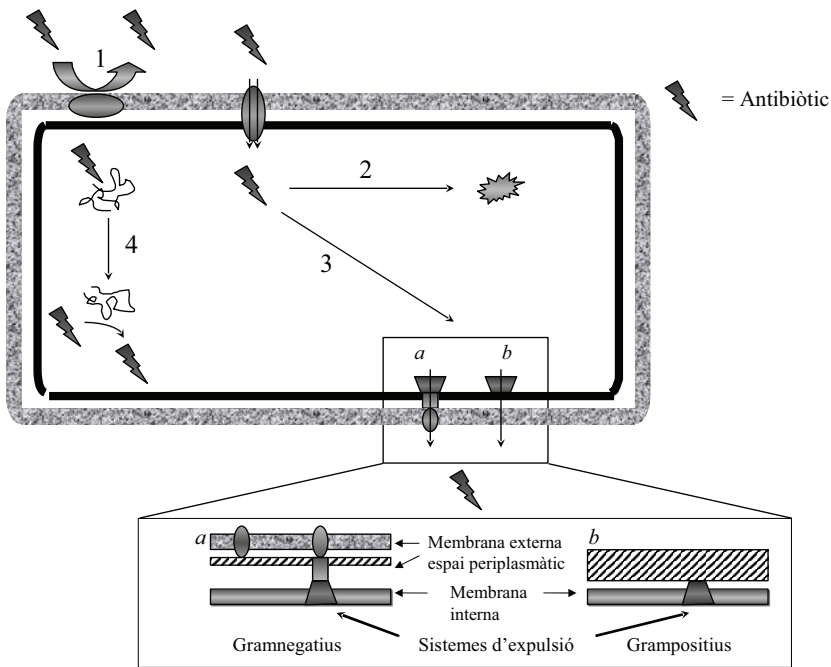


FIGURA 2. 1) Impermeabilitat de membrana. 2) Hidròlisi de l'antibiòtic. 3) Sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa. 4) Canvi conformacional a la proteïna diana.

exemple, s'espera que bacteris potencialment patògens puguin contenir combinacions de proteïnes d'expulsió pertanyents a les diferents famílies. Existeixen diferents tipus de bombes d'expulsió (Putman *et al.*, 2000) (vegeu la figura 3):

a) Bombes que són específiques de substrat i, per tant, confereixen resistència a un únic agent antimicrobià (p. ex.: les bombes que expulsen tetraciclina, que pertanyen a la família MFS). Normalment aquestes es troben codificades per gens que viatgen en transposons integrats en plasmidis conjugatius (Lomovskaya i Watkins, 2001).

b) Bombes inespecífiques de substrat i que, per tant, s'anomenen *transportadors de múltiples agents antimicrobians* (MDR, de l'anglès *multi-drug resistance*), poden conferir resistència a diferents components antibacterians no relacionats estructuralment. Normalment es troben codificades per gens que

formen part del cromosoma bacterià (Lomovskaya i Watkins, 2001).

A més, segons els criteris estructurals i bioenergètics aquests sistemes es divideixen en dos grups majoritaris (Putman *et al.*, 2000):

a) Transportadors de múltiples antimicrobians del tipus ABC, els quals utilitzen l'energia que prové de la hidròlisi de l'ATP per expulsar els antimicrobians fora de la cèl·lula.

b) Transportadors secundaris de múltiples antimicrobians, els quals expulsen l'antibiòtic fora de la cèl·lula a través d'un intercanvi de protons o de ions sodi. De bombes d'aquests tipus tenim les de la família RND, SMR, MFS i MATE (aquesta subdivisió està feta segons la mida que presentin i segons llur estructura primària i secundària).

Així, tenim diferents famílies relacionades amb l'expulsió activa i aquestes es divideixen en (Putman *et al.*, 2000; Borges-Walmsley i Walmsley, 2001; Nelson, 2002):



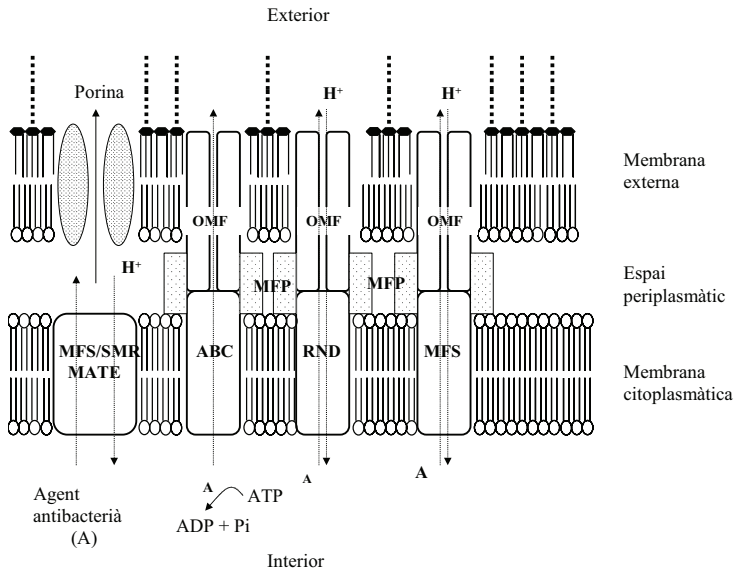


FIGURA 3. Classes de sistemes d'expulsió activa.

a) MFS (de l'anglès *major facilitator superfamily*): aquesta família de transportadors està formada per proteïnes que presenten dotze o catorze segments transmembranosos (a la membrana citoplasmàtica) i utilitzen el flux de protons com a font d'energia. Aquest tipus de transportadors són presents tant en bacteris grampositius com gramnegatius i també en cèl·lules eucariotes. En els bacteris gramnegatius aquests sistemes es poden associar a una proteïna de fusió de membrana (MFP, de l'anglès *membrane fusion protein*) i a una proteïna de membrana externa (OMF, de l'anglès *outer membrane protein*), que forma un canal, per tal de translocar els antimicrobians a través de la membrana interna i externa, i els expulsa fora de la cèl·lula. Cal esmentar, però, que el veritable paper de les MFP és encara desconegut, encara que podrien actuar com una proteïna de canal capaç de translocar els agents antimicrobians entre el transportador de membrana interna i la proteïna de membrana externa. Una altra hipòtesi alternativa seria que les MFP empenyen les dues proteïnes a la vegada, de manera que el transpor-

tador de membrana interna passaria directament l'antibacterià a la proteïna de membrana externa (Borges-Walmsley i Walmsley, 2001). Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment agents antimicrobians, colorants d'amoni quaternari i ions fòsfor. I els bacteris hoste són principalment (entre parèntesi trobem alguns dels transportadors d'aquesta família descrits en el gènere bacterià): *Mycobacterium* (Tet V, Tap, LfrA), *Lactobacillus* (LmrP), *Staphylococcus* (Tet K, NorA, Qac A i B), *Bacillus* (Blt, Bmr i Bmr 3), *Escherichia* (Tet A, B i E, Bcr, Emr B i D, MdfA), *Streptococcus* (PmrA), *Vibrio* (VceB) i *Corynebacterium* (Cmr).

b) RND (de l'anglès *resistance-nodulation cell division family*). L'estructura d'aquests transportadors és més llarga que els que formen part de la família MFS, però només presenten dotze segments transmembranosos (encara que posseeixen uns dominis periplasmàtics i extracitoplasmàtics entre les hèlixs 1-2, 7 i 8 molt més llargs). Aquests transportadors, tal com els transportadors del tipus MFS, també es troben associats a les MFP i a les

proteïnes de membrana externa i utilitzen el flux de protons com a font d'energia. Aquest tipus de transportadors només s'ha descrit en bacteris gramnegatius; no s'han trobat en bacteris grampositius ni en cèl·lules eucariotes. Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment agents antimicrobians, àcids grassos, detergents i colorants bàsics. I els bacteris hoste són principalment: *Escherichia* (AcrB, AcrF, YhiV), *Pseudomonas* (MexB, MexD, MexF, MexY), *Neisseria* (MtrD), *Haemophilus* (HI0895 ≈ AcrB), *Burkholderia* (Ceo B, AmrB), *Stenotrophomonas* (SmeB i SmeE) i *Acinetobacter* (AdeB).

c) SMR (de l'anglès *small multidrug resistance family*). En aquesta família els transportadors són molt més petits que els de les famílies MFS i RND, ja que normalment estan formats per quatre fragments transmembranosos. També utilitzen el flux de protons com a font d'energia. Només presenten el transportador a la membrana citoplasmàtica, no es troben associats a cap MFP. S'han descrit tant en bacteris grampositius com gramnegatius, però no en cèl·lules eucariotes. Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment agents antimicrobians, antisèptics d'amoni quaternari, etidis i tetrafenilfosfats. I els bacteris hoste són principalment: *Mycobacterium* (Mmr), *Staphylococcus* (Qac G, H i Smr), *Bacillus* (EbrA i B, YkkC i D) i *Escherichia* (EmrE, TehA).

d) MATE (de l'anglès *multidrug and toxic compound extrusion family*). En aquesta família els transportadors estan formats per dotze segments transmembranosos i utilitzen el flux de protons com a font d'energia. S'han trobat tant en bacteris grampositius com gramnegatius. Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment colorants, fluoroquinolones hidrofíliques i aminoglicòsids. I els bacteris hoste són principalment: *Haemophilus*, *Vibrio* (NorM), *Bacillus* (PmrA) i *Escherichia* (Ydhe).

e) Transportadors del tipus ABC (de l'anglès *ATP-binding cassette*). Aquests són trans-

portadors que utilitzen com a font d'energia ATP i presenten múltiples segments transmembranosos. Es troben tant en cèl·lules eucariotes com procariotes (tant en bacteris grampositius com gramnegatius). Tenim com a membres: MDR1 humana, que és una P-glicoproteïna de resistència a múltiples antibiòtics, i els transportadors de resistència múltiple en humans associats a la proteïna MRP1 (MRP). Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment ionòfors, alcaloides d'etidi i fosfolípids. I els bacteris hoste són principalment: *Mycobacterium*, *Staphylococcus* (MsrA), *Lactobacillus* (LmrA) i *Escherichia* (MsbA, MdlA, MdlB, CydC, CydD).

f) PET (de l'anglès *putative efflux transporter family*). Aquests transportadors han estat trobats recentment en bacteris i en cèl·lules eucariotes, però llur paper en la resistència a agents antimicrobians no ha estat encara establert.

## REGULACIÓ DEL SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA

La majoria d'aquests sistemes d'expulsió activa, a més d'estar sotmesos a una regulació local (repressora o activadora) per proteïnes codificades en gens adjacents als del mateix sistema, poden tenir l'expressió controlada a altres nivells. Seria lògic pensar que s'activen en presència de llur substrat natural; no obstant això, hom desconeix la funció real de la majoria d'aquests sistemes d'expulsió i, tot i que hom ha vist que són capaços d'expulsar una àmplia varietat de compostos, fins ara no s'han identificat els substrats naturals en la majoria del casos. Podríem dir que existeixen quatre sistemes de regulació:

a) *Regulació mitjançant un repressor local*. El gen que codifica la proteïna que actua com a repressor està localitzat cap amunt del primer gen de l'operó. En algunes ocasions la repressió no és total, sinó que permet una ex-

pressió basal que pot estar relacionada amb la resistència intrínseca basal a alguns agents antibacterians. Entre els diferents operons que codifiquen sistemes d'expulsió activa que es troben regulats per un repressor local trobem els sistemes AcrAB en *E. coli* (Ma *et al.*, 1996) i MexAB-OprM en *P. aeruginosa* (Evans *et al.*, 2001) (vegeu la figura 4). Generalment, l'aparició de fenotipus de multiresistència està associada a la presència de mutacions als gens reguladors locals o en llurs regions promotores (Jellenritter i Kern, 2001; Zihra-Zarifi *et al.*, 1999; Adewoye *et al.*, 2002).

b) *Regulació mitjançant un activador local.* Fins avui només s'ha identificat aquest tipus de regulació a l'operó mexEF-oprN de *P. aeruginosa*. L'activador local (*mexT*) està localitzat cap amunt dels gens de l'operó (Köhler *et al.*, 1999) (vegeu la figura 4).

c) *Activació mitjançant un sistema de doble component.* En general, aquests sistemes de doble component que vehiculen la transducció de senyals estan constituïts per una fosforilasa que rep els estímuls activadors i un regulador de la resposta que s'activa mitjançant fosforilació. Un d'aquests sistemes de doble component descrits en la bibliografia científica és l'EvgSA. EvgA és la proteïna reguladora de la resposta i activa els sistemes d'expulsió activa EmrKY i YhiUV en *E. coli* (Nishino i Yamaguchi, 2002). L'operó emrKY es localitza cap avall de l'operó regulador evgSA, mentre que, en el cas de l'operó yhiUV, l'activació s'exerceix a distància (vegeu la figura 4).

d) *Reguladors globals.* Grkovic *et al.* (2001) han indicat que la majoria de sistemes suara esmentats podrien estar regulats globalment. Aquests reguladors globals s'activen en situacions d'estrès bacterià (estrès oxidatiu, estrès osmòtic, xoc tèrmic, etc.) i regulen positivament i negativament l'expressió d'un ampli nombre de gens, entre els quals n'hi ha alguns que codifiquen sistemes d'expulsió activa. En *E. coli* l'activador global MarA (codificat pel gen *marA*) regula l'expressió tant positiva com negativa d'almenys seixanta gens (Barbosa i

Levy, 2000) (vegeu la figura 4). Entre aquests gens es troba l'operó *acrAB*. A més de MarA, s'han identificat tres reguladors globals en *E. coli* implicats en l'activació d'*acrAB*. Aquests són SoxS, Rob (Ma *et al.*, 1996) i SdiA (Rahmati *et al.*, 2002)

### IMPORTÀNCIA CLÍNICA DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA

Com ha estat esmentat anteriorment, aquests sistemes d'expulsió activa es troben normalment reprimits, però sota certes condicions d'estrès microbià llur síntesi pot activar-se i generar fenotipus de resistència a agents antibacterians no detectats mitjançant tècniques habituals d'anàlisi al laboratori. Tenint en compte la infinitat de factors d'estrès que s'esdevenen al lloc de la infecció, aquests podrien contribuir a explicar la raó d'algun dels fracassos terapèutics per als quals no tenim actualment explicació. A més, durant la infecció es poden seleccionar mutants amb expressió constitutiva d'aquests sistemes d'expulsió, normalment per mutacions en llurs sistemes de regulació. Aquest fenomen es veu afavorit per dos factors, que són: a) si el bacteri presenta un fenotipus hipermutador, aquest afavoreix l'adquisició de mutacions que poden facilitar la pèrdua de la regulació dels sistemes d'expulsió activa i b) en aquells bacteris amb capacitat de produir *biofilm* hom ha descrit que pot tenir lloc un increment de sistemes d'expulsió activa.

Si bé els primers sistemes d'expulsió activa associats a resistència als agents antibacterians van ésser descrits en bacteris gramnegatius, com *E. coli* i *P. aeruginosa*, s'han reportat sistemes similars en la majoria de bacteris d'interès clínic, tant gramnegatius com grampositius. Fins avui, hom ha descrit cinc tipus diferents de sistemes d'expulsió activa en *P. aeruginosa* que poden afectar diversos agents antibacterians. A causa que

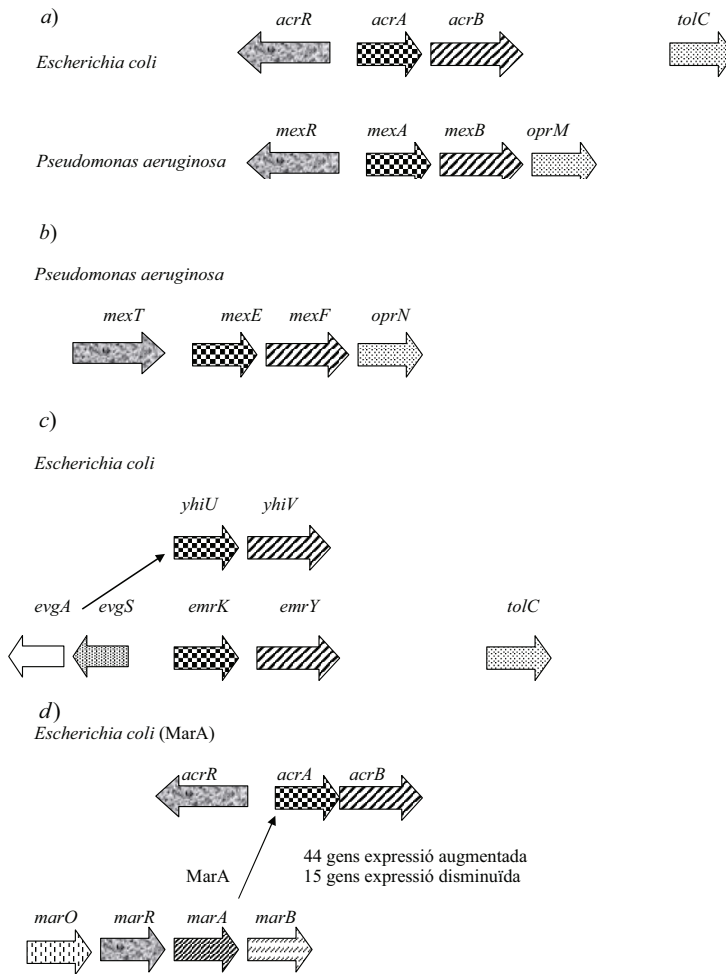


FIGURA 4. a) Regulació mitjançant un repressor local. b) Regulació mitjançant un activador local. c) Sistema de doble component. d) Regulador global.

aquest microorganisme ha estat àmpliament estudiat des d'aquest punt de vista, la majoria d'estudis en els quals hom ha intentat esbrinar el paper de la sobreexpressió d'aquests sistemes d'expulsió activa en el desenvolupament de multiresistència durant el tractament s'han realitzat amb aquest microorganisme. Ziha-Zarifi *et al.* (1999) van estudiar vint-i-un malalts amb infeccions per *P. aeruginosa* en els quals s'havia aïllat una soca multiresistent durant el tractament, i hom va observar

que onze aïllaments multiresistents presentaven una sobreexpressió de MexAB-OprM. Un resultat similar va ésser obtingut per Le Thomas *et al.* (2001), els quals van aïllar una soca multiresistent de *P. aeruginosa* a partir d'un malalt tractat amb ciprofloxacina en monoteràpia. La soca multiresistent tenia una CIM de ciprofloxacina de 32 mg/l, mentre que la soca inicial tenia una CIM de 0,25 mg/l. Els investigadors associaren aquest increment a la sobreexpressió de MexAB-OprM. Carmeli

*et al.* (1999) fan un seguiment de 271 pacients amb infeccions per *P. aeruginosa* i tractats amb diverses teràpies antimicrobianes (ciprofloxacina, imipenem, ceftazidima i piperacil·lina), i observen que en vint-i-vuit pacients (10,2%) s'aïlla durant el tractament una soca resistent i els resultats indiquen que l'agent antimicrobià que ocasiona aparició de soques multiresistents amb més freqüència és l'imipenem.

El millor tractament per a infeccions ocasionades per bacteris en els quals es pot produir amb facilitat una sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa no és conegut, però l'optimització de l'agent antibacterià, i també la combinació de diversos agents antibacterians que siguin substrats de diferents sistemes d'expulsió activa poden representar una estratègia terapèutica raonable.

## INHIBIDORS DELS SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA

Els mecanismes d'expulsió activa es troben actualment àmpliament reconeguts com a components majoritaris de resistència en diverses classes d'agents antibacterians.

Per combatre la resistència mitjançada pels sistemes d'expulsió activa existeixen dues possibilitats:

a) Modificacions estructurals dels agents antimicrobians disponibles actualment perquè es vegin afectats mínimament per aquests sistemes.

b) Descobriment i desenvolupament d'agents terapèutics capaços d'inhibir l'activitat transportadora de les bombes d'expulsió activa, i que puguin utilitzar-se en combinació amb els antimicrobians més utilitzats en teràpia clínica.

Com a exemple, tenim una nova classe de tetraciclins semisintètiques, les *glicilciclins*, que són capaces d'evitar la resistència mitjançada per bombes d'expulsió activa, ja que no són reconegudes per la proteïna transportado-

ra (Sum *et al.*, 1998). També s'han descobert fluoroquinolones que no es veuen afectades pels sistemes d'expulsió NorA i PmrA presents en bacteris grampositius (Lomovskaya i Watkins, 2001).

Recentment, s'ha demostrat l'existència de diverses substàncies capaces d'inhibir aquests sistemes i, per tant, capaces de millorar considerablement l'activitat antibacteriana de molts antibiòtics (Lomovskaya i Watkins, 2001).

Abans d'utilitzar un determinat inhibidor, primer s'ha de demostrar la seva bona farmacocinètica, la seva mínima toxicitat i la compatibilitat amb els diferents agents antimicrobians amb els quals s'administrarà. A més, s'han de detectar els agents antimicrobians i les dianes bacterianes en les quals serà més productiu emprar-los. Els factors que s'han de tenir en compte per assegurar-ne l'òptima activitat i, per tant, aconseguir una eficiència clínica total, són (Lomovskaya i Watkins, 2001):

— Estudiar la prevalença de la resistència mitjançada pels sistemes d'expulsió.

— Avaluar la multiplicitat de les bombes d'expulsió activa.

— Estudiar l'existència d'altres factors responsables de resistència a un determinat agent antibacterià.

— Estudiar la interacció entre diferents mecanismes de resistència.

A més, per qualificar aquests compostos com a bons i veritables inhibidors s'han de complir els criteris següents (Lomovskaya i Watkins, 2001):

— Han de potenciar l'activitat dels múltiples substrats de la bomba a inhibir.

— No han de potenciar l'activitat dels agents antimicrobians que no són expulsats per la bomba.

— No han de tenir activitat en soques bacterianes que no presenten bombes d'expulsió activa.

— Han d'augmentar l'acumulació intracel·lular i disminuir l'expulsió dels substrats de les bombes.

TAULA 1. *Inhibidors de sistemes d'expulsió activa (Lomovskaya i Watkins, 2001)*

Inhibidors	Bombes inhibides		Agents antimicrobians afectats (↓ CMI <sup>e</sup> )
	Transportadors específics	Transportadors MDR <sup>d</sup>	
13-CPTC <sup>a</sup>	Tet A		Doxiciclina
	Tet B		Tetraciclina, doxiciclina
UK-57,562	Tet C		Tetraciclina
Ro 07-3149	Tet K		Tetraciclina
Reserpina		NorA, PmrA, MdfA, EmrE	Fluoroquinolones
INF 55,271		NorA, PmrA	Fluoroquinolones
MC-207,110		Mex, AcrAB	Levofloxacina, ciprofloxacina
CCCP <sup>b</sup>		AcrAB <sup>c</sup>	Fluoroquinolones, tetraciclina, cloramfenicol

<sup>a</sup> 13-CPTC: 13-ciclopentil tetraciclina.

<sup>b</sup> CCCP: carbonil cianida *m*-clorfenilhidrazona. És un inhibidor del flux de protons (PMF, de l'anglès *proton motive force*).

<sup>c</sup> Okusu *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1994.

<sup>d</sup> MDR: de l'anglès *multidrug resistance*.

<sup>e</sup> CMI: Concentració mínima inhibidora.

— No han d'afectar el flux de protons que es produeix a la membrana interna.

Aquest esquema s'ha utilitzat amb èxit per identificar inhibidors de la bomba NorA de *S. aureus* i les bombes Mex de *P. aeruginosa*.

Normalment, els compostos sintètics o extractes de productes naturals capaços d'inhibir el creixement bacterià en presència però no en absència d'agents antimicrobians serien ideals com a inhibidors.

A la taula 1 trobem els inhibidors més importants de sistemes d'expulsió activa tant de bacteris grampositius com gramnegatius (Lomovskaya i Watkins, 2001).

Podem dir que els inhibidors que han mostrat més activitat enfront de bombes d'expulsió de múltiples antimicrobians, i que, per tant, tindrien una repercussió més important, són la reserpina i l'MC-207,110.

a) La *reserpina* (vegeu la figura 5) és un alcaloide que primerament va ésser conegut com a inhibidor de les bombes d'expulsió activa de bacteris grampositius, el sistema Bmr de *B. subtilis* (Neyfakh *et al.*, 1991) i NorA de *S. aureus*, que fa que les soques que la presenten manifestin un increment en la sensibilitat enfront de les fluoroquinolones hidrofíliques, però no hidrofòbiques (Kaatz i Seo, 1997), i en

soques de *S. pneumoniae* on s'ha trobat que és capaç de disminuir la CIM de certes fluoroquinolones. A més, cal esmentar que el tractament amb reserpina de soques de *S. aureus* i *S. pneumoniae* no solament inhibeix els transportadors actius sinó que també és capaç de prevenir l'emergència de resistència en aquestes soques (Markham i Neyfakh, 1996; Markham, 1999).

També, s'ha descrit la seva activitat en bacteris gramnegatius, com en el cas de *Bacteroides fragilis* (Miyamae *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 1999).

b) *MC-207,110*: Fenil-arginil-β-naftilamida (vegeu la figura 6). És un dipèptid d'amida sintètic de baix pes molecular (Renau *et al.*, 1999). S'ha demostrat que posseeix una mínima activitat antibacteriana intrínseca i que inhibeix els sistemes d'expulsió activa de tipus Mex de *P. aeruginosa*, i disminueix la CIM de levofloxacina en un mínim de vuit vegades (Renau *et al.*, 1999). També inhibeix el sistema AcrAB d'*E. coli* i de *S. typhimurium* (Mazzariol *et al.*, 2000; Baucheron *et al.*, 2002).

Com a punt important cal destacar la necessitat d'incentivar i insistir en la recerca de nous compostos d'aquest tipus capaços d'inhibir els sistemes d'expulsió activa presents

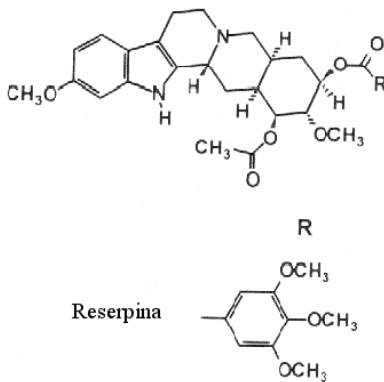


FIGURA 5. Estructura química de la molècula de reserpina.

en la majoria de bacteris (tant grampositius com gramnegatius) i, per tant, capaços de potenciar l'efecte de l'agent antimicrobià amb el qual s'administrin. Aquests compostos podrien aportar una gran quantitat d'efectes beneficiosos, però manquen encara molts estudis perquè aquests inhibidors puguin ésser introduïts en clínica i perquè puguin estar totalment acceptats per la comunitat mèdica.

## BIBLIOGRAFIA

- ADEWOYE, L.; SUTHERLAND, A.; SRIKUMAR, R.; POOLE, K. (2002). «The MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity». *J. Bacteriol.*, vol. 184, pàg. 4308-4312.
- BARBOSA, T.; LEVY, S. B. (2000). «Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA». *J. Bacteriol.*, vol. 182, pàg. 3467-3474.
- BAUCHERON, S.; IMBERECHTS, H.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. (2002). «The AcrAB multidrug transporter plays a major role in high level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204». *Microb. Drug Resist.*, vol. 8, pàg. 281-289.
- BORGES-WALMSLEY, M. I.; WALMSLEY, A. R. (2001). «The structure and function of drug pumps». *Trends in Microbiol.*, vol. 9, pàg. 71-79.
- CARMELI, I.; TROILLET, N.; ELIOPOULOS, G. M.; SAMORE, M. H. (1999). «Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 1379-1382.
- EVANS, K.; ADEWOYE, L.; POOLE, K. (2001). «MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region». *J. Bacteriol.*, vol. 183, pàg. 807-812.
- GRKOVIC, S.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. (2001). «Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria». *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, pàg. 225-237.
- JELLENRITTER, A. S.; KERN, W. V. (2001). «Enhanced expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 1467-1472.
- KAATZ, G. W.; SEO, S. M. (1997). «Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, pàg. 2733-2737.
- KÖHLER, T.; EPP, S. F.; CURTY, L. K.; PECHERE, J. C. (1999). «Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system *Pseudomonas aeruginosa*». *J. Bacteriol.*, vol. 181, pàg. 6300-6305.
- LE THOMAS, I.; COVETDIC, G.; CLERMONT, O.; BRAHIMI, N.; PLASIAT, P.; BINGEN, E. (2001). «*In vivo* selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy». *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, pàg. 553-555.
- LI, X. Z.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIIDO, H. (1994). «Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol and norfloxacin». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, pàg. 1732-1741.
- LOMOVSKAYA, O.; WATKINS, W. (2001). «Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria». *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 3, pàg. 225-236.
- MA, D.; ALBERTI, M.; LYNCH, C.; NIKAIIDO, H.; HEARST, J. E. (1996). «The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals». *Mol. Microbiol.*, vol. 19, pàg. 101-112.
- MARKHAM, P. N. (1999). «Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the

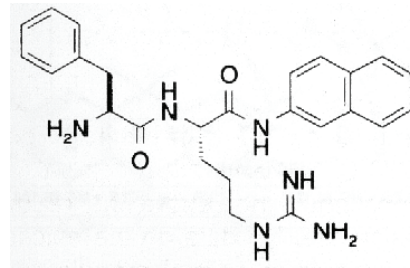


FIGURA 6. Estructura de la molècula de MC-207,110.

- multidrug efflux inhibitor reserpine». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 988-989.
- MARKHAM, P. N.; NEYFAKH, A. A. (1996). «Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, pàg. 2673-2674.
- MAZZARIOL, A.; TOKUE, Y.; KANEGAWA, T. M.; CORNAGLIA, G.; NIKAIIDO, H. (2000). «High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 3441-3443.
- MIYAMAE, S.; NIKAIIDO, H.; TANAKA, Y.; YOSHIMURA, F. (1998). «Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pàg. 2119-2121.
- NELSON, M. L. (2002). «Modulation of antibiotic efflux in bacteria». *Cur. Med. Chem-Antiinfect. Agents.*, vol. 1, pàg. 3.
- NEYFAKH, A. A.; BIDNENKO, B. E.; CHEN, L. B. (1991). «Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, pàg. 4781-4785.
- NIKAIIDO, H. (1994). «Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux». *Science*, vol. 264, pàg. 382-388.
- NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. (2002). «EbgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*». *J. Bacteriol.*, vol. 184, pàg. 2319-2323.
- OKUSU, H. D.; MA, D.; NIKAIIDO, H. (1996). «AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic-resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants». *J. Bacteriol.*, vol. 178, pàg. 306-308.
- PETERSON, M. L.; HOVDE, L. B.; WRIGHT, D. H.; HOANG, A. D.; RADDATZ, J. K.; BOYSEN, P. J.; ROSTCHOFER, J. C. (1999). «Fluoroquinolone resistance in *Bacteroides fragilis* following sparfloxacin exposure». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 2251-2255.
- PUTMAN, M.; VEEN, H. W. VAN; KONINGS, W. N. (2000). «Molecular properties of bacterial multidrug transporters». *Microbiol. Molec. Rev.*, vol. 64, pàg. 672-693.
- RAHMATI, S.; YANG, S.; DAVIDSON, A. L.; ZECHIEDRICH, E. L. (2002). «Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA». *Mol. Microbiol.*, vol. 43, pàg. 677-685.
- RENAU, T. E.; LEGER, R.; FLAMME, E. M.; SANGALANG, J.; SHE, M. W.; YEN, R.; GANNON, C. L.; GRIFFITH, D.; CHAMBERLAND, S.; LOMOVSKAYA, O.; HECKER, S. J.; LEE, V. J.; OHTA, T.; NAKAYAMA, K. (1999). «Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin». *J. Med. Chem.*, vol. 42, pàg. 4928-4931.
- SUM, P. E.; SUM, F. W.; PROJAN, S. J. (1998). «Recent developments in tetracycline antibiotics». *Curr. Pharm. Des.*, vol. 4, pàg. 119-132.
- ZIHA-ZARIFI, I.; LLANES, C.; KÖHLER, T.; PECHERE, J. C.; PLESIAI, P. (1999). «*In vivo* emergence of multidrug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 287-291.



### 4.3 Resistencia mediada por plásmidos

Las mutaciones cromosómicas que modificaban las dianas de las quinolonas o la disminución en la acumulación del antibiótico en el interior de la bacteria eran considerados hasta no hace mucho como los únicos mecanismos de resistencia bacteriana frente a quinolonas. En 1987, Munshi *et al.* (120) publicaron un trabajo en el que ponían de manifiesto la transferencia de la resistencia al ácido nalidíxico mediada por plásmido de *Shigella dysenteriae* a *E. coli*, pero posteriores estudios mostraron que no existía un plásmido directamente implicado en tal proceso (12). En 1998, Martínez-Martínez *et al.* (112) publicaron un trabajo en el cual un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente procedente de un cultivo de orina de un paciente de Birmingham, Alabama, con infección del tracto urinario, poseía un plásmido que, una vez conjugado en *E. coli*, incrementaba su resistencia al ácido nalidíxico de 4 a 32 mg/L, y frente a ciprofloxacino de 0,008 a 0,25 mg/L.

#### 4.3.1 Qnr

Aquel plásmido, llamado pMG252, facilitaba la selección de mutantes con niveles altos de resistencia, y aumentaba entre 4 y 8 veces la resistencia ya fuera debida a una o varias mutaciones definidas en la ADN girasa, a porinas o a sistemas de expulsión activa. Dado que pMG252 no alteraba el patrón de porinas y no reducía la acumulación de la quinolona en el interior celular se propuso la posibilidad de un nuevo mecanismo de resistencia frente a quinolonas, y al gen que lo provocaba se le llamó *qnr* (del inglés “quinolone resistance”) (112) (actualmente *qnrA1*).

La proteína Qnr pertenece a la familia de los pentapéptidos repetidos, la cual se define por presencia de repeticiones en tándem de motivos (Ser, Thr, Ala o Val)-(Asp o Asn)-(Leu o Phe)-(Ser, Thr o Arg)-(Gly) (185). Se conocen gran variedad de proteínas

pertenecientes a esta familia pero la función de muchas de ellas sigue siendo desconocida. Dos de estas proteínas son McbG y MfpA. Ambas proteínas guardan aproximadamente un 20% de homología con QnrA. McbG protege a la ADN girasa del efecto inhibitorio de la microcina B17 (MccB17) y algunas quinolonas (88). Por otro lado, la expresión del gen *mfpA* tiene como resultado un incremento de entre 4 y 8 veces de la CMI a ciprofloxacino en *Mycobacterium segmentatis* mientras que la inactivación del mismo genera un incremento de la susceptibilidad a ciprofloxacino (118). Una variante de este gen encontrada en *Mycobacterium tuberculosis* generaba la inhibición de la actividad de la ADN girasa mediante interacción directa con la enzima. Se piensa que esta proteína inhibe la ADN girasa mediante la competencia con el ADN por la unión al enzima, lo cual provocaría que la ADN girasa unida a MfpA no participaría en la formación del complejo quinolona-ADN girasa-ADN que es letal para las células (76).

Como se esperaba a raíz de su estructura, el gen *qnr* no parece tener efecto en la acumulación de quinolona intracelular ni tampoco provoca inactivación del antibiótico. El efecto directo generado por la proteína Qnr ha sido estudiado mediante ensayos de superenrollamiento del ADN (152). Al menos *in vitro*, Qnr protege a la ADN girasa de la inhibición por parte del ciprofloxacino. Esta protección depende de la concentración de Qnr y es inversamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino (180). Además, la Topoisomerasa IV, la diana secundaria de las quinolonas en enterobacterias, parece estar también protegida de la acción de las quinolonas por Qnr (181).

Aunque la acción de Qnr resulta en un bajo nivel de resistencia a quinolonas, esta susceptibilidad reducida facilita la selección de mutantes con mayores niveles de resistencia (112). Se piensa que este bajo nivel de resistencia al antibiótico haría posible

a las poblaciones bacterianas alcanzar concentraciones que facilitarían la aparición de mutaciones secundarias y de esta manera mayores niveles de resistencia (112).

Hoy día se conocen cuatro variedades del gen *qnr*: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *qnrC*. La distribución geográfica de estos determinantes es bastante amplia, repartiéndose por los cinco continentes (152). Hoy en día se han descrito seis variantes de QnrA, dos de QnrS, diecinueve de QnrB (87) y una de QnrC (196).

#### 4.3.2 AAC(6')-Ib-cr

Recientemente se ha conocido un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos mediante la inactivación enzimática de ciertas quinolonas. La variante *cr* del gen *aac(6')-Ib* codifica para un aminoglicósido acetiltransferasa que confiere una susceptibilidad reducida frente a ciprofloxacino mediante la *N*-acetilación de su grupo piperazinil amina (153). El gen *aac(6')-Ib* codifica un aminoglicósido acetiltransferasa común responsable de la resistencia a aminoglicósidos como kanamicina, amikacina o trobamicina.

Se clonó un plásmido que contenía una copia de esta nueva variante del gen *aac(6')-Ib* en una cepa de *E.coli* DH10B y dio como resultado una CMI a kanamicina de 64 mg/L, como era de esperar, y un incremento de la CMI a ciprofloxacino de entre tres y cuatro veces. Esta nueva variante recibe el nombre de *aac(6')-Ib-cr* por su resistencia a ciprofloxacino (*ciprofloxacin resistance*). No solo Aac(6')-Ib-cr ha sido descrita por generar una baja resistencia a ciprofloxacino, sino que además, actúa de manera aditiva junto con Qnr para generar resistencia a ciprofloxacino (153).

Aac(6')-Ib-cr presenta dos cambios aminoacídicos, Trp102-Arg y Asp179-Tyr, respecto de Aac(6')-Ib, los cuales son necesarios y suficientes para la capacidad de la enzima de acetilar al ciprofloxacino. Cuando *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* están presentes en la

misma bacteria, el nivel de resistencia a ciprofloxacino se incrementa cuatro veces más que cuando *qnr* se presenta solo, con una CMI a ciprofloxacino de 1 mg/L. Además, la presencia de Aac(6')-Ib-cr sólo incrementa sustancialmente la frecuencia de selección de mutantes cromosómicos expuestos a ciprofloxacino (153).

### 4.3.3 Qep

Un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos ha sido descrito recientemente por Yamane *et al.* (202). El nuevo mecanismo consiste en un gen llamado *qepA* que codifica para una bomba de expulsión activa. QepA muestra una elevada similitud con el resto de miembros de la familia MFS de sistemas de expulsión activa, responsables de la resistencia a quinolonas hidrofílicas como norfloxacino y ciprofloxacino. Después del reciente descubrimiento de los mecanismos de resistencia mediante protección de la diana e inactivación enzimática, esta bomba de expulsión representa un nuevo mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas mediado por plásmidos. En un trabajo reciente de Liu *et al.* (106), en el que estudiaban la presencia de este gen en 751 cepas de *E. coli* procedentes de 140 instalaciones médicas (el único hasta ahora donde se estudia la prevalencia de este gen), se pone de manifiesto su baja presencia (0,3% de cepas positivas para este gen). Cabe destacar que estos dos últimos mecanismos de resistencia mencionados no afectan a la actividad del ácido nalidíxico.

## 4.4 Expresión de las dianas

En el año 2003 se describió por primera vez un mecanismo de resistencia a quinolonas basado en una disminución de los niveles de expresión de la topoisomerasa

IV (86). Consecuentemente, este mismo efecto debería conseguirse con un descenso en los niveles de expresión de la ADN girasa. Este enlentecimiento se asociaba a mutaciones en el promotor del gen que mermaban su nivel de transcripción.

#### **4.5 Transferencia de fragmentos de los genes *gyrA* y *parC***

Otro mecanismo de resistencia bacteriana a quinolonas, descrito hasta ahora únicamente en *Streptococcus pneumoniae* y viridans streptococci, se basa en la incorporación vía transformación, de fragmentos de los genes *gyrA* y *parC*, incluidos aquellos que contienen la región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ) (57, 90). Estudios realizados *in vitro* demostraron que esta resistencia podía ser transferida de viridans streptococci a *S. pneumoniae* y viceversa. La frecuencia de transformación era de entre  $10^{-3}$  a  $<10^{-7}$  en relación a las homologías de sus RDRQ.

## **5 DESARROLLO DE NUEVAS QUINOLONAS**

Las resistencias bacterianas frente a agentes antibacterianos han ido creciendo a un ritmo constante durante los últimos años, así como también han aumentado las infecciones provocadas por bacterias multirresistentes. No en vano, el CDC (del inglés “Center for Diseases Control”) de los Estados Unidos (1) considera las enfermedades infecciosas causadas por bacterias multirresistentes como una de las enfermedades emergentes de hoy día. Es por esto que se hace necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos que puedan paliar esta situación. Las características básicas que han de tener estos antibióticos son: i) una elevada actividad antibacteriana, ii) una buena farmacocinética, iii) mínima toxicidad, iv) que estén dirigidos al mayor número posible

de dianas y v) muy importante, que presenten un bajo índice de desarrollo de resistencias.

### 5.1 Artículo III. Old and new strategies for discovery of antibacterial agents

J. Vila, J Sánchez-Céspedes and E. Giralt

*Curr. Med. Chem. – Anti-Infective Agents*, 2005, 4: 337-353

En este trabajo hemos intentado presentar una revisión completa de los métodos empleados en el descubrimiento de agentes antibacterianos, desde los métodos clásicos a los más actuales. El desarrollo de nuevos agentes antibacterianos se puede llevar a cabo a partir de moléculas derivadas de agentes antibacterianos conocidos o mediante la identificación de nuevos agentes activos frente a nuevas dianas. Ahora se conocen las bases genéticas y bioquímicas de la resistencia de muchas clases de antimicrobianos, lo cual ha resultado de gran utilidad en el diseño de una estrategia racional que puede usarse para contrarrestar las resistencias bacterianas. Esta estrategia puede seguir dos enfoques: i) Modificación de la estructura básica del agente antibacteriano, que eluda los mecanismos de resistencia frente al agente antibacteriano original, y ii) Desarrollo de un compuesto que inhiba el mecanismo de resistencia frente a un antibiótico determinado, de manera que la administración conjunta del agente antibacteriano y el inhibidor, como co-fármaco, potenciará su actividad. Existen además dos enfoques principales en la identificación de nuevas dianas: 1. Clásico y, 2. Genómico. El primero incluye el estudio de metabolitos secundarios en bacterias y hongos, y recientemente también en extractos vegetales, macro- y microorganismos marinos así como en bacterias del suelo no cultivables, con actividad antibacteriana. El segundo enfoque incluye nuevas herramientas moleculares, tales como la genómica comparativa, la química combinatoria, y el modelaje computerizado, que han ayudado al desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.





# Old and New Strategies for the Discovery of Antibacterial Agents

J. Vila<sup>1,\*</sup>, J. Sánchez-Céspedes<sup>1</sup> and E. Giralt<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer - IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona – PCB, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

**Abstract:** In this review we have tried to present a complete and integrated picture of the old and new ways to discover antibacterial agents. The development of new antibacterial agents can be made from derivatives of known antibacterial agents or by identification of novel agents active against previously unexploited targets. The genetic and biochemical basis of resistance to most classes of antibacterial agents is now known and this has been important in the design of a rational strategy that can be used to counteract resistance. This strategy can follow two approaches: i. Modification of the basic structure of the antibacterial agent, which circumvents antibacterial resistant mechanisms, and ii. Development of a compound inhibiting the mechanism of resistance for an antibacterial agent, hence the concomitant administration of the antibacterial agent plus the inhibitor, as a co-drug, will potentiate this activity. There are also two main approaches to find new protein targets: 1. Classical and, 2. Genomic. The first includes the study of secondary metabolites of bacteria and fungi with antibacterial activity, and it has now been expanded to include plant extracts and marine macro- and microorganisms, as well as non-cultivable soil bacteria. Recent tools such as comparative genomic, combinatorial chemistry, and computerized modelling have helped in the development of new antibacterial agents. Finally, other approaches, such as bacteriophages, antisense RNA and proteins involved in pathogenicity to find new antibacterial drugs are currently investigated.

**Keywords:** New antibacterial agents, antibacterial resistance, comparative genomic, comparative chemistry.

## INTRODUCTION

In the last decade, the resistance of bacteria to antibacterial agents has been steadily rising, hence, the infections caused by multiresistant bacteria has also increased. In fact, the Center for Diseases Control (Atlanta, USA) considers infectious diseases caused by multiresistant bacteria as one of the emergent diseases today [1].

This increase in antimicrobial resistance has been observed in bacteria causing mainly community-acquired infections, in those causing both community and nosocomial-acquired infections and in those causing mainly nosocomial infections. An example of increased resistance in a community-acquired infection causing bacteria is *Salmonella typhimurium*. A steady increase was observed in the resistance of *S.typhimurium* clinical isolates to ampicillin, chloramphenicol, tetracycline and trimethoprim from 1987 to 1994 [2]. Moreover, in recent years the increase in the resistance to quinolones in this microorganism has also been shown [3]. *Staphylococcus aureus* is an example of bacteria causing both community and nosocomial-acquired infections [4]. In 1996, the first clinical isolate of *S.aureus* with reduced susceptibility to vancomycin (MIC = 8 mg/L) was reported from Japan [5]. Recently, a vancomycin-resistant *S.aureus* clinical isolate (MIC > 32 mg/L) has been reported in a patient in United States [6]. This resistance was associated with the presence of the *vanA* gene previously described in *En-*

*terococci*. Finally, the paradigm of multiresistant bacteria is *Acinetobacter baumannii* [7], a nosocomial bacteria causing infections mainly in intensive care units. Isolates of this microorganism resistant to virtually all chemotherapeutically useful antibacterial agents have recently been identified [8]. Although measures to limit the use of antibiotics and to reduce the spread of resistant microorganisms can help in limiting the emergence of resistance microorganisms, new antibacterial agents are needed because of the current situation of bacterial resistance.

There are several microorganisms, such as *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, and *Francisella tularensis* that can be used as biological weapons of mass destruction by terrorists. Although they are responsible for very different illnesses, they share availability, ease of production, ability to cause widespread disease by aerosol attack and the capability to generate microorganisms resistant to currently available antibacterial agents by genetic engineering. Therefore, this is another important reason for the development of new antibacterial agents.

The ideal antibacterial agent would have the following features: i. Very high activity; ii. Good pharmacokinetics (high absorption, wide distribution and favorable half-life); iii. Null or low toxicity; iv. Affecting several different protein targets (see epigraph on "Essential enzymes already known" and v. Low rate of development of resistance.

New antibiotics continue to be discovered at a rate of >500/year [9], but these almost invariably belong to previously identified classes of antibacterial agents. Currently,

\*Address correspondence to this author at the Department of Microbiology, School of Medicine, University of Barcelona, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barceloan, Spain; E-mail: jvila@ub.edu

more than 125 microbial genomics have been published (<http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/>), <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/micr.html>)

This phenomenon has generated a large amount of raw material for *in silico* analysis and opens the door for comparative genomics for discovering new essential molecular targets for the development of new antibacterial agents. Here we describe the current strategies used to develop new antibacterial agents focusing on both the old and new approaches to achieve this goal.

### IMPROVING EXISTING ANTIBACTERIAL AGENTS

With the exception of the oxazolidinones, such as linezolid, and daptomycin, which is a cyclic lipopeptide, no new classes of antibacterial agents have been commercialized in almost 30 years. All the antibacterial agents that have appeared during this period of time were designed to improve already known antibacterial agents.

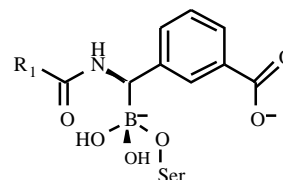
The genetic and biochemical basis of resistance to most classes of antibacterial agents is now known and this has been important in the design of a rational strategy that can be used to counteract resistance. This strategy can follow two approaches: i. Modification of the basic structure of the antibacterial agent, which circumvents antibacterial resistant mechanisms, and ii. Development of a compound inhibiting the mechanism of resistance for an antibacterial agent, hence the concomitant administration of the antibacterial agent plus the inhibitor, as a co-drug, will potentiate this activity.

Among the advantages of this approach is the greater potential for obtaining a useful compound when working with a known class of antibacterial agent than when taking an entirely new approach. Moreover, working with known classes of compounds provides at least some predictability concerning potential side effects. On the other hand, the main restriction of this approach in the development of new antibacterial agents is that it can be only considered a temporary solution since the development of these antibacterial agents is based on the mechanism of resistance to the parental antibacterial agent and, in this sense, it has been proven that the existence of mechanisms of resistance to the parental drug can facilitate the easy development of resistance to the new derivative. For instance, telithromycin, which shows high activity against macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains, selects telithromycin-resistant mutants within a few generations, due to the fact that macrolide-resistant strains already present a mutation affecting telithromycin activity [10].

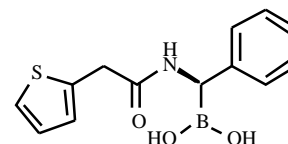
Examples of the first approach are: development of semi-synthetic penicillins such as methicillin, which was developed because of its stability to staphylococcal penicillinases. Third generation cephalosporines which are stable to TEM-1 and SHV-1  $\beta$ -lactamases, are probably the two most frequently found  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. Another more recent example is the development of the glycolicines, a derivative of minocycline, which are active against strains carrying the Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D) or Tet(K) determinants. These determinants confer resistance to tetracycline by means of efflux pump expression. However, these

efflux pumps do not affect glycolicines. We have recently developed derivatives of ciprofloxacin which shows a better activity against these strains of *A.baumannii* carrying a mutation in the amino acid codon Ser-83 of the *gyrA* gene, which produces resistance to ciprofloxacin (unpublished results).

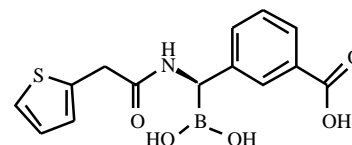
Among examples belonging to the second approach, amoxicillin plus clavulanic acid is considered the prototype. This antibacterial agent is constituted by the association of amoxicillin (responsible for the activity) and clavulanic acid (inhibitor of some  $\beta$ -lactamases which inhibit amoxicillin). An important class of  $\beta$ -lactamase is AmpC, which has spread among bacteria and they have been shown to play an important role in the acquisition of  $\beta$ -lactam resistance in microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* [11] or *A. baumannii* [12]. Morandi and colleagues [13] have recently described a compound, which inhibits the AmpC  $\beta$ -lactamase. They synthesized structural analogues of cephalosporin  $\beta$ -lactamase-bound intermediates, replacing the  $\beta$ -lactam motif with a boronic acid (Fig. 1A), a motif that has been shown to be a strong inhibitor of the AmpC. By synthesizing a range of compounds with these parameters, the researchers found molecules that inhibit AmpC, even at very low concentrations, with  $K_i$  values as low as 1 nM as measured in enzyme-binding assays. The two most effective inhibitors (Fig. 1B and 1C) were shown to reverse the resistance of several clinical pathogens to third-generation cepha-



A. High energy intermediate formed between a boronic acid serine- $\beta$ -lactamase inhibitor and the active center of the enzyme.



B. (1R)-1-(2-Thienylacetyl-amino)-1-phenylmethylboronic acid.



C. (1R)-1-(2-Thienylacetyl-amino)-1-(3-carboxyphenyl)methylboronic acid.

**Fig. (1).** A. High energy intermediate formed between a boronic acid serine- $\beta$ -lactamase inhibitor and the active center of the enzyme, B. (1R)-1-(2-Thienylacetyl-amino)-1-phenylmethylboronic acid and C. (1R)-1-(2-Thienylacetyl-amino)-1-(3-carboxyphenyl)methylboronic acid. (Ref. 13)

losporin ceftazidime in bacterial cells. Although AmpC is a very important class of  $\beta$ -lactamases, the other classes A, B and D play also an important role and the prevalence of these enzymes is increasing worldwide. Therefore, an inhibitor affecting at least A, C and D which are all serine  $\beta$ -lactamase with high stability and rate of diffusion would be desirable. A broad-spectrum penem inhibitor (BRL 42715) (Fig. 2) with high capacity of inhibition toward class A, C and D  $\beta$ -lactamases was investigated [14]. However, it was not developed commercially due to its instability and short half-life in humans. Both  $\beta$ -lactam and non- $\beta$ -lactam inhibitors have recently been described. A new  $\beta$ -lactamase inhibitor, a methyldene penem having a 5,6-dihydro-8H-imidazo [2,1-c] [1,4] oxazine heterocyclic substituent at the C6 position with a Z configuration (Fig. 3) has been found to irreversibly inhibit both class A and C serine- $\beta$ -lactamase with  $IC_{50}$  values of 0.4 and 9.0 nM for TEM-1 and SHV-1 (class A), respectively, and 4.8 nM for AmpC (class C)  $\beta$ -lactamases [15]. A non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor (AVE1330A), which is a representative of a novel class of bridged bicyclic [3.2.1]diazabicyclo-octanones, has recently been evaluated (Fig. 4), showing that in combination with ceftazidime exhibits broad-spectrum activity against class A- and class C-producing *Enterobacteriaceae* [16].

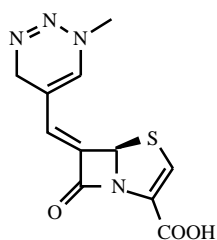


Fig. (2). Chemical structure of BRL 42715. (Ref. 14)

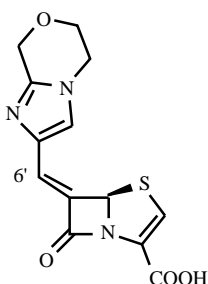


Fig. (3). A 6-(5,6-dihydro-8H-imidazo [2,1-c] [1,4]oxazine methyldene) penem derivative. (Ref. 15)

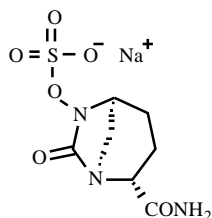


Fig. (4). Non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor (AVE1330A). (Ref. 16).

Another recent example of the development of an inhibitor of an enzyme involved in antibacterial agent resistance is a compound inhibiting dihydrofolate reductase. This enzyme is able to confer resistance to trimethoprim. A library of 1329 compounds has been synthesized in solution. These compounds have been evaluated for inhibition of human dihydrofolate reductase and the bacterial enzymes from trimethoprim susceptible *Staphylococcus aureus* and trimethoprim resistant *S. pneumoniae*. Several potent inhibitors were found, with one of the most potent possessing an  $IC_{50}$  value of 42 nM against *S. aureus* and 550 nM against *S. pneumoniae*. [17].

Another mechanism of resistance to antibacterial agents is the overexpression of efflux pumps. Drug efflux pumps can be specific (ex. tetA) or broad affecting different classes of antibacterial agents. An overexpression of active efflux systems reduces the accumulation of the antibacterial agent. Several efflux systems have been described so far: four are  $H^+$  antiporters: major facilitator (MF) superfamily; the resistance nodulation and cell division (RND) family; the small multi-drug resistance (SMR) family and the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. Another efflux pump is the ATP binding cassette superfamily. These transporters hydrolyse ATP to obtain the energy for active efflux. Lomovskaya *et al.* [18, 19] have recently described compounds inhibiting efflux pumps (Fig. 5), which contribute to the resistance in *P. aeruginosa*.

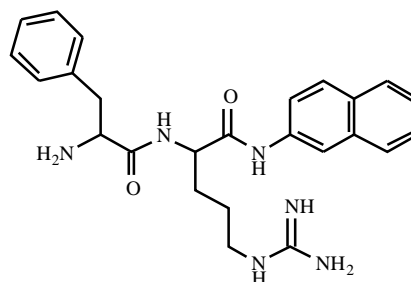


Fig. (5). Efflux pump inhibitor MC-207,110. (Refs. 18 and 19)

Inhibition of enzymes responsible for aminoglycoside modification is difficult to find due to the multiple enzymes involved in this task. However, some protein kinase inhibitors have been found to perform this role.

## NEW ANTIBACTERIAL AGENTS

Protein targets for antibacterial agents are defined as enzymes essential for the growth and/or survival of bacteria. The main features that a protein target should combine are: i. Universally present among medically important pathogens; ii. Essential for bacterial growth or viability, and iii. Different from a human counterpart if it exists.

There are also two main approaches to find new protein targets: 1. Classical and, 2. Genomic.

### Classical Screening

The study of secondary metabolites that organisms such as bacteria or fungi have evolved, largely for the purpose of

their own survival, has historically proved of immense benefit in the discovery of antibiotics. However this classical approach has also changed during the last decade. The number and diversity of natural products being examined have expanded to include plant extracts and marine macro- and microorganisms. One explanation of why natural antibiotics target only 20 or so gene products is that evolution allowed the selection of targets that could be inhibited efficiently in competitive microorganisms but not so efficiently that the antibiotic-producing organism could not devise an intrinsic resistance mechanism against its own drug product [20].

Recently, it has been shown that most of the soil-bacteria are non-cultivable. Therefore, another approach to be used to check for antibiotics produced by this non-cultivable bacteria is the purification of DNA from soil samples, cloning large fragments and searching for the production of new antibiotics [21-23]. Heterologous expression of metagenomic DNA libraries in *Escherichia coli* lends proof to the concept that transcription and translation of entire biosynthetic pathways can be supported, giving rise to a measurable biological activity [24, 25].

Another approach linked to the classical one is the use of combinatorial chemistry (see specific epigraph) to generate additional sample diversity for high-throughput screening (Fig. 6). If a hit is found then the mechanisms of action of this potential antibacterial agent should be investigated. In this sense, protein-based screening strategies were developed that relied on the identification of surrogate peptide ligands, being used in competitive displacement assays to identify small molecule inhibitors [26]. This can be obtained by different approaches: 1. Genomics and 2. Proteomics. Changes in gene expression in response to antimicrobial compound treatment are often indicative of the mechanism of action of the compound. Therefore, examining the transcriptional

profile induced by treatment with an antimicrobial agent of unknown mechanism, it could be possible to infer the mechanism of action. One approach is when cells are exposed to subinhibitory concentrations of the antibiotic and the total RNA and protein profiles of the exposed cells are compared to those of untreated controls. This can be achieved by DNA microarrays or 2D-gel electrophoresis. As an example of the use of DNA microarrays in detecting the mechanism of action of an antibiotic, Wilson *et al.* [27] investigated the genes induced by isoniazid, which are probably encoding proteins physiologically relevant to the drug's mode of action. In the wide sense of the word, proteomics is used to characterize differences in the protein expression between biological specimens. A spot may be extracted, digested with an endoprotease such as trypsin and subjected to mass spectrometry. The experimental peptide mass may then be compared to the theoretical masses and calculated from the genomic information through a variety of programs.

Another approach to investigate the mechanism of action of an antibacterial agent is to select resistant mutants [28, 29] and to compare the transcriptional profile.

### Genomic Approaches

Currently over 100 microbial genomes have been totally or partially sequenced. This information can provide an excellent way to find new protein targets and, therefore, a new opportunity to discover new antibacterial agents. A scheme of the pathway followed to find a new antibacterial agent, starting with the comparison of different bacterial genomes is shown in (Fig. 7).

In the first step the genomes of different bacteria are compared (**Comparative genome analysis**). The number and types of genomes to be compared depends on the kind of

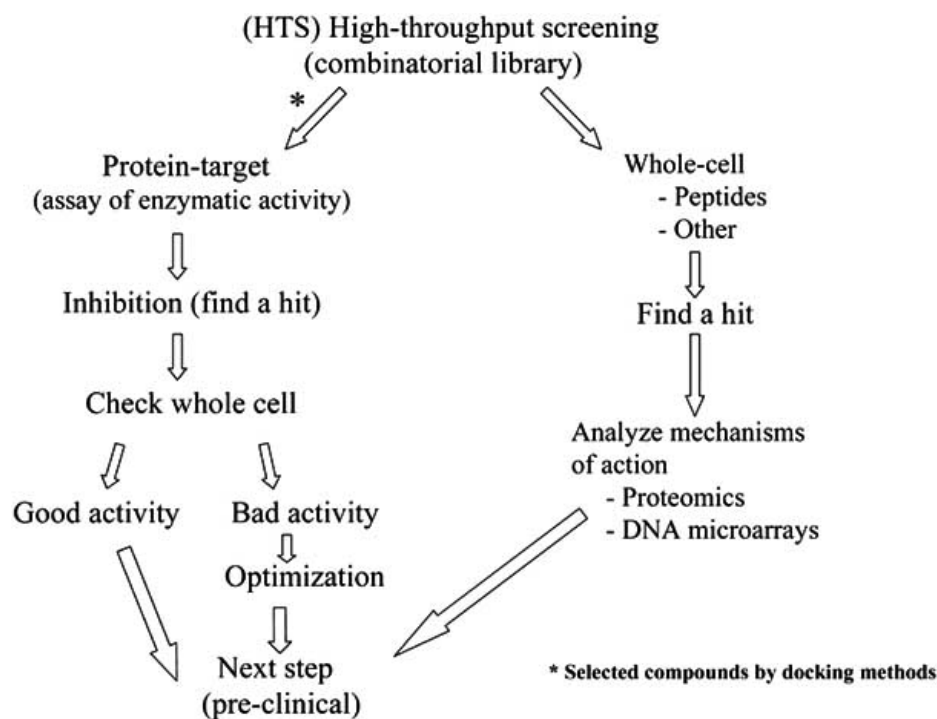


Fig. (6).

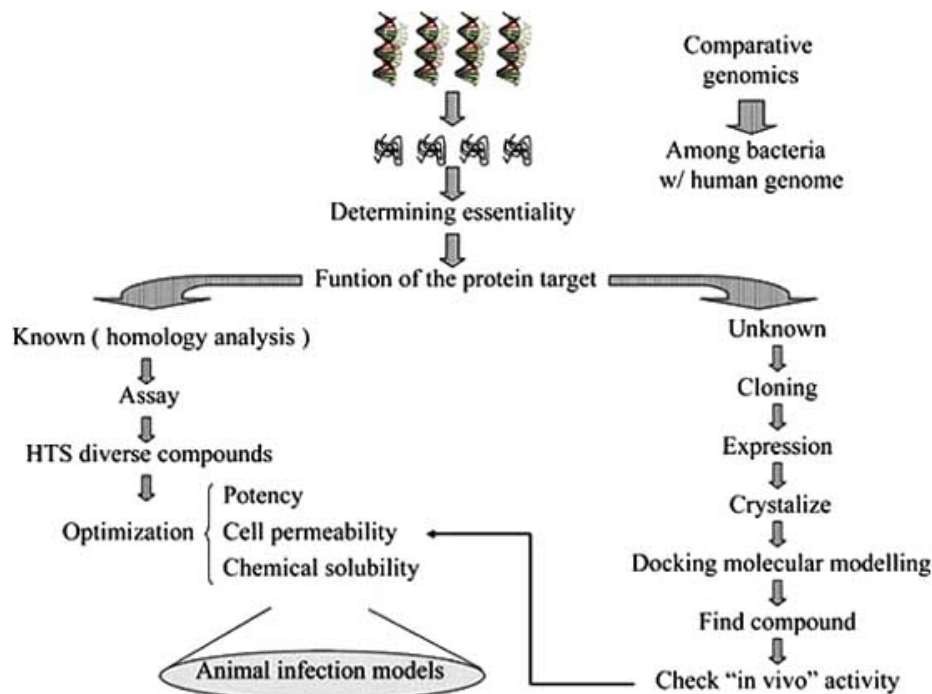


Fig. (7).

antibacterial agent we are searching for. For instance, for a broad-spectrum antibacterial agent both Gram-negative and Gram-positive bacterial genomes are compared, whereas for an antibacterial agent with a narrow spectrum, only specific genes for the microorganism that has been selected (Ex. *Mycobacterium tuberculosis*) will be chosen for further investigation. Once one or several genes have been selected, the distribution of this gene in other bacteria can be analyzed to assess the maximum potential spectrum and help to avoid the wasting of costly research efforts on targets that might be absent in important pathogens. With a computational tool, Brucoleri *et al.* [30] showed what determines the concordance of putative gene products, the proteins conserved among specific bacterial genomes. They compared *E. coli* with *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* and *M. tuberculosis* and found 89 concordances. The recent availability of human genome sequence information has allowed an initial comparison of the selected bacterial genes to exclude genes encoding proteins that are highly similar to human counterparts in order to avoid toxicity. Although the presence of a human homologue does not necessarily rule out the target, it flags a possible issue regarding its selectivity [31]. Several programs have been used for such studies of similarity, among which the Glimmer and COG Database should be highlighted. However, some of the sequenced genomes are from avirulent microorganisms (Ex. *E. coli* K12) and the comparison of the genome of this avirulent strain with strain O157:H7 showed that the latter contained an additional 0.9 Mb of DNA, comprising 1.652 ORFs [32]. Much of this additional DNA is horizontally-acquired foreign DNA, for instance, some of the genes encoding virulence factors. Therefore, if genome comparison is to obtain specific virulence factors to develop inhibitors of themselves, the right strain should be chosen.

Musgegian and Koonin [33] compared two genomes from *Mycoplasma genitalium* and from *H. influenzae* and found 240 genes in common. However, when seven genes chosen at random from the 240 genes were tested in *H. influenzae* by transposon mutagenesis, only three were found to be essential for "in vitro" growth. In this same way, Brucoleri *et al.* [34] produced a list of 89 broad-spectrum potential antibacterial agents genes using a comparative genomics concordance analysis.

When a gene encoding a putative novel protein target is found the **essentiality** of the enzyme encoded in this gene should be determined. Currently there are several tools to analyze whether a gene is essential, some are based on obtaining a knock-out of the gene: 1. Allelic replacement mutagenesis (Fig. 8); 2. Transposon footprinting; 3. Plasmid-insertion of mutagenesis (Fig. 9); 4. Isolation of conditional lethal mutants; 5. Antisense RNA (Fig. 10), and 6. Controlled gene expression. Allelic replacement mutagenesis has been used to investigate whether enzymes involved in the mevalonate pathway such as HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase, mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and mevalonate diphosphate decarboxylase are essential enzymes for the *in vitro* growth of *S. pneumoniae* [35].

When the knock-out approach is used the following consideration should be kept on mind. The frequent occurrence of polycistronic messages in bacteria means that disruption of a gene may have a deleterious effect on the expression of a distal neighboring gene (polar effect). In this case, the inviability caused by a gene knock-out could be due to loss of expression of a gene other than the one disrupted. Precautions can be taken to reduce these effects by, for example, including a moderate-strength outward reading promoter in the disrupted version of the allele so as to permit expression

### ALLELIC-REPLACEMENT

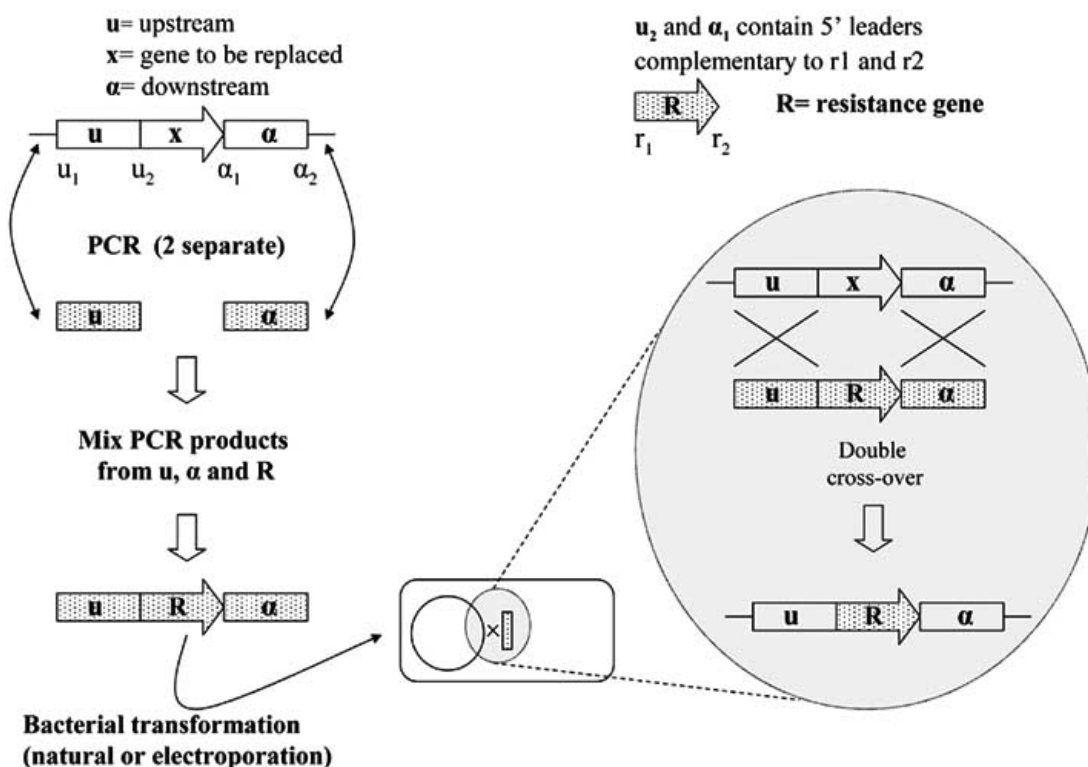


Fig. (8).

### PLASMID INSERTION MUTAGENESIS

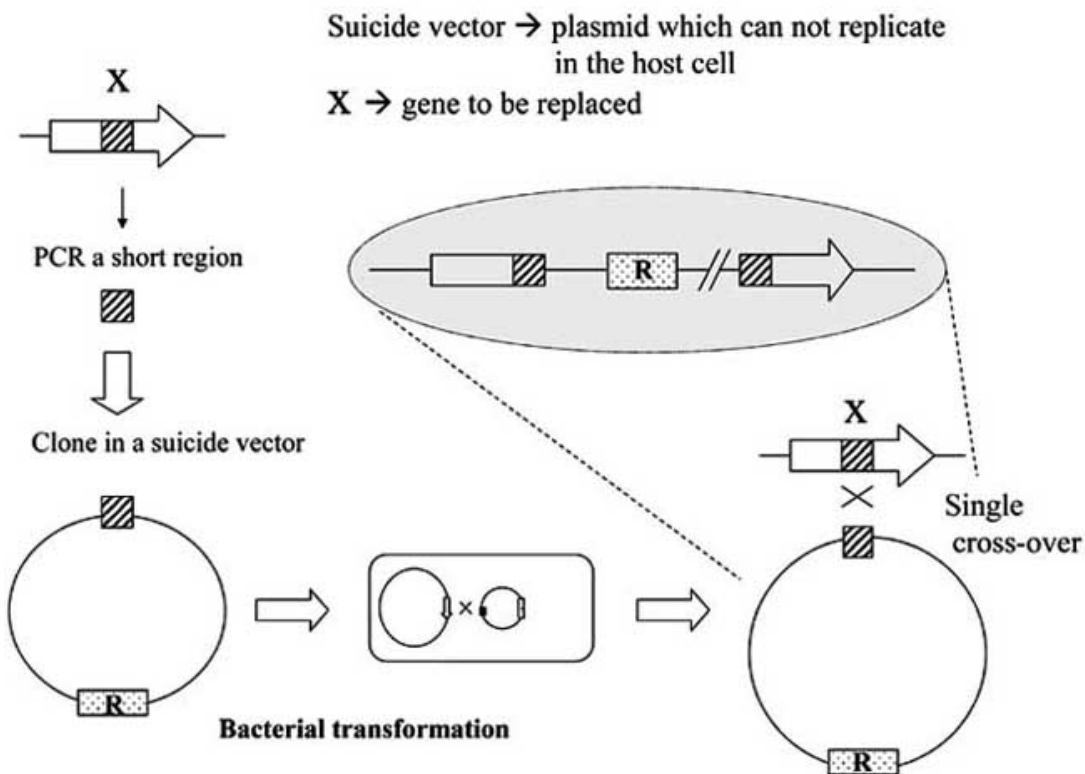


Fig. (9).

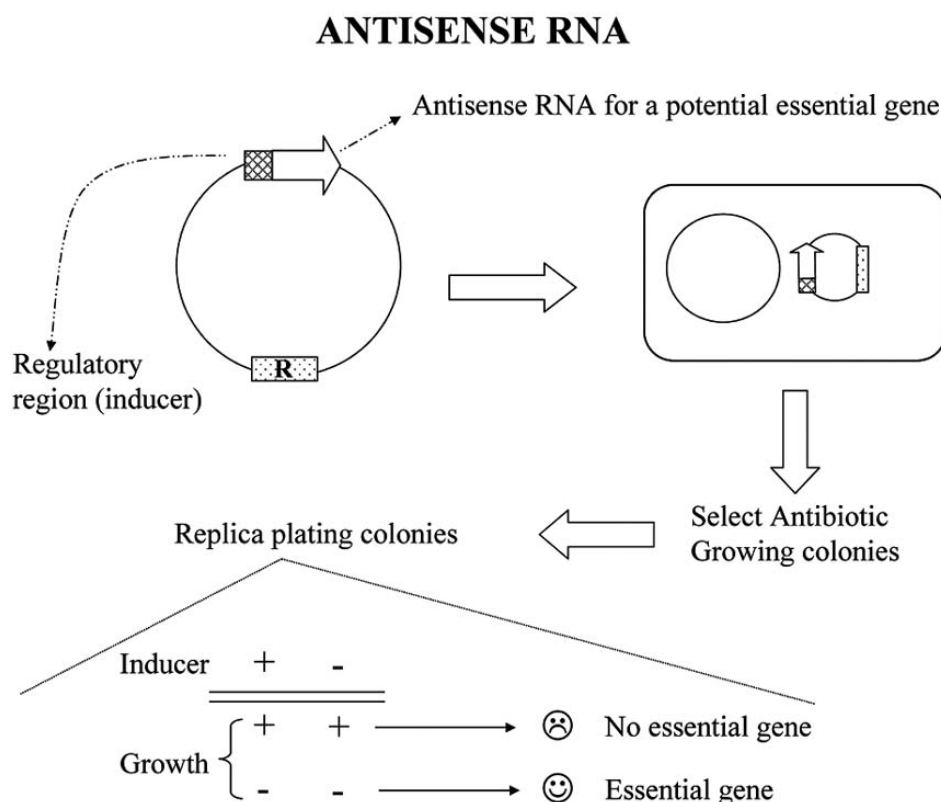


Fig. (10).

of the downstream gene(s) [36]. Moreover, defining essentiality for a gene in a bacteria does not imply essentiality in another bacterial species. Therefore, essentiality should be determined in different bacterial pathogens.

An understanding of the function of the essential protein has, until now, been an absolute requirement for the development of a relevant screening assay. When the essentiality of the gene is shown, the **biochemical function** of the enzyme encoded in this essential gene may or may not be known. If the function of the gene product is not known or the design of an “*in vitro*” assay is difficult, an alternative would be to screen potential inhibitors directly on the basis of transcript profiling, therefore comparing these profiles with the one generated by knock-out mutations. Computational approaches have also been used to elucidate the structures of the unknown gene product; for instance to assign fold structures (see specific epigraph) [37].

In both cases regardless of whether the biochemical function is known, the cloning and expression of the gene allows a protein target to be produced in a significant amount, making it available for high-throughput screening when the function is known or to know the structure of the protein and infer the function from it, when this is not known.

After this screening, when a compound that inhibits the target is found, a whole bacteria screening is needed. The compound may maintain its activity or it may not be able to penetrate the cell wall and, hence, the activity is lost since it can not reach the target. In the latter case, if a promising

target inhibitor that cannot accumulate in the pathogen is found, medicinal chemistry may attempt to overcome this problem.

In spite of the proved efficiency of sequence alignments for assigning biological functions to novel proteins, on occasions the lack of similarities in the ‘sequence space’ to related proteins with known function renders this approach unfeasible. In such a situation, biological function can be assigned in some cases by determining 3D structure by either X-ray crystallography or NMR, and then by inferring molecular functions by analysis of this structure [38-42].

Both X-ray crystallography and NMR have advantages and drawbacks [38]. The former has no protein size limitations and is very efficient when a well diffracting protein crystal is available. However, the production of these crystals is still an unpredictable process that can take from hours to years. In contrast, NMR structure determination does not require crystals but is currently limited by size constraints (it is normally used for proteins smaller than 250 amino acids) and lengthy data collection and analysis times. When used adequately these two methods provide high quality protein-structures.

Applying a 3D structure of a protein of unknown function to the assignment of a cellular function is straightforward when the new structure resembles that of proteins with known biochemical activities [39]. In a recent NMR study, a structural proteomics consortium led by C.H. Arrowsmith reported the 3D structure of a first series of twelve proteins from distinct microorganisms, including *E. coli*, *Methano-*

*bacterium thermoautotrophicum* and the myxoma virus [43]. The twelve sequences were submitted to a Swiss Modeler [44, 45] to determine whether a 3D structure could be predicted on the basis of sequence similarity. Only in two cases was a relatively reliable prediction possible on the basis of 27.4 and 30.6% sequence identity, respectively. In contrast, when the search was done on the '3D space' rather than the 'sequence space', *i.e.* when the new structures were compared with all the structures in the Protein Data Bank (PDB) [46], most were structurally similar to other structures in the PDB and a putative biological function was inferred for most of them (10 of 12).

Several computational tools allow protein structure comparison and structure-based sequence alignment [47, 42]. The most popular is the Dali, a network tool developed by C. Sander *et al.* [48]. The Dali server compares protein structure in 3D. You submit the coordinates of your protein problem and Dali compares them against those in the PDB. The method is based on minimization of residue-residue ( $C^{\alpha}$ - $C^{\alpha}$ ) distance matrices using a Monte Carlo procedure.

Another recent example that illustrates the power of protein 3D structure comparison to determine cellular functions is the case of MJ0882, a hypothetical protein from *Methanococcus janaschii* [49]. The X-ray crystal structure of MJ0882 showed what is called a "S-adenosyl-methionine dependent methyltransferase fold". In spite of the absence of similarity in the 'sequence space' between MJ0882 and any previously known methyltransferase, methyltransferase activity was subsequently confirmed by enzymatic assay.

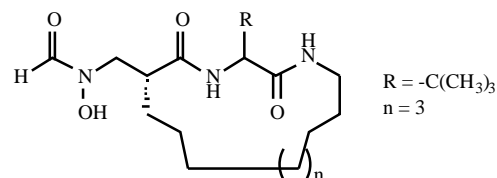
The identification of a small molecule tightly bound to a protein whose structure has recently been resolved also represents an important contribution to function elucidation. In a recent paper on the structural genomics of the *Thermotoga maritima* proteome [50], S.A. Lesley *et al.* reported the presence of four FAD molecules in the active site of a thymidylate synthase-complementing protein, TM0423, which indicates a flavin-dependent mechanism in the alternative thymidylate synthesis pathway.

In summary, 3D protein structure determination by NMR or X-ray crystallography is a powerful tool for the identification of new targets for the design of new antibacterial agents. Homology modelling, *i.e.* calculation of a plausible 3D protein structure, on the basis of experimentally determined structures of closely related proteins, can be useful in certain cases but must be used with caution.

## STRUCTURE-BASED ANTIBACTERIAL AGENTS DESIGN

The ultimate goal of structure-based drug design is to develop new ligands by using information from the 3D structure of a therapeutic target without previous knowledge of other ligands [51, 52, 53]. The PDB was founded in 1971 at Brookhaven National Laboratory as the sole international repository for 3D structural data on biological macromolecules [54, 46]. On July 1st, 2003, this database included 21,572 structures: 19,451 proteins, peptides and viruses; 902 protein-nucleic acid complexes; 1,201 nucleic acids; and 18 carbohydrates [55]. The last decade has been marked by a great rise in the total number of structures in the PDB per

year and an increase in complexity. Accessible structures span from single proteins, such as the early deposited lysozyme [56], to antibodies [57], entire viruses [58] or the very recent calcium pump [59]. Just to quote some examples of protein structures that are more directly related to the design of antibiotics, the crystal structures of four peptide deformylases from *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *Bacillus stearothermophilus I* have recently been elucidated by Mikol *et al.* [60] both in free form and bound to the naturally occurring antibiotic actinonin. Some structural species dependent differences are found in the vicinity of the enzyme active site, highlighting the way to follow to design new highly potent broad-spectrum bacterial peptide deformylase (PDF) inhibitors. Most of PDF inhibitors are metal chelators appended to peptidomimetics there remains some concern about their selectivity and *in vivo* stability. An approach to improve stability against proteolysis is to form a cyclic peptide. In this sense, it has recently been reported a macrocyclic PDF inhibitor (Fig. 11) which was a potent inhibitor ( $K_1 = 0.67$  nM) and was 10-fold more potent than the acyclic counterpart [61]. Similarly, the crystal structure of  $\omega$ -ketoacyl carrier protein synthase III by Qiu *et al.* [62], from Smith Kline Beecham, opened the way to the structure-based design of novel antibacterial agents focused on the inhibition of this enzyme, a key condensing enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis. As a final example, structural analysis of nucleotide binding to an aminoglycoside phosphotransferase [63] allowed Berghuis *et al.* [64] to propose some clues for the structure-based design of novel aminoglycosides that are more resistant to the action of phosphotransferases, which constitute one of the major mechanisms of bacterial resistance to aminoglycosides [65].



**Fig. (11).** Chemical structure of a peptide deformylase inhibitor. (Ref. 61).

In the "post-genome" era, focus is turning to the expressed products of the genome, the "proteome". However, with respect to the design of new antibacterial agents, nucleic acids and nucleo-protein complexes constitute therapeutic targets of parallel importance to proteins.

DNA, and more recently RNA, are recognized as important therapeutic targets [66]. Structural studies on nucleic acids are less evolved than those on protein counterparts; however, the field is advancing rapidly thanks to experimental X-ray and NMR techniques and also from the viewpoint of theoretical methods [67]. Of paramount significance for the structure-based design of antibacterial agents is the elucidation of the complete 3D structure of two ribosomal subunits [68, 69, 70]. The bacterial ribosome, formed by more than 50 proteins and three species of RNA, is the target for seven distinct classes of antibiotics used for clinical applications, including macrolides, aminoglycosides and tetracyclines [71]. NMR and X-ray crystallography have pro-



vided new data on the binding mechanisms of each of these families [72-74] as well as valuable insight for the design of new antibacterial agents.

Last but not least, experimental crystallographic and spectroscopic methods have supplied useful information on the 3D structure of the antibacterial agents themselves. This information is crucial to improve our understanding of their mode of action and to model interaction with their respective therapeutic targets. In a very elegant study, Contantine *et al.* [75], from Bristol-Myers Squibb, used NMR to elucidate both the conformation and the absolute configuration of nocathiacin I, a cyclic thiazolyl peptide antibiotic isolated from *Nocardia sp.* (ATCC-202099) (Fig. 12) that displays potent activity *in vitro* and *in vivo* against Gram-positive bacteria, including several antibiotic-resistant strains. Nocathiacin I interferes with bacterial protein synthesis by interacting with the ribosomal L11 protein and with a region of the 23S ribosomal RNA known as the L11 binding domain. On the basis of the NMR structure of nocathiacin I together with the crystal structure of the L11-RNA complex [76], the authors modelled the interactions between the ribosome and nocathiacin I and undertook the structure-based design of novel thiazolyl peptide antibiotics.

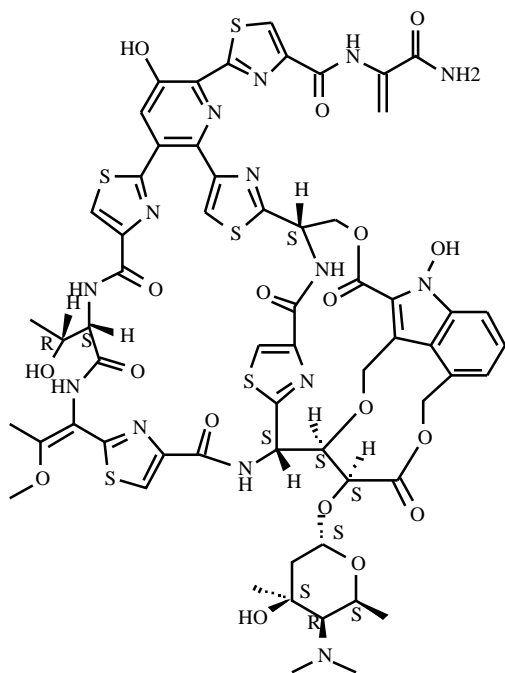


Fig. (12). Chemical structure of nocathiacin I.

### Docking Algorithms and Virtual Screening

From a methodological point of view, docking algorithms constitute a very useful although not infallible tool in the identification of a good-ligand structure on the basis of a previously known 3D protein/receptor structure of its therapeutic target [51, 52, 77]. Docking programs try to solve the so-called “docking problem” *i.e.* to find the energy and the best mode of interaction between a small, possibly flexible, ligand and a large, usually rigid, macromolecular receptor [53, 78, 79, 80]. The starting point for a docking exercise is

the chemical structure of the ligand and the 3D structure of the receptor. The program then typically generates a large number of possible ligand-receptor complexes and ranks them according to their free energy. In each complex the ligand may occupy a distinct position in the receptor, may change orientation or, with respect to flexibility, may differ in conformation.

A docking algorithm is often used to compare the binding energy of an ensemble (a library) of distinct putative ligands. This library can be either an “in-house” collection of previously synthesized compounds, compounds from a medicinal chemistry database [53] or *de novo* ligands. In all these cases we use the term virtual screening to differentiate between ‘in silico’ screening activity and ‘true’ screening using either *in vitro* or *in vivo* procedures.

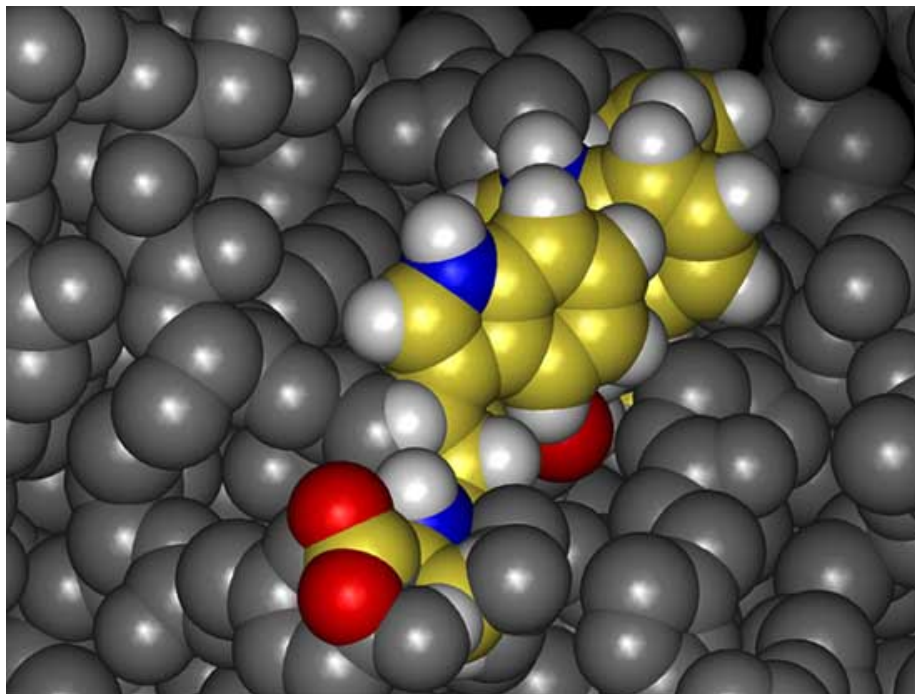
Automated docking methods fall into two broad categories: rapid techniques such as Flex X [81, 82] or DOCK [83, 84] and slower but more accurate approaches such as AutoDock [85, 86, 87]. The appropriateness of a program to address a specific problem must be decided case by case. Depending on the number and complexity of the ligands to be analyzed, rapid methods must be used and the risks of failure caused by either incomplete sampling of the conformational space or to an erroneous energetic ranking must be assumed.

Generally speaking, the problem of ligand flexibility can be tackled by the modern versions of docking algorithms, albeit at the expense of computational time [85]. In contrast, only recently has the flexibility of the receptor protein emerged as an important issue and been invoked to decipher common failures in molecular docking of ligand-protein complexes [88, 89, 90, 91].

A very exciting application of docking algorithms is ligand “*de novo*” design. A number of programs, such as SPROUT [92], SKELDIV [93] or LUDI [94], are among those most used for these purposes. LUDI, for instance, extracts from a library of molecular fragments those that, when bonded, form a molecule that can fit into the cavity of the protein under study. Each fragment is chosen for its potential for good hydrophobic and hydrogen-bonding interaction with the target receptor.

An even more promising approach for ligand “*de novo*” design is based on the use of the so-called “evolutionary algorithms” [95, 96, 97, 98]. To illustrate this technique, we have chosen the method used in the laboratory of one of the authors for the design of peptides that bind specifically to predetermined protein-surface patches [95, 99]. We start with a library of  $n$  randomly generated distinct peptides. Their ‘fitness’, that is to say, their affinity for a predetermined surface-patch from a given protein, is assessed using docking algorithms. This allows the peptide ensemble to be ranked according to fitness. Using criteria such as elitism and operations such as mutations or crossover, the evolutionary algorithm then produces a new ensemble of peptides that are generated from the previous one [99].

After several cycles of evolution/evaluation, a final ensemble of  $n$  peptides (generation #  $z$ ) is obtained. This approach was applied to the design of hexapeptides that bind to *E. coli* DNA Gyrase A. One of the best “*de novo*” designed ligands is shown in (Fig. 13), bound to a surface patch of the



**Fig. (13).** Hexapeptide (in color) docked on the surface of *E.coli* DNA gyrase (in grey).

enzyme centered in the region involved in the mechanism of action of the quinolone antibiotic ciprofloxacin. An alternative approach to evolutionary algorithms for the design of bactericidal peptides has been reported by S. Patel *et al.* at Unilever Research [100].

Docking is not an exact science. Therefore, *virtual* screening is not yet a substitute for *true* screening. However, while our computer screen can build the structure of a new compound in a question of minutes, the synthesis of this same compound can take days, weeks or even months. Fortunately, advances in organic synthesis in recent decades and, particularly, the arrival of combinatorial chemistry, have contributed greatly to solve this “true synthesis” bottleneck.

### Combinatorial Chemistry

Combinatorial chemistry in the mid 90's led to a revolution in synthetic activity related to medicinal chemistry. After successive waves of great enthusiasm and even greater deception the field is now settled, and combinatorial chemistry has been adopted in several academic and, specially, industrial laboratories as a more efficient way to synthesize series of compounds specially in the field of lead discovery and lead optimization [101, 102, 103].

There are three main approaches to combinatorial chemistry:

- i) Synthesis of mixtures
- ii) Parallel synthesis
- iii) One-bead/one-compound procedure

The *synthesis of mixtures* made a great contribution to combinatorial chemistry at the beginning of its short history. Using the method of ‘solid phase peptide synthesis’ devel-

oped, among others, by B. Merrifield at Rockefeller University in New York, it is relatively easy to synthesize libraries via the incorporation of mixtures of reagents (instead of a single reagent) at given steps of a synthetic pathway. At the end of the synthesis, the entire library is assayed for a desired property, for instance antimicrobial activity.

If the library shows, to some extent, the desired activity, the next step is then ‘deconvolution’, *i.e.* to identify the compound(s) responsible for the activity observed. Deconvolution requires the synthesis of sub-libraries, that is to say libraries where one position has a fixed known structure while the others remain variable. Each of these sub-libraries is evaluated. After several cycles of sub-library synthesis/biological evaluation, the active compound(s) is identified (Fig. 14).

In *parallel synthesis*, each compound of the library is synthesized independently in a distinct reaction vessel. Although this combinatorial approach was initially associated with solid-phase synthesis methods, it is now used indistinctly in solid-phase or in solution.

The *one-bead/one compound procedure* is, to a certain extent, a combination of the two procedures above. Using an ingenious technique called the ‘split and mix’ method, the simultaneous synthesis of hundreds (or thousands) of compounds attached to beads of a solid support can be performed, in such a way that each bead contains multiple copies of the same compound. After screening of the bead library, only those that are positive, are analyzed to elucidate the structure of the compounds attached. These active compounds can then be synthesized independently in order to confirm and further evaluate their biological activity.

These three combinatorial approaches have their *pros* and *cons*. The *synthesis of mixtures* is the best approach for very

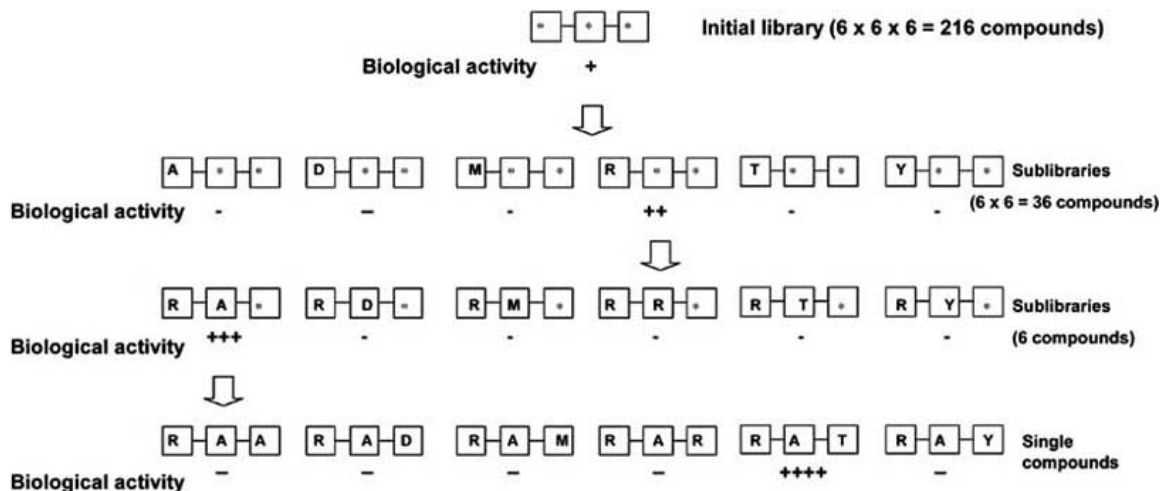


Fig. (14). Schematic representation of one-bead/one-compound combinatorial chemistry approach.

large libraries (even million compounds) but is greatly limited because the biological assay is always done with a mixture of compounds, which produces the associated problems derived from synergism (either enhancement of activity or inhibition phenomenon). *Parallel synthesis* is, in general, the most popular approach in companies. Libraries are normally limited to a few hundred compounds but each individual member can be adequately purified, chemically characterized and biologically evaluated. Finally, the *one bead/one-compound* technique is normally limited to the availability of a screening method in solid-phase. When this method is available, this approach is a very good compromise between synthetic efficiency (facile synthesis of relatively large several hundred compound libraries) and biological evaluation in the absence of other chemically-related members.

During the last decade, combinatorial chemistry has been applied to drug discovery in practically all fields of medicinal chemistry and antibiotics are, clearly, not an exception. The use of combinatorial chemistry in the design of antibiotics has recently been reviewed [104]. Here we address a very recent example on a structure-based design of agents that target the bacterial ribosome from an excellent study by A. Jordan *et al.* [105].

Thiostrepton is a natural thiopeptide antibiotic that is active against Gram-positive bacteria, similarly to the previously cited nocathiacin I, that stabilizes the binding of the ribosomal protein L11 to the 23S ribosomal RNA L11 binding domain (L11BD) [106]. The chemical structure of thiostrepton is shown in (Fig. 15). On the basis of the NMR structure of thiostrepton bound to L11BD [107], Jordan *et al.* synthesized a library of 93 compounds with the aim of mimicking the ability of thiostrepton to bind to L11BD. The structure of some of these compounds is shown in (Fig. 16) (The substituent R represents an amine moiety incorporated from the amines a to e of the insert). From the library synthesized, five compounds were found to interfere with the dynamics of L11-L11BD binding in similar manner to thiostrepton. However, none displayed any substantial antibacterial activity [105]. In our opinion, this example is a good illustration of the present state of structure-based antibiotic design. The availability of structural data and the synthesis

of compounds that interact in a proper manner with their therapeutic target do not guarantee the identification of an active molecule '*in vivo*'. In this regard, pharmacokinetics in general, and bacterial uptake in particular, are key issues to address.

### NMR-Based Ligand Screening

The last example from the study by Jordan *et al.* shows the applications of combinatorial chemistry to improve the development of new antibacterial agents, using a previously available lead compound as the starting point, in this case thiostrepton. However, combinatorial chemistry combined with a powerful high-throughput screening method can also make a great contribution to the discovery of new lead compounds for a given therapeutic target.

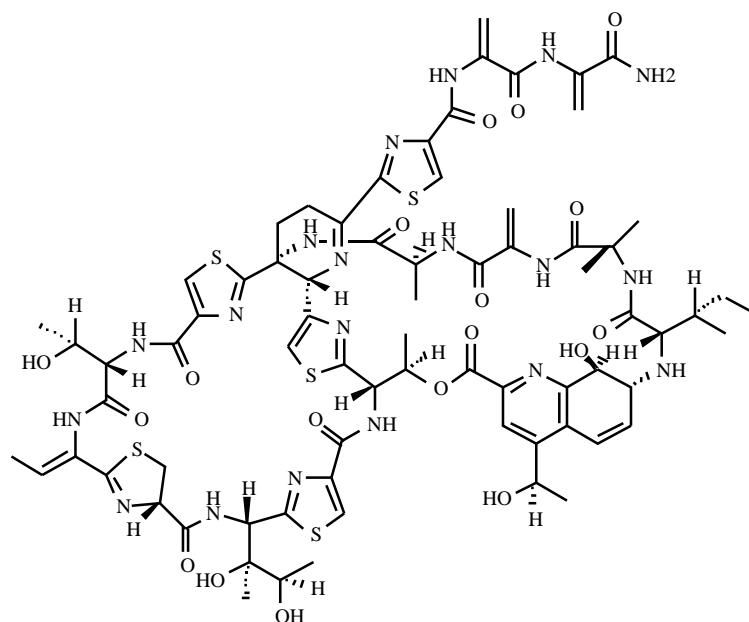
NMR-based ligand screening associated with combinatorial chemistry is currently emerging as a very powerful combination in this exciting and challenging arena.

The use of NMR in ligand screening has been recently reviewed by one of us [108]. Here we will comment on only one recent example from the work of Fesik's group in Abbott Laboratories [109].

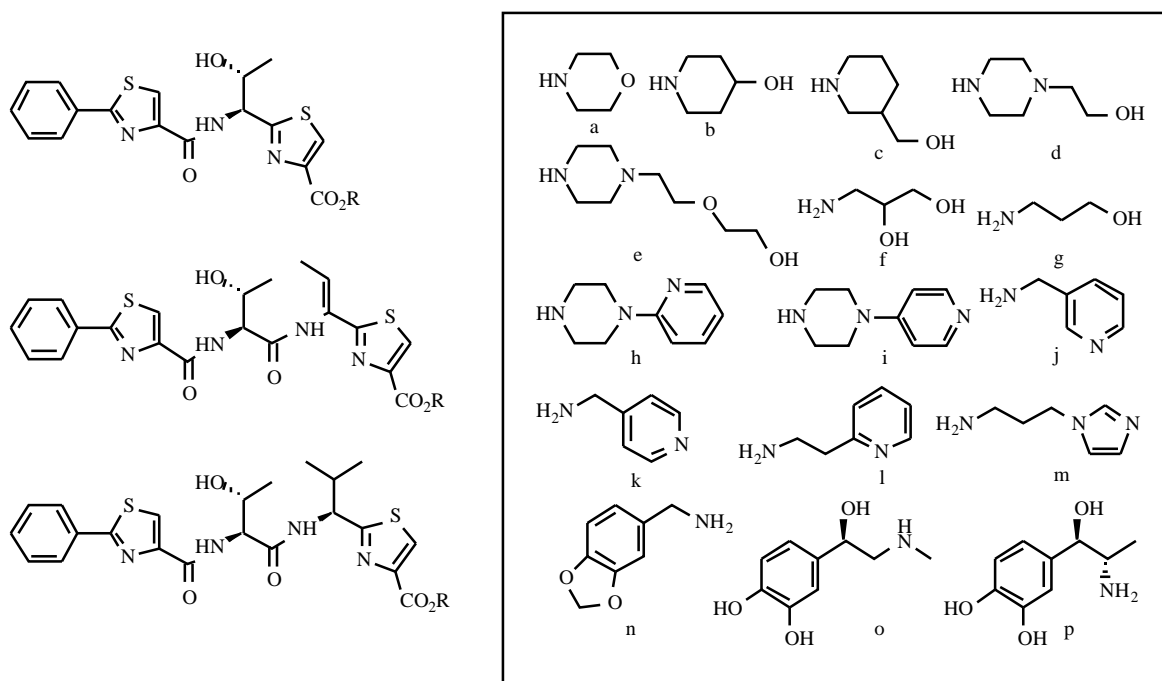
The clinical use of aminoglycosides is hampered both by toxicity problems (nephrotoxicity and ototoxicity) and the development of resistance in important microbial pathogens. In an attempt to overcome these problems, S. Fesik *et al.* have prepared a combinatorial library of aminoglycoside mimetics and screened this library using NMR. For this purpose they prepared large quantities of *Escherichia coli* 16S A-site RNA and looked for small-molecule RNA binders against this RNA target. Compounds with binding affinities ranging from 70  $\mu\text{M}$  to 3  $\mu\text{M}$  were selected as lead compounds. Further synthetic optimization of some of these leads afforded several small-molecule aminoglycoside mimetics that are structurally very different from previously known aminoglycosides [109].

### Tuning the ADME Properties

Tuning the absorption, distribution, metabolic and excretion (ADME) properties is a crucial step in the development



**Fig. (15).** Chemical structure of thioestrepton.



**Fig. (16).** Chemical structure of a library of thioestrepton mimicks.

of any new drug and antibacterial agents are not an exception. What makes the development of a new antibiotic unique is the complexity of the cellular uptake issue. Antimicrobial drug action is limited by both microbial and host membranes [110]. On the one hand, microorganisms possess stringent cell membranes which limit the cellular uptake of antimicrobials [111]. On the other hand, mammalian membranes limit drug distribution and access to intracellular pathogens. Phagocytes, for instance, have been shown to be

capable of sheltering intracellular pathogens from the otherwise lethal action of many antibiotics [112]. The structure-based optimization of the cell-uptake properties of new antibiotics is restrained by our insufficient knowledge of membrane permeability mechanisms at a structural level.

Nevertheless, the development of cell penetrating peptides (CPPs) will have an important impact in the field [113, 114]. Thus, the group of Good in Sweden has been very active studying peptide-mediated delivery into yeasts and

bacteria. They have shown, for instance, that an efficient delivery of green fluorescent protein (GFP) into *Candida albicans* and *S. aureus* using the peptide VLTNENPFSDP fused to the GFP sequence. Another peptide sequence, YKKSNNPFSD, was more efficient for *B. subtilis* and CFFKDEL for *E. coli* [115].

In another series of experiments, they showed how the non-toxic NPFSD peptide, when fused to the ricin A chain toxin (RTA), enhanced both cell uptake and toxicity against *C. albicans*, which like other yeasts is resistant to naked RTA [116]. More recently, in collaboration with Langel's group, the same authors, have shown that some CPPs by themselves can exhibit interesting antimicrobial properties [110]. These last results serve to 'close a circle' with the well recognized translocation properties of several families of natural peptide antibiotics such as proline-rich peptides from the bactericidin family [117] or antimicrobial peptides from amphibian skin such as magainin and buforin [118, 119].

### ESSENTIAL ENZYMES ALREADY KNOWN

Up to the present, a long list of potential new protein targets have been reported, among these are found: enzymes involved in peptidoglycan biosynthesis, tRNA synthetases, dihydropteroate synthase, lipid A biosynthesis, and peptide deformylase. However, these protein targets have not yet resulted from the genomic efforts.

Most of the steps involved in peptidoglycan synthesis have been investigated as potential strategies against cell wall inhibition [120]. The muramyl peptide ligases encoded by murD, murE and murF, involved in the early stages of the peptidoglycan synthesis represent particularly attractive targets for the development of an antibacterial agent. These ligases share some features, which makes it easy to find a common inhibitor and, hence, the emergence of resistance to this new antibacterial agent would be less likely due to the multiple mutation (in all protein targets) to confer resistance to this antibacterial agent. Different derivatives of 2-phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol derivatives have been synthesized and have been evaluated, showing some of them good "in vitro" inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* MurB, MurC and MurD enzymes and antimicrobial activity against Gram-positive bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. However the MICs of these compounds increase to value >128 mg/L when they were determined in the presence of bovine serum albumin [121]. Other compounds derived from phenyl thiazolyl urea and carbamate have also been evaluated as inhibitors of bacterial cell-wall biosynthesis. Many of them demonstrated good activity against MurA and MurB and Gram-positive bacteria. 3,4-difluorophenyl 5-cyanothiazolylurea demonstrated antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [122]. However, the activity of these compounds also decreased in the presence of bovine serum albumin.

Aminoacyl tRNA synthetases are enzymes catalyzing the attachment of the amino acid to specific RNA molecules. The essentiality of these enzymes and, hence, their potentiality as a drug target is shown by the fact that mupirocin (pseudomonic acid), an inhibitor of bacterial isoleucyl tRNA

synthetase [123], shows antibacterial activity. Moreover, the crystal structure of many aminoacyl tRNA synthetases has currently been obtained, and there is a possibility for structure-based design of inhibitors

The outer leaflet of the outer membrane of Gram-negative bacteria is composed mainly of lipopolysaccharide (endotoxin), being lipid A an important part of this molecule. Inhibiting lipid A biosynthesis has been found to be lethal to bacteria [124]. It is important to think that even when antibiotics are effective against severe Gram-negative infections, lipid A may shed from dying bacteria, causing activation of macrophages and endothelial cells, resulting in an overproduction of cytokines and inflammatory mediators which damage microvascular epithelia [125]. The antiendotoxin strategies are: i. Interruption of the synthesis of lipopolysaccharide; ii. Binding and neutralization of its activity; and iii. Prevention of the interaction between lipopolysaccharide and host effector cells. Initial experiences with anti-lipopolysaccharide antibodies were disappointing, but a clinical trial on a new generation of agents is starting. Recent advances have elucidated much of the enzymology involved in LPS biosynthesis. This knowledge has been used to develop several inhibitors of LPS biosynthesis, some having antibacterial activity [126]. An agent inhibiting a deacetylase, encoded in the *envA* gene, which is the second enzyme in lipid A biosynthesis, has been found. This is a chiral hydroxamic acid attached to a 2-phenylloxazoline ring system [127]. Several analogues of this compound are rapidly bactericidal within 4 hours. A bacteriophage has been isolated which infects and disrupts enteric Gram-negative bacteria through the inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis. The phage produces a short nucleotide sequence which functions as an antisense RNA which blocks the production of bacterial enzymes responsible for lipopolysaccharide synthesis [128].

In a recent paper, Dandliker *et al.* [129] reported a novel antibacterial class. Screening a library of compounds in search of ribosome inhibitor, they found an inhibitor showing a structure similar to that of quinolones but presenting a totally different mechanism of action. This inhibitor inhibits protein synthesis by inhibiting ribosomes and this appears to be a new mechanism of action since the strains resistant to this novel inhibitor did not present cross-resistance to other ribosome inhibitors, such as macrolides, chloramphenicol, tetracycline, aminoglycosides or oxazolidinones.

### OTHER APPROACHES

#### Bacteriophages

Phages were early hypothesized as therapeutic agents for combating pathogenic bacteria. However, the discovery and successful use of antibiotics to treat infectious diseases hindered this aim. The development of bacterial resistance to antibacterial agents has recently led researchers to test the possibilities of using phages as therapeutic agents. A lot of work is required mainly from pharmacological and toxicological points of view. However, Fischetti *et al.* [130, 131] have recently used the bactericidal capability of some lytic enzymes encoded in phages to prevent and remove *S.pneumoniae* and *S.pyogenes* from mice. They proposed the name of "enzymbiotics". Recently, new research has examined the mechanisms that bacteriophages use to inhibit bacterial

growth and exploited the findings to identify new small-molecule inhibitors. The research group sequenced the genomes of 43 phages that target three human pathogens, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. By using functional genomics strategies, they identified various antimicrobial proteins produced by the bacteriophages. The proteins were used as “bait” to screen for the cognate bacterial targets. The screen revealed several novel bacterial proteins that are important for microbial growth [132].

### Antisense Agents

These small nucleic acid sequences inhibit gene expression by binding to specific sequences of nucleic acids. Therefore, using this approach to inactivate crucial segments of either DNA or RNA can lead to the death of bacteria. However, two facts limit the use of antisense agents. First of all, the uptake of free oligonucleotides from the extracellular environment is inefficient and second, oligonucleotides rapidly degrade in the cell. Recently, the use of antisense peptide nucleic acids (PNA) conjugated to peptides that can specifically inhibit *E. coli* gene expression and growth [133] has been described. This PNA is a DNA mimic attached to a pseudopeptide backbone that could be used to develop improved antisense agents. Peptides can be used to carry antisense agents into the cell. Overall, antisense oligodeoxyribonucleotides, whose base hybridizes with specific gene transcripts, constitute a new technology for controlling gene expression in prokaryotes and show promise as antimicrobial agents.

Proteins involved in pathogenicity have recently become the focus of a concentrated research program for the development of novel anti-infective drugs. Several targets currently under investigation are associated with bacterial virulence [134]. These targets are unique because their inhibition should interfere with the infection process rather than bacterial growth or viability. One advantage of these non-classical targets is that the use of inhibitors of these targets might not exert selective pressure toward the development of bacterial resistance.

### Adhesines

An important virulence factor in the initial stage of the infection is favoring the adherence to the epithelial or mucosal cell. In Gram-negative bacteria this adherence is mainly carried out by the fimbriae or pilus. A periplasmic chaperone is essential for the production of pilus. Chaperones are proteins that assist the noncovalent assembly and disassembly of protein-containing structures but are not normally components of these structures. Small-molecule inhibitors of the periplasmic chaperone, such as 2-pyridinones, which block some of the functions along the biogenesis pathway, should result in the production of afimbrial bacteria that are unable to adhere to host tissue. The pilus assembly pathway is conserved among the *Enterobacteriaceae* and perhaps all Gram-negative bacteria and the chaperone family share between 25 and 60% homology.

In *S. aureus*, a surface protein called sortase is required to anchor protein A to the cell wall and for virulence [135]. Inhibitors of sortase, such as peptidylchloromethane analogues, might be useful in human infections caused by

Gram-positive bacteria [136]. Over 60 surface proteins from Gram-positive bacteria contain a conserved hexapeptide, LPXTGX, which is cleaved by sortase (proteolytic enzyme) between the residues, threonine and glycine, and linked covalently to the peptidoglycan. Therefore, inhibitors of sortase will result in no anchorage and release of proteins from the cell and prevent adherence to host tissues [137, 138, 139].

### Transduction Systems

Mostly virulence is a response requiring the induction of virulence genes encoding for virulence factors [140]. Two-component signal transduction systems are those linking external stimuli with this response. This system is constituted by at least a histidine protein kinase and a response regulator. Four features make this system attractive as a potential target for antibacterial agents: i. Significant homology is shared among kinase and response regulator proteins of different genera of bacteria, particularly in amino acid residues located near active sites; ii. Pathogenic bacteria use two-component signal transduction to regulate expression of essential virulence factors that are required for survival inside the host. iii. Signal transduction in eukaryotic cells takes place by a different mechanism, and iv. And the most important point is that bacteria contain many two-component systems, and some are involved in the regulation of DNA replication and the cell cycle and hence, are essential for viability [141, 142]. Barrett *et al.* [143] discovered a compound, RWJ-49815, which was a representative of a family of hydrophobic tyramines, that inhibits the growth of Gram-positive bacteria and also inhibits the autophosphorylation of kinase A, one of the components of a two-component system in *B. subtilis*. Therefore, this was thought to be the target for RWJ-49815.

The importance of this approach lies in: 1. If this acts on virulence without affecting viability, it has a limited application; 2. If this acts on a two-component system which is essential for bacteria, it is a good candidate, and 3. It being a co-drug for some antibiotics, for instance: vancomycin resistant phenotype in enterococci associated with the presence of the *vanA* gene is regulated by the *vanR-vanS* two component system. Therefore, the inhibition of this component renders bacteria susceptible again to vancomycin.

The **quorum sensing** signalling system is defined as highly complex chemical communication signals between bacteria. Cell to cell communication molecules regulate biofilm development. For instance, *P. aeruginosa* produce low levels signaling molecules. As the cells form a biofilm, the concentration of these signaling molecules increases triggering changes in the expression of genes, switching on and off. One of the genes switched on is that required for the synthesis of the alginate that makes much of the extracellular matrix. In the depths of the biofilm, where oxygen and nutrients fail to penetrate, bacteria are dormant. These bacteria are protected from treatment by antibacterial agents, which can otherwise control free-living (planktonic) bacteria [144]. An understanding of quorum sensing may lead to new therapeutic strategies.

Limitations of these approaches based on pathogenicity are:

1. Narrow-spectrum of activity since it is designed against a very specific process in a bacterium.
2. Analysis of the pathogenicity inhibitors can not be performed by an easy test such as the determination of the MIC of an antibiotic in the presence of an inhibitor of a mechanism of resistance (*i.e.* -lactamases). Therefore, more cumbersome assays such as tissue culture or animal models should be used.
3. Is the therapy that targets virulence factors likely to be effective? I personally believe that this kind of therapy would not be very effective since it is targeted against very specific molecules, which overall, have already played their role when the onset of the symptoms appears. However, this strategy may have a role in prophylaxis or, more important, as a concomitant administration with an antibacterial agent, for instance if a compound inhibiting the development of the biofilm is discovered, the administration of both, this component plus and antibiotic against the microorganism causing the infection would be very important to control such infection.

### CONCLUDING REMARKS

Although the application of genomics has not yet led to the identification of a novel antibacterial agent, it is a powerful tool for drug discovery and is obvious that genomics, functional genomics, proteomics and combinatorial chemistry have the potentiality to change the manner as antibacterial drugs are discovered. However, the approaches based on the improving of existing antibacterial agents or the classical screening of new antibacterial agents still being very useful in the development of new drugs.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Oscar Peña for his help in the artwork. This work was partially supported by grants FIS02/0353 from Spanish Ministry of Health and by 2002 SGR00121 DURSI (Departament de Universitats, Recerca I Societat de la Informació) of the Generalitat de Catalunya and MCYT-FEDER (BIO2002-2301).

### REFERENCES

- [1] Emerging Infectious Diseases, <http://www.cdc.gov>.
- [2] Gallardo, F.; Ruiz, J.; Marco, F.; Townner, K. J.; Vila, J. *J. Med. Microbiol.*, **1999**, *48*, 367.
- [3] Heurtin-Le Corre, C.; Donnio, P.Y.; Bonnier, M.; Traver, M. F.; Lacourt, A.; Avril, J. L. *Pathol. Biol.* (Paris), **1998**, *46*, 587.
- [4] Marin, M. *Medicina* (Buenos Aires), **2002**, *62* Suppl 2, 30.
- [5] Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T.; Tenover, F. C. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1997**, *40*, 135.
- [6] Tenover, F. C.; Weigel, L. M.; Appelbaum, P. C.; McDougal, L. K.; Chaitram, J.; McAllister, S.; Clark, N.; Killgore, G.; O'Hara, C. M.; Jevitt, L.; Patel, J. B.; Bozdogan, B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 275.
- [7] Vila, J. *Rev. Med. Microbiol.*, **1998**, *9*, 87.
- [8] Biendo, M.; Laurans, G.; Lefebvre, J. F.; Daoudi, F. E. F. *J. Clin. Microbiol.*, **1999**, *37*, 2170.
- [9] Strohl, W.R. *Biotechnology of Antibiotics*, Ed.; William, R.; Strohl. **1997**; 1-47.
- [10] Walsh, F.; Willcock, J.; Amyes, S. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, *52*, 345.

- [11] Li, C.; Nicolau, D. P.; Lister, P. D.; Quintiliani, R.; Nightingale, C. H. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2004**, *53*, 297.
- [12] Danes, C.; Navia, M. M.; Ruiz, J.; Marco, F.; Jurado, A.; Jimenez de Anta, M. T.; Vila, J. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *50*, 261.
- [13] Morandi, F.; Caselli, E.; Morandi, S.; Focia, P. J.; Blazquez, J.; Shoichet, B. K.; Prati, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 685.
- [14] Coleman, K.; Griffin, D. R. J.; Page, J. W. J.; Upshon, P. A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, *33*, 1580.
- [15] Nukaga, M.; Abe, T.; Venkatesan, A. M.; Mansour, T. S.; Bonomo, R. A.; Knox, J. R. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 13152.
- [16] Bonnefoy, A.; Dupuis-Hamelin, C.; Steier, V.; Delachaux, C.; Seys, C.; Stachyra, T.; Fairley, M.; Guitton, M.; Lampilas, M. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2004**, *54*, 410.
- [17] Wyss, P. C.; Gerber, P.; Hartman, P. G.; Hubschwerlen, C.; Locher, H.; Marty, H. P.; Stahl, M. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2304.
- [18] Renau, T. E.; Leger, R.; Flamme, E. M.; Sangalang, J.; She, M. W.; Yen, R.; Gannon, C. L.; Griffith, D.; Chamberland, S.; Lomovskaya, O.; Hecker, S. J.; Lee, V. J.; Ohta, T.; Nakayama, K. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4928.
- [19] Lomovskaya, O.; Warren, M. S.; Lee, A.; Galazzo, J.; Fronko, R.; Lee, M.; Blais, J.; Cho, D.; Chamberland, S.; Renau, T.; Leger, R.; Hecker, S.; Watkins, W.; Hoshino, K.; Ishida, H.; Lee, V. J. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45*, 105.
- [20] Cassell, G. H.; Mekalanos, J. *JAMA*, **2001**, *285*, 601.
- [21] Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 895.
- [22] Berry, A. E.; Chiocchini, C.; Selby, T.; Sosio, M.; Wellington, E. M. H. *FEMS Microb. Lett.*, **2003**, *223*, 15.
- [23] Liles, M. R.; Manske, B. F.; Bintrim, S. B.; Handelsman, J.; Goodman, R. M. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, *69*, 2684.
- [24] MacNeil, I. A.; Tiong, C. L.; Minor, C.; August, P. R.; Grossman, T. H.; Loiacono, K. A.; Lynch, M.; Phillips, T.; Narula, S.; Sundaramoorthi, R.; Tyler, A.; Aldredge, T.; Long, H.; Gilman, M.; Holt, D.; Osburne, M. S. *J. Mol. Micro. Biotechnol.*, **2001**, *3*, 301.
- [25] Gillespie, D. E.; Brady, S. F.; Bettermann, A. D.; Cianciotto, N. P.; Liles, M. R.; Rondon, M. R.; Clardy, J.; Goodman, R. M.; Handelsman, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 4301.
- [26] Christensen, D. J.; Gottlin, E. B.; Benson, R. E.; Hamilton, P. T. *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*, 721.
- [27] Wilson, M.; DeRisi, J.; Kristensen, H. H.; Imboden, P.; Rane, S.; Brown, P. O.; Schoolnik, G. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 12833.
- [28] Adrian, P. V.; Mendrick, C.; Loebenberg, D.; McNicholas, P.; Shaw, K. J.; Klugman, K. P.; Hare, R. S.; Black, T. A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 3101.
- [29] Delgado, M. A.; Rintoul, M. R.; Farías, R. N.; Salomón, R. A. *J. Bacteriol.*, **2001**, *183*, 4543.
- [30] Bruccoleri, R. E.; Dougherty, T. J.; Davison, D. B. *Nucl. Acids. Res.*, **2002**, *30*, 4103.
- [31] McDevitt, D.; Rosenberg, M. *Trends Microbiol.*, **2001**, *9*, 611.
- [32] Hayashi, T.; Makino, K.; Ohnishi, M.; Kurokawa, K.; Ishii, K.; Yokoyama, K.; Han, C.G.; Ohtsubo, E.; Nakayama, K.; Murata, T.; Tanaka, M.; Tobe, T.; Iida, T.; Takami, H.; Honda, T.; Sasakawa, C.; Ogasawara, N.; Yasunaga, T.; Kuhara, S.; Shiba, T.; Hattori, M.; Shinagawa, H. *DNA Res.*, **2001**, *8*, 11.
- [33] Mushegian, A. R.; Koonin, E. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 10268.
- [34] Bruccoleri, R. E.; Dougherty, T. J.; Davison, D. B. *Nucl. Acids. Res.*, **1998**, *26*, 4482.
- [35] Wilding, E. I.; Brown, J. R.; Bryant, A. P.; Chalker, A. F.; Holmes, D. J.; Ingraham, K. A.; Iordanescu, S.; So, C. Y.; Rosenberg, M.; Gwynn, M. N. *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, 4319.
- [36] Moir, D. T.; Shaw, K. J.; Hare, R. S.; Vovis, G. F. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, 439.
- [37] Dubchak, I.; Muehnik, I.; Kim, S. *Microb. Comput. Genomics.*, **1998**, *3*, 171.
- [38] Bogyo, M.; Hurley, J.H. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 2.
- [39] Zhang, C.; Kim, S-H. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 28.
- [40] Graves, P.R.; Haystead, T.A.J. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **2002**, *39*.
- [41] Burley, S.K.; Almo, S.C.; Bonanno, J.B.; Capel, M.; Chance, M.R.; Gaasterland, D.; Lin, D.; Sali, A.; Studier, F. W.; Swaminathan, S. *Nat. Genet.*, **1999**, *23*, 151.
- [42] Eisenstein, E.; Gilliland, G.L.; Herzberg, O.; Moul, J.; Orban, J.; Poljak, R.J.; Banerji, D.; Richardson, D.; Howard, A.J. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2003**, *7*, 2.

- [43] Yee, A.; Chang, X.; Pineda-Lucena, A.; Wu, B.; Semesi, A.; Le, B.; Ramelot, T.; Lee, G.M.; Bhattacharya, S.; Gutierrez, P.; Denisov, A.; Lee, C.-H.; Cort, J.R.; Kozlov, G.; Liao, J.; Finak, G.; Chen, L.; Wishart, D.; Lee, W.; McIntosh, L.P.; Gehring, K.; Kennedy, M.A.; Edwards, A.M.; Arrowsmith, C.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 1825.
- [44] Peitsch, M.C. *Biochem. Soc. Trans.*, **1996**, *24*, 274.
- [45] Peitsch, M.C.; Schwede, T.; Guex, N. *Pharmacogenomics*, **2000**, *1*, 257.
- [46] Bernstein, F.S.; Koetzle, T.F.; Williams, G.J.; Meyer, E.F.; Brice, M.D.; Rodgers, J.R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *J. Mol. Biol.*, **1977**, *112*, 535.
- [47] Aloy, P.; Oliva, B.; Querol, E.; Aviles, F.X.; Russell, R.B. *Prot. Sci.*, **2002**, *11*, 1101.
- [48] Holm, L.; Sander, C. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, *20*, 478.
- [49] Huang, L.; Hung, L.W.; Kim, R.; Kim, S.H. *J. Struct. Funct. Genomics*, **2003**, *In press*.
- [50] Lesley, S.A.; Kuhn, P.; Godzik, A.; Deacon, A.M.; Mathews, I.; Kreuzsch, A.; Spraggon, G.; Klock, H.E.; McMullan, D.; Shin, T.; Vincent, J.; Robb, A.; Brinen, L.S.; Miller, M.D.; McPhillips, T.M.; Miller, M.A.; Scheibe, D.; Canavas, J.M.; Guda, C.; Jaroszewski, L.; Selby, T.L.; Elsliger, M.A.; Wooley, J.; Taylor, S.S.; Hodgson, K.O.; Wilson, I.A.; Schultz, P.G.; Stevens, R.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 11664.
- [51] Böhm, H.-J. *Protein Ligand Interactions*; Ed.; Schneider: Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [52] Lybrand, T.P. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1995**, *5*, 224.
- [53] Thormann, M.; Pons, M. *J. Comput. Biol.*, **2001**, *22*, 1971.
- [54] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. *Nucl. Acids Res.*, **2000**, *28*, 235.
- [55] Protein Data Bank Annual Report. **2003**.
- [56] Blake, C.C.F.; Koenig, D.F.; Mair, G.A.; North, A.C.T.; Phillips, D.C.; Sarma, V.R. *Nature*, **1965**, *206*, 757.
- [57] Deisenhofer, J. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 2361.
- [58] Jones, T.A.; Liljas, L. *J. Mol. Biol.*, **1984**, *177*, 735.
- [59] Toyoshima, C.; Nomura, H. *Nature*, **2002**, *418*, 605.
- [60] Guilloteau, J.P.; Mathieu, M.; Giglione, C.; Blanc, V.; Dupuy, A.; Chevrier, M.; Gil, P.; Famechon, A.; Meinel, T.; Mikol, V. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 951.
- [61] Hu, X.; Nguyen, K. T.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Pei, D. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3771.
- [62] Qiu, X.; Janson, C.A.; Konstantinidis, A.K.; Nwagwu, S.; Silverman, C.; Smith, W.W.; Khandekar, S.; Lonsdale, J.; Abdel-Meguid, S. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 36465.
- [63] Hon, W.C.; McKay, G.A.; Thompson, P.R.; Sweet, R.M.; Yang, D.S.; Wright, G.D.; Berghuis, A.M. *Cell*, **1997**, *89*, 887.
- [64] Burk, D.L.; Hon, W.C.; Leung, A.K.-W.; Berghuis, A.M. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8756.
- [65] Wright, G.D.; Berghuis, A.M.; Mobashery, S. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1998**, *456*, 27.
- [66] Sucheck, S.J.; Wong, C.H. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *4*, 678.
- [67] Orozco, M.; Perez, A.; Noy, A.; Luque, F.J. *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, *32*, 350.
- [68] Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. *Science*, **2000**, *289*, 905.
- [69] Schluenzen, F.; Tocilj, A.; Zarivach, R.; Harms, J.; Gluehmann, M.; Janell, D.; Bashan, A.; Bartels, H.; Agmon, I.; Franceschi, F.; Yonath, A. *Cell*, **2000**, *407*, 327.
- [70] Toyoshima, C.; Nomura, H. *Nature*, **2002**, *418*, 605.
- [71] Knowles, D.J.C.; Foloppe, N.; Matassova, N.B.; Murchie, A.I.H. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2002**, *2*, 501.
- [72] Ogle, J.M.; Brodersen, D.E.; Clemons, W.M.Jr.; Tarry, M.J.; Carter, A.P.; Ramakrishnan, V. *Science*, **2001**, *292*, 897.
- [73] Vincens, Q.; Westhof, E. *Structure*, **2001**, *9*, 647.
- [74] Douthwaite, S.; Champney, W.S. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *48*, 1.
- [75] Constantine, K.L.; Mueller, L.; Huang, S.; Abid, S.; Lam, K.S.; Li, W.; Leet, J.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 7284.
- [76] Wimberly, B.T.; Guymon, R.; McCutcheon, J.P.; White, S.W.; Ramakrishnan, V. *Cell*, **1999**, *97*, 491.
- [77] Henry, C.M. *Chem. Eng. News*, **2001**, *79*, 69.
- [78] Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 4759.
- [79] Gane, P.J.; Dean, P.M. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, 401.
- [80] Hoffmann, D.; Kramer, B.; Washio, T.; Steinmetz, T.; Rarey, M.; Lengauer, T. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4422.
- [81] Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.*, **1996**, *261*, 470.
- [82] Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1977**, *11*, 369.
- [83] Kuntz, I.D.; Blaney, J.M.; Oatley, S.J.; Langridge, R.; Ferrin, T.E. *J. Mol. Biol.*, **1982**, *161*, 269.
- [84] Shoichet, B.K.; Kuntz, I.D. *Prot. Eng.*, **1993**, *6*, 723.
- [85] Garrett, M.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. *J. Comput. Chem.*, **1978**, *19*, 1639.
- [86] Goodsell, D.S.; Olson, A.J. *Prot. Struct. Func. Genet.*, **1990**, *8*, 195.
- [87] Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Huey, R.; Olson, A.J. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1996**, *10*, 293.
- [88] Teague, S.J. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2003**, *2*, 527.
- [89] Verkhivker, G.M.; Bouzida, D.; Gehlhaar, D.K.; Rejto, P.A.; Arthurs, S.; Colson, A.B.; Freer, S.T.; Larson, V.; Luty, B.A.; Marrone, T.; Rose, P.W. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **2000**, *14*, 369.
- [90] Carlson, H.A. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 447.
- [91] Verkhivker, G.M.; Bouzida, D.; Gehlhaar, D.K.; Rejto, P.A.; Freer, S.T.; Rose, P.W. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, *12*, 197.
- [92] Gillet, V.; Jonson, A.P.; Mata, P.; Sike, S.; Williams, P. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1993**, *7*, 127.
- [93] Bhom, H.J. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1992**, *6*, 61.
- [94] Honma, T.; Banyo, T. *Med. Res. Rev.*, **2003**, *23*, 606.
- [95] Belda, I.; Llorca, X.; Piqueras, M.G.; Teixido, M.; Nicolas, E.; Giralt, E. *IlligAL Report No. 2003005*, **2003**, *1*.
- [96] Teixido, M.; Belda, I.; Roselló, X.; González, S.; Fabre, M.; Llorca, X.; Bacardit, J.; Garrell, J.M.; Vilarió, S.; Albericio, F.; Giralt, E. *QSAR & Comb. Sci.*, **2003**, *7*, 745.
- [97] Pegg, S.C.-H.; Haresco, J.J.; Kuntz, I.D. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **2001**, *15*, 911.
- [98] Budin, N.; Majeux, N.; Tenette-Souaille, C.; Cafisch, A. *J. Comput. Chem.*, **2001**, *16*, 1956.
- [99] Martinell, M.; Salvatella, X.; Belda, I.; Llorca, X.; Pastor, J.J.; Vilaseca, M.; Gairí, M.; Giralt, E. *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*; Ed.; Chorev, M. & Sawyer, T.K., American Peptide Society, **2002**.
- [100] Patel, S.; Stott, I.; Bhakoo, M.; Elliott, P. *Patenting Evolved Bactericidal Peptides*, in: Bentley, P.J., Corne, D. W., Eds.; Morgan Kaufmann Publishers, Creative Evolutionary Systems, **2001**, 525.
- [101] Jung, G. Ed. *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries-A Handbook*, VCH, Ed.; Weinheim, **1996**.
- [102] Sucholeiki, I. Ed. *High-Throughput Synthesis. Principles and Practices*, Marcel Dekker, Inc. New York, **2001**.
- [103] Beck-Sickinger, A. *Combinatorial Strategies in Biology and Chemistry*, Wiley, Chichester, **2001**.
- [104] Wijkman, J.C.H.M.; Beckett, R.P. *Drug Discov. Today*, **2002**, *7*, 126.
- [105] Bower, J.; Drysdale, M.; Hebdon, R.; Jordan, A.; Lentzen, G.; Matassova, N.; Murchie, A.; Powles, J.; Roughley, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2455.
- [106] Xing, Y.; Draper, D.E. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 1581.
- [107] Lentzen, G.; Klinck, R.; Matassova, N.; Aboul-ela, F.; Murchie, A.I.H. *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 769.
- [108] Salvatella, X.; Giralt, E. *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, *6*, 365.
- [109] Yu, L.; Oost, T.K.; Schkeryantz, J.M.; Yang, J.; Janowick, D.; Fesik, S.W. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4444.
- [110] Nekhotiaeva, N.; Elmquist, A.; Rajarao, G.K.; Hällbrink, M.; Langel, U.; Good, L. *FASEB J.*, **2004**, *18*, 394.
- [111] Hancock, R.E.; Rozek, A. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2002**, *206*, 143.
- [112] Schwab, J.C.; Mandell, G.L. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **1989**, *3*, 461.
- [113] Fernández-Carneado, J.; Kogan, M.J.; Castel, S.; Giralt, E. *Ang. Chemie.*, **2004**, *in press*.
- [114] Fernández-Carneado, J.; Kogan, M.J.; Pujals, S.; Giralt, E. *Biopolymers (Pep. Sci.)* **2004**, *in press*.
- [115] Rajarao, G.K.; Nekhotiaeva, N.; Good, L. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2002**, *215*, 267.
- [116] Rajarao, G.K.; Nekhotiaeva, N.; Good, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *301*, 529.
- [117] Sadler, K.; Eom, K.D.; Yang, J.-L.; Dimitrova, Y.; Tam, J.P. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 14150.
- [118] Takeshima, K.; Chikushi, A.; Lee, K.K.; Yonehara, S.; Matsuzaki, K. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 1310.



- [119] Rinaldi, A.C. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 799.
- [120] Katz, A. H.; Caufield, C. E. *Curr. Pharm. Des.*, **2003**, *9*, 857.
- [121] Li, Z.; Francino, G. D.; Hu, W.; Labthavikul, P.; Petersen, P. J.; Severin, A.; Singh, G.; Yang, Y.; Rasmussen, B.A.; Lin, Y-I.; Skotnichi, J.S.; Mansour, T.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 1591.
- [122] Francino, G.D.; Li, Zong.; Albright J. D.; Endy, N.H.; Katz, A.H.; Petersen, P. J.; Labthavikul, P.; Singh, G.; Yang, Y.; Rasmussen, B. A.; Lin, Y-I.; Mansour, T.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 235.
- [123] Tao, J.; Schimmel, P. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **2000**, *9*, 1767.
- [124] Alexander, C.; Rietschel, E. T. J. *Endotoxin Res.*, **2001**, *7*, 167.
- [125] Ulevitch, R. J.; Tobias, P. S. *Annu. Rev. Immunol.*, **1995**, *13*, 437.
- [126] Yethon, J. A.; Whitfield, C. *Curr. Drug-Target Infect. Dis.*, **2001**, *1*, 91.
- [127] Onishi, H. R. ; Pelak, B. A.; Gerckens, L. S.; Silver, L. L.; Kahan, F. M. ; Chen, M. H. ; Patchett, A. A. ; Galloway, S. M. ; Hyland, S.A. ; Anderson, M. S.; Raetz, C. R. *Science*, **1996**, *274*, 980.
- [128] Mamat, U.; Rietschel, E. T. ; Schmidt, G. *Mol. Microbiol.*, **1995**, *15*, 1115.
- [129] Dandliker, P. J.; Pratt, S. D.; Nilius, A. M.; Black-Schaefer, C.; Ruan, X.; Towne, D. L.; Clark, R. F.; Englund, E. E.; Wagner, R.; Weitzberg, M.; Chovan, L. E.; Hickman, R. K.; Daly, M. M.; Kakavas, S.; Zhong, P.; Cao, Z.; David, C. A.; Xuei, X.; Lerner, C. G.; Soni, N. B.; Bui, M.; Shen, L. L.; Cai, Y.; Merta, P. J.; Saiki, A. Y. C.; Beutel B. A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47*, 3831.
- [130] Nelson, D. ; Loomis, L. ; Fischetti, V. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 4107.
- [131] Loeffler, J. M. ; Nelson, D. ; Fischetti, V. A. *Science*, **2001**, *294*, 2170.
- [132] Wu, J. J.; Liu, J.; Dehbi, M.; Moeck, G.; Arhim, F.; Callejo, M.; Dixit, D.; Ha, N.; Kwan, T.; Sirois, S.; Srikumar, R.; Williams, D. 43rd ICAAC Abstracts, ASM, **2003**, 221.
- [133] Good, L.; Awasthi, S. K.; Dryselius, R.; Larsson, O.; Nielsen, P. E. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 360.
- [134] Alksne, L. E. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **2002**, *11*, 1149.
- [135] Ilangovan, U.; Ton-That, H.; Iwahara, J.; Schneewind, O.; Clubb, R. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 6056.
- [136] Ton-That, H.; Liu, G.; Mazmanian, S. K.; Faull, K. F.; Schneewind, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 12424.
- [137] Schneewind, O. ; Mihaylova-Petkov, D. ; Model, P. *EMBO J.*, **1993**, *12*, 4803.
- [138] Schneewind, O. ; Fowler, A. ; Faull, K. F. *Science*, **1995**, *268*, 103.
- [139] Schneewind, O. ; Model, P. ; Fischetti, V. A. *Cell*, **1992**, *70*, 267.
- [140] Stock, A.M.; Robinso, V.L.; Goudreau, P.N. *Ann. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 183.
- [141] Hecht, G.B.; Lane, T. ; Ohta, N. ; Sommer, J. M. ; Newton, A. *EMBO J.*, **1995**, *14*, 3915.
- [142] Quon, K. C.; Marcznski, G. T. ; Shapiro, L. *Cell*, **1996**, *84*, 83.
- [143] Barrett, J. F.; Goldschmidt, R. M.; Lawrence, L. E.; Foleno, B.; Chen, R.; Demers, J. P.; Johnson, S.; Kanojia, R.; Fernandez, J.; Bernstein, J.; Licata, L.; Donetz, A.; Huang, S.; Hlasta, D. J.; Macielag, M. J.; Ohemeng, K.; Frechette, R.; Frosco, M. B.; Klaubert, D. H.; Whiteley, J. M.; Wang, L.; Hoch, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 5317.
- [144] Hartman, G., Wise, R. *Lancet*, **1998**, *351*, 848.



## **OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

---



## 6 OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Desde la introducción en terapéutica, en la década de los 60, del ácido nalidíxico y sus derivados, que conformaron en su día la primera generación de quinolonas antibacterianas, se han sintetizado y utilizado en clínica varios compuestos químicamente relacionados cada vez más efectivos, uno de los más representativos de los cuales es, sin duda, el ciprofloxacino.

Desafortunadamente, desde la aparición de las quinolonas, las resistencias bacterianas a las mismas han evolucionado de forma paralela. Conforme han ido apareciendo nuevas moléculas con mayor capacidad bactericida y mejores parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos, también se han ido identificando nuevos y más sofisticados mecanismos de resistencia, que se han ido adaptando a las necesidades de cada momento. Es por ello que se hace necesaria una nueva metodología para el diseño y la síntesis de nuevos agentes antibacterianos con el objetivo de aumentar su potencia antibacteriana y, al mismo tiempo, disminuir la probabilidad de generar a corto plazo nuevos mecanismos de resistencia. Con este fin, es fundamental conocer todos los mecanismos de resistencia y cuál es, en detalle, su mecanismo de acción, para poder diseñar nuevas moléculas capaces de, manteniendo su capacidad bactericida, eludir dichos mecanismos.

Por otro lado, y en colaboración con el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona y los laboratorios CENAVISA, se diseñaron y sintetizaron diversas moléculas derivadas de la estructura química de ciprofloxacino y norfloxacino. Estudiamos el comportamiento de estas nuevas moléculas desde el punto de vista farmacodinámico (actividad antimicrobiana sobre diferentes especies patógenas, convenientemente seleccionadas, medida *in vitro* por su concentración mínima

inhibidora, CMI) y a continuación, utilizando la molécula con mejor actividad antibacteriana procedimos, en colaboración con el Servicio de Medicina Experimental del Hospital Virgen del Rocío y el Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de la Macarena, a llevar a cabo estudios farmacocinéticos *in vivo* de la molécula UB-8902.

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

- 1- Investigar las bases moleculares de los mecanismos de resistencia a quinolonas en bacterias Gram-negativas. En concreto, en *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Citrobacter freundii*.
- 2- Investigar el modelo de interacción entre ADN-ADN girasa-quinolona.
- 3- Diseño, síntesis y evaluación de derivados de ciprofloxacino y norfloxacino, frente a bacterias Gram-negativas.

Creemos que los resultados obtenidos justifican plenamente la presentación y defensa de esta Memoria y señalan la conveniencia de realizar estudios más profundos, especialmente en lo que atañe al íntimo conocimiento de los mecanismos de resistencia de bacterias Gram-negativas, para a partir de ahí, contribuir al diseño y desarrollo de nuevas quinolonas.

## **RESULTADOS**

---





## 7 RESULTADOS

### 7.1 Mecanismos de Resistencia a Quinolonas

#### 7.1.1 Resultados adicionales

#### 7.1.2 Cambios en la expresión de sistemas de expulsión activa y porinas asociados con la resistencia a quinolonas en dos cepas isogénicas de *E. coli*

Existen diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencias frente a las fluoroquinolonas. Los más estudiados y de los que se dispone mayor información son, como ya se ha comentado en la introducción, los relacionados con las mutaciones en los genes diana de las quinolonas (ADN girasa y topoisomeras II). Otras mutaciones, que pueden afectar a la acumulación de las quinolonas en el interior de la bacteria incluyen a aquellas que afectan la expresión de las porinas, y las que afectan a los mecanismos de expulsión activa de estos antimicrobianos fuera de la bacteria.

En un estudio previo, Tavío *et al.* (178) analizaron el papel de algunos mecanismos, actualmente descritos, en la adquisición de resistencia a quinolonas. Para ello generaron 18 cepas mutantes de *E. coli*, mediante exposición a concentraciones crecientes de norfloxacin y lomefloxacin. Posteriormente, se analizaron las diferencias y similitudes entre cada cepa mutante y su respectiva cepa original, para clarificar el papel de las mutaciones en las enzimas diana, la permeabilidad y la expulsión activa, en el desarrollo de la resistencia a fluoroquinolonas.

Una de estas parejas fue la constituida por las cepas PS5 y NorE5, cuyas principales características, en lo que se refiere a la resistencia a fluoroquinolonas, se muestran en la tabla 7.1.2.1. Se trataba de dos cepas isogénicas con diferente CMI frente

a norfloxacino y que presentaban, una mutación en el gen *gyrA* en el caso de PS5 y una doble mutación, una en el gen *gyrA* y otra en el gen *parC* en el caso de NorE 5. En este trabajo encontraron que NorE5 no expresaba la porina OmpF y que además presentaba una menor acumulación de norfloxacino en el interior celular, la cual se doblaba al tratar la bacteria con carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP), un desacoplador metabólico que disipa la energía de la célula, lo cual indicaba que la acumulación era dependiente de un mecanismo energético, posiblemente relacionado con un mecanismo de expulsión activa (colapsado por la presencia de CCCP) que bombeaba activamente norfloxacino fuera de la bacteria.

En este trabajo nos planteamos, mediante diferentes enfoques, poner de manifiesto la existencia de los diferentes mecanismos de resistencia a quinolonas que afectaban tanto a la permeabilidad de la membrana como a los mecanismos de expulsión activa.

Tabla 7.1.2.1 Características de las cepas isogénicas PS5 y NorE5

Cepa	CMI norfloxacino ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Mutaciones		Cantidad de norfloxacino acumulada (mg/mg proteína)		
		<i>gyrA</i> (Ser-83)	<i>parC</i> (Ser-80)	sin CCCP	con CCCP	Diferencia cccp-sin CCCP
PS5	0,5	Leu	-	$0,147 \pm 0,04$	$0,199 \pm 0,06$	0,052
NorE5	32	Leu	Arg	$0,038 \pm 0,02$	$0,231 \pm 0,10$	0,193

En una primera aproximación se compararon los patrones de expresión génica entre ambas cepas mediante la utilización de chips de ADN (**Artículo II**). Mediante esta técnica es posible comparar la expresión de multitud de genes entre diferentes cepas, y de esta manera, en nuestro caso podemos inferir que los genes que presentan disminuida o aumentada su expresión, ya sea en EMP5 o en NorE5, pueden estar implicados en los mecanismos de resistencia frente a las quinolonas. De esta manera se pudieron caracterizar una serie de genes que presentaban diferentes niveles de expresión

en cada una de las cepas (Tabla 7.1.2.2). Los resultados mostraron la sobreexpresión de diferentes genes, lo cuales codifican proteínas involucradas en la permeabilidad de la membrana así como otras integrantes de sistemas de expulsión activa. Sin embargo, otros genes como *tolC*, no mostraron cambios en su expresión.

Tabla 7.1.2.2. Estudio mediante chips de ADN

<b>Expresión incrementada en NorE5</b>	
Factor de transcripción	<i>soxS</i>
Factor de transcripción	<i>marA</i>
Potencial proteína reguladora	<i>yhjB</i>
Sistema de expulsión acridina	<i>acrAB</i>
Potencial proteína transporte	<i>ydhE</i>
Proteína transportadora	<i>yceE</i>
Proteína membrana externa	b1377
Proteína membrana	b1629
<b>Expresión disminuida en NorE5</b>	
Proteína membrana externa	<i>ompF</i>

En la siguiente etapa de este trabajo nos propusimos analizar la expresión proteica en cada cepa, con el fin de identificar proteínas que pudieran relacionarse con la resistencia a fluoroquinolonas. Se llevó a cabo una purificación de proteínas de membrana externa en cada una de las cepas y se compararon sus patrones de expresión mediante electroforesis bidimensional. Las proteínas que significativamente aumentaban o disminuían su expresión fueron entonces caracterizadas mediante digestión con tripsina y análisis mediante espectrometría de masas (MALDI TOF-TOF)

(110). Como resultado de estos estudios pusimos de manifiesto la disminución en la expresión de OmpF, así como el incremento en la expresión de la proteína TolC, integrante del sistema de expulsión activa AcrAB-TolC, en la cepa NorE5 (Figura 7.1.2.1).

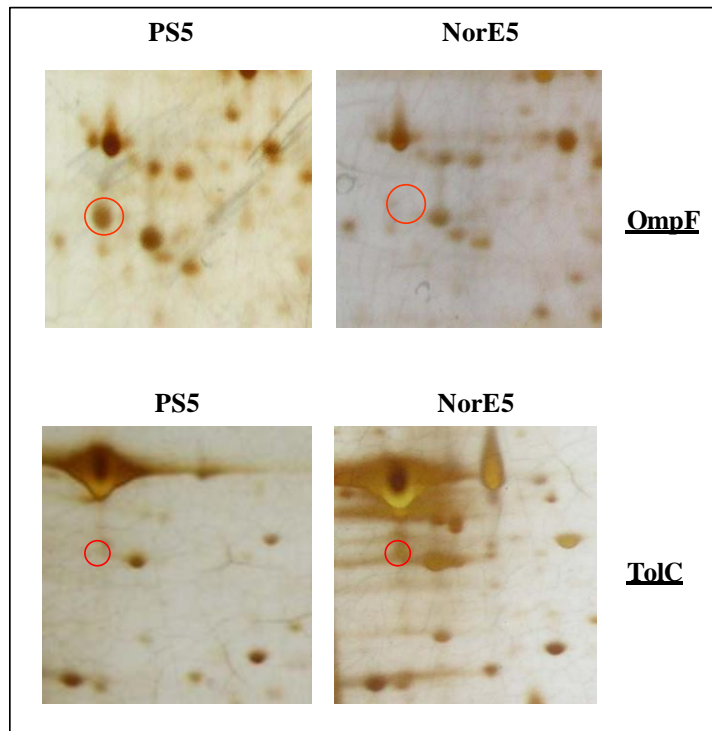


Figura 7.1.2.1. Electroforesis bi-dimensional (detalle)

Para terminar, quisimos poner de manifiesto la sobreexpresión de las proteínas AcrA y AcrB en la cepa NorE5 respecto de la cepa PS5, para lo cual utilizamos la técnica de RT-PCR, mediante la cual se analiza el nivel de expresión del ARN (**Artículo II**). Se utilizaron cebadores específicos para los genes *acrA* y *acrB*; *facra* (5'-CCTCAGGTTAGCGGGATTAT-3') y *racart* (5'-GATTGATGCGTGCAGTTTCTA-3') para *acrA*, y *facbrt* (5'-TTCGGCTTCTCAATAAATACCC-3') y *racbrt* (5'-GCCATCGCGGAAACAAT-3')

para *acrB*. Como control interno de expresión se utilizó el gen *gapA*, un gen de expresión constitutiva en *E. coli*. Como se muestra en la Figura 7.1.2.2, ambos genes presentaban una expresión claramente superior en la cepa NorE5.

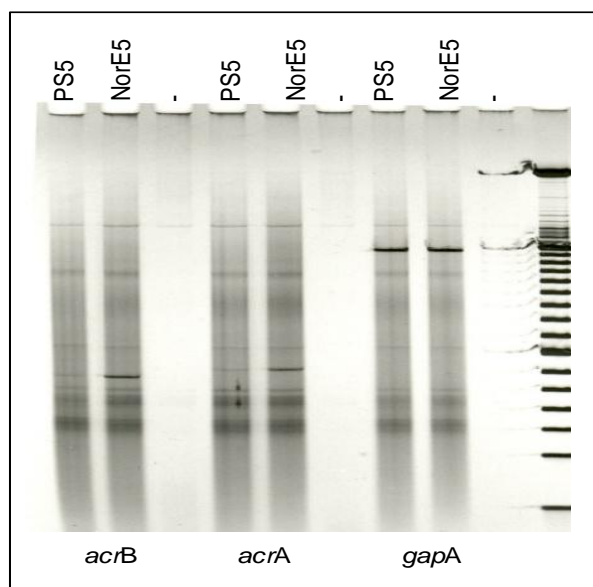


Figura 7.1.2.2. RT-PCR de los genes *acrA* y *acrB*

En esta parte inicial de nuestro trabajo quisimos confirmar mediante diferentes aproximaciones, genómicas y proteómicas, que los mecanismos de resistencia involucrados en la resistencia a quinolonas en *E. coli* se deben principalmente, a las mutaciones en los genes diana de estas quinolonas, y que además, los mecanismos implicados en la acumulación de estos fármacos en el interior de *E. coli* juegan un papel fundamental en la modulación final del nivel de resistencia a quinolonas. Así pues, partimos de que una mutación en el gen *gyrA* de *E. coli* genera niveles elevados de resistencia frente al ácido nalidíxico, pero sin embargo, es necesaria una segunda mutación en el gen *parC* para generar resistencia frente a fluoroquinolonas. Además, dependiendo de la afinidad tanto de las porinas como de los sistemas de expulsión

activa por las diferentes fluoroquinolonas, se alcanzarán valores variables de resistencia a quinolonas (178).

**7.1.3 Artículo I.** Clonal dissemination of a *Yersinia enterocolitica* strains, with various susceptibilities to nalidixic acid

**Clonal dissemination of a *Yersinia enterocolitica* strains, with various susceptibilities to nalidixic acid**

Javier Sánchez-Céspedes, Margarita M. Navia, Rocío Martínez, Beatriz Orden, Rosario

Millán, Joaquín Ruíz and Jordi Vila

*J. Clin. Microbiol.*, 2003, 1769-1771

El objetivo de este trabajo fue estudiar las relaciones epidemiológicas existentes en 10 aislamientos clínicos de *Yersinia enterocolitica* sensibles y resistentes al ácido nalidíxico y sus mecanismos de resistencia a quinolonas. Se estudiaron 10 cepas de *Y. enterocolitica* procedentes de heces de pacientes con diarrea en la Comunidad de Madrid (Laboratorio de Argüelles). El análisis epidemiológico se realizó mediante la digestión del ADN cromosómico, utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y su posterior separación en campo pulsante (PFGE) y mediante REP-PCR. La susceptibilidad al ácido nalidíxico se determinó mediante microdilución. Por último, el estudio de las mutaciones existentes en *gyrA* y *parC* se realizó mediante la amplificación de la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) de dichos genes y su posterior secuenciación. Tanto mediante campo pulsado como mediante REP-PCR, se obtuvieron patrones similares de todas estas cepas con no más de una variación entre ellos. Todas estas cepas, aisladas a lo largo de ocho meses se encontraron diseminadas en ocho poblaciones de la Comunidad de Madrid. Seis de las cepas analizadas se mostraron resistentes al ácido nalidíxico. Todas ellas presentaban mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) del gen *gyrA*: cuatro cepas con una mutación en el codón del aminoácido Ser-83 que producía

un cambio a Arg, una cepa con un cambio de Ser-83 a Ile y una última cepa con la variación Asp-87 a Tyr. No se detectaron mutaciones en *parC*. La resistencia al ácido nalidíxico presentada por estas cepas viene definida por la presencia de mutaciones en el gen *gyrA*. Los resultados muestran la expansión clonal de una cepa Nal<sup>R</sup> derivada de una cepa sensible probablemente por presión selectiva con fluoroquinolonas.



## Clonal Dissemination of *Yersinia enterocolitica* Strains with Various Susceptibilities to Nalidixic Acid

Javier Sánchez-Céspedes,<sup>1</sup> Margarita M. Navia,<sup>1</sup> Rocío Martínez,<sup>2</sup> Beatriz Orden,<sup>2</sup>  
Rosario Millán,<sup>2</sup> Joaquín Ruiz,<sup>1</sup> and Jordi Vila<sup>1\*</sup>

*Servei de Microbiologia, Institut Clínic Infeccions i Immunologia, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona,<sup>1</sup> and C. E. Argüelles Microbiology Laboratory, Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28008 Madrid,<sup>2</sup> Spain*

Received 13 September 2002/Returned for modification 18 October 2002/Accepted 7 January 2003

**Ten epidemiologically related *Yersinia enterocolitica* clinical isolates were studied. Six isolates were nalidixic acid resistant (MIC > 512 µg/ml), with mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of the *gyrA* gene, suggesting clonal dissemination of a nalidixic acid-susceptible *Y. enterocolitica* strain which has acquired different mutations generating resistance to nalidixic acid.**

*Yersinia enterocolitica* is a gram-negative bacillus mainly causing gastrointestinal infection. Antibiotics are usually not required for gastrointestinal disease; however, they are necessary for treating systemic infections in immunocompromised patients (4). Fluoroquinolones show good in vitro activity against this microorganism (3). The main purpose of this study was to investigate the epidemiological relationship and the mechanisms of resistance to quinolones among 10 nalidixic acid-resistant and nalidixic acid-susceptible *Y. enterocolitica* clinical isolates.

From July 2000 to March 2001, 31 *Y. enterocolitica* strains recovered from outpatients from the so-called Sixth Area of Madrid were isolated at the C. E. Argüelles Microbiology Laboratory (Hospital Universitario Puerta de Hierro). This area includes some neighborhoods in Madrid and nearby towns, the farthest being Collado Villalba, 40 km from Madrid. Ten of these 31 strains were studied. Bacterial strains were isolated in cefsulodin-irgasan-novobiocin agar and identified by biochemical techniques. All clinical strains analyzed are shown in Table 1. The control strains 37DV and 66599 used in this study were isolated in the Hospital Clinic, Barcelona, Spain, far from Madrid. Serotyping was performed by the slide agglutination test with commercial antisera (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, France). The PCR amplification of the *yst* gene was carried out with primers 1a (5'-AAA GAT AGT TTT TGT TCT TGT-3') and 1b (5'-GCA GCC AGC ACA CGC GGG-3') under the following conditions: 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C and a final extension at 65°C for 16 min. All the strains belonged to serotype O:3, the most prevalent in Spain (9), and presented the chromosomal gene *yst*, which encodes a heat-stable enterotoxin (4).

Antibiotic susceptibility was determined by the microdilution method according to the NCCLS guidelines (12). MICs of nalidixic acid and ciprofloxacin are shown in Table 1.

Epidemiological analysis was performed by two different methods. The first was analysis of chromosomal DNA by di-

gestion with low-frequency restriction enzymes (*ApaI* and *XhoI*) followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) under conditions previously described (7, 9), although changes were introduced in the original protocol to optimize the technique for *Y. enterocolitica*. We added 20 mM thiocyanate to the TE-1 buffer to inhibit the powerful DNase of *Y. enterocolitica*. Electrophoretic conditions were also modified as follows: initial switch time, 5 s; final switch time, 8 s; run time, 20 h; gradient, 6.0 V/cm; temperature, 14°C. The second method was repetitive-extragenic-palindrome PCR (REP-PCR) using the conditions previously described by Navia et al. (13). Tenover's criteria were used to define the relationship among the studied strains, which were analyzed by PFGE (16). When PFGE was performed on the DNA after digestion with *ApaI*, 10 similar patterns, differing in no more than three bands, were found among all the strains. When *XhoI* was used, 9 of the 10 strains showed the same pattern, whereas for strain 915892 there was a loss of one band. In both cases the two control strains presented totally different patterns. All the patterns resulting from REP-PCR were identical but differed from those for the control strains (Table 1). The epidemiological studies clearly showed a close epidemiological relationship among the analyzed strains. The PFGE method has been extensively used to analyze the epidemiological relationship among strains of *Y. enterocolitica* (1, 6, 8, 11). In our study the same discriminatory power for both REP-PCR and PFGE was observed. Thus, the speed and ease of REP-PCR make it useful for analyzing the epidemiological relationship among *Y. enterocolitica* strains.

Mutations in the *gyrA* and *parC* genes were studied by PCR amplification of their quinolone resistance-determining regions (QRDR). To amplify the *gyrA* gene, consensus primers were designed upon comparison of the *gyrA* gene sequences from *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* (*gyrAY1*, 5'-CGC GTA CTG TTT GCG ATG AA-3'; *gyrAY2*, 5'-CGG AGT CAC CAT CGA CGG AA-3'); to amplify the *parC* gene, the primers *parC* 1 (5'-CGC GAC GGC CTG AAG CCG GTG CA-3') and *parC* 2 (5'-GCC GTC GCG CGA ACC GAA G-3') were used. The PCR and DNA sequencing conditions for both reactions have been described elsewhere (18).

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Hospital Clínic, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34.93.2275522. Fax: 34.93.2275454. E-mail: vila@medicina.ub.es.

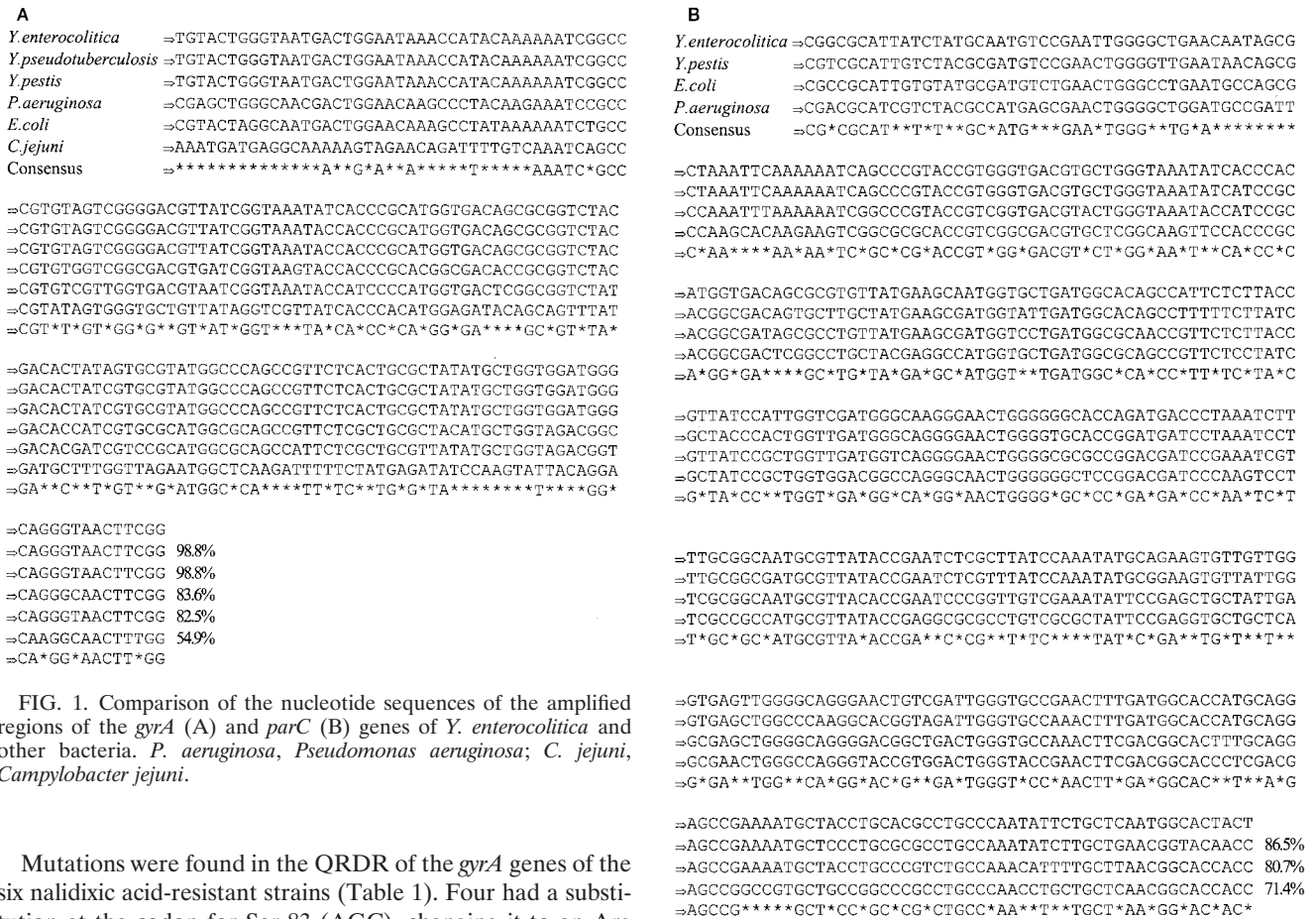


FIG. 1. Comparison of the nucleotide sequences of the amplified regions of the *gyrA* (A) and *parC* (B) genes of *Y. enterocolitica* and other bacteria. *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *C. jejuni*, *Campylobacter jejuni*.

Mutations were found in the QRDR of the *gyrA* genes of the six nalidixic acid-resistant strains (Table 1). Four had a substitution at the codon for Ser-83 (AGC), changing it to an Arg codon (two to AGG and two to AGA). The fifth strain exhibited a mutation in the same codon producing a change from Ser-83 to Ile (ATC). The remaining strain presented a mutation in the codon for amino acid Asp-87 which changed it to a Tyr codon (TAC). Mutations in the *parC* genes were not found in any of the studied strains. Our results agree with those for *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in which a mutation at the codon for amino acid Ser-83 is the most frequently found among clinical isolates, being related to a moderate level

of resistance to fluoroquinolones but high levels of resistance to nalidixic acid (14, 15, 19). This is the first time these QRDR have been sequenced in *Y. enterocolitica*, and they show a high similarity to those of *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis*. The percentages of DNA sequence similarity between the *gyrA* and *parC* genes of *Y. enterocolitica* and those of other microorganisms are shown in Fig. 1.

TABLE 1. Characteristics of *Y. enterocolitica* clinical isolates

Strain	Date of isolation	Place of isolation	MIC (µg/ml) of:		PFGE pattern <sup>c</sup>		REP-PCR pattern	Serotype	GyrA QRDR amino acid at position <sup>d</sup> :	
			CIP <sup>a</sup>	NAL <sup>b</sup>	<i>Xho</i> I	<i>Apa</i> I			83	87
892287	July 00	Las Matas	0.5	>512	A	B	C	O:3	Arg (AGG)	Asp
854820	Aug. 00	Collado Villalba	0.5	512	A	B	C	O:3	Arg (AGG)	Asp
836314	Sep. 00	Aravaca	0.5	512	A	B	C	O:3	Arg (AGA)	Asp
842656	Nov. 00	Boadilla del Monte	1	512	A	B <sub>2</sub>	C	O:3	Ser	Tyr (TAC)
861247	Nov. 00	Collado Villalba	1	512	A	B	C	O:3	Ile (ATC)	Asp
828365	Feb. 01	Aniceto Marinas	0.25	512	A	B <sub>4</sub>	C	O:3	Arg (AGA)	Asp
915892	Nov. 00	Majadahonda	0.125	16	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C	O:3	Ser	Asp
881000	Feb. 01	Pozuelo de Alarcón	0.125	2	A	B	C	O:3	Ser	Asp
990572	Feb. 01	Torrelorones	0.125	8	A	B <sub>5</sub>	C	O:3	Ser	Asp
839104	Mar. 01	Aravaca	0.015	8	A	B <sub>2</sub>	C	O:3	Ser	Asp

<sup>a</sup> CIP, ciprofloxacin.  
<sup>b</sup> NAL, nalidixic acid.  
<sup>c</sup> Subscripts indicate subtypes of the major clone.  
<sup>d</sup> Codons are in parentheses.

Several articles have reported outbreaks caused by the serotypes O:8, O:9, and O:3 of *Y. enterocolitica* (5, 10, 17). However, no reports have described an epidemiological relationship among clinical isolates with different antimicrobial susceptibilities from a wide geographical area.

The emergence of nalidixic acid-resistant *Y. enterocolitica* around Madrid posed the question of possible clonal dissemination. Susceptible and resistant strains were selected from several towns. All the strains analyzed belonged to the O:3 serotype, showed an epidemiological relationship, and carried the *yst* gene.

Fluoroquinolones have been ranked as the second most widely used antimicrobial agent both in Spanish hospitals and the community (2). This high level of usage, together with the use of antibiotics in animal feed, may explain the increase in the resistance to quinolones in *Y. enterocolitica* clinical isolates. Our results suggest the clonal dissemination of a nalidixic acid-susceptible *Y. enterocolitica* strain which has acquired different mutations that generate resistance to nalidixic acid and which has probably emerged due to the selective pressure exerted by the overuse of fluoroquinolones.

Nucleotide sequence accession numbers. Accession numbers for the *gyrA* and *parC* genes of *Y. enterocolitica* in the GenBank are AY064398 and AY064399, respectively.

This study was supported by grant FIS 00/0997 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain. Javier Sánchez-Céspedes has a fellowship from the University of Barcelona, Spain.

#### REFERENCES

- Ackers, M. L., S. Schoenfeld, J. Markman, M. G. Smith, M. A. Nicholson, W. DeWitt, D. N. Cameron, P. M. Griffin, and L. Slutsker. 2000. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurised milk. *J. Infect. Dis.* **181**:1834–1837.
- Asensio, A., R. Canton, J. Vaqué, J. Roselló, J. L. Arribas, and the EPINE Work Group. 2002. Utilización de los antimicrobianos en los hospitales españoles (EPINE, 1990–1999). *Med. Clin. (Barc.)* **118**:731–736.
- Auckenthaler, R., M. Michea-Hamzehpour, and J. C. Pechere. 1986. In vitro activity of newer quinolones against aerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **17**:29–39.
- Bottonne, E. J. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:257–276.
- Cover, T. L., and R. C. Aber. 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**:16–24.
- Frederiksson-Ahomaa, M., T. Autio, and H. Korkeala. 1999. Efficient subtyping of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 with pulsed-field gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**:308–312.
- Gallardo, F., J. Ruiz, F. Marco, K. J. Towner, and J. Vila. 1999. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J. Med. Microbiol.* **48**:367–374.
- Hosaka, S., M. Uchiyama, M. Ishikawa, T. Akahoshi, H. Kondo, C. Shimachi, T. Sasahara, and M. Inoue. 1997. *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 septicemia in an otherwise healthy adult: analysis of chromosome DNA pattern by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3346–3347.
- Lobato, M. J., E. Landeras, M. A. González-Hevia, and M. C. Mendoza. 1998. Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3297–3302.
- Marjai, E., M. Kalman, I. Kajary, A. Belteky, and M. Rodler. 1987. Isolation from food and characterization by virulence test of *Yersinia enterocolitica* associated with an outbreak. *Acta Microbiol. Hung.* **34**:97–109.
- Najdenski, H., I. Iteman, and E. Carniel. 1994. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2913–2920.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Navia, M. M., J. Ruiz, A. Ribera, M. T. Jimenez De Anta, and J. Vila. 1999. Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:743–748.
- Ruiz, J., J. Gomez, M. M. Navia, A. Ribera, J. M. Sierra, F. Marco, J. Mensa, and J. Vila. 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42**:257–261.
- Ruiz, J., F. Marco, P. Goñi, F. Gallardo, J. Mensa, A. Trilla, T. Jiménez de Anta, and J. Vila. 1995. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:737–738.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. E. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233–2239.
- Thompson, J. S., and M. J. Gravel. 1986. Family outbreak of gastroenteritis due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 from well water. *Can. J. Microbiol.* **32**:700–701.
- Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goñi, E. Giral, and M. T. Jimenez De Anta. 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2477–2479.
- Vila, J., J. Ruiz, and M. Navia. 1999. Molecular bases of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agents Chemother.* **3**:323–344.



**7.1.4 Artículo V.** Characterization of the AcrAB locus in two *Citrobacter freundii* clinical isolates

**Characterization of the AcrAB locus in two *Citrobacter freundii* clinical isolates**

Javier Sánchez-Céspedes and Jordi Vila

*Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, 30: 259-263

El objetivo principal de este estudio fue investigar los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en dos aislamientos clínicos isogénicos de *Citrobacter freundii*, lo cual nos llevó a la caracterización parcial de los genes *acrA* y *acrB* de este microorganismo. Se caracterizaron dos cepas de *C. freundii* (1.44 y 1.38) aisladas secuencialmente del mismo paciente. Su relación epidemiológica se estableció mediante REP-PCR y PFGE, y su susceptibilidad a ciprofloxacino y cloranfenicol se determinó mediante E-test. Se investigaron además las mutaciones en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (RDRQ) de los genes *gyrA* y *parC*, así como sus perfiles proteicos de membrana externa. La expresión de los genes *acrA* y *acrB* en ambas cepas fue analizada mediante RT-PCR utilizando el gen *gapA* como control de expresión. Ambos aislamientos clínicos pertenecían al mismo clon tanto por REP-PCR como por PFGE. Sus CMI's frente a ciprofloxacino fueron de 8 mg/L para la cepa 1.44 y 32 mg/L para la cepa 1.38. Las CMI's frente a cloranfenicol de las cepas 1.44 y 1.38 fueron de 16 y 96 mg/L, respectivamente. Ambas cepas mostraban las mismas mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (Thr-83--Ile y Asp-87--Tyr en *gyrA* y Ser-83--Ile en *parC*). No se encontraron diferencias significativas en sus patrones proteicos de membrana externa. Sin embargo, sí se observaron diferencias en la cantidad de ciprofloxacino acumulado, observándose menor acumulación en la cepa 1.38. Mediante la utilización de chips de ADN se observó que la cepa 1.38 sobre-expresaba once genes comparada con la cepa

1.44. Entre estos genes encontrábamos los genes *acrA* y *acrB*. Estos resultados fueron corroborados mediante RT-PCR. La homología en nucleótidos entre las secuencias parciales de *acrA* (1027 pb) y *acrB* (420 pb) obtenidas en estas cepas de *C. freundii* respecto de las secuencias en *E. coli* fueron del 81,5% y 86% respectivamente. Los genes *acrA* y *acrB* de *C. freundii* son similares a los descritos en *E. coli* y su sobre-expresión, en colaboración con las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, puede jugar un papel importante en la modulación de la CMI final a fluoroquinolonas.



## Short communication

## Partial characterisation of the *acrAB* locus in two *Citrobacter freundii* clinical isolates

Javier Sánchez-Céspedes, Jordi Vila\*

Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

Received 12 April 2007; accepted 5 May 2007

### Abstract

We studied the mechanisms of resistance to fluoroquinolones in two *Citrobacter freundii* strains (1.44 and 1.38) isolated from the same patient and belonging to the same clone by pulsed-field gel electrophoresis. This study allowed partial characterisation of the *acrA* and *acrB* genes of this microorganism. As previously reported, the two strains showed the same substitutions in the GyrA and ParC proteins (Thr-83 → Ile and Asp-87 → Tyr in GyrA and Ser-83 → Ile in ParC). However, differences were observed in the amount of ciprofloxacin accumulated, with strain 1.38 showing less accumulation. Expression of genes in both strains was analysed using DNA microarrays for *Escherichia coli*. Ten genes were overexpressed in strain 1.38 compared with strain 1.44, including genes *acrA* and *acrB*. Nucleotide similarity between the partially sequenced *acrA* and *acrB* genes of *C. freundii* and *E. coli* was 80.7% and 85%, respectively. The *acrA* and *acrB* genes of *C. freundii* are similar to those described in *E. coli* and their overexpression may play an important role in modulating the final minimum inhibitory concentration of fluoroquinolones in collaboration with mutations in the *gyrA* and *parC* genes.

© 2007 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

**Keywords:** *Citrobacter freundii*; *acrA*; *acrB*

### 1. Introduction

*Citrobacter freundii* are Gram-negative bacilli causing a range of infections such as urinary tract infections, neonatal sepsis, brain abscess, meningitis, bloodstream infections, intra-abdominal sepsis and pneumonia [1]. Invasive *Citrobacter* infections are associated with a high mortality rate, with 33–48% of patients presenting with *Citrobacter* bacteraemia [2]. This high mortality rate may be due to ineffective empirical antibiotic therapy. With the use of broad-spectrum antibiotics, *C. freundii* has become increasingly resistant to antimicrobial agents [3].

Fluoroquinolones are a group of antimicrobial agents with good activity against Gram-negative bacteria, including *C. freundii*. Fluoroquinolones act by inhibiting the activity of type II topoisomerases (DNA gyrase and topoisomerase IV) [4]. Development of fluoroquinolone resistance in Gram-

negative bacteria is due to two main factors: (i) mutations in the topoisomerases [4,5]; and (ii) decreased intracellular accumulation of the antimicrobial agent by decreased cell wall permeability or increased efflux pump expression [4]. Moreover, the presence of a plasmid carrying the *qnr* gene can contribute to the acquisition of quinolone resistance, mainly in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* [4]. A single mutation in the amino acid codon Ser-83 of the *gyrA* gene is associated with decreased susceptibility or low-level resistance to fluoroquinolones [4], whereas double mutations in the amino acid codons Ser-83 and Asp-87 of the *gyrA* gene are associated with high levels of resistance [4]. On the other hand, accumulation of amino acid changes in GyrA with the simultaneous presence of alterations in ParC contribute to an increase in quinolone resistance [4]. In *C. freundii*, mutations in *gyrA* and/or *parC* appear to be the main mechanism of resistance to quinolones [5,6].

Gram-negative bacteria contain multidrug transporters to fluoroquinolones belonging to five different families: the multidrug and toxic compound extrusion (MATE)

\* Corresponding author. Tel.: +34 932 275 522; fax: +34 932 279 372.  
E-mail address: jvila@ub.edu (J. Vila).

family; the major facilitator superfamily (MFS); the resistant–nodulation–division (RND) family; the small multidrug resistance (SMR) family; and the ATP-binding cassette (ABC) family [7]. The AcrAB pump is a member of the RND family, which has been investigated in depth in some Enterobacteriaceae [7]. First described in *E. coli*, this transporter consists of three elements: AcrB, an integral inner membrane protein; AcrA, a periplasmic lipoprotein; and an outer membrane channel, thought to be TolC [7]. The role of AcrAB in resistance to quinolones has been shown in other Enterobacteriaceae such as *Salmonella* [4,7,8], *Klebsiella* spp. [4,7,9] and *Enterobacter* spp. [4,7,10].

In this study, we characterised the *acrA* and *acrB* genes in *C. freundii* and investigated expression of these genes in two isogenic *C. freundii* strains isolated from the same patient and showing the same mutations in the *gyrA* and *parC* genes but with different levels of resistance to several antimicrobial agents.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial isolates

Two *C. freundii* clinical isolates (strains 1.44 and 1.38) were consecutively recovered from the stools of a patient during a study of the effect of the use of norfloxacin on intestinal flora of cirrhotic patients treated with this fluoroquinolone in the Clinical Microbiology Laboratory at the Hospital Clínic of Barcelona, Spain. Analysis of the isolates by chromosomal DNA digestion with low-frequency restriction enzyme and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed that they belonged to the same clone [11].

### 2.2. Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing was performed by the microdilution method according to the guidelines established by the Clinical and Laboratory Standards Institute [12]. The antimicrobial agents used were ciprofloxacin (Bayer, Barcelona, Spain) and chloramphenicol (Sigma, St Louis, MO). The minimum inhibitory concentrations (MICs) for these isolates were determined either with or without the efflux pump inhibitor phenylalanine arginine  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) at 20  $\mu$ g/mL.

### 2.3. Microarrays

Total RNA from the *C. freundii* strains was extracted from a mid-exponential phase culture (optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) 0.6) using Qiagen RNeasy spin columns (Qiagen, Chatsworth, CA). A total of 20  $\mu$ g of total RNA was labelled with Cy-3-dUTP (RNA from strain 1.44) or Cy-5-dUTP (RNA from strain 1.38) in a standard reverse transcriptase (RT) reaction, using Superscript II(+) (Gibco BRL, Carlsbad, CA) with 1  $\mu$ g of random hexamer (Amer-

sham Pharmacia, Piscataway, NJ) primers. After purification through Microcon-30 (Millipore, Billerica, MA), Cy3- and Cy-5-labelled cDNA were combined with SSC (2.5 $\times$  final; 1 $\times$  SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate, pH 7), sodium dodecyl sulphate (0.25%) and 40  $\mu$ g of *E. coli* rRNA (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Germany) in a final volume of 16  $\mu$ L and hybridised with the DNA microarray for 5 h at 65 °C. The DNA microarray contained 4058 open reading frames (ORFs) representing 95% of *E. coli* ORFs, performed as described in the MGuide (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>). The glass slide was washed and scanned using an Axon Scanner GENPIX 1.0 (Axon Instruments, Foster City, CA) at 10  $\mu$ m per pixel resolution. The resulting 16-bit TIFF images were analysed using SCANALYZE software (<http://rana.stanford.edu/software/>). The reproducibility of the technique was assessed in two separate experiments. A normalised relative Cy5/Cy3 ratio >2 was considered as a significant increase in expression and a normalised relative Cy3/Cy5 ratio >2 was considered as a significant decrease in expression in the two different experiments performed.

### 2.4. Quantitation of mRNA by RT-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Once RNA was pure and free of DNA using RNawiz (Ambion, Austin, TX), a RT-PCR reaction was performed following the instructions of the SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit with Platinum *Taq* (Invitrogen, Barcelona, Spain). The primers used to perform the RT-PCR were designed from the sequences obtained previously as described below. Two sets of primers, *facart* and *racart* for the *acrA* gene and *facbrt* and *racbrt* for the *acrB* gene, were used. *facart* (5'-CCTCAGGTTAGCGGGATTAT-3') and *racart* (5'-GATTGATGCGTGCAGTTTCTA) amplified a region of 303 bp, whilst *facbrt* (5'-TTCGGCTTCTCAATAAATACCC-3') and *racbrt* (5'-GCCATCGCGGAAACAAT-3') amplified a region of 289 bp. As an internal control for the RT-PCR, the housekeeping gene *gapA* (626 bp) was used. The primers used to amplify this gene were *Gap1* (5'-GTATCAACGGTTTTGGCCG-3') and *Gap2* (5'-AGCTTTAGCAGCACCGGTA-3'). The components of the reaction mixture were 2 $\times$  reaction mix (SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit with Platinum *Taq*), 0.5 mM of each primer, 1 U of the RT/platinum *Taq* MIX (SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit with Platinum *Taq*), 500 ng of the RNA template and distilled water to a volume of 50  $\mu$ L. The reaction was performed with two initial steps of 50 °C for 30 min (reverse transcription) and 95 °C for 2 min to activate the *Taq* polymerase, followed by 16 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min.

To quantify a PCR product, it is important to stop the kinetic amplification reaction, usually between cycles 10 and 25, to compare the expression of a gene in differ-



ent isolates. After several trials, the final number of cycles was 16 for each of the three genes. The RT-PCR products obtained were run in an acrylamide gel (Amersham, Barcelona, Spain) using the GenePhor apparatus (Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain). The gel was then stained using a DNA silver staining kit (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain).

### 2.5. Amplification and DNA sequencing of the *acrA* and *acrB* genes

PCR amplification of the *acrA* and *acrB* genes was carried out using the primers AcrA1 (5'-AAGTCACCTCTCCG-ATTAGC-3') and AcrA2 (5'-CCTGTTGCGGGACTAA-AATA-3') for the partial sequence of the *acrA* gene and AcrB1 (5'-TCATCCTCGTGTTCCTGGTT-3') and AcrB2 (5'-TAGTGGTGCCTGCTCTTCTC-3') for the partial sequence of the *acrB* gene under the conditions previously described for *gyrA* amplification [11].

### 2.6. GenBank accession number for the partial sequence of the *acrA* and *acrB* genes in *C. freundii*

GenBank accession numbers were AY886898 for the partial sequence of the *acrA* gene and AY886899 for the partial sequence of the *acrB* gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 3. Results

In a previous report, the mechanisms of resistance to fluoroquinolones in two isogenic *C. freundii* isolates (1.44 and 1.38) from the same patient were studied. The relationship between these isolates was determined by repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR and PFGE [11]. Both isolates showed the same pattern of mutations at the quinolone resistance-determining region of *gyrA* (amino acid codons Thr83 → Ile and Asp87 → Tyr) and *parC* (amino acid codon Ser80 → Ile) and the same level of expression of the three main porins (OmpC, OmpF and OmpA) [11]. None the less, varying susceptibility to ciprofloxacin and chloramphenicol was observed: the MICs of ciprofloxacin and chloramphenicol were 16 µg/mL and 4 µg/mL, respectively, for isolate 1.44 and 64 µg/mL and 32 µg/mL, respectively, for isolate 1.38. Moreover, differences were observed when ciprofloxacin uptake was determined. Isolate 1.38 showed less accumulation than isolate 1.44, and addition of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) increased uptake by 51% for isolate 1.38 and by only 8.7% for isolate 1.44 [11]. When the MICs of ciprofloxacin and chloramphenicol were calculated in the presence of an efflux pump inhibitor (PAβN), a decrease was observed [11]. Both results suggested the probable role of an efflux pump in resistance to these antimicrobial agents.

DNA microarray assay was used to analyse the gene expression of isolate 1.38 compared with the isogenic iso-

Table 1

Genes with increased and decreased expression in *Citrobacter freundii* isolate 1.38 compared with *C. freundii* isolate 1.41 analysed by DNA microarrays

Gene	Product	Fold change <sup>a</sup>
Increased expression (Cy5/Cy3 ratio)		
<i>acrA</i>	Acridine efflux pump	2.21, 2.05
<i>acrB</i>	Acridine efflux pump	3.31, 2.95
<i>aspA</i>	Aspartate ammonia-lyase	2.70, 2.08
<i>dnaK</i>	Chaperone Hsp70	2.01, 2.00
<i>gcvT</i>	T protein, tetrahydrofolate-dependent	2.05, 1.99
<i>glpQ</i>	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	2.87, 2.83
<i>ndh</i>	Respiratory NADH dehydrogenase	3.20, 3.01
<i>yfiA</i>	Putative yhbH sigma 54 modulator	2.03, 2.22
<i>yibD</i>	Putative regulator	2.08, 2.45
<i>ymfL</i>	Orf, hypothetical protein	3.39, 2.87
Decreased expression (Cy3/Cy5 ratio)		
<i>creD</i>	Tolerance to colicin E2	2.09, 3.08
<i>focA</i>	Probable formate transporter	3.26, 3.10
<i>nmpC</i>	Outer membrane protein (porin)	2.03, 2.24
<i>yacA</i>	Orf, hypothetical protein	2.29, 2.87
<i>ydeF</i>	Putative transport protein	2.00, 1.98
<i>yecC</i>	ATP-binding component of a transport system	2.72, 2.94

<sup>a</sup> Data represent the results from two different experiments.

late 1.44 to find potential genes associated with quinolone resistance. The evolutionary proximity between *C. freundii* and *E. coli* led to the use of DNA microarrays containing genes that constitute the whole genome of *E. coli* in order to analyse the expression of the *C. freundii* genome. Table 1 shows the list of genes with increased or decreased expression in isolate 1.38 compared with isolate 1.44. Isolate 1.38 showed 10 overexpressed genes and 6 genes with decreased expression compared with isolate 1.44. Most of the overexpressed genes were associated with bacterial metabolism. However, the *acrA* and *acrB* genes, likely associated with multidrug resistance, were also overexpressed. Among the genes with decreased expression, the *nmpC* gene encoding an outer membrane protein should be highlighted (Table 1). To corroborate the results obtained by DNA microarrays, expression of the *acrA* and *acrB* genes was determined by RT-PCR. Fig. 1 shows a clear increase in the expression of both genes in isolate 1.38.

Furthermore, the PCR products obtained with the aforementioned primers for the *acrA* and *acrB* genes were sequenced. The DNA sequence of the *acrA* and *acrB* genes obtained from isolates 1.44 and 1.38 showed 100% homology. These DNA sequences represented 86.0% and 13.3% of the total sequence of the *acrA* and *acrB* genes of *E. coli*, respectively. Table 2 compares the nucleotide and amino acid sequences obtained for the *acrA* and *acrB* genes compared with those from *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Klebsiella* spp. When compared with *E. coli*, the percentages of nucleotide and amino acid sequence similarity were: *acrA* gene, 80.7% and AcrA 90.9%, respectively; and *acrB* gene, 85% and AcrB 98.3%, respectively (Table 2).

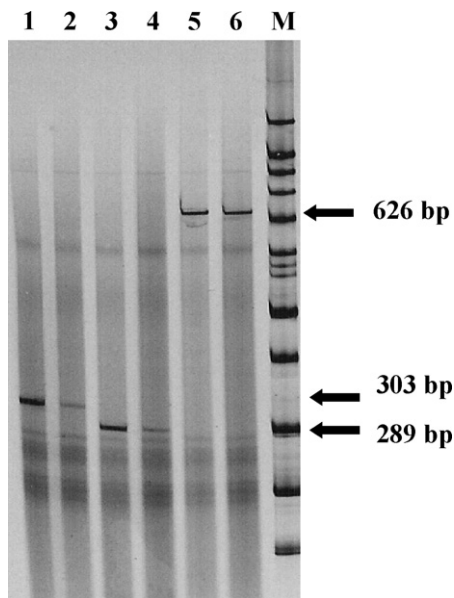


Fig. 1. Expression of the *acrA* and *acrB* genes in *Citrobacter freundii* isolates 1.38 and 1.44 determined by reverse transcription polymerase chain reaction. The *gapA* gene was used as an internal control of expression. The amplicons were resolved by acrylamide gel electrophoresis. Lane 1, amplicon from mRNA of the *acrA* gene of isolate 1.38; lane 2, amplicon from mRNA of the *acrA* gene of isolate 1.44; lane 3, amplicon from mRNA of the *acrB* gene of isolate 1.38; lane 4, amplicon from mRNA of the *acrB* gene of isolate 1.44; lane 5, amplicon from mRNA of the *gapA* gene of isolate 1.38; lane 6, amplicon from mRNA of the *gapA* gene of isolate 1.44; lane M, 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Barcelona, Spain). Arrows indicate the size of the amplicon of *gapA*, *acrA* and *acrB*, respectively.

Table 2  
Homology between the nucleotide and amino acid sequences of *Citrobacter freundii* vs. other Enterobacteriaceae

Species	Nucleotide		Amino acid	
	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	AcrA	AcrB
<i>Escherichia coli</i>	80.7	85.0	90.9	98.3
<i>Salmonella</i> spp.	80.5	86.7	91.7	96.6
<i>Shigella</i> spp.	80.2	77.4	90.6	74.1
<i>Klebsiella</i> spp.	76.5	70.0	87.4	87.8

4. Discussion

Overall, in Enterobacteriaceae mutations in *gyrA* and/or *parC* as well as a decrease in drug accumulation play important roles in the acquisition of quinolone resistance. This latter effect is mainly associated with overexpression of an efflux pump. In *E. coli*, the predominant efflux system is encoded by the *acrAB-tolC* genes, and deletion of the *acrAB* locus transforms isolates (even those with mutations in the *gyrA* gene) to being hypersusceptible to fluoroquinolones and other drugs [13]. Recently, it has been suggested that constitutive expression of an efflux pump, probably AcrAB, may generate an intrinsic low level of resistance to nalidixic acid and chloramphenicol [14]. High levels of resistance to fluoroquinolones require multiple mutations in the *gyrA* and *parC* genes and overexpression of an efflux pump(s).

We characterised the *acrAB* locus of *C. freundii*, showing overexpression of this operon in a high-level ciprofloxacin-resistant *C. freundii* isolate. Two isogenic *C. freundii* isolates showing the same mutations in the *gyrA* and *parC* genes but with different MICs for ciprofloxacin and chloramphenicol were analysed. These isolates had differing ciprofloxacin accumulation, which was reverted when calculated in the presence of a proton motive force inhibitor (CCCP), implicating the overexpression of an efflux pump. First, DNA microarrays, constituted by genes from *E. coli*, were used to screen for expression of genes in the more ciprofloxacin-resistant isolate compared with the less ciprofloxacin-resistant isolate. Despite a potential limitation to analysing the expression of genes from *C. freundii*, our results showed its possible utility as a screening assay to determine genes with altered expression when analysing two isogenic *C. freundii* isolates. In the DNA microarray analysis, overexpression of the *acrA* and *acrB* genes was observed, which was further confirmed by RT-PCR. However, the third component of this efflux system, corresponding to the outer membrane protein TolC, was not found. This may be due to: (i) a low homology between the *tolC* gene from *C. freundii* compared with *E. coli*; and (ii) differences in transcript stability. Previous studies in *E. coli* have shown co-ordinated activation of TolC and AcrAB [15], and Barbosa and Levy [16] showed overexpression of this gene in an *E. coli* isolate expressing *marA* when analysed by DNA microarrays.

The AcrAB system has been shown to play an important role in resistance to quinolones in several Enterobacteriaceae. In our study, overexpression of AcrAB generated increased resistance to fluoroquinolones and chloramphenicol. Indeed, in strain 1.38 the MIC of chloramphenicol decreased from 32 µg/mL to 1 µg/mL in the presence of an efflux pump inhibitor (PAβN), which has been shown to affect the activity of the AcrAB-tolC system [10]. These data also showed moderate expression of the *acrAB* operon in strain 1.44, which had a MIC of chloramphenicol of 4 µg/mL and a MIC of 1 µg/mL when calculated in the presence of PAβN. Our results agree with a recent report by Baucheron et al. [8], who showed that these efflux systems can increase the level of resistance to quinolones, chloramphenicol and tetracycline in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Moreover, they reported a synergistic effect on resistance to chloramphenicol and tetracycline resulting from the simultaneous expression of AcrAB-TolC and FloR (chloramphenicol resistance) and Tet(G) (tetracycline resistance). These mechanisms of resistance are efflux pumps in the MFS family. Mazzariol et al. [9] also showed overexpression of AcrAB-TolC both in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. In *K. pneumoniae*, the highest MIC of ciprofloxacin (64 µg/mL) was explained by the concomitant presence of mutations both in the *gyrA* and *parC* genes plus overexpression of AcrAB.

Among the six genes with decreased expression in isolate 1.38, the *nmpC* gene is of note since it encodes an outer

membrane protein, functioning as a porin. No relationship has been described between antibiotic permeability and the NmpC porin. However, this membrane protein could functionally replace the OmpF or OmpC porins [17]. Further investigation is necessary to determine the implication of this porin in the penetration of some antimicrobial agents through the outer membrane and the potential interplay between this porin and overexpression of AcrAB.

In summary, this is the first time that the *acrAB* operon has been described in *C. freundii*, showing a high similarity with that described in *E. coli*. Overexpression of *acrA* and *acrB* may play an important role in modulating the final MIC of fluoroquinolones together with mutations in the *gyrA* and *parC* genes.

**Funding:** This work has been supported in part by grants FIS 05/0068 from the Ministry of Health, Spain, and 2005 SGR00444 from the Department d'Universitats, Recerca I Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (to J.V.). J.S.-C. has a fellowship from Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) C14.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- [1] Pepperell C, Kus JV, Gardam MA, Humar A, Burrows LL. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3555–60.
- [2] Chen YS, Wong WW, Fung CP, Yu KW, Liu CY. Clinical features and antimicrobial susceptibility trends in *Citrobacter freundii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect* 2002;35:109–14.
- [3] Wang JT, Chang SC, Chen YC, Luh KT. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33:258–62.
- [4] Vila J. Fluoroquinolone resistance. In: White DG, Aleksun MN, McDermott PF, editors. *Frontiers in antimicrobial resistance*. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 41–52.
- [5] Nishino Y, Deguchi T, Yasuda M, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *FEMS Microbiol Lett* 1997;154:409–14.
- [6] Tavío MM, Vila J, Ruiz J, et al. In vitro selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Citrobacter freundii*: analysis of the quinolone resistance acquisition. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:521–4.
- [7] Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:382–402.
- [8] Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeck-aert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3729–35.
- [9] Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3984–6.
- [10] Mallea M, Mahamound A, Chevalier J, et al. Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. *Biochem J* 2003;376:801–5.
- [11] Navia MM, Ruiz J, Ribera A, Jiménez de Anta MT, Vila J. Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:743–8.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne, PA: CLSI; 2006.
- [13] Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:10–3.
- [14] Saenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixido M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:544–5.
- [15] Aono R, Tsukagoshi N, Yamamoto M. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1998;180:938–44.
- [16] Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* 2000;182:3467–74.
- [17] Hindahl MS, Crockford GW, Hancock RE. Outer membrane protein NmpC of *Escherichia coli*: pore-forming properties in black lipid bilayers. *J Bacteriol* 1984;159:1053–5.



**7.1.5 Artículo VIII.** Two chromosomally located *qnrB* variants, *qnrB6* and the new *qnrB16*, in *Citrobacter* spp. isolates causing bacteraemia

**Two chromosomally located *qnrB* variants, *qnrB6* and the new *qnrB16*, in *Citrobacter* spp. isolates causing bacteraemia**

J. Sanchez-Cespedes, S. Martí, S. M. Soto, V. Alba, C. Melción, M. Almela, F. Marco  
and J. Vila

*Clin. Microbiol. Infect.*, 2008 (Artículo en Revisión)

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en una colección de Enterobacterias causantes de bacteremia. La búsqueda de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se realizó mediante PCR múltiple en 306 Enterobacterias aisladas de bacteremias en el Hospital Cínic de Barcelona. El estudio plasmídico de las cepas portadoras de los determinantes *qnr* se realizó mediante digestión del ADN celular con las enzimas *I-CeuI* y nucleasa S1 y posterior Southern blot con sondas específicas para los genes *qnrB*, *qnrS* y 23S ARNr. Cinco cepas dieron positivas para la PCR múltiple de estos genes. Una nueva variante del gen *qnrB*, el *qnrB16*, fue hallada en un aislamiento de *Citrobacter freundii*. Se encontró además la variante *qnrB6* en dos aislamientos de *C. freundii* y un aislamiento de *Citrobacter werkmanii*. Asimismo, el gen *qnrS2* fue localizado en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*. No se encontró el gen *qnrA* en ninguno de los aislamientos estudiados. El gen *qnrS2* estaba localizado en un plásmido de un tamaño aproximado de 50 kb, mientras que los determinantes *qnrB6* y *qnrB16* tenían una localización cromosómica. En nuestro hospital la prevalencia del *qnrB* fue mayor que para los genes *qnrS* y *qnrA*. Conviene además puntualizar la alta prevalencia del gen *qnrB* en aislamientos de *C.*

*freundii*, así como la identificación de la nueva variante *qnrB16* y la localización cromosómica de los genes *qnrB6* y *qnrB16*.

1 **Two chromosomally located *qnrB* variants, *qnrB6* and the new *qnrB16*,**  
2 **in *Citrobacter* spp. isolates causing bacteraemia**

3  
4  
5 J. Sanchez-Céspedes<sup>1</sup>, S. Martí<sup>1</sup>, S. M. Soto<sup>1</sup>, V. Alba<sup>1</sup>, C. Melción<sup>1</sup>, M. Almela<sup>1</sup>,  
6 F. Marco<sup>1</sup>, and J. Vila<sup>1\*</sup>.

7  
8 <sup>1</sup> Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic, IDIBAPS,  
9 Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

10  
11 **Keywords:** *qnrB6*, *qnrB16*, quinolone resistance, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter*  
12 *werkmanii*

13  
14 **Running title:** Two chromosomally located *qnrB* variants.

15  
16 \* Corresponding author:

17 Jordi Vila

18 Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic

19 Hospital Clínic

20 Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain

21 Tel. 34-93-2275522

22 Fax. 34-93-2279372

23 e-mail [jvila@ub.edu](mailto:jvila@ub.edu)

24

25

26 **ABSTRACT**

27 The objective of this study was to determine the prevalence of the plasmid-mediated  
28 quinolone resistance *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes in a collection of Enterobacteriaceae  
29 causing bacteraemia. Analysis of the presence of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes was  
30 performed by multiplex PCR in 306 clinical isolates. Plasmid analysis was performed  
31 by *I-CeuI* and S1 nuclease digestion and hybridization with specific probes for the *qnr*  
32 and 23S rRNA genes. Five strains were found to carry a *qnr* gene, among which a new  
33 variant of the *qnrB* gene, *qnrB16*, were detected in a *Citrobacter freundii* isolate. The  
34 *qnrB6* variant was found in two *C. freundii* isolates and in a *Citrobacter werkmanii*  
35 isolate. A *qnrS2* gene was also found in a *Klebsiella pneumoniae* isolate. The QnrA  
36 determinant was not found in any of the strains studied. The *qnrS2* gene was located on  
37 a plasmid of ca. 50 kb in size, whereas the *qnrB6* and *qnrB16* determinants were  
38 chromosomally inserted between the *pspF* and the *orf2* genes which had previously  
39 been located in a complex integron. In our hospital, the prevalence of the *qnrB* gene was  
40 higher than for the *qnrA* and *qnrS* determinants. Moreover, it is important to point out  
41 the description of the new *qnrB16* gene.

42

43

44

45

46

47



48 **INTRODUCTION**

49 Quinolones are a group of antimicrobial agents with good activity against Gram-  
50 negative bacteria. Quinolones act by inhibiting the activity of type II topoisomerases  
51 (DNA gyrase and topoisomerase IV) [1,2]. The DNA gyrase introduces negative  
52 superhelical twists into DNA, whereas topoisomerase IV relaxes DNA. Mutations in the  
53 *gyrA* gene (encoding the A subunit of the DNA gyrase) augment quinolone resistance  
54 by typically 4- to 8-fold [2,3].

55       Development of fluoroquinolone resistance in Gram-negative bacteria is due to  
56 two main factors: (i) mutations in the genes encoding the protein targets [1,2,4] and (ii)  
57 decreased intracellular accumulation of the antimicrobial agent by decreased cell wall  
58 permeability or overexpression of an efflux pump system [1,2]. In 1998, Martínez-  
59 Martínez *et al.* [5] reported that a multiresistant isolate of *Klebsiella pneumoniae* from  
60 an urine culture collected in Birmingham, Alabama, contained a broad host range  
61 plasmid (pMG252) which, in *E. coli* transconjugants, increased resistance to nalidixic  
62 acid from 4 to 32 mg/L, and to ciprofloxacin from 0.008 to 0.25 mg/L. Because  
63 pMG252 did not alter host porin expression and did not reduce quinolone accumulation,  
64 the possibility of a novel resistance mechanism was suggested and the responsible gene  
65 was called *qnr* [5]. Qnr proteins belong to the pentapeptide-repeat family, which is  
66 defined by a tandem five amino acid repeat with the recurrent motif (Ser, Thr, Ala or  
67 Val)(Asp or Asn)(Leu or Phe)(Ser, Thr or Arg)(Gly) [6]. At present, six variants of  
68 QnrA, two variants of QnrS and nineteen variants of QnrB have been described  
69 worldwide [7].

70       Although the action of Qnr results in low-level quinolone resistance, this  
71 reduced susceptibility facilitates the selection of mutants with higher-level resistance

72 [5]. It is thought that this low level of resistance to the antibacterial agent would make a  
73 raise concentrations of the bacterial populations, facilitating the occurrence of  
74 secondary mutations and causing an increment in the level of resistance [5]. The  
75 geographical distribution of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes is known to be wide. The  
76 spread of these and new additional *qnr* genes could have a substantial impact on the  
77 treatment of Gram-negative bacterial infections with fluoroquinolones [8].

78 In this study, the prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA*,  
79 *qnrB* and *qnrS* genes was studied in a collection of 306 Enterobacteriaceae isolates  
80 causing bacteriemia.

81

## 82 MATERIAL AND METHODS

### 83 Bacterial isolates

84 Three hundred and six Enterobacteriaceae isolates from blood samples were collected  
85 between 2001 and 2002 at the Hospital Clinic of Barcelona, Spain: 111 *Escherichia*  
86 *coli* (36.2%), 54 *Klebsiella pneumoniae* (17.6%), 28 *Proteus mirabilis* (9.2%), 25  
87 *Enterobacter cloacae* (8.2%), 22 *Serratia marcescens* (7.2%), 21 *Salmonella enteritidis*  
88 (6.9%), 16 *Klebsiella oxytoca* (5.2%), 8 *Salmonella typhimurium* (2.6%), 6  
89 *Enterobacter aerogenes* (2%), 5 *Citrobacter freundii* (1.6%), 4 *Citrobacter koseri*  
90 (1.3%), 3 *Morganella morganii* (1%), 2 *Pantoea agglomerans* (0.7%) and 1 *Citrobacter*  
91 *werkmanii* (0.3%).

92

93

## 94 **PCR amplification and sequencing**

95 Screening of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes was performed by multiplex PCR using a  
96 cocktail of specific primers [9]. Bacterial strains positive for each *qnr* gene were used as  
97 positive controls, and were run in each batch of tested samples [10]. Positive reactions  
98 were confirmed by direct sequencing of the PCR products. To complete the sequences  
99 of the *qnr* genes an inverse PCR was performed digesting the DNA with *Bfal* “C<sup>▼</sup>TAG”  
100 (New England Biolabs, Ipswich, MA). The fragments obtained were autoligated  
101 overnight at 16°C using T4 Ligase (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) and used  
102 as a template for a PCR with inverse primers designed from the amplified sequences  
103 (qnrevI, 5'-CAGAGCCATATTTGTACCTG-3', and qnrevII, 5'-  
104 GTTGGACAACCTACCAGGCAT-3'). The sequences obtained were compared in the  
105 GenBank to determine the corresponding *qnr* variant. The quinolone-resistance  
106 determining region (QRDR) of the *gyrA* and *parC* genes of the *Citrobacter* spp. isolates  
107 was sequenced directly from PCR-amplified DNA using the specific primers previously  
108 described [11]. To amplify the QRDR of the *gyrA* and *parC* genes of *Klebsiella*  
109 *pneumoniae* the primers used were E-1, 5'-AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT-3' and  
110 E-2, 5'-GCCATACCTACGGCGATACC-3' for *gyrA* and PARC1, 5'-  
111 AAACCTGTTTCAGCGCCGCATT-3' and PARC 2, 5'-GTGGTGCCGTTAAGCAAA-  
112 3' for *parC*.

## 113 **Antimicrobial susceptibility testing**

114 Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the E-test method,  
115 and CLSI breakpoints were used to define susceptibility [12]. MIC testing was  
116 conducted for the following antibiotics: nalidixic acid, ciprofloxacin and norfloxacin  
117 (IZASA, Barcelona, Spain).

**118 Conjugation experiment**

119 The conjugation test was attempted by liquid mating-out assay using the reference strain  
120 *E.coli* J53 Rif<sup>R</sup> and the *C. freundii* 21112 clinical isolate. Transconjugants were selected  
121 on Müller Hinton (MH) agar plates containing rifampicin (50 mg/L) and nalidixic acid  
122 (16 mg/L).

123

**124 Plasmid DNA analysis**

125 Plasmid DNA identification was attempted using genomic mapping with *I-CeuI* and S1  
126 nuclease followed by Southern blot and double hybridization with probes for the *qnr*  
127 and the 23S rRNA (*rrl* gene) genes as previously described [13,14].

128

**129 Determination of the genetic surrounding of the *qnrB* genes**

130 DNA from the four isolates was digested with *SacI* “GAGCT<sup>v</sup>C” (New England  
131 Biolabs, Ipswich, MA), which does not have recognition sites in the *qnrB* genes. The  
132 fragments obtained were autoligated overnight at 16°C using T4 DNA Ligase (Promega  
133 Biotech Ibérica, Madrid, Spain) and used as templates for a PCR with inverse primers  
134 designed from the sequences obtained with the inverse PCR performed with *qnr*evI and  
135 *qnr*evII to obtain the whole sequence of the *qnrB*6 and *qnrB*16 genes (*qnr*evIII: 5’-  
136 GACATCGGTTTAGTTTCCGG-3’, and *qnr*evIV: 5’-  
137 TCGTTCCACTTATCAAATAG-3’). The resulting bands were sequenced using the  
138 BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, United  
139 Kingdom).

140

141

142

**143 Molecular typing**

144 Epidemiological analysis was performed in the three *C. freundii* in order to discard the  
145 clonality of the strains. The analysis was performed by digestion of the chromosomal  
146 DNA with a low-frequency restriction enzyme (*XbaI*) followed by pulsed-field gel  
147 electrophoresis (PFGE) under conditions previously described [15].

148

**149 Nucleotide sequence accession number**

150 The sequence for the *qnrB16* gene described has been assigned GenBank accession  
151 number EU136183 as recommended by Jacoby *et al* [7].

152

**153 RESULTS**

154 Five out of the 306 (1.6%) Enterobacteriaceae isolated as a cause of bacteraemia  
155 carried a *qnr* gene, four of which corresponded to the *qnrB* gene and the fifth to the  
156 *qnrS* gene. The *qnrA* gene was not found in any of the strains studied. The *qnrS* gene  
157 corresponded to the *qnrS2* variant and was found in a *K. pneumoniae* clinical isolate. A  
158 new variant of the *qnrB* gene was detected in *C. freundii* (*qnrB16*) (Table1). The amino  
159 acid sequence of QnrB16 differed from QnrB1 by four amino acids: S79A, I142M,  
160 A144T and V212I. Furthermore, QnrB6 and QnrB16 differed only in one amino acid,  
161 A144T [7].

162 The quinolone resistance-determining region (QRDR) of the *gyrA* and *parC*  
163 genes of the five isolates was amplified and sequenced. *C. freundii* 21112 showed two  
164 mutations, one in the *gyrA* gene (Thr83Ile) and one in the *parC* gene (Ser80Ile). The  
165 other strains did not show any mutation in the analyzed genes. The characteristics  
166 related to the presence of mutations in the target genes, the type of *qnr* determinant and

167 the MICs of the quinolones tested for the studied strains have been summarized in Table  
168 1.

169 PFGE was performed to discard the possibility of a clonal relationship among  
170 the three *C. freundii* clinical isolates. Figure 1 clearly shows the three different patterns  
171 of the isolates studied. Therefore, the three *C. freundii* isolates were not  
172 epidemiologically related and the presence and acquisition of the *qnrB* determinants  
173 could not be explained by vertical transmission.

174 Plasmids containing the *qnrB* genes could not be purified neither by using  
175 commercial plasmid extraction kits nor by the Kieser technique [16]. This was the first  
176 fact that led us to consider the chromosomal location of these genes. Another approach  
177 to elucidate the location of these *qnrB* genes was the conjugation experiment of the *C.*  
178 *freundii* 62778 clinical isolate. The conjugation assay yielded negative results, which  
179 also supported the theory of the chromosomal location. Plasmid analysis and  
180 hybridization experiments of the *K. pneumoniae* 46408 isolate showed that *qnrS2* was  
181 located on a plasmid of approximately 50 Kb (Figure 2C). Analysis of the *qnrB*  
182 determinants in the other isolates by genomic mapping with *I-CeuI* and S1 nuclease  
183 followed by Southern blot and double hybridization with probes for the *qnr* genes and  
184 for the 23S rRNA (*rrl* gene) genes, (Figures 3 and 4), revealed that both, *qnrB6* and  
185 *qnrB16*, were chromosomally located. Figure 3 shows a genomic map with *I-CeuI* using  
186 PFGE with pulse times ramped from 5-20 seconds during 19 hours. Although we were  
187 unable to discriminate the bands where the *qnr* probes hybridized, the sizes suggested  
188 by the hybridization signals indicate their chromosomal location. Modification of the  
189 PFGE conditions as previously described by Liu *et al.*[13] provided better resolution in  
190 the area of the gel with a high molecular weight (Figure 4). The resulting Southern blot  
191 showed that the *qnr* probes for the *qnrB* genes were outside the limits of the marker,

192 being above 750 kb, thereby making the presence of a plasmid in that region  
193 impossible.

194 A region of circa 2 Kb near the *qnrB6* and *qnrB16* genes was sequenced by  
195 inverse PCR. In both cases the genetic surrounding was similar to that recently  
196 published in the Genbank (accession n° AJ609296) showing a *qnrB2* gene inserted into  
197 a class 1 integron and flanked upstream by the *pspF* gene and downstream by the *orf2*  
198 and the *sapA* genes.

199

## 200 **DISCUSSION**

201 QnrA, QnrB and QnrS have been found in all continents and in the most clinically  
202 common Enterobacteriaceae [8,17-20] but also, for the first time, a QnrS determinant  
203 has recently been reported in an *Aeromonas* spp [17]. Several studies around the world  
204 have shown the prevalence of the QnrB determinants in Enterobacteriaceae [9,18,21-  
205 26]. In Spain, several studies have shown the prevalence of the *qnrA* and *qnrS* genes  
206 [8,27]. In a study performed by Cano *et al.* [28], among 202 *E. cloacae* and *E.*  
207 *aerogenes* clinical isolates, 22 *E. cloacae* carried the a *qnrS* determinant. Five different  
208 REP-PCR profiles were obtained for the *qnrS*-positive *E. cloacae*, containing 14, 4, 2, 1  
209 and 1 isolates respectively. All of them were resistant to ciprofloxacin except 4 isolates  
210 clonally related by REP-PCR which were susceptible to ciprofloxacin and to nalidixic  
211 acid and 1 isolate intermediately resistant to ciprofloxacin and resistant to nalidixic acid.  
212 Lavilla *et al.* [27] recently analysed 305 ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates  
213 for the presence of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes. Fifteen isolates carried a *qnr*  
214 determinant, among which, 14 carried a *qnrA1* determinant and 1 carried the *qnrS1*  
215 determinant. The positive strains corresponded to *K. pneumoniae* (7), *E. cloacae* (6) and  
216 *E. coli* (2). In a recent study, 3 out of 55 ciprofloxacin-resistant *E. coli* clinical isolates

217 causing uncomplicated community-acquired cystitis, were found to contain a *qnrB*-like  
218 gene. This is the first time that a QnrB determinant has been reported in Spain [29].

219 In this study, we report a new variant of the *qnrB* gene, *qnrB16*. An interesting  
220 feature observed in the present study is the high prevalence of the *qnrB* determinant in  
221 our hospital compared with those for *qnrA* and *qnrS*, and the high prevalence of this  
222 *qnrB* gene in *Citrobacter* spp. (4 out of 5 *qnr* positive isolates), similar to what has been  
223 found in Korea [26]. The new QnrB16 variant reported here differs from QnrB1 by four  
224 amino acids: S79A, I142M, A144T and V212I [7]. None of these positions fit with  
225 position 115, which has been proposed as a potential point of union between the Qnr  
226 determinants and DNA or type II topoisomerases [30]. Characterization of the  
227 interaction of Qnr with DNA and type II topoisomerases is necessary for a better  
228 understanding of its mechanism of action and to design new antibacterial agents able to  
229 counteract its action.

230 This is also the first time that a *qnrS2* determinant has been found in a *K.*  
231 *pneumoniae* isolate. To date, the *qnrS2* gene has been described only in a transferable  
232 IncQ-related plasmid (pGNB2) isolated from an activated sludge bacterial community  
233 of a wastewater treatment plant in Germany [20], in a *Salmonella enterica* subsp.  
234 *enterica* serovar Anatum [21], in a *Vibrio parahaemolyticus* isolate and in an  
235 *Aeromonas punctata* [17].

236 Only *C. freundii* 21112 and *K. pneumoniae* 46408 isolates were resistant to  
237 nalidixic acid. *C. freundii* 21112 carried a *qnrB6* determinant as well as one mutation in  
238 the *gyrA* gene (Thr83Ile) and one mutation in the *parC* gene (Ser80Ile) which would  
239 explain the high MIC of nalidixic acid (>256 mg/L) and also the MIC of ciprofloxacin  
240 (3 mg/L). *K. pneumoniae* 46408 carried a *qnrS2* determinant, but no mutations were  
241 found in any of the studied genes (*gyrA* and *parC*). A *Salmonella* isolate carrying the



242 *qnrS2* determinant showed MICs of 0.5 and 16 (mg/L) to ciprofloxacin and nalidixic  
243 acid, respectively [21]. Moreover, a *qnrS2* determinant found in an *Aeromonas punctata*  
244 [17] was transferred to an *E. coli* TOP10 conferring a low level of resistance to  
245 fluoroquinolones; from 1mg/mL to 4 mg/mL to nalidixic acid and from < 0.01 mg/mL  
246 to 0.25 mg/mL to ciprofloxacin. Since no mutations in the *gyrA* and *parC* genes were  
247 found, the high level of resistance to nalidixic acid (>256 mg/L) and ciprofloxacin (>32  
248 mg/L) in this *K. pneumoniae* isolate could have been achieved with the combination of  
249 the *qnrS2* determinant and some other mechanism of quinolone resistance such as  
250 changes in the permeability (associated with a decrease of porin expression or the  
251 overexpression of efflux pump systems) for these antimicrobial agents or the recently  
252 reported mechanisms encoded by the *aac(6')-Ib-cr* and/or *qepA* genes [31,32]. In the  
253 rest of the remaining *qnr*-positive isolates and as reported previously, the *qnr*  
254 determinant alone did not provide resistance to fluoroquinolones [33-35].

255 A chromosomally located origin of these genes has been only proposed in  
256 *Shewanella algae* [36] and in *C. werkmanii* [22]. Furthermore, some reports have  
257 suggested a chromosomal location of the commonly plasmid-borne *qnr* determinants  
258 [37,38]. Repeated plasmid purification and conjugation experiments using *E. coli*  
259 J53Rif<sup>R</sup> yielded negative results for the presence of *qnr*-containing plasmids. Genomic  
260 mapping analysis with *I-CeuI* and S1 nuclease followed by Southern blot hybridization  
261 studies confirmed these results and pointed out the chromosomal location of these  
262 genes. Although plasmids larger than 750 kb have been described  
263 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=1&type=7&name=Plasmids>),  
264 their distribution is rare and they have been found only in bacteria with special  
265 requirements and from extreme environments. Therefore, all these data demonstrate the

266 chromosomal location of the *qnrB6* gene in *C. freundii* and *C. werkmanii* and the  
267 *qnrB16* gene in *C. freundii*.

268 On the other hand, genes for *qnrA* and sometimes *qnrB* have been found as part  
269 of complex class of type 1 integrons containing a presumed recombinase, Orf513  
270 [39,40]. However, in the few *qnrS* plasmids sequenced, *qnrS* was not part of an  
271 integron, although one plasmid was bracketed by inverted repeats with an insertion  
272 sequence-like structure that could have been responsible for its mobilization [21]. The  
273 *qnrB* determinants showed in this study were found to be associated with an integron-  
274 like structure similar to that reported for a *qnrB2* gene in *K. pneumoniae* [41].

275 Since new variants of these *qnr* determinants continuously appear in different  
276 locations and also outside the Enterobacteriaceae family, further studies are necessary  
277 to elucidate a valid map of the distribution of these *qnr* determinants as well as to  
278 determine their clinical implications and its contribution to the quinolone resistance.

279

280

## 281 **ACKNOWLEDGEMENTS**

282 This work has been supported by Grants FIS 05/0068 from the Ministry of Health,  
283 Spain, and SGR00444 from the Departament d'Universitats, Recerca I Societat de la  
284 Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (to J.V.).

285

286

287

288

289

290

291 **Table 1.** Characteristics of isolates with quinolone-resistant determinants (*qnr*)

Isolate	Amino acid changes		QnrB	QnrS	*CI	NA	NX
	GyrA	ParC					
<i>C. freundii</i> 72857	-	-	B16	-	0.19	8	0.5
<i>C. freundii</i> 62778	-	-	B6	-	0.19	8	0.25
<i>C. freundii</i> 21112	Thr83Ile	Ser80Ile	B6	-	3	>256	12
<i>C. werkmanii</i> 14.0	-	-	B6	-	0.09	6	0.19
<i>K. pneumoniae</i> 46408	-	-	-	S2	>32	>256	48

298 \*CI: Ciprofloxacin; NA: Nalidixic acid; NX: Norfloxacin. Values of MICs are expressed in  
299 mg/L

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

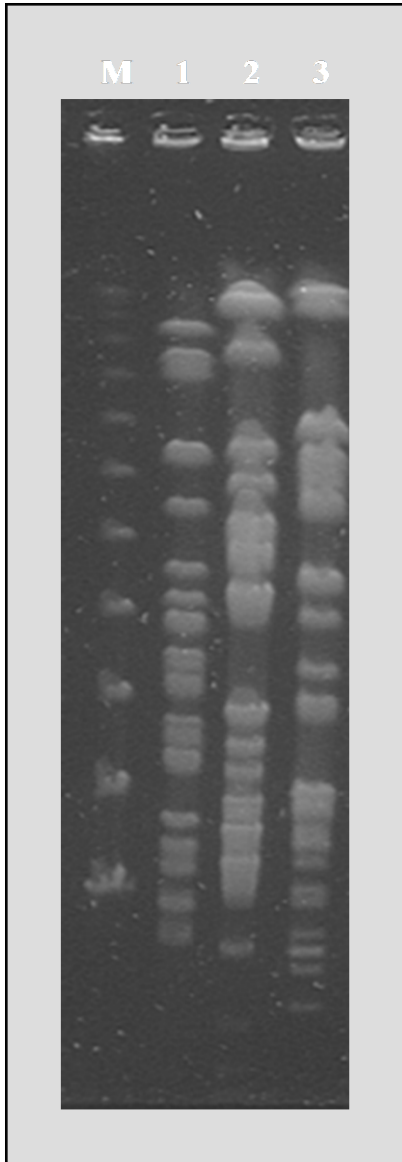
311

312

313

314

315 **Figure 1.** PFGE of the three *C. freundii* clinical isolates The DNA was digested with  
316 *Xba I*. M: Lambda marker; 1, *C. freundii* 72857; 2, *C. freundii* 62778; 3, *C. freundii*  
317 21112.



318

319

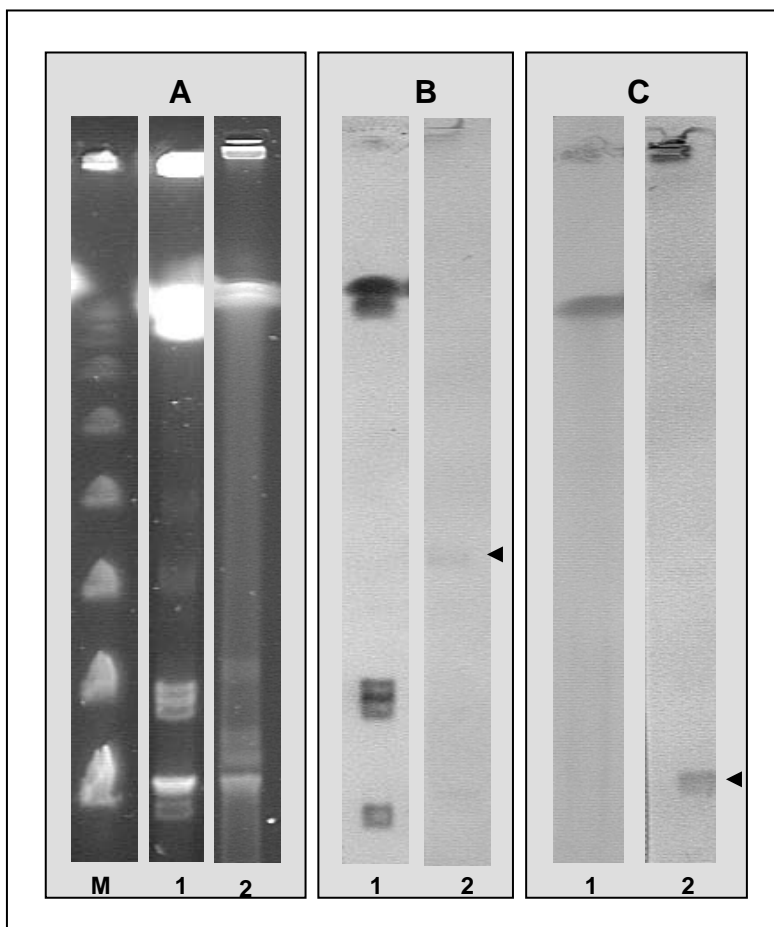
320

321

322

323

324 **Figure 2.** Plasmid identification in *K. pneumoniae* 46408 by genomic mapping with *I-*  
325 *CeuI* and by digestion with nuclease S1. (A) PFGE gel: Lane M – Lambda ladder PFGE  
326 marker. Lane 1 - Digestion with *I-CeuI*. Lane 2 - Digestion with S1 nuclease. (B)  
327 Digestion with *I-CeuI*: Lane 1 - Hybridization with a probe for the 23S rRNA gene.  
328 Lane 2 – Hybridization with a probe for QnrS. (C) Digestion with S1 nuclease: Lane 1 -  
329 Hybridization with a probe for the 23S rRNA gene. Lane 2 – Hybridization with a probe  
330 for QnrS.



331

332 \* Arrows represent plasmid location.

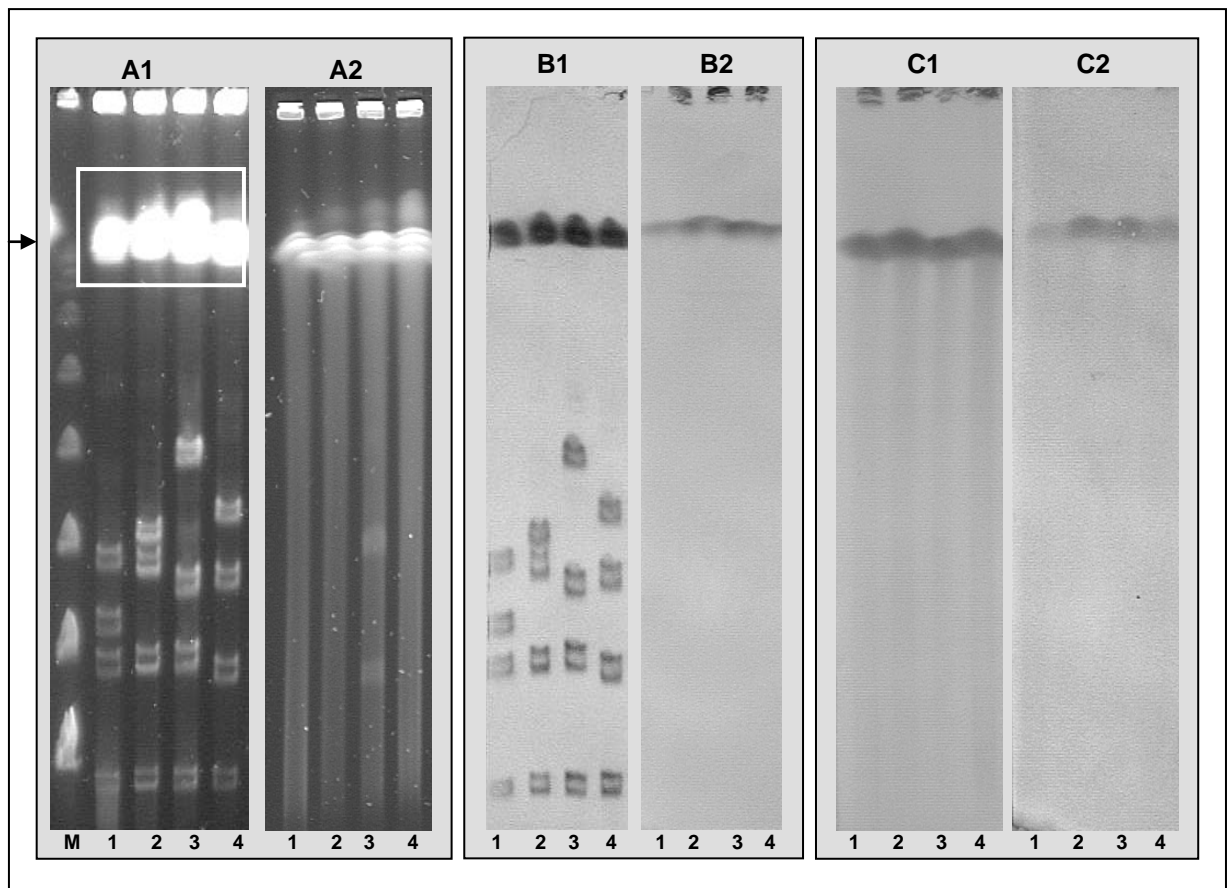
333

334

335

336

337 **Figure 3.** *QnrB* identification by genomic mapping with *I-CeuI* and by digestion with  
 338 S1 nuclease. (A) PFGE gel: A1 - Digestion with *I-CeuI*. A2 - Digestion with S1  
 339 nuclease. (B) Digestion with *I-CeuI*: B1 - Hybridization with a probe for the 23S rRNA  
 340 gene. B2 – Hybridization with a probe for *QnrB*. (C) Digestion with S1 nuclease: C1 -  
 341 Hybridization with a probe for the 23S rRNA gene. C2 – Hybridization with a probe for  
 342 *QnrB*. Lane M – Lambda ladder PFGE marker. Lane 1 - *C. freundii* 72857; Lane 2 - *C.*  
 343 *freundii* 62778; Lane 3 - *C. freundii* 21112; Lane 4 - *Citrobacter werkmanii* 14.0  
 344



345

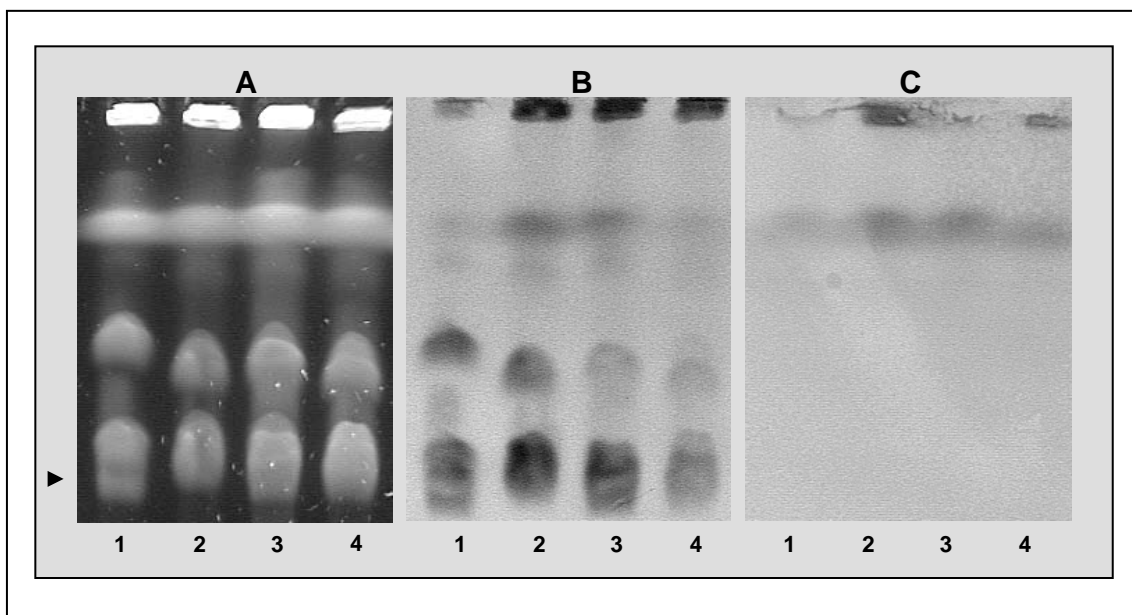
346 \* Square selection in A1 represents the region amplified in Figure 4 after changing the PFGE  
 347 conditions. The arrow represents the last band of the Lambda ladder (727.5 kb).

348

349

350

351 **Figure 4.** Plasmid identification by genomic mapping with *I-CeuI* following the PFGE  
352 conditions described by Liu *et al.* [13] (A) PFGE gel. (B) Hybridization with a probe for  
353 the 23S rRNA gene. (C) Hybridization with probe for QnrB. Lane M – Lambda ladder  
354 PFGE marker. Lane 1 - *C. freundii* 72857; Lane 2 - *C. freundii* 62778; Lane 3 - *C.*  
355 *freundii* 21112; Lane 4 - *Citrobacter werkmanii* 14.0  
356



357

358 \* The arrow represents the last band of the Lambda ladder (727.5 kb).

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

## REFERENCES

370

371 1. Vila J. Fluoroquinolone resistance, *In* D.G.White, M.N.Alekshun, and  
372 P.F.McDermott (eds.), *Frontiers in antimicrobial resistance*. ASM Press,  
373 Washington, DC. 2005, 41-52

374 2. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased  
375 accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**:  
376 1109-1117.

377 3. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; **41**  
378 (Suppl 2): S120-S126.

379 4. Nishino Y, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Nakano M, Kanematsu E, Ozeki  
380 S, Kawada Y. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes associated with  
381 fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *FEMS*  
382 *Microbiol Lett* 1997; **154**: 409-414.

383 5. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a  
384 transferable plasmid. *Lancet* 1998; **351**: 797-799.

385 6. Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, Fiser A, Roderick SL, Takiff HE, Blanchard  
386 JS. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 2006; **45**: 1-10.

387 7. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martinez-Martinez L, Nordmann P, Pascual A,  
388 Poirel L, Wang M. *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;  
389 **52**: 2297-2299.



- 390 8. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-  
391 mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 629-640.
- 392 9. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in  
393 ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States.  
394 *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2872-2874.
- 395 10. Sanchez-Cespedes J, Blasco MD, Marti S, Alba V, Alcalde E, Esteve C, Vila J.  
396 Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate.  
397 *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2990-2991.
- 398 11. Navia MM, Ruiz J, Ribera A, de Anta MT, Vila J. Analysis of the mechanisms of  
399 quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob*  
400 *Chemother* 1999; **44**: 743-748.
- 401 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for  
402 antimicrobial susceptibility testing and W. P. 16th informational supplement.  
403 M100-S18.
- 404 13. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with *I-Ceu I*, an intron-  
405 encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp.,  
406 *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1993; **90**: 6874-  
407 6878.
- 408 14. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing  
409 large plasmids. *Anal Biochem* 1995; **226**: 235-240.
- 410 15. Gallardo F, Ruiz J, Marco F, Towner KJ, Vila J. Increase in incidence of  
411 resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of

- 412 Salmonella serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology  
413 and mechanisms of resistance. *J Med Microbiol* 1999; **48**: 367-374.
- 414 16. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans*  
415 and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; **12**: 19-36.
- 416 17. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy C, Nordmann P. Unexpected occurrence of  
417 plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas*  
418 spp. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 231-237.
- 419 18. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC.  
420 *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents*  
421 *Chemother* 2006; **50**: 1178-1182.
- 422 19. Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone  
423 resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of  
424 *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*  
425 2007; **51**: 1223-1227.
- 426 20. Bonemann G, Stiens M, Puhler A, Schluter A. Mobilizable IncQ-related plasmid  
427 carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial  
428 community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;  
429 **50**: 3075-3080.
- 430 21. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F,  
431 Chiller TM, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi  
432 serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 297-304.

- 433 22. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Schwarz S. Novel variant of the *qnrB*  
434 gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **52**:  
435 1206-1207.
- 436 23. Strahilevitz J, Engelstein D, Adler A, Temper V, Moses AE, Block C, Robicsek  
437 A. Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of  
438 *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005.  
439 *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3001-3003.
- 440 24. Kim MH, Sung JY, Park JW, Kwon GC, Koo SH. Coproduction of *qnrB* and  
441 *armA* from Extended-Spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*.  
442 *Korean J Lab Med* 2007; **27**: 428-436.
- 443 25. Pai H, Seo MR, Choi TY. Association of QnrB determinants and production of  
444 extended-spectrum beta-lactamases or plasmid-mediated AmpC beta-lactamases  
445 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;  
446 **51**: 366-368.
- 447 26. Park YJ, Yu JK, Lee S, Oh EJ, Woo GJ. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in  
448 AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter*  
449 *freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob*  
450 *Chemother* 2007; **60**: 868-871.
- 451 27. Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Sabate M, Garcia-Fernandez A, Larrosa MN,  
452 Bartolome RM, Carattoli A, Prats G. Prevalence of *qnr* genes among extended-  
453 spectrum {beta}-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain.  
454 *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 291-295.

- 455 28. Cano ME, Rodriguez-Martinez JM, Agüero J, Pascual A, Martínez-Martínez L.  
456 Detection of *qnrS* in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Spain. *Clin*  
457 *Microbiol Infect* 2006; **12**: Abstract O52.
- 458 29. Cagnacc S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A. European emergence of  
459 ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and  
460 O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin*  
461 *Microbiol* 2008; **46**: 2605-2612.
- 462 30. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. In-vitro mutagenesis of *qnrA* and *qnrS* genes  
463 and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 940-  
464 943.
- 465 31. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush  
466 K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a  
467 common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; **12**: 83-88.
- 468 32. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K,  
469 Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump,  
470 QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*  
471 2007; **51**: 3354-3360.
- 472 33. Mammeri H, Van De LM, Poirel L, Martínez-Martínez L, Nordmann P.  
473 Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in  
474 Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 71-76.
- 475 34. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of  
476 plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003; **51**: 1037-  
477 1039.

- 478 35. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Zhang Y, Hooper DC. Activities of newer  
479 quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the  
480 plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob Agents*  
481 *Chemother* 2004; **48**: 1400-1401.
- 482 36. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mhammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of  
483 plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents*  
484 *Chemother* 2005; **49**: 3523-3525.
- 485 37. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Pascual A, Nordmann P. Plasmid-mediated  
486 quinolone resistance in Australia. *Microb Drug Resist* 2006; **12**: 99-102.
- 487 38. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging plasmid-mediated  
488 quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae*  
489 clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:  
490 1295-1299.
- 491 39. Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC. Genetic environment of  
492 quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly  
493 described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother*  
494 2006; **50**: 3200-3202.
- 495 40. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones  
496 in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2005; **56**: 463-469.
- 497 41. Espedido BA, Partridge SR, Iredell JR. bla(IMP-4) in different genetic contexts in  
498 Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;  
499 **52**: 2984-2987.



**7.1.6 Artículo VI. Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical**

*Aeromonas veronii* isolate

**Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate**

Javier Sanchez-Céspedes, M<sup>a</sup> Dolores Blasco, Sara Martí, Verónica Alba, Elena

Alcaide, Consuelo Esteve and Jordi Vila

*Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52 (8), 2990-2991

El principal objetivo de este estudio fue analizar la prevalencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en una colección de cepas de *Aeromonas* spp. de origen ambiental y clínico. Fueron estudiados 57 aislamientos, los cuales fueron identificados mediante métodos bioquímicos (resistentes y susceptibles al ácido nalidíxico). Treinta y dos cepas tenían un origen ambiental mientras que las 25 cepas restantes procedían de aislamientos clínicos. La búsqueda de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se realizó mediante PCR múltiple, utilizando cebadores específicos y controles para cada gen. La secuencia obtenida se comparó con las secuencias ya publicadas en el banco de genes (GenBank). Sus susceptibilidades antibióticas fueron determinadas mediante el uso de E-test, y el análisis de los genes *gyrA* y *parC* se realizó mediante PCR de la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) en las cepas positivas para la presencia del gen *qnr*. Se realizó además el estudio plasmídico en la cepa portadora del determinante *qnr* mediante digestión del ADN de la célula con las enzimas *I-CeuI* y nucleasa S1 y posterior Souther-blot con sondas específicas para los genes *qnrS2* y 23S ARNr. De entre todas las cepas estudiadas sólo una de ellas fue positiva para la PCR múltiple. Esta cepa correspondía a un aislamiento clínico de *Aeromonas veronii* biovar sobria. Presentaba dos mutaciones, una en el gen *gyrA* (Ser83-Ile) y otra en el gen *parC* (Ser80-Ile). El gen *qnr* obtenido fue secuenciado y se observó que presentaba una

homología del 100% respecto del gen *qnrS2* publicado en el GenBank. Esta cepa mostraba resistencia frente al ácido nalidíxico (>256 mg/L), el cirpofloxacino (8 mg/L) y el norfloxacino (12 mg/L). El plásmido portador del gen *qnrS2* presentaba un tamaño de entre 48,5-97,0 Kb (pA272). Este plásmido fue clonado en una cepa de *E. coli* J53 Rif<sup>R</sup>. Las CMI's estimadas mediante E-Test, de la cepa original y de la transformada con el plásmido pA272, mostraron incrementos de entre 10 y más de 64 veces en la cepa transformada. No se observaron incrementos en las CMI's frente a otros antibióticos tales como  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol o tetraciclina en la cepa de *E. coli* transformada. Esta es la primera vez que se describe un plásmido portador de un determinante *qnrS* en un aislamiento clínico de *Aeromonas* spp. El descubrimiento del gen *qnrS2* en un aislamiento clínico fuera de la familia Enterobacteriaceae enfatiza la versatilidad de estos determinantes para dispersarse entre diferentes especies bacterianas con el riesgo potencial que ello comporta para la salud humana.



## Letters to the Editor

### Plasmid-Mediated QnrS2 Determinant from a Clinical *Aeromonas veronii* Isolate<sup>▽</sup>

The main objective of this study was to determine the prevalence of the Qnr determinants in clinical and environmental *Aeromonas* spp. A total of 52 *Aeromonas* sp. isolates identified by biochemical methods (5), 25 isolated from natural waters (1) and 27 isolated from clinical samples from hospitals in Valencia, Spain, were tested for quinolone resistance by the disk diffusion method (4) (nalidixic acid, 30 µg; oxolinic acid, 2 µg; flumequine, 30 µg; ciprofloxacin, 5 µg; and levofloxacin, 5 µg). Among the studied isolates, 27 showed resistance to nalidixic acid and susceptibility to ciprofloxacin, 24 isolates were susceptible to both nalidixic acid and ciprofloxacin, and only 1, the *A. veronii* A272 clinical isolate, was resistant to both nalidixic acid and ciprofloxacin. The isolates resistant to nalidixic acid were also resistant to oxolinic acid and flumequine. Moreover, *A. veronii* A272 was the only one resistant to levofloxacin. Screening of the *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes was performed by multiplex PCR using a set of specific primers for all isolates. Bacterial strains positive for each *qnr* gene were used as positive controls (*Klebsiella pneumoniae* UAB1 for *qnrA*, *Escherichia coli* J53 pMG252 for *qnrB*, and *E. coli* J53 pMG298 for *qnrS*) and were run in each batch of tested samples. Only an *A. veronii* clinical isolate (*A. veronii* A272) presented a *qnr* gene, which showed 100% homology with the *qnrS2* gene previously reported in an isolate from the bacterial community of a wastewater treatment plant in Germany (2) and in a non-Typhi *Salmonella* clinical isolate in the United States (6).

The *qnrS2*-carrying strain was identified as *A. veronii* by sequencing of the 16S rRNA gene (10). The MICs for nalidixic acid, ciprofloxacin, and norfloxacin were determined using the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden). CLSI breakpoints were used to define susceptibility (4). The MICs showed by this strain were >256 mg/liter, 8 mg/liter, and 12 mg/liter to nalidixic acid, ciprofloxacin, and norfloxacin, respectively (Table 1). PCR amplification of the quinolone resistance-determining regions of the *gyrA* and *parC* genes was performed with primers previously described (7). *A. veronii* CECT 4260 and CECT 4258 strains, susceptible to quinolones, were included. The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with

software available on the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Comparison of the deduced amino acid sequences of GyrA and ParC with those of susceptible *A. veronii* CECT 4258 and CECT 4260 strains showed that *A. veronii* A272 carried mutations in the quinolone resistance-determining regions of both the *gyrA* and *parC* genes (Table 1). As previously reported, the same mutations were found in a strain that showed a MIC to ciprofloxacin of 0.5 mg/liter (7). Therefore, the level of resistance to these antibacterial agents could be explained by these two mutations in the *gyrA* and *parC* genes plus the additive effect of the presence of the QnrS2 determinant as previously suggested by Martinez-Martinez et al. (9).

Conjugation experiments were performed by the liquid mating-out assay using rifampin-resistant *E. coli* J53 and an environmental *Aeromonas* subsp. resistant to rifampin as recipient strains and nalidixic acid as the selective agent. The conjugation experiments provided negative results. After the extraction and purification of the *qnrS2*-containing plasmid (pA272) (the *qnrS2*-containing plasmid showed a size ranging from 48.5 to 97.0 kb [Lambda ladder PFG marker; New England Biolabs, Ipswich, MA]), a transformation experiment was done with rifampin-resistant *E. coli* J53 by electroporation. The quinolone MICs of the recipient *E. coli* J53 strain and of the transformed strain, determined by Etest, revealed a 10- to more than 64-fold increase in the transformant (Table 1). In addition, we did not observe increased resistance to β-lactam antibiotics, aminoglycosides, chloramphenicol, and tetracycline in the transformed *E. coli* strain (data not shown).

To analyze the genetic context of the *qnrS2* gene, the DNA of *A. veronii* A272 was digested with MspI “C\*CGG” (recognition site) (New England Biolabs, Ipswich, MA), which does not have recognition sites in the *qnrS2* gene. The fragments obtained were autoligated overnight at 16°C using T4 DNA ligase (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) and used as a template for a PCR with inverse primers designed from the *qnrS2* gene sequence (*qnrS2*invF, 5'-GAACAGCTTCTCGAAGCGTTG-3', and *qnrS2*invR, 5'-ACTGTGGTGTGCATATGTGTG-3'). The resulting bands were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom). The sequence obtained around the *qnrS2* gene (approximately 300 bp from each side) showed that this gene was inserted into an *mpR* gene as previously reported by Cattoir et al. (3).

This is the first time that a *qnrS*-containing plasmid in an *Aeromonas* sp. clinical isolate has been described. Up to now, *qnr* determinants have only been reported in *Enterobacteriaceae* (8, 11–15), except for a recent report on a *qnrS*-containing plasmid found in environmental *A. caviae* (*A. punctata*) and *A. media* isolates (3). The identification of a *qnrS2* gene in a clinical isolate not within the *Enterobacteriaceae* family emphasizes the versatility of these determinants to spread among the different bacterial species with the consequent potential risk for human health.

This work has been supported in part by grants FIS 05/0068 from the Ministry of Health, Spain; CGL2004-02009 from the Ministry of Education and Science, Spain; and SGR00444 from the Department

TABLE 1. Quinolone susceptibilities of the *A. veronii* A272 clinical isolate, the *E. coli* J53 isolate, and the *E. coli* J53 isolate transformed with plasmid pA272

Strain	Amino acid change		QnrS2 <sup>a</sup>	MIC to quinolones (mg/liter) <sup>b</sup>		
	GyrA	ParC		NAL	CIP	NOR
<i>A. veronii</i> CECT 4258	Ser83	Ser80	–	<0.25	<0.02	<0.02
<i>A. veronii</i> CECT 4260	Ser83	Ser80	–	<0.25	<0.02	<0.02
<i>A. veronii</i> A272	Ile83	Ile80	+	>256	8	12
<i>E. coli</i> J53			–	4	0.023	0.19
<i>E. coli</i> J53 + pA272			+	>256	0.5	2

<sup>a</sup> –, negative; +, positive.

<sup>b</sup> NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; NOR, norfloxacin.

d'Universitats, Recerca I Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (to J.V.). M.D.B. is the recipient of a Ph.D. fellowship from the Spanish government (Ministry of Education and Science).

We thank G. Jacoby for providing us with the control strains used in this study.

## REFERENCES

1. **Blasco, M. D., C. Esteve, and E. Alcaide.** 20 February 2008, posting date. Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03765.x.
2. **Bonemann, G., M. Stiens, A. Puhler, and A. Schluter.** 2006. Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3075–3080.
3. **Cattoir, V., L. Poirel, C. Aubert, C. Soussy, and P. Nordmann.** 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:231–237.
4. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. **Esteve, C.** 1995. Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* isolated from fish and surrounding aquatic environment. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:391–402.
6. **Gay, K., A. Robicsek, J. Strahilevitz, C. H. Park, G. Jacoby, T. J. Barrett, F. Medalla, T. M. Chiller, and D. C. Hooper.** 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.* **43**:297–304.
7. **Goni-Urriza, M., C. Arpin, M. Capdepey, V. Dubois, P. Caumette, and C. Quentin.** 2002. Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:350–359.
8. **Lavilla, S., J. J. Gonzalez-Lopez, M. Sabate, A. Garcia-Fernandez, M. N. Larrosa, R. M. Bartolome, A. Carattoli, and G. Prats.** 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:291–295.
9. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, I. Garcia, J. Tran, and G. A. Jacoby.** 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1037–1039.
10. **Martinez-Murcia, A. J., S. Benlloch, and M. D. Collins.** 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:412–421.
11. **Park, Y. J., J. K. Yu, S. Lee, E. J. Oh, and G. J. Woo.** 2007. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:868–871.
12. **Robicsek, A., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* **6**:629–640.
13. **Strahilevitz, J., D. Engelstein, A. Adler, V. Temper, A. E. Moses, C. Block, and A. Robicsek.** 2007. Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3001–3003.
14. **Wang, M., D. F. Sahn, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1295–1299.
15. **Wu, J. J., W. C. Ko, S. H. Tsai, and J. J. Yan.** 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1223–1227.

**Javier Sánchez-Céspedes†**

*Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina Universitat de Barcelona 08036 Barcelona, Spain*

**M. Dolores Blasco‡**

*Departament de Microbiologia i Ecologia Universitat de València València, Spain*

**Sara Martí**

**Verónica Alba**

*Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina Universitat de Barcelona 08036 Barcelona, Spain*

**Elena Alcalde**

**Consuelo Esteve**

*Departament de Microbiologia i Ecologia Universitat de València València, Spain*

**Jordi Vila\***

*Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina Universitat de Barcelona 08036 Barcelona, Spain*

\*Phone: 34-93-2275522

Fax: 34-93-2279372

E-mail: jvila@ub.edu

† J. Sanchez-Céspedes and M. D. Blasco contributed equally to the experimental work.

‡ Published ahead of print on 27 May 2008.

## 7.2 Interacción ADN girasa/Fluoroquinolonas

### 7.2.1 Artículo VII. Binding mechanism of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA Gyrase: Towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance

#### **Binding mechanism of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA Gyrase: Towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance**

Madurga S, Sanchez-Céspedes J, Belda I, Vila J, Giralt E

*ChemBiochem.*, 2008, 9(13):2081-2086

En este trabajo hemos estudiado la resistencia bacteriana frente a fluoroquinolonas como resultado de las mutaciones en la proteína diana ADN girasa. Aunque se sabe que la ADN girasa es la diana principal para las quinolonas en bacterias Gram-negativas, los detalles moleculares de la interacción quinolona-girasa aún continúan siendo un misterio. El modo de unión de las fluoroquinolonas ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino a la ADN girasa fue analizado mediante cálculos de acoplamiento (“docking”) sobre la superficie de la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) del gen *gyrA*. El análisis de estos modelos de unión permite el estudio a nivel atómico de los mecanismos de resistencia asociados con las mutaciones en el gen *gyrA* más comúnmente encontradas en cepas de *Escherichia coli* resistentes a fluoroquinolonas. Se encontró que la mutación en la posición Asp87 resultaba crítica en la unión de estas fluoroquinolonas porque ésta interaccionaba con el nitrógeno cargado positivamente de estas drogas antibacterianas. El papel de otra de las más frecuentes mutaciones encontradas en la región RDRQ, la Ser83-Leu, podía ser explicado

mediante los contactos que la cadena lateral de este residuo establece con las moléculas de fluoroquinolona. Finalmente, nuestros resultados sugieren que, aunque la posición Arg121 nunca se ha asociado con la resistencia a fluoroquinolonas, este residuo podría contribuir a la unión de la ADN girasa al ADN, y además, podría jugar un papel fundamental en la unión del antibiótico al gen *gyrA* y determinaría su colocación en la región RDRQ de la enzima.

DOI: 10.1002/cbic.200800041

# Mechanism of Binding of Fluoroquinolones to the Quinolone Resistance-Determining Region of DNA Gyrase: Towards an Understanding of the Molecular Basis of Quinolone Resistance

Sergio Madurga,<sup>[a, b]</sup> Javier Sánchez-Céspedes,<sup>[c]</sup> Ignasi Belda,<sup>[a]</sup> Jordi Vila,<sup>[c]</sup> and Ernest Giralt\*<sup>[a, d]</sup>

We have studied the bacterial resistance to fluoroquinolones that arises as a result of mutations in the DNA gyrase target protein. Although it is known that DNA gyrase is a target of quinolone antibacterial agents, the molecular details of the quinolone–gyrase interaction remain unclear. The mode of binding of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin to DNA gyrase was analyzed by means of docking calculations over the surface of the QRDR of GyrA. The analysis of these binding models allows study of the resistance mechanism associated with *gyrA* mutations more commonly found in *E. coli* fluoroquinolone-resistant strains

at the atomic level. Asp87 was found to be critical in the binding of these fluoroquinolones because it interacts with the positively charged nitrogens in these bactericidal drugs. The role of the other most common mutations at amino acid codon Ser83 can be explained through the contacts that the side chain of this residue establishes with fluoroquinolone molecules. Finally, our results strongly suggest that, although Arg121 has never been found to be associated with fluoroquinolone resistance, this residue makes a pivotal contribution to the binding of the antibiotic to GyrA and to defining its position in the QRDR of the enzyme.

## Introduction

Bacterial resistance to antibiotics is the inevitable consequence of the use of antimicrobial agents. This resistance can be mediated by genes located either on the chromosome or on genetic elements of extraneous origins such as R (resistance) plasmids, transposons, and integrons.<sup>[1]</sup> These elements provide an efficient mechanism for rapid horizontal and vertical dissemination of antibiotic resistance determinants among bacterial species.<sup>[2–4]</sup>

Quinolones and fluoroquinolones are among the most extensively used drugs for the treatment of bacterial infections both in human and veterinary medicine. Such wide use has led to rapidly increasing bacterial resistance to this kind of antibiotics. The therapeutic use of quinolones began in 1962, with the introduction of nalidixic acid for the treatment of urinary tract infections in humans.<sup>[5]</sup> In the 1970s, fluoridation of the quinolone molecule at the C-6 position yielded norfloxacin, the first fluoroquinolone.<sup>[6]</sup> Ciprofloxacin, perhaps the most important and most widely used fluoroquinolone, was introduced onto the clinical market in 1987. Since then, structural revisions of quinolone molecules have provided numerous new agents for the treatment of a variety of bacterial infections. Older quinolones are active mostly against Gram-negative bacteria, whereas newer ones have broad spectra of activity including Gram-positive pathogens and anaerobes.<sup>[5,7,8]</sup> However, the future utility of these drugs is threatened by the increasing rate of emergence of quinolone-resistant bacteria.<sup>[9–13]</sup>

The emergence of quinolone resistance is accounted for by several mechanisms.<sup>[14–18]</sup> Resistance to fluoroquinolones typically arises as a result of alterations in the target enzymes

(DNA gyrase and topoisomerase IV) and changes in drug entry and efflux. Target alterations most frequently occur in GyrA, particularly within a short limited region called the “quinolone resistance-determining region” (QRDR).<sup>[19]</sup> The most common mutations include Ser83Leu and Asp87Asn of the *gyrA* gene of *E. coli*.<sup>[19,20]</sup> The level of drug resistance varies depending on the mutations and the bacterial species. Quinolone inhibition of DNA gyrase occurs through the formation of a stable ternary complex between DNA gyrase, DNA, and the quinolone molecule that blocks the progression of DNA replication.<sup>[21,22]</sup> DNA gyrase is a target of quinolone antibacterial agents; however, the molecular details of the quinolone–gyrase interaction are not clear. Quinolone resistance mutations frequently occur at residues Ser83 and Asp87 of the GyrA subunit, so it is feasi-

[a] Dr. S. Madurga, Dr. I. Belda, Prof. E. Giralt  
Institute for Research in Biomedicine  
Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona (Spain)  
Fax: (+34) 934-037-126  
E-mail: ernest.giralt@irbbarcelona.org

[b] Dr. S. Madurga  
Department of Physical Chemistry & IQTCUB, University of Barcelona  
Martí Franqués 1, 08028 Barcelona (Spain)

[c] J. Sánchez-Céspedes, Prof. J. Vila  
Department of Microbiology, School of Medicine, Hospital Clinic  
IDIBAPS, Barcelona (Spain)

[d] Prof. E. Giralt  
Department of Organic Chemistry, University of Barcelona  
Martí Franqués 1, 08028 Barcelona (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

ble that these residues are involved in drug binding. A binding model of quinolone action proposed by Maxwell and co-workers<sup>[23–27]</sup> postulated that both DNA gyrase and DNA are required to bind quinolones in a stable form. This model is based mainly on the observation that alterations in DNA gyrase that confer quinolone resistance reside in the QRDR (between residues 67 and 106 of GyrA in *E. coli*) and correlate with reduced binding of quinolones to the resistant mutant enzyme–DNA complex.

Here we have determined the binding position of quinolones to DNA gyrase in order to identify the molecular traits of their mode of action and to explain further how point mutations contribute to bacterial resistance to fluoroquinolones. Although several docking studies have been done either with the ATP binding site of the GyrB subunit<sup>[28,29]</sup> or outside the QRDR region of GyrA,<sup>[30]</sup> this is the first docking study with fluoroquinolones binding to the QRDR region of GyrA. Quinolones interact with the complex of DNA and DNA gyrase rather than with the enzyme alone, so it is necessary to modify the docking procedure in order to examine the effect of DNA on the binding of fluoroquinolones to DNA gyrase. We chose three representative fluoroquinolones—ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin—to perform this study.

## Results

### Fluoroquinolone structures

Ab initio calculations were performed with ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin. Optimized structures of ciprofloxacin and levofloxacin molecules had the attached piperazine ring in the equatorial conformation (Figure 1). This conformation preference is also observed experimentally for the *N*-methylpiperidine molecule.<sup>[31–34]</sup>

Ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin can each exist as three chemical species (cationic, zwitterionic, and anionic) depending on the pH of the aqueous solution. For ciprofloxacin, the experimentally measured  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values are 5.9 and 8.2.<sup>[35]</sup> For ofloxacin, which is a racemic mixture of the active (levofloxacin) and inactive enantiomer, the experimentally measured  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values are 6.1 and 8.1.<sup>[30]</sup> Thus, at physiological pH the major contribution is from the zwitterionic state. We therefore used the zwitterionic states of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin in docking calculations.

### Docking procedure

Before docking calculations directed towards a selected target were performed, it was necessary to define a region of the target in which the best mode of binding of the ligand would be searched. In this study, the available information on the residues most relevant to achieving greatest bacterial resistance to fluoroquinolones (Ser83 and Asp87) was used to select the region of DNA gyrase in which grid maps were calculated. In this docking procedure, the potential maps are defined in such a way that they contain or are very near these two DNA gyrase residues. From the crystal structure of a related system, which consists of the ternary complex between a human Top1 construct covalently attached to a DNA duplex with bound topotecan,<sup>[36]</sup> information about the relative disposition of the topotecan inhibitor molecule with respect to the DNA strand can be extracted. In this case, part of the ring plane of the topotecan molecule is intercalated into the duplex DNA. In addition, by solving the structure of a DNA duplex with covalently linked nalidixic acid by NMR and restrained torsion angle molecular dynamics, Siegmunt et al. found that nalidixic acid adopts a stacked conformation with nucleotide base pairs.<sup>[37]</sup> To force a similar orientational effect in the disposition of fluoroquinolones with respect to DNA, docking calculations were performed by a strategy that divides the surface of the DNA

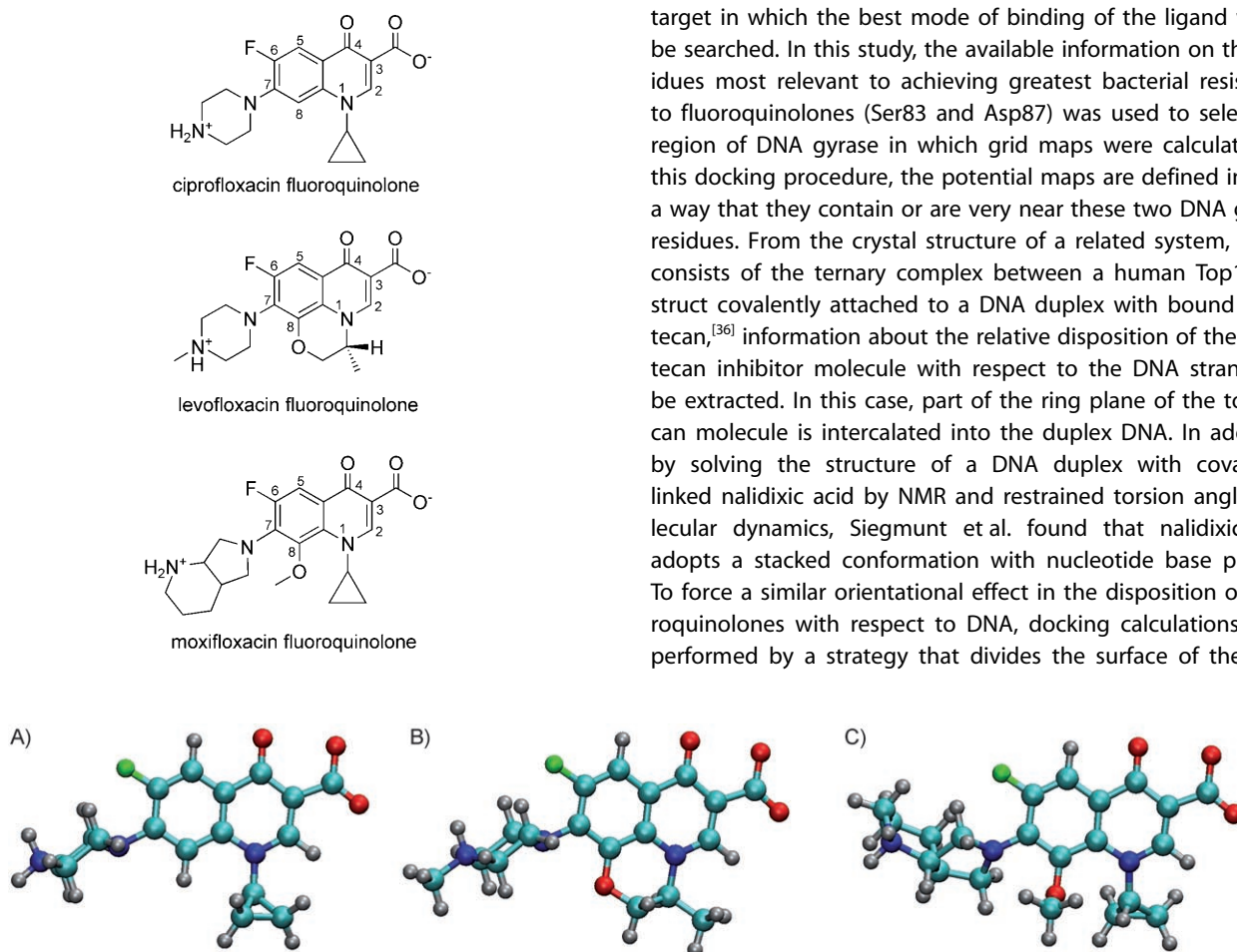
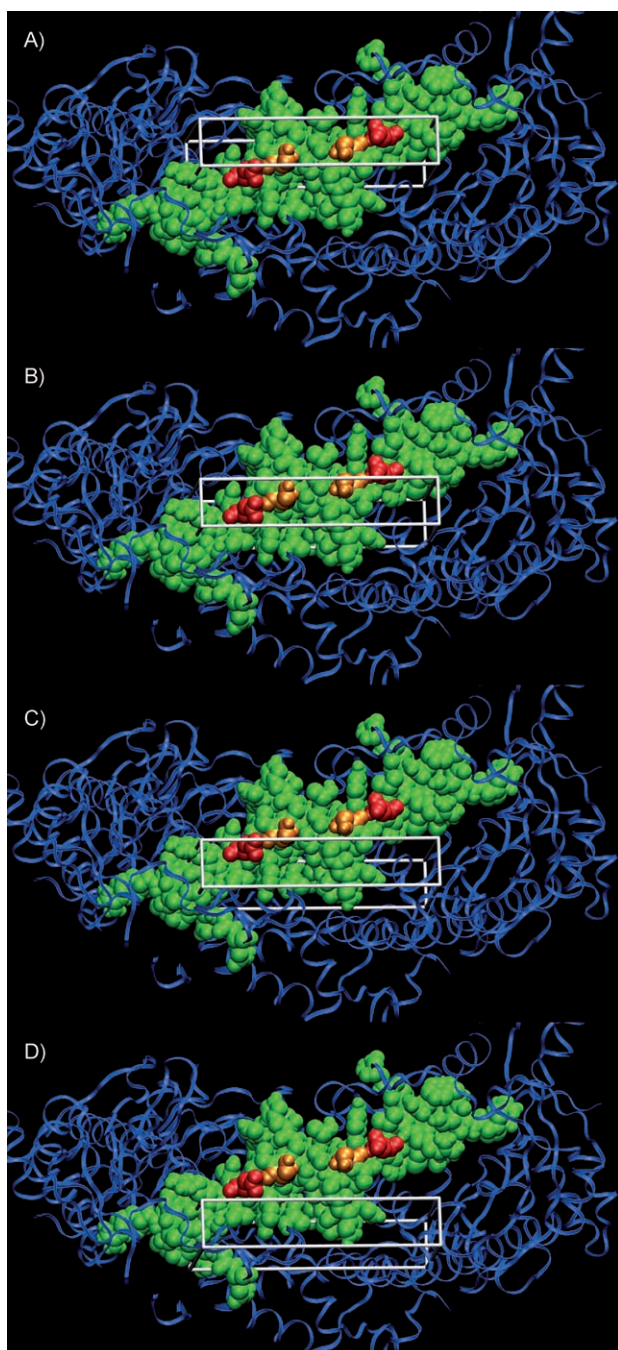


Figure 1. Structures of A) ciprofloxacin, B) levofloxacin, and C) moxifloxacin fluoroquinolones used in docking calculations.

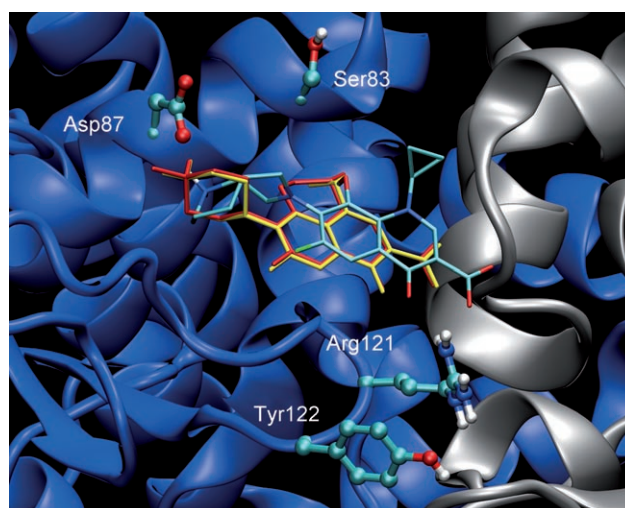
gyrase into several narrow regions. In this model, four overlapping narrow grids (Figure 2) were designed, to obtain fluoroquinolone structures oriented perpendicularly to the expected direction of the axes of the DNA. Docked structures of fluoroquinolones showed an orientation that made it possible to establish a stacked conformation with base pairs of the DNA attached to DNA gyrase. These docked fluoroquinolones could thus participate in a ternary complex with DNA gyrase and

DNA. Each box had a width of 7.5 Å and was displaced by 3.75 Å with respect to the adjacent box, so the limit of each box coincided with the center of the neighboring box. The boxes were oriented in such a way that the longest dimension of each box was perpendicular to the expected direction of the DNA axes.

For each small narrow box (Figure 2), a docking calculation with ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin was carried out. Figure 3 shows the best docking solution for each fluoroquinolone out of the four boxes. The best solutions for all



**Figure 2.** The four boxes (A–D) used in the calculations of docking of fluoroquinolones to DNA gyrase. The QRDR of DNA gyrase (from residues 67 to 106) is represented in CPK model. Ser83 and Asp87 are shown in orange and red, respectively. Non-QRDR DNA gyrase residues are drawn in ribbon representation.



**Figure 3.** The best docked structures for ciprofloxacin (yellow), levofloxacin (red), and moxifloxacin (cyan) were obtained in Box C. Ser83, Asp87, Arg121, and Tyr122 are also displayed in ball and stick representation. The two subunits of the DNA gyrase are in blue and grey in ribbon representation.

three molecules were obtained for the same box (box C), with similar patterns of binding to DNA gyrase. In each of the three fluoroquinolones the carboxylate group established a salt bridge with the guanidinium group of Arg121, whereas the positively charged N atom of the fluoroquinolone interacted with the carboxylate group of Asp87. For ciprofloxacin and levofloxacin, the carboxylate moiety also interacted with the Gly81 backbone HN proton, whereas for moxifloxacin this interaction was established to be at a large distance (4.1 Å).

Van der Waals contacts were observed between the Ser83 residue and the three compounds. Distances from the  $\alpha$  carbon of Ser83 to the N1 and C8 atoms of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin structures are shown in Table 1. All distances were below 6 Å, except for the distance to N1 in the case of moxifloxacin (about 7 Å). These values indicate that the pattern of moxifloxacin binding differs slightly. The docked structure of this fluoroquinolone was slightly displaced in relation to the structures of the other two drugs (Figure 3). Consequently, for ciprofloxacin, the cyclopropyl substituent interacted with Ser83, but for moxifloxacin the interaction of the same substituent with Ser83 was less significant.

With regard to the number of intermolecular atom contacts for a selected group of fluoroquinolone atoms with DNA gyrase protein atoms, we identified two patterns of binding

**Table 1.** Distances from the  $\alpha$  carbon of Ser83 to the N1 [ $d(\text{C}\alpha\text{-N1})$ ] and C8 atoms [ $d(\text{C}\alpha\text{-C8})$ ] of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin structures obtained in the oriented models.

	$d(\text{C}\alpha\text{-N1})$ [Å]	$d(\text{C}\alpha\text{-C8})$ [Å]
ciprofloxacin	5.3	5.6
levofloxacin	5.1	5.4
moxifloxacin	6.8	5.6

(Table 2). On the one hand, ciprofloxacin and levofloxacin showed a greater number of atom contacts for the N1 and C8 substituents of their fluoroquinolone rings than for their C7 substituents. On the other hand, the C7 substituent of moxifloxacin established a greater number of atom contacts with DNA gyrase than the N1 and C8 substituents.

**Table 2.** The number of intermolecular atom contacts for the group of N1 and C8 atoms and their substituents and for the group of C7 atom and their substituents of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin with DNA gyrase calculated with the LigPlot<sup>[38]</sup> program.

	N1 and C8	C7
ciprofloxacin	14	3
levofloxacin	14	3
moxifloxacin	2	12

### Docking of fluoroquinolones to structures taken from molecular dynamic calculations

To study the stabilities of the binding modes of the three fluoroquinolones, new docking calculations with distinct conformations of the DNA gyrase were performed by use of the four narrow boxes procedure. Ten structures taken from a 500 ps molecular dynamics procedure were used as a target. For each protein conformation, docking calculations were carried out for each narrow box, and the minimal-energy solution was selected. The greatest number of more stable docking structures was obtained for box C (Table 3). Consideration of distinct rotamer conformations of DNA gyrase thus did not alter the pattern of binding found with the crystal DNA gyrase structure. The best structures of the three fluoroquinolones were in the same cavity of DNA gyrase, and the binding modes were very similar to those obtained with the narrow box procedure using the crystal structure of DNA gyrase.

**Table 3.** Distribution of the best docking solutions out of the four narrow boxes for a total of ten distinct DNA gyrase conformations.

	Box A	Box B	Box C	Box D
ciprofloxacin	0	1	9	0
levofloxacin	0	0	7	3
moxifloxacin	0	0	9	1

## Discussion

Using ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin, here we have applied a docking model in which solutions are restricted to a determined orientation over the surface of the QRDR of GyrA. We consider this model suitable for study of this system.

Docking results showed very similar patterns of binding for ciprofloxacin and for levofloxacin. It is known that mutation at the amino acid codons for Ser83 and/or Asp87 confers a bacterial resistance mechanism against these two fluoroquinolones. Our results allow us to explain these experimental observations, because Asp87 has been found to be critical in the binding of these drugs. This residue is crucial because it interacts with the positively charged nitrogen in the fluoroquinolones. In addition, we have found that Ser83 shows contacts with the N1 substituents of these two antimicrobial agents. These contacts can explain the resistance to these fluoroquinolones displayed when Ser83 is mutated with a residue possessing a side chain, which can establish steric hindrance.

For moxifloxacin, the interaction with Asp87 is also critical. However, the Ser83 mutation is tolerated. Our docking results suggest that this tolerance develops because this drug can establish better binding to DNA gyrase. The greater separation between positive and negative atoms in moxifloxacin appears to favor binding with the negative Asp87 and the positive Arg121 charge of DNA gyrase. The distances between the carboxylate C atoms and the positively charged N atoms of the fluoroquinolones were 10.6, 10.7, and 11.3 Å for ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin, respectively. In addition, Ser83 showed less contact with moxifloxacin than with ciprofloxacin and levofloxacin. Thus, mutation of Ser83 with another residue bearing a larger side chain can produce less steric hindrance with moxifloxacin than with the other two fluoroquinolones.

Notably, the docking results suggest that the role of Asp87 in the quinolone resistance mechanism is more relevant than that of Ser83. However, mutation of Ser83 is experimentally more frequently observed, thereby indicating the contribution of this mutation to the resistance mechanism. Mutations that change Ser83 either into leucine or into tryptophan confer high levels of quinolone resistance (about tenfold increases), whereas mutations that change Ser83 to alanine result in lower levels of resistance (about fivefold increases).<sup>[39]</sup> To explain the effect of each of the experimentally observed Ser83 mutations fully, a study with the ternary complex of quinolone, DNA, and DNA gyrase would be required.

These data are consistent with previous studies that showed that a mutation in the amino acid codon Thr86 (equivalent to Ser83 in *E. coli*) of *gyrA* of *Campylobacter jejuni* produces a slight increase in the minimum inhibitory concentration of moxifloxacin but high increases in resistance to ciprofloxacin and levofloxacin. In addition, our results are in agreement with previous reports that a double mutation in the amino acid codons Thr86 and Asp90 (equivalent to Asp87 in *E. coli*) is required to generate a high level of resistance to moxifloxacin.<sup>[40]</sup>

For the three fluoroquinolones, Arg121 was another relevant point of binding. However, this residue has never been found to be mutated to achieve fluoroquinolone resistance. It is



worth noting that Arg121 is located next to the active-site tyrosine. On the basis of these observations, we propose that this residue contributes to DNA binding or cleavage and that mutations in the amino acid codon Arg121 may be detrimental to the activity of the DNA gyrase, and that mutation in this residue could consequently be lethal for the microorganism. This hypothesis would explain why this possible escape mechanism suggested by our docking procedures has never been found in nature.

## Conclusions

Our study provides a structural hypothesis for the binding modes of three representative members of the fluoroquinolone antibiotics family to the QRDR of GyrA. Furthermore, analysis of these binding models allows us to study at the atomic level the resistance mechanism associated with the *gyrA* mutations most commonly found in fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains. Finally, our results strongly suggest that, although Arg121 has never been found to be associated with fluoroquinolone resistance, this residue plays a key role in the binding of the antibiotic to GyrA and determines its position in the QRDR of the enzyme.

## Computational Methods

**Fluoroquinolone ab initio calculations:** At the ab initio level, the density functional method was used to calculate the structures of the three fluoroquinolones. The DFT calculations were made by use of the hybrid exchange-correlation functional B3LYP and the 6-31+G\*\* basis set. The B3LYP method is a good compromise between reliability and computational cost, as demonstrated by many examples.<sup>[41–43]</sup> The geometries of all systems were optimized in vacuum by use of the GAMESS<sup>[44]</sup> package. Convergence problems of the zwitterionic species were found in the ab initio calculations and can probably be attributed to the instabilities of these species in the gas phase. To avoid this problem, ab initio gas-phase optimizations were performed with the cationic forms of the fluoroquinolones. For docking calculations, the carboxylic proton was removed in each case, in order to use the zwitterionic form that is present in solution.

**Docking calculations:** The calculations were performed with the software package AutoDock3.05.<sup>[45]</sup> Kollman united-atom partial charges were assigned to protein and ligand molecules, and atomic fragmental volumes of the protein atoms were assigned by use of the Addsol utility of AutoDock3. With the aid of the AutoDock Tools, two box sizes were defined to calculate the potential grid maps. In one set of calculations, a grid map of 80×100×50 points covering a large region of the DNA gyrase was used. For a second set of calculations, four narrow grids of 20×100×50 points were defined. In all cases, the 0.375 Å grid-point spacing were used. The potentials grid maps were calculated by use of AutoGrid, version 3.0. The Autotors utility was used to define the rotatable bonds in the ligand. Ten dockings were performed with the Lamarckian Genetic Algorithm with use of a population size of 50 individuals with a total of 10<sup>8</sup> energy evaluations.

**Molecular dynamics simulations:** Molecular dynamics simulations of two gyrase subunits were carried out by use of Gromacs<sup>[46]</sup> with the 43a1 force field.<sup>[47]</sup> The X-ray crystal structure of DNA gyrase

(N-terminal portion of *E. coli gyrA*) was used to prepare the starting coordinates (1ab4 pdb code). DNA gyrase was neutralized by addition of 24 sodium ions and was then immersed in a rectangular box containing 32 415 SPC<sup>[48]</sup> water molecules. 1000 energy minimization cycles were done to remove repulsive van der Waals contacts. Equilibration dynamics of the entire system were performed at 300 K for 50 ps. Following the equilibration procedure, 500 ps MD simulations were carried out with a periodic boundary condition in the NPT ensemble at 300 K by use of Berendsen temperature coupling<sup>[49]</sup> and constant pressure (1 atm) with use of the isotropic Parrinello–Rahman procedure.<sup>[50]</sup> The LINCS algorithm<sup>[51]</sup> was applied to fix bond lengths. A time step of 2.0 fs and a nonbond-interaction cut-off radius of 14 Å were used. Electrostatic interactions were calculated with the particle-mesh Ewald (PME) method.<sup>[52]</sup> The trajectory was sampled every 2 ps for analyses.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health, Spain (FIS 05/0068), MCYT-FEDER (BIO2005/00295 and PETRI 1995-0957-OP), and the Generalitat de Catalunya (XeRBA, 2005SGR-00444 and 2005SER-00663). The simulations were done on the MareNostrum supercomputer at the Barcelona Supercomputing Center-Centro Nacional de Supercomputación (The Spanish National Supercomputing Center).

**Keywords:** antibiotics · DNA gyrase · docking · fluoroquinolones · molecular modeling

- [1] B. H. Normark, S. Normark, *J. Intern. Med.* **2002**, *252*, 91–106.
- [2] D. Ferber, *Science* **2003**, *302*, 1488.
- [3] S. R. Norrby, C. E. Nord, R. Finch, *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5*, 115–119.
- [4] L. B. Rice, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 2023–2032.
- [5] P. Ball, *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 17–24.
- [6] A. M. Emmerson, A. M. Jones, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 13–20.
- [7] P. Ball, *Semin. Respir. Infect.* **2001**, *16*, 215–224.
- [8] P. C. Appelbaum, S. H. Gillespie, C. J. Burley, G. S. Tillotson, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *23*, 533–546.
- [9] J. Vila, J. Sánchez-Céspedes, J. M. Sierra, M. Piqueras, E. Nicolas, J. Freixas, E. Giralt, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *28*, 19–24.
- [10] G. G. Zhanel, A. Walkty, K. Nichol, H. Smith, A. Noreddin, D. J. Hoban, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *45*, 63–67.
- [11] J. M. Ling, A. W. Lam, E. W. Chan, A. F. Cheng, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 895–904.
- [12] J. A. Karlowsky, C. Thornsberry, M. E. Jones, A. T. Evangelista, I. A. Critchley, D. F. Sahm, *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 183–187.
- [13] T. A. Davies, R. Goldschmidt, S. Pflieger, M. Loeloff, K. Bush, D. F. Sahm, A. Evangelista, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 168–175.
- [14] D. C. Hooper, *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *31*, S24–S28.
- [15] K. Poole, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2233–2241.
- [16] D. C. Hooper, *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *32*, S9–15.
- [17] D. C. Hooper, *Emerging Infect. Dis.* **2001**, *7*, 337–341.
- [18] J. Vila in *Fluoroquinolone Resistance. Frontiers in Antimicrobial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy* (Eds.: D. G. Whittle, M. N. Aleskun, P. F. McDermott), ASM Press, Washington, D.C., **2005**.
- [19] J. Vila, J. Ruiz, F. Marco, A. Barceló, P. Goñi, E. Giralt, M. T. Jiménez de Anta, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2477–2479.
- [20] J. Vila, J. Ruiz, P. Goñi, M. T. Jiménez de Anta, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 491–493.
- [21] H. Hiasa, M. E. Shea, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34780–34786.
- [22] L. M. Wentzell, A. Maxwell, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 779–791.
- [23] R. J. Reece, A. Maxwell, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *26*, 335–375.
- [24] A. Maxwell, *J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, *30*, 409–414.
- [25] C. J. R. Willmott, A. Maxwell, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 126–127.

- [26] A. Maxwell, *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 102–109.
- [27] J. G. Heddle, F. M. Barnard, L. M. Wentzell, A. Maxwell, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1249–1264.
- [28] T. Schulz-Gasch, M. Stahl, *J. Mol. Model.* **2003**, *9*, 47–57.
- [29] H. J. Boehm, M. Boehringer, D. Bur, H. Gmuender, W. Huber, W. Klaus, D. Kostrewa, H. Kuehne, T. Luebbbers, N. Meunier-Keller, F. Mueller, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2664–2674.
- [30] D. A. Ostrov, J. A. Hernández Prada, P. E. Corsino, K. A. Finton, N. Le, T. C. Rowe, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3688–3698.
- [31] M. Rubiralta, E. Giral, A. Diez, *Piperidine: Structure, Preparation, Reactivity and Synthetic Applications of Piperidine and Its Derivatives*, Elsevier, Amsterdam, **1991**.
- [32] D. C. Appleton, J. McKenna, J. M. McKenna, L. B. Sims, A. R. Walley, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 292–293.
- [33] P. J. Crowley, M. J. T. Robinson, M. G. Ward, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 915–925.
- [34] E. L. Eliel, D. Kandasamy, C. Yen, K. D. Hargrave, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3698–3707.
- [35] D. Barrón, E. Jimenez-Lozano, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A* **2001**, *919*, 395–406.
- [36] M. Facompré, C. Tardy, C. Bal-Mahieu, P. Colson, C. Perez, I. Manzanares, C. Cuevas, C. Bailly, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7392–7399.
- [37] K. Siegmund, S. Maheshwary, S. Narayanan, W. Connors, M. Riedrich, M. Printz, C. Richert, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4838–4848.
- [38] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127–134.
- [39] S. Conrad, J. R. Saunders, M. Oethinger, K. Kaifel, G. Klotz, R. Marre, W. V. Kern, *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *38*, 443–455.
- [40] J. Ruiz, A. Moreno, M. T. Jimenez de Anta, J. Vila, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *25*, 542–545.
- [41] R. Sanchez, B. M. Giuliano, S. Melandri, W. Caminati, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *435*, 10–13.
- [42] G. R. Silva, I. Borges, Jr., J. D. Figueroa-Villar, *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *105*, 260–269.
- [43] S. Madurga, J. C. Paniagua, E. Vilaseca, *Chem. Phys.* **2000**, *255*, 123–136.
- [44] M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. J. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis, J. A. Montgomery, *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
- [45] G. Morris, D. Goodsell, R. Halliaday, R. Huey, R. Belew, A. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- [46] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 306–317.
- [47] W. F. van Gunsteren, X. Daura, A. E. Mark in *Encyclopedia of Computational Chemistry* (Ed.: P. von Ragué Schleyer), Wiley, New York, **1998**, pp. 1211–1216.
- [48] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, J. Hermans in *Intermolecular Forces* (Ed.: B. Pullman) Reidel, Dordrecht, **1981**, pp. 331–342.
- [49] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- [50] M. Parrinello, A. Rahman, *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190.
- [51] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
- [52] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577–8592.

---

Received: January 22, 2008

Published online on August 1, 2008

### 7.3 Desarrollo de nuevas quinolonas

#### 7.3.1 Artículo IV. Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria

#### Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria

J. Vila, J. Sánchez-Céspedes, J.M. Sierra, M. Piqueras, E. Nicolás, J. Freixas,  
and E. Giralt

*Int. J. Antimicrob. Agents, 2006, 28: 19-24*

El objetivo de este trabajo fue analizar una colección de moléculas derivadas de ciprofloxacino y norfloxacino con el fin de determinar cuáles de ellas presentaban una mejor actividad antibacteriana frente a bacterias que previamente presentaban una resistencia a fluoroquinolonas asociada con mutaciones en el gen *gyrA* y/o *parC*. Se sintetizaron 4 derivados de norfloxacino y 20 derivados de ciprofloxacino, y se examinaron sus valores de CMI mediante el método de microdilución frente a cepas sensibles y resistentes a quinolonas de *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Staphylococcus aureus*. De entre todas estas moléculas, el derivado de ciprofloxacino 7-(4-metil)-piperazina (UB-8902) mostró una CMI<sub>50</sub> 16 veces inferior a la observada para ciprofloxacino frente a cepas de *A. baumannii* y de 8 veces inferior a la observada para ciprofloxacino frente a cepas de *S. maltophilia*. Al sustituir el radical metilo de la posición 4 del piperazilo por un radical etilo, butilo o heptilo, se observó que su actividad antibacteriana frente a *A. baumannii* disminuía de manera constante. El derivado de ciprofloxacino 7-(4-metil)-piperazina

(UB-8902) mostró una muy buena actividad frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *S. maltophilia*.



## Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria

J. Vila<sup>a,\*</sup>, J. Sánchez-Céspedes<sup>a</sup>, J.M. Sierra<sup>a</sup>, M. Piqueras<sup>b</sup>,  
E. Nicolás<sup>b</sup>, J. Freixas<sup>c</sup>, E. Giralt<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Departament de Química Orgànica, Facultat de Químiques, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Cenavisa, S.A., Reus, Tarragona, Spain

Received 5 December 2005; accepted 3 February 2006

### Abstract

The objective of this study was to analyse an array of ciprofloxacin and norfloxacin derivatives in order to determine those with good activity against bacteria that already present fluoroquinolone resistance associated with mutations in the *gyrA* and/or *parC* genes. Four norfloxacin and 20 ciprofloxacin derivatives were synthesised and tested against quinolone-susceptible and -resistant *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Staphylococcus aureus* strains using a microdilution test. Among the derivatives, the 4-methyl-7-piperazine ciprofloxacin derivative showed a minimum inhibitory concentration for 50% of the organisms that was 16- and 8-fold lower than ciprofloxacin for *A. baumannii* and *S. maltophilia*, respectively. When the methyl group at position 4 in the piperazine ring was substituted by ethyl, butyl or heptyl groups, activity against *A. baumannii* steadily decreased. The 7-(4-methyl)-piperazine ciprofloxacin derivative (UB-8902) showed very good activity against these multiresistant microorganisms including *A. baumannii* and *S. maltophilia*. © 2006 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

**Keywords:** Multiresistant bacteria; *Acinetobacter baumannii*; *Stenotrophomonas maltophilia*; Norfloxacin derivatives; Ciprofloxacin derivatives

### 1. Introduction

*Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* may be considered the paradigm of multiresistant bacteria [1–5]. To date, *A. baumannii* has been reported to be resistant to all commercialised antimicrobial agents, including colistin [1]. Likewise, *S. maltophilia* resistant to all antibiotics except trimethoprim/sulphamethoxazole is frequently isolated [1,6,7]. Among the different classes of antimicrobial agents, the fluoroquinolones are the most extensively used. Since the development of norfloxacin, fluoroquinolones have gained prominence in the therapy of bacterial infections owing to their broad antibacterial spectrum and excellent bioavailability. However, the emergence of quinolone resistance has been steadily rising. This

emergence of resistance has been associated with the use of quinolones both in humans and animals [8–10]. The mechanisms of resistance to quinolones are associated with [10]: (i) mutations mainly in the *gyrA* and *parC* genes, encoding the A subunits of DNA gyrase and topoisomerase IV (quinolone protein targets), respectively. However, in some microorganisms mutations in the *gyrB* and *parE* genes, encoding the B subunits of DNA gyrase and topoisomerase IV, respectively, may also play a role in quinolone resistance; (ii) a decrease in drug accumulation related to a decrease in quinolone permeability or to increased efflux of the quinolone from the cell owing to overexpression of some efflux pumps; and (iii) the presence of the *qnr* gene that encodes a DNA gyrase protection mechanism [11].

The development of new antibiotics can be achieved from derivatives of known antimicrobial agents or by identification of novel agents active against previously unexploited targets [12]. The former procedure is mainly

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 227 5522; fax: +34 93 227 9372.  
E-mail address: jvila@ub.edu (J. Vila).

based on the knowledge of the mechanisms of resistance and the derivatives are designed to avoid these mechanisms. The main objective of this study was to analyse an array of ciprofloxacin and norfloxacin derivatives in order to determine those with good activity against bacteria that already present fluoroquinolone resistance associated with mutations in the *gyrA* and/or *parC* genes.

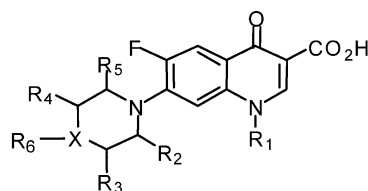
## 2. Methods

Three clinical isolates of *Escherichia coli*, *A. baumannii* and *Staphylococcus aureus* with different minimum inhibitory concentrations (MICs) of ciprofloxacin, from susceptible to resistant, were used in the first screening. None of the isolates were epidemiologically related [13]. The geno-

typic characteristics of the isolates are listed in Table 1. In addition, 30 *A. baumannii* and 31 *S. maltophilia* clinical isolates were used to test the compound with the best activity. Ciprofloxacin, norfloxacin and their derivatives were synthesised as described previously [14,15] and were provided by Cenavisa, S.A. Laboratories (Reus, Spain). Antimicrobial susceptibility was determined by the broth microdilution method according to National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines [16].

## 3. Results

Ciprofloxacin and norfloxacin as well as four norfloxacin derivatives and ten ciprofloxacin derivatives (Fig. 1) were tested against three microorganisms representative of



	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
16	NH	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
17	O	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
18	NC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
19	CHOH	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
20	NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
21	CH <sub>2</sub>	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
22	O	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	Me	-
23	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
24	CH <sub>2</sub>	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	OH	H	H	-
25	S	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
26	S → O	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	-
27	NH	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	Me	H	H	-
28	CH <sub>2</sub>	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	Me	H	H	-
29	NH	Et	H	H	H	H	-
30	NC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Et	H	H	H	H	-
31	O	Et	H	H	H	H	-
32	S	Et	H	H	H	H	-
33	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	Me
34	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	Et
35	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	Bu
36	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	H	H	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>
37	N	Et	H	H	H	H	Et
38	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	Me	H	H	Me
39	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	Me	H	H	Et
40	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	Me	H	H	Bu
41	N	cC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	Me	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>

Fig. 1. Norfloxacin and ciprofloxacin derivatives 16–41.

Table 1  
Genomic description of the strains

Strain	<i>gyrA</i>		<i>parC</i> <sup>a</sup>	
	Ser-83 <sup>b</sup>	Asp-87	Ser-80	Glu-84
<i>Escherichia coli</i>				
C-20	Ser	Asp	Ser	Glu
C-4	<u>Leu</u>	Asp	Ser	Glu
1273	<u>Leu</u>	<u>Tyr</u>	Ser	<u>Lys</u>
<i>Acinetobacter baumannii</i>				
58	Ser	Asp	Ser	Glu
661	<u>Leu</u>	Asp	Ser	Glu
31	<u>Leu</u>	Asp	Ser	<u>Lys</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>				
5-61	Ser	Asp	Ser	Glu
5-96	Ser	Asp	<u>Phe</u>	Glu
4-10	<u>Leu</u>	Asp	<u>Phe</u>	Glu

<sup>a</sup> *grlA* in *S. aureus*.

<sup>b</sup> Ser-80 in *S. aureus*.

Enterobacteriaceae (*E. coli*), Gram-negative non-fermentative bacilli (*A. baumannii*) and Gram-positive cocci (*S. aureus*). The structure of ciprofloxacin (**16**) and norfloxacin (**29**), two closely related fluoroquinolones, can be described as derived from a bicyclic 1-alkyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxylic acid with a piperazine ring at position 7. Ciprofloxacin and norfloxacin differ in the nature of the 1-alkyl group (R<sub>1</sub> = cC<sub>3</sub>H<sub>5</sub> and Et, respectively) (see Fig. 1). We have designed and synthesised a collection of four norfloxacin derivatives and ten ciprofloxacin derivatives that share the 1-alkyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxylic acid backbone but differ in the nature of the heterocyclic substituent at position 7. The rationale of this design is to try to modulate the specificity of ciprofloxacin and norfloxacin

against resistant microbial strains through modulation of the chemical nature of this substituent. In derivatives **17**, **19**, **21**, **22**, **24**, **25**, **26**, **31** and **32**, the piperazine ring was replaced by a different heterocycle. The remaining compounds incorporate more conservative changes, i.e. N-monosubstituted or N,C-disubstituted piperazines instead of the original unsubstituted piperazine ring.

The genetic features of the strains used in this study are listed in Table 1. The three strains each of *E. coli*, *A. baumannii* and *S. aureus* used were: (1) wild-type *E. coli* (strain C-20), *A. baumannii* (strain 58) and *S. aureus* (strain 5-61) with no mutations in the *gyrA* or *parC* genes and with MICs of ciprofloxacin of 0.06, 0.125 and 0.125 µg/mL, respectively; (2) a strain with a mutation in the *gyrA* gene in *E. coli* (strain C-4) and *A. baumannii* (strain 661) and in the *grlA* gene of *S. aureus* (strain 5-96), which generated MICs of ciprofloxacin of 0.5, 8 and 1 µg/mL, respectively; and (3) an *E. coli* strain with two mutations in the *gyrA* gene and one mutation in the *parC* gene (MIC of ciprofloxacin, 16 µg/mL) (strain 1273), an *A. baumannii* strain with a mutation in the *gyrA* gene and another in the *parC* gene (MIC of ciprofloxacin, 32 µg/mL) (strain 31), and a *S. aureus* strain carrying one mutation in the *gyrA* gene and one mutation in the *grlA* gene, producing a MIC of ciprofloxacin of 8 µg/mL (strain 4-10).

Among the 14 derivatives studied initially, 10 derived from ciprofloxacin and 4 from norfloxacin, compound **38** with two methyl groups, at R<sub>3</sub> and R<sub>6</sub> of the piperazine substituent at position 7 of the 1,4-dihydroquinoline nucleus, showed much better activity than ciprofloxacin against wild-type and mutated strains of *A. baumannii* and *S. aureus* but not against *E. coli* (Table 2).

A series of analogues of compound **38** were further synthesised to improve the activity of this derivative (Fig. 1; Table 3) and were tested against *A. baumannii*. Compound

Table 2  
Minimum inhibitory concentrations (MICs; in µg/mL) of ciprofloxacin, norfloxacin and some of their derivatives for *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*<sup>a</sup>

Compound	<i>E. coli</i>			<i>A. baumannii</i>			<i>S. aureus</i>		
	C-20	C-4	1273	58	661	31	5-61	5-96	4-10
Ciprofloxacin ( <b>16</b> )	0.06	0.5	16	0.125	8	32	0.125	1	8
<b>17</b>	0.06	4	>128	2	4	16	0.03	0.12	8
<b>18</b>	2	>128	>128	16	16	16	0.5	1	8
<b>19</b>	2	>16	>128	16	16	32	0.06	0.12	8
<b>20</b>	2	32	>128	8	16	16	0.12	0.5	8
<b>21</b>	0.12	4	>128	2	2	32	0.25	0.5	64
<b>22</b>	0.25	8	>128	16	32	64	0.06	0.25	32
<b>23</b>	0.06	2	64	8	8	32	0.12	0.5	16
<b>24</b>	0.25	16	>128	>128	>128	>128	0.03	0.25	8
<b>25</b>	0.06	4	>128	4	4	32	0.016	0.12	8
<b>26</b>	0.06	4	128	0.5	64	128	0.25	0.25	32
Norfloxacin ( <b>29</b> )	0.06	1	32	0.5	32	>64	0.5	16	32
<b>30</b>	8	32	32	16	32	32	8	4	16
<b>31</b>	0.25	16	>64	0.25	32	>64	<0.06	0.25	>64
<b>37</b>	0.125	32	>64	0.25	>64	>64	0.125	5	8
<b>38</b>	0.06	0.5	32	<0.06	2	32	<0.03	0.5	8

<sup>a</sup> See Table 1 for genomic description of the strains.

Table 3  
Activity of compound **38** and some of its derivatives against *Acinetobacter baumannii*<sup>a</sup>

Compound	MIC (µg/mL)		
	58	661	31
Ciprofloxacin	0.125	8	32
<b>38</b>	<0.06	2	8
<b>17</b>	2	4	16
<b>27</b>	32	32	32
<b>28</b>	0.125	4	8
<b>33</b> (UB-8902)	<0.06	0.5	4
<b>34</b>	0.06	0.5	16
<b>35</b>	1	2	64
<b>36</b>	8	8	64
<b>39</b>	32	32	32
<b>40</b>	0.06	2	16
<b>41</b>	0.125	16	16

MIC, minimum inhibitory concentration.

<sup>a</sup> See Table 1 for genomic description of the strains.

**33**, in which the methyl group at R<sub>3</sub> from compound **38** was removed, was of interest, with increased activity against ciprofloxacin-resistant *A. baumannii* strains being seen. The MIC of ciprofloxacin for the *A. baumannii* strain carrying a substitution in GyrA (Ser83 → Leu) (strain 661) was 8 µg/mL, whereas the MIC of compound **33** was 0.5 µg/mL (Table 3). Meanwhile, the MICs of ciprofloxacin and compound **33** for the strain with a substitution in GyrA (Ser → Leu) and ParC (Glu-84 → Lys) (strain 31) were 32 µg/mL and 4 µg/mL, respectively. When the methyl group at R<sub>6</sub> of compound **33** was substituted by an ethyl (compound **34**, enrofloxacin), butyl (compound **35**) or heptyl (compound **36**) group, the activity against *A. baumannii* steadily decreased (Table 3). On determining the susceptibility of a collection of epidemiologically unrelated clinical isolates of *A. baumannii* and *S. maltophilia* to compound **33** (so-called UB-8902) compared with ciprofloxacin (Table 4), an MIC<sub>50</sub> of UB-8902 that was 16-fold lower than ciprofloxacin for *A. baumannii* and 8-fold lower for *S. maltophilia* was observed. MICs of wild-type and mutated strains of *A. baumannii* and *S. maltophilia* to ciprofloxacin and UB-8902 are listed in Tables 5 and 6. Overall, the activity of compound **33** compared with ciprofloxacin increased between 2- and 8-fold for wild-type *A. baumannii* strains, between 8- and 64-fold for *A. baumannii* strains with one mutation in the *gyrA* gene and between 8- and >32-fold for strains with one mutation in the *gyrA* gene and one mutation in the *parC* gene.

Table 4  
In vitro activity of ciprofloxacin (**16**) and the new fluoroquinolone UB-8902 (**33**) against *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*

	Ciprofloxacin			<b>33</b> (UB-8902)		
	MIC range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<i>A. baumannii</i> (n = 26)	<0.06 to >64	64	>64	<0.06 to 8	4	8
<i>S. maltophilia</i> (n = 11)	2 to >64	4	64	<0.06 to 32	0.5	8

MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL).

Table 5  
In vitro activity of ciprofloxacin (**16**) and the new fluoroquinolone UB-8902 (**33**) against *Acinetobacter baumannii*

QRDR mutation <sup>a</sup> / <i>A. baumannii</i> strain	<b>16</b>	<b>33</b>
Wild-type		
77	2	1
201	0.5	0.06
88	64	8
93	<0.06	<0.06
65580	0.5	<0.06
58	0.12	<0.06
Ser-83 → Leu		
46I	64	2
333028B	>64	4
Y-29	32	0.5
33167B	64	4
661	8	0.5
74I	1	<0.06
875	64	8
34	32	4
33	8	0.5
167R	4	0.25
175	16	2
Ser-83 → Leu; Ser-80 → Leu		
113321	>64	4
105346	>64	8
F-14	>64	4
E-24	>64	4
84I	64	8
13714B	>64	4
67384RC	>64	4
5985V	64	4
215I	>64	8
709R	>64	4
A5-22	64	2
A5-45	32	4
Ser-83 → Leu; Glu-84 → Lys		
31	>64	4

<sup>a</sup> Mutations in the quinolone resistance-determining region: *gyrA*, Ser-83; *parC*, Ser-80, Glu-84.

The activity of compound **33** compared with ciprofloxacin for most *S. maltophilia* strains increased from 4- to 533-fold.

#### 4. Discussion

Hospital-acquired multiresistant microorganisms such as *A. baumannii* and *S. maltophilia* are of great concern. *Acinetobacter baumannii* clinical isolates resistant to all antimicrobial agents, even colistin, have been described



Table 6  
In vitro activity of ciprofloxacin (**16**) and the new fluoroquinolone UB-8902 (**33**) against *Stenotrophomonas maltophilia*

<i>S. maltophilia</i>	<b>16</b>	<b>33</b>
4834R	2	0.25
N26-17	>64	8
N30-41	16	4
2-19	2	0.12
J19-15	2	0.5
239V	4	0.5
26091V	2	0.25
D2-10	32	4
15519H	64	0.12
L9-5Rs	4	0.12
L10-26Rs	64	0.12
5506R	8	0.5
D1-22Rs	4	0.5
J12-26	8	0.5
L13-34	>64	32
O29-23	16	0.12
L9-13	64	0.5
O27-34	8	1
2-20	2	2
3554F	2	1
D7-14	8	2
11424-O	64	8
N29-7Rs	2	2
D6-7Rs	4	0.25
N15-10CG	2	1
22122	>64	32
D10-8Rs	8	1
N26-34	2	0.12
N8-40	2	0.5
1-26	4	0.5
N13-8Rs	2	0.25

[1,5]. Moreover, the typical resistance phenotype of *S. maltophilia* is to all antimicrobial agents except trimethoprim/sulphamethoxazole. Therefore, therapeutic alternatives for the treatment of nosocomial infections caused by these microorganisms are needed. One of the approaches to develop a more active antimicrobial agent is to know the mechanism(s) of resistance and to develop derivatives of this antimicrobial agent that circumvent this mechanism of resistance. The acquisition of quinolone resistance is mainly due to chromosomal mutations in genes (*gyrA* and *parC*) encoding the A subunits of the protein targets (DNA gyrase and topoisomerase IV) as well as mutations causing reduced drug accumulation, either by decreased uptake or increased efflux [10]. The primary quinolone resistance determinant in Gram-negative microorganisms is located in a region called the quinolone resistance-determining region (QRDR) in *GyrA*. Amino acid substitutions have been described in different positions in this region, with changes at position 83 being the most frequent [10]. Although the interplay between low permeability and constitutive expression of some efflux pumps [10] can produce a low level of intrinsic resistance in *A. baumannii*, the main mechanisms of resistance to quinolones are mutations in topoisomerase genes (*gyrA* and/or *parC*) [17,18]. Meanwhile, in *S. maltophilia*,

quinolone-susceptible and -resistant strains presented identical amino acid sequences in *GyrA* and *ParC* [19,20], suggesting that in this microorganism low permeability, overexpression of efflux pumps or the interplay between both effects may play an important role in the acquisition of quinolone resistance [21]. However, the amino acid of *GyrA* found in the position equivalent to Ser-83 of *E. coli* was Gln instead of Ser or Thr. Although this should be investigated, this unusual amino acid may generate an intrinsic resistance to quinolones in *S. maltophilia*. In this study, a number of 7-substituted norfloxacin and ciprofloxacin derivatives were synthesised and evaluated for their antibacterial activities. We chose this position to generate ciprofloxacin and norfloxacin derivatives because it has been implicated in the interaction between quinolones and DNA gyrase, especially with the QRDR where the substitutions related to quinolone resistance have been located [10,22–24]. Therefore, we thought that changes in this position would improve the activity. We found that the 7-(4-methyl)-piperazine ciprofloxacin derivative UB-8902 showed very good activity against multiresistant microorganisms such as *A. baumannii* and *S. maltophilia*.

### Acknowledgments

This work has been supported in part by Grants PETRI (PETRI1995-0430-OP) from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Spain, and 2005 SGR00444 from the Department d'Universitats, Recerca I Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (to J.V.), and grant MCYT-FEDER (BIO-2002-2301) (to E.G.). J.S.-C. has a fellowship from Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) C14.

### References

- [1] Arroyo LA, Garcia-Curiel A, Pachon-Ibañez ME, et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005;43:903–5.
- [2] Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2002;49:697–8.
- [3] Rodriguez-Hernandez MJ, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Cuberos L, Garcia-Curiel A, Pachon J. Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. Clin Microbiol Infect 2004;10:581–4.
- [4] Vila J. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. Rev Med Microbiol 1998;9:87–97.
- [5] Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:753–7.
- [6] Caylan R, Kaklikkaya N, Aydin K, et al. An epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a university hospital. Jpn J Infect Dis 2004;57:37–40.
- [7] Fadda G, Spanu T, Ardito F, et al.; Italian Epidemiological Observatory. Antimicrobial resistance among non-fermentative Gram-

- negative bacilli isolated from the respiratory tracts of Italian inpatients: a 3-year surveillance study by the Italian Epidemiological Survey. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:254–61.
- [8] Bearden DT, Danziger LH. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy* 2001;21:224S–32S.
- [9] Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001;7:337–41.
- [10] Vila J. Fluoroquinolone resistance. In: Whitte DG, Alekshun MN, McDermott PF, editors. *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy*. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 41–52.
- [11] Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797–9.
- [12] Vila J, Sánchez-Céspedes J, Giralt E. Old and new strategies for the discovery of antibacterial agents. *Curr Med Chem Anti-Infect Agents* 2005;4:337–53.
- [13] Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, et al. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999;37:758–61.
- [14] Escribano E, Calpena AC, Garrigues TM, Freixas J, Doménech J, Moreno J. Structure–absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1996–2000.
- [15] Merino V, Freixas J, Bermejo MV, Garrigues TM, Moreno J, Pla-Delfina JM. Biophysical models as an approach to study passive absorption in drug development: 6-fluoroquinolones. *J Pharm Sci* 1995;84:777–82.
- [16] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement. M100-S15. Wayne, PA: NCCLS; 2005.
- [17] Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta MT. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1201–3.
- [18] Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta MT. Quinolone resistance in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Agents* 1997;39:757–62.
- [19] Ribera A, Doménech-Sánchez A, Ruiz J, Benedí J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2002;8:245–52.
- [20] Valdezate S, Vindel A, Echeita A, et al. Topoisomerase II and IV quinolone-resistance determining regions in *Stenotrophomonas maltophilia* in clinical isolates with different levels of quinolone susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:665–71.
- [21] Valdezate S, Vindel A, Saéz-Nieto JA, Baquero F, Cantón R. Preservation of topoisomerase genetic sequences during in vivo and in vitro development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* strains. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:220–3.
- [22] Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, et al. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug–DNA binding model. *Biochemistry* 1989;28:3886–94.
- [23] Palumbo M, Gatto B, Zagotto G, Palu G. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol* 1993;1:232–4.
- [24] Vila J, Ruiz J, Marco F, et al. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2477–9.

### 7.3.2 Resultados adicionales

### 7.3.3 Ensayo de superenrollamiento de la ADN girasa en presencia de ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902

El principal objetivo de este experimento fue poner de manifiesto si la causa de la mayor actividad antibacteriana de la molécula UB-8902 comparada con la de ciprofloxacino se debía a una mayor potencia inhibitoria de la primera sobre la actividad de la ADN girasa. Este ensayo se basa en la capacidad que presenta la ADN girasa de superenrollar el ADN utilizando la energía del ATP. Así pues podíamos, mediante la realización de esta prueba, valorar el grado de inhibición que sobre la ADN girasa ejercen ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902.

Para llevar a cabo nuestro propósito utilizamos el ensayo comercial “Gyrase supercoiling assay kit” (Inspiralis, Norwith, UK) el cual incluye la ADN girasa, el plásmido pBR322 relajado como sustrato y un tampón que contiene el ATP necesario para que la ADN girasa lleve a cabo su acción. Una vez preparadas las reacciones, se incubaban a 37 °C durante 30 minutos y se cargaban en un gel de agarosa al 1%. Este gel se revelaba con SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Oregon, USA), y se observaba que reacciones habían inhibido en mayor grado la actividad de la ADN girasa, ya que las diferentes moléculas de ADN migraban de manera diferente en función de su grado de superenrollamiento. A partir de este gel de agarosa y utilizando un programa de análisis de imágenes (FUJIFILM, Science Lab 2001, Image Gauge V. 4.0) podíamos calcular la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) para cada antibiótico, la cual se define como la concentración de antibiótico requerida para inhibir en un 50% la actividad de la ADN girasa.

Se prepararon un control negativo, que sólo contenía el tampón y el plásmido pBR322 en su forma relajada, un control positivo, que contenía además 1 unidad de la ADN girasa, y finalmente, tres reacciones a cuatro concentraciones diferentes de los tres antibacterianos a analizar. Las reacciones preparadas en detalle fueron:

	<u>Control negativo</u>	<u>Control positivo</u>	<u>Muestra a analizar</u>
Tampón.....	6 µl	6 µl	6 µl
ADN girasa.....	-	1 unidad	1 unidad
pBR322.....	500 ng	500 ng	500 ng
Agua.....	hasta 30 µl	hasta 30 µl	hasta 30 µl
Antimicrobiano (mg/L)	{ - - - -	-	0,06
		-	0,12
		-	0,24
		-	0,48

El gel obtenido se muestra a continuación:

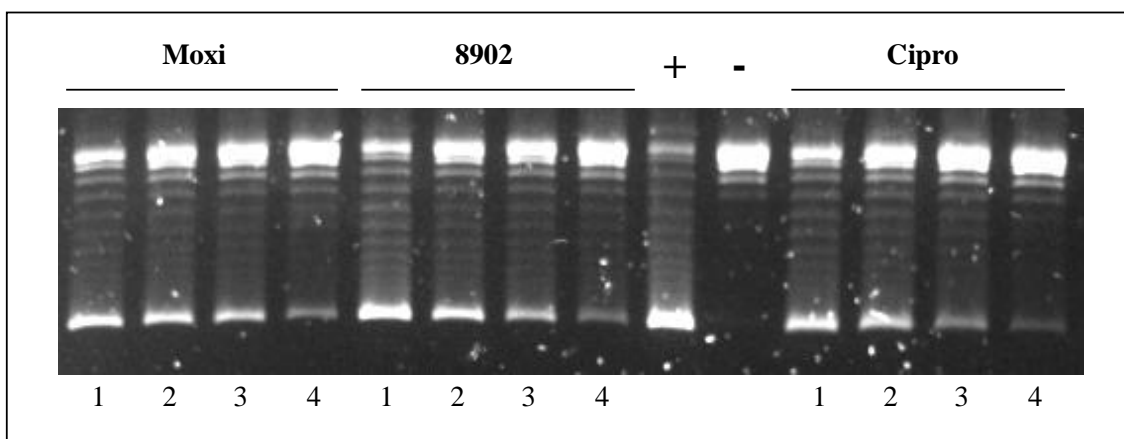


Figura 7.3.1. Ensayo de superenrollamiento de la ADN girasa frente a moxifloxacino (moxi), UB-8902 (8902) y ciprofloxacino (cipro)

Los números en la base de cada carril indican la concentración de antibiótico utilizada en cada caso. 1, 0,06 mg/L; 2, 0,12 mg/L; 3, 0,24 mg/L y 4, 0,48 mg/L.

Después de analizar las densidades de las bandas mediante el programa informático obtuvimos los siguientes valores de  $CI_{50}$ :

Moxifloxacino.....0,35 mg/L

Ciprofloxacino.....0,245 mg/L

UB-8902.....0,33 mg/L

Así pues, obteníamos mediante este experimento que el agente antibacteriano con una mayor potencia inhibitoria de la actividad de la ADN girasa era el ciprofloxacino, seguido de la UB-8902 y finalmente el moxifloxacino.



#### **7.3.4 Ensayo de acumulación de ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902 en *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli***

Con el objetivo de profundizar más aun en el mecanismo de acción de la UB-8902 nos propusimos clarificar si la mayor acumulación de este agente antibacteriano en el interior de la bacteria podía justificar su mayor actividad. Para ello se realizaron ensayos de acumulación de esta molécula frente a ciprofloxacino y moxifloxacino. Los microorganismos utilizados para este experimento fueron *A. baumannii*, frente al cual la UB-8902 presentaba una actividad mejorada respecto a ciprofloxacino y moxifloxacino y *E. coli*, frente al cual la UB-8902 presentaba una actividad similar a la de ciprofloxacino.

El espectro de emisión fluorescente de la mayoría de las fluoroquinolonas es muy similar, con una excitación máxima comprendida entre 275 y 297 nm y una emisión máxima comprendida entre 440 y 509 nm. La relación entre fluorescencia y concentración es lineal, así pues, puede ser utilizada en el laboratorio para, de manera indirecta determinar la concentración de fluoroquinolona en una muestra dada.

Cuando las células bacterianas son expuestas a fluoroquinolonas, estos compuestos penetran en la célula y reaccionan con sus dianas (ADN girasa y topoisomerasa IV) para producir la muerte celular. No están del todo claras las rutas usadas por las fluoroquinolonas para penetrar en el interior bacteriano, ni que proporción de la fluoroquinolona se encuentra en el citoplasma y cual asociada con otros compartimentos bacterianos como la membrana externa. Cuando una bacteria es expuesta a fluoroquinolonas, éstas alcanzan diferentes niveles de acumulación que pueden ser medidos mediante espectrofluorimetría si la fluoroquinolona es fluorescente.

El punto crítico en los experimentos dirigidos a cuantificar la acumulación de fluoroquinolonas es cómo eliminar la droga que permanece en el medio extracelular una vez se han completado las condiciones requeridas de un experimento en particular. Para lograr esto separaremos las células bacterianas de la fluoroquinolona extracelular mediante centrifugación de la suspensión bacteriana y subsiguientes lavados con un tampón para eliminar cualquier resto de fluoroquinolona que pueda quedar.

Una vez que las bacterias con su contenido de fluoroquinolona han sido separadas de la droga extracelular, se lisan las bacterias, para lo cual se utiliza un tampón Glicina-HCl (pH 3.0) ya que a este pH la intensidad de la fluorescencia de las fluoroquinolonas a concentraciones de 1 a 200 ng/mL es máxima y lineal, y las fluoroquinolonas son rápidamente liberadas de la bacteria. Los restos celulares son eliminados mediante centrifugación y la concentración de la fluoroquinolona en el sobrenadante puede ser medida mediante análisis por regresión utilizando un fluorímetro.

Muchos trabajos durante los últimos años han puesto de manifiesto que la acumulación de fluoroquinolonas resulta del equilibrio entre la cantidad de droga que entra en la bacteria y la cantidad de la misma que es expulsada mediante mecanismos de expulsión activa. Para la demostrar que la energía está involucrada en la acumulación de fluoroquinolonas se utilizan inhibidores de bombas de expulsión activa como marcador indirecto. Esto se consigue mediante la medición de la acumulación de las fluoroquinolonas después que la bacteria ha sido incubada en presencia de un desacoplador metabólico (CCCP: carbonil cianida m-clorofenilhidrazona), que disipa la energía de la célula. Un incremento en la acumulación de fluoroquinolona después del tratamiento con CCCP indica que la acumulación es dependiente de un mecanismo



energético, a menudo relacionado con un mecanismo de expulsión activa (colapsado por la presencia de CCCP) que bombea activamente fluoroquinolona fuera de la bacteria.

### Materiales y Métodos

En la tabla siguiente se detallan los valores de CMI de las cepas utilizadas frente a las fluoroquinolonas ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902:

Tabla 7.3.1. Susceptibilidades antibióticas de las cepas estudiadas frente a ciprofloxacino, UB-8902 y moxifloxacino

Compuesto	MICs (mg/L)		
	<i>A. baumannii</i>		<i>E. Coli</i> ATCC
	58	661	
<b>Ciprofloxacino</b>	0,25	8	0,06
<b>UB-8902</b>	<b>0,03</b>	<b>0,5</b>	<b>0,06</b>
<b>Moxifloxacino</b>	0,016	1	-

Las cepas *A. baumannii* 58 y *E. coli* ATCC no presentaban mutaciones en las enzimas diana *gyrA* y/o *parC*, mientras que la cepa *A. baumannii* 661 presentaba una única mutación en la Ser 83 del gen *gyrA* (Ser83-Leu).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se crecen las bacterias en 10 mL de medio (Mueller-Hinton broth) en agitación a 37°C durante toda la noche.
2. Lavar tres veces con tampón fosfato salino (PBS), pH 7.2.

3. Resuspender la bacteria en PBS hasta alcanzar una  $OD_{660}$  (densidad óptica) de 1 ( $8 \times 10^8$  a  $10^9$  ufc/mL). Mantener en hielo.
4. Se preparan 4 (a-d) tubos eppendorf por cepa y antibiótico a analizar, y se alicuotan 500  $\mu$ l de cada cepa.
  - a. Tubo con cepa que será incubada con antibiótico y carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP).
  - b. Tubo con cepa que será incubada con antibiótico pero sin CCCP.
  - c. Tubo con cepa que será incubada sin antibiótico y con CCCP.
  - d. Tubo con cepa que será incubada sin antibiótico y sin CCCP.
5. Se añade el CCCP a los tubos “a” y “c” a una concentración final de 100  $\mu$ M y a los tubos “b” y “d” se les añade la misma cantidad pero de etanol puro (dado que el CCCP se disuelve en etanol trabajamos con las condiciones más similares para minimizar el error). Se incuba durante 10 minutos a 37 °C en un bloque térmico.
6. Pasados los 10 minutos se añade el agente antibacteriano a los tubos “a” y “b” a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL. Dado que el antibiótico está resuspendido en agua destilada estéril se pone la misma cantidad de ésta en los tubos “c” y “d”. Se incuban 10 minutos a 37 °C.
7. Posteriormente se añade a cada tubo 1 mL de tampón fosfato frío (es muy importante la temperatura, ya que así se detiene la entrada del antibiótico en la bacteria) y rápidamente se centrifuga a 4 °C durante 3 minutos a 13000 rpm.
8. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1 mL del mismo tampón. Se repite la centrifugación.

9. Se decanta el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado bien seco.  
Se resuspende en 1 mL de glicina-HCl 0,1 M pH 3.0 y se deja a temperatura ambiente durante toda la noche (para lisar las células).
10. Al día siguiente se centrifugan los tubos durante 5 minutos a 13000 rpm.
11. Nos quedamos con el sobrenadante que es donde se encuentra el antibiótico.
12. Se hace la lectura en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 279 nm para ciprofloxacino y UB-8902 y de 325 nm para moxifloxacino, y una longitud de onda de emisión de 447 nm para ciprofloxacino y UB-8902 y de 510 nm para moxifloxacino.

Para calcular la concentración citoplasmática de antibiótico que acumula una determinada cepa se calcula una recta patrón donde se representen intensidades de fluorescencia frente concentraciones crecientes y conocidas del agente antibacteriano. Posteriormente se extrapolan los valores de intensidad de fluorescencia de las muestras en la recta y se calculan sus concentraciones.

$$A = C - B \text{ (ng de fluoroquinolona)}$$

siendo:

A: la acumulación de antibiótico expresada en ng de fluoroquinolona.

C: la concentración de la cepa que se ha incubado con el agente antibacteriano.

B: la concentración de la cepa que no ha sido incubada con el agente antibacteriano.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos, expresados en ng de fluoroquinolona, se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 7.3.2. Resultados del ensayo de acumulación expresados en ng de fluoroquinolona  $\pm$  desviación estándar.

	<i>A. baumannii</i> 58		<i>A. baumannii</i> 661		<i>E. coli</i> ATCC	
	- CCCP	+ CCCP	- CCCP	+ CCCP	- CCCP	+ CCCP
<b>Ciprofloxacino</b>	77,05 $\pm$ 4,31	79,85 $\pm$ 7,85	74,55 $\pm$ 13,3	95,15 $\pm$ 22,42	125,9 $\pm$ 0,57	122,85 $\pm$ 0,21
<b>Moxifloxacino</b>	25,65 $\pm$ 5,02	68,05 $\pm$ 3,75	30,12 $\pm$ 1,27	61,05 $\pm$ 11,3	42,9 $\pm$ 3,11	153,4 $\pm$ 0,57
<b>UB-8902</b>	32,9 $\pm$ 2,97	28,9 $\pm$ 0,57	19,6 $\pm$ 0,14	22,8 $\pm$ 0,28	34,4 $\pm$ 3,39	59,3 $\pm$ 4,67

De los resultados obtenidos se desprende que, sin tener en cuenta la presencia de CCCP, el antibiótico que más se acumula intracelularmente en las tres cepas es ciprofloxacino, mientras que UB-8902 y moxifloxacino presentan niveles similares de acumulación. Cuando añadimos CCCP, inhibiendo de esta manera el efecto de las bombas de expulsión activa, encontramos que ciprofloxacino sigue siendo la fluoroquinolona que más se acumula, menos en el caso de *E. coli*, donde la UB-8902 presenta una acumulación ligeramente superior. Sólo se observa una diferencia significativa en la acumulación, al comparar el efecto de CCCP en cada uno de los microorganismos, en el caso de moxifloxacino, donde los valores de acumulación se doblan cuando inhibimos la fuente de energía de las bombas de expulsión activa en todos los microorganismos.

### 7.3.5 Acumulación y actividad intracelular de la fluoroquinolona UB-8902 en leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN)

S. Ballesta<sup>1</sup>, I. García<sup>1</sup>, J. Sanchez-Cespedes<sup>2</sup>, J. Vila<sup>2</sup>, A. Pascual<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Microbiología, Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla; <sup>2</sup>Dept.

Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona

(Artículo en preparación)

La fluoroquinolona UB-8902, un derivado 7-(4-metil)-piperazina de ciprofloxacino, muestra una actividad antimicrobiana *in vitro* mayor que la de ciprofloxacino (191). En esta parte del estudio se analizó la acumulación de la UB-8902 en leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) y su actividad frente dos cepas isogénicas de *Staphylococcus aureus* con diferentes mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*.

La acumulación de la UB-8902, fue determinada mediante un ensayo fluorométrico (APH) (142). Las células PMN humanas fueron incubadas en tampón HBSS (del inglés “Hanks balanced salt solution”) conteniendo diferentes concentraciones de UB-8902 (de 2 a 50 mg/L). Después de diferentes tiempos de incubación a 37°C, la concentración del agente antimicrobiano asociado a los PMN fue calculada y expresada como relación entre concentración celular y concentración extracelular (relación C/E). La liberación de UB-8902-asociado a los PMN también fue estudiada. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado con PMNs procedentes de cuatro donadores diferentes. Los datos obtenidos se expresan en resultado  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre grupos fueron comparadas mediante análisis de la varianza, con una significancia estadística asignada al valor P de  $\leq 0,05$ . Así mismo, también se estudió el efecto sobre la acumulación de estas fluoroquinolonas de

la viabilidad celular, condiciones ambientales, inhibidores metabólicos, sustratos potencialmente competitivos y PMN estimulados.

La acumulación de UB-8902 en las células PMN fue rápida, alcanzando concentraciones intracelulares de más de 6 veces superiores a las concentraciones extracelulares después de 20 minutos de incubación a 37°C ( $6,5 \pm 0,8$ ) (Figura 7.3.2). La expulsión de UB-8902 de las células PMN humanas fue también rápida. Una vez que se retiró el antimicrobiano del medio, la concentración de UB-8902 asociada a PMN disminuyó un 70% después de 5 minutos de incubación a 37°C (Figura 7.3.2). El efecto de diferentes concentraciones extracelulares (2, 5, 10, 25 y 50 mg/L) en la acumulación de UB-8902 en los PMN fue también evaluada. Se encontró que la acumulación de UB-8902 asociado a los PMN se saturaba a concentraciones extracelulares mayores 10 mg/L ( $C/E \leq 3$ ).

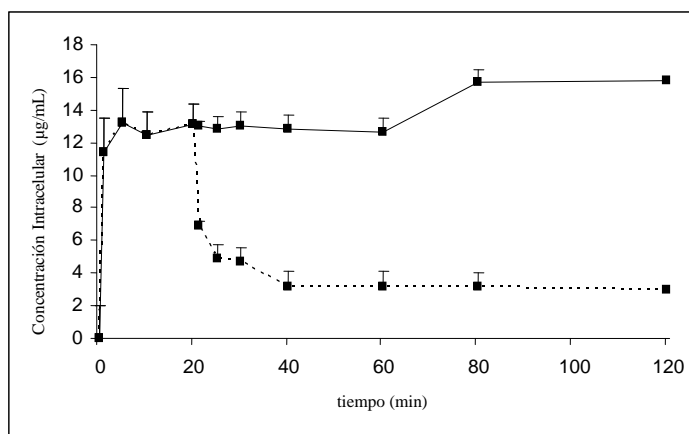


Figura 7.3.2. Acumulación de UB-8902 en los PMN y liberación de UB-8902 asociado a los PMN después de retirar la droga del medio. Los experimentos se llevaron a cabo con una concentración extracelular de 2 mg/L y 37 °C. Datos expresados en resultado  $\pm$  desviación estándar

Se evaluaron así mismo la influencia de diferentes factores ambientales en esta acumulación: viabilidad celular, temperatura (4°C frente a 37°C), pH externo (de 5 a 8),

inhibidores metabólicos (fluoruro sódico y cianuro sódico a  $1,5 \times 10^{-3}$  M, m-clorofenil hidrazona,  $1,5 \times 10^{-5}$  M y 2,4-dinitrofenol  $1 \times 10^{-4}$  M), la activación membranal con 200 nM de acetato de forbol miristato (PMA) y la fagocitosis de *S. aureus* opsonizado (5% de suero humano con un ratio 10/1 de bacteria/PMN).

La penetración intracelular de UB-8902 no se vio afectada ni cuando se utilizaron células muertas ( $7,6 \pm 1,3$  frente al control  $6,5 \pm 1,5$ ) ni a  $4^{\circ}\text{C}$  (relación C/E  $6,3 \pm 1,5$ ). La acumulación de UB-8902 se incrementó significativamente a pH ácido (pH6; C/E =  $8,6 \pm 1,6$ ). De entre los inhibidores utilizados, sólo el cianuro sódico alteraba significativamente la penetración de UB-8902 ( $3,3 \pm 1,4$ ). Sin embargo, la preincubación de las células PMN con fluoruro sódico, con m-clorofenilhidrazona, y con 2,4- dinitrofenol, no afectaron a su acumulación. Ni la estimulación celular con acetato de forbol miristato (PMA), ni la ingestión de *S. aureus* opsonizado afectaron a la acumulación de la droga (C/E razón:  $7,1 \pm 0,8$  y  $7,0 \pm 1,0$  respectivamente).

La actividad intracelular de esta fluoroquinolona fue determinada mediante la incubación de las células PMN que contenían *S. aureus* intracelularmente en presencia de la fluoroquinolona. Se utilizaron para este apartado tres cepas de *S. aureus*, una que no presentaba mutaciones en los genes diana de las fluoroquinolonas (*gyrA* y/o *parC*), y otras dos con diferentes mutaciones en estos genes. Las características genómicas y susceptibilidades antibióticas de estas cepas se muestran en la siguiente tabla 7.3.3.

Se evaluó la actividad intracelular de UB-8902 comparada con la de moxifloxacino en un ensayo de 3 horas mediante un método previamente descrito (144). Para ello se utilizaron las cepas *S. aureus* 5-61, *S. aureus* 5-61 G8 y *S. aureus* 5-61 M14. Las CMI's para UB-8902 y moxifloxacino de estas cepas se muestran en la Tabla 7.3.3. Los datos de actividad intracelular se expresaron como porcentajes de

supervivencia de *S. aureus* en relación con los niveles de un control sin agentes antimicrobianos a las 3 horas del ensayo  $\pm$  la desviación estándar.

Tabla 7.3.3. Características genómicas y susceptibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus* utilizadas en este estudio

Cepa	Mutaciones			MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>gyrA</i> (Ser-84)	<i>gyrA</i> (Glu-88)	<i>grlA</i> (Ser-80)	UB-8902	Moxifloxacino
<b>5-61</b>	Salvaje	Salvaje	Salvaje	0,06	0,03
<b>5-61 G8</b>	Salvaje	Salvaje	Mutante	0,5	0,125
<b>5-61 M14</b>	Salvaje	Mutante	Mutante	4	0,5

A todas las concentraciones extracelulares analizadas, UB-8902 producía un descenso significativo de la supervivencia intracelular de la cepa *S. aureus* 5-61. La reducción de la supervivencia intracelular de las cepas mutadas, *S. aureus* 5-61 G8 y *S. aureus* 5-61 M14, sólo fue significativa a la mayor concentración extracelular evaluada (de 1 a 5 mg/L). UB-8902 no mostró diferencias significativas en su actividad intracelular frente a las cepas mutadas (Figura 7.3.4.). Estos resultados son similares a los observados para moxifloxacino, sin embargo, moxifloxacino mostraba una actividad intracelular ligeramente superior a la de UB-8902 frente a las tres cepas analizadas. Este efecto podría ser debido en parte tanto a su gran actividad intrínseca como a su mayor acumulación intracelular cuando se compara con UB-8902.



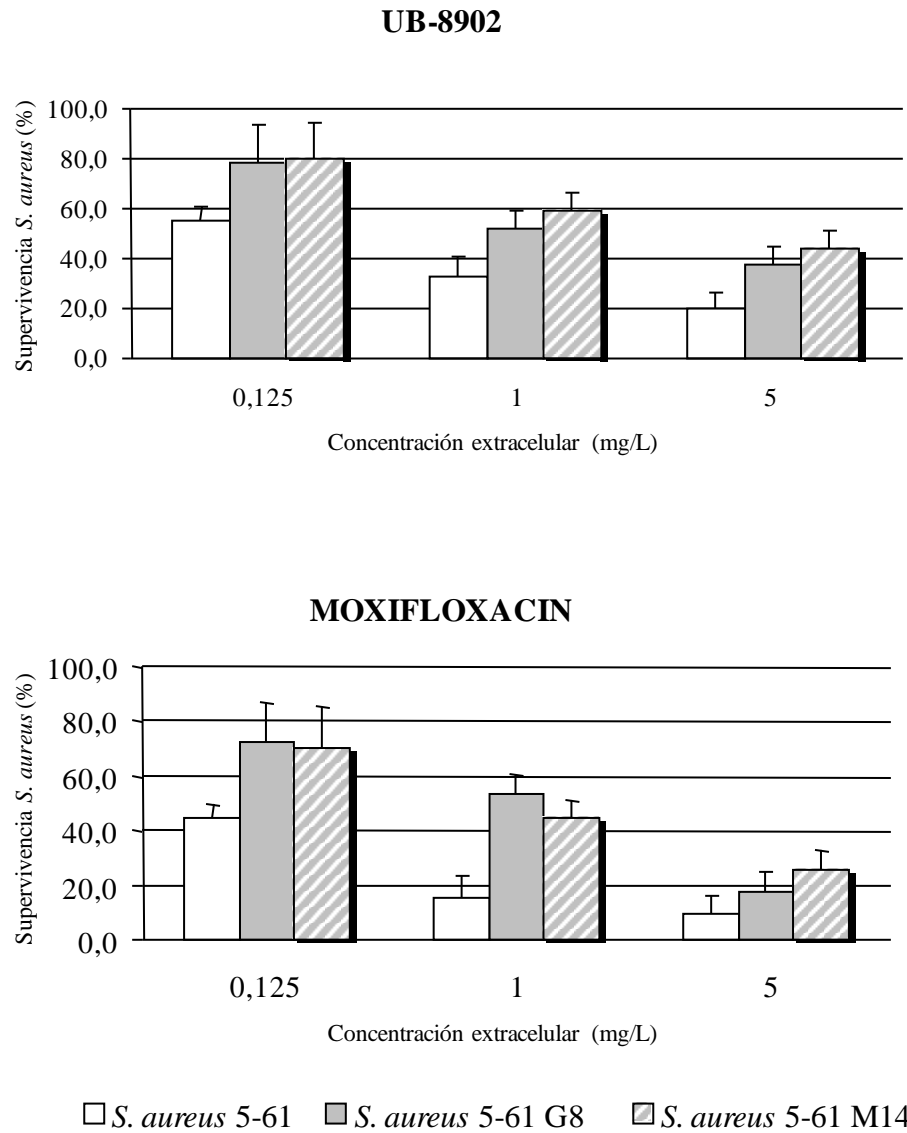


Figura 7.3.4. Actividad de UB-8902 y Moxifloxacin frente *S. aureus* intracelular en PMN (n=4). Datos expresados en tanto por ciento de supervivencia de la bacteria después de una incubación de 3 horas a 37°C comparados con los controles sin antimicrobiano. P<0,05 (resultado ± SD).



### 7.3.6 Optimización y estudios pre-clínicos de un derivado del ciprofloxacino (UB-8902)

López Rojas R<sup>1</sup>., Sánchez-Céspedes J. <sup>2</sup>, Docobo-Pérez F. <sup>1</sup>, Vila J. <sup>2</sup>, Pachón J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla; <sup>2</sup>Dept. Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona

(Artículo en preparación)

El objetivo fundamental de este estudio fue la evaluación de la actividad *in vivo* de UB-8902 frente a *A. baumannii* y *S. maltophilia*, utilizando un modelo de sepsis murina y otro de neumonía. Los objetivos específicos que nos marcamos fueron:

- i) Estudio de los parámetros de toxicidad (Dosis Letal) de la nueva quinolona (DL<sub>0</sub>, DL<sub>50</sub> y DL<sub>100</sub>) utilizando un modelo de sepsis experimental; inoculando intraperitonealmente (ip) grupos de 6 ratones hembra C57BL/6 (16-20g) con 0,5 mg/kg de UB-8902, aumentando en base 2 hasta alcanzar un 100% de mortalidad (método Reed and Munch).
- ii) Determinación de la dosis mínima letal bacteriana (DML) y la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de las cepas *A. baumannii* 58 (Ab58), *A. baumannii* 661 (Ab661), *S. maltophilia* N<sub>26-34</sub> (SmN<sub>26-34</sub>) y *S. maltophilia* O<sub>27-34</sub> (SmO<sub>27-34</sub>), en un modelo murino de sepsis peritoneal, inoculando grupos de diez animales con 8 log ufc/mL (potencialmente letal) y disminuyendo en base 10.
- iii) Estudio de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de UB-8902, en un modelo de sepsis peritoneal con grupos de diez animales, usando un inóculo similar a la DML de las cepas y administrando dosis de UB-8902 desde 0,5 mg/kg incrementando en base 2 hasta alcanzar el 50% de supervivencia.
- iv) Estudios farmacocinéticos de la UB-8902 en ratones C57BL/6 con una dosis de 20 mg/kg.

v) Evaluación *in vivo* en un modelo de neumonía murina, comparando UB-8902 con ciprofloxacino (CIP) y moxifloxacino (MOX) en términos de log ufc/g pulmón, mortalidad y % de hemocultivos estériles.

**Modificaciones de la metodología y plan de trabajo sobre los proyectados inicialmente y su justificación:**

Para disponer de elementos de comparación con los resultados que se obtuvieran *in vivo*, se realizaron previamente ensayos de la actividad bactericida *in vitro*, mediante curvas de tiempo muerte, en los que se compara la actividad de UB-8902 con ciprofloxacino y moxifloxacino.

En los estudios *in vivo*, tras no obtenerse DE<sub>50</sub> con la cepa sensible a ciprofloxacino de *S. maltophilia* N<sub>26-34</sub>, se decidió no continuar los experimentos *in vivo* con esta bacteria.

Durante el curso de los experimentos, y tras caracterizar con éxito el modelo de neumonía con ambas cepas de *A. baumannii*, por motivos que aún no conocemos, la cepa *A. baumannii* 661 (cepa resistente a ciprofloxacino) perdió virulencia a pesar de su correcta conservación. Debido a ello será necesario realizar de nuevo los experimentos con otra cepa de *A. baumannii* resistente a ciprofloxacino.

Las cepas elegidas para los experimentos y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a los antibióticos utilizados en los ensayos fueron las siguientes:

Compuesto	MICs ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>A. baumannii</i>		<i>S. maltophilia</i>	
	58	661	N <sub>26-34</sub>	O <sub>27-34</sub>
<b>Ciprofloxacino</b>	0.25	8	1	8
<b>UB-8902 (33)</b>	0.03	0.5	0.25	1
<b>Moxifloxacino</b>	0.016	1	0.06	1

La cepa *A. baumannii* 58 no presentaban mutaciones en las enzimas diana *gyrA* y/o *parC*, mientras que la cepa *A. baumannii* 661 presentaba una única mutación en la Ser 83 del gen *gyrA* (Ser83-Leu).

## Resultados

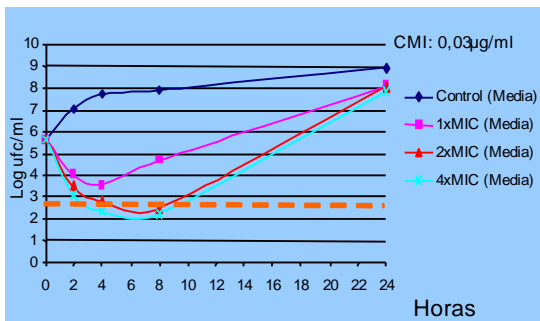
### 1. Ensayos *in vitro*

La actividad bactericida se estudió mediante curvas de tiempo-muerte, utilizando un volumen de 20 ml de caldo (MHBCA) y concentraciones de 1, 2 y 4 veces la CMI de las cepas frente a los antibióticos ensayados, y un inóculo aproximado de  $5 \times 10^5$  ufc/ml de cada una de las cepas en fase de crecimiento logarítmico. Se utilizaron como control de crecimiento tubos con 20 ml de caldo con inóculo bacteriano y sin antimicrobiano. Se determinó el número de ufc/ml viables en los tubos problema y en los controles, en el momento inicial (0 horas) y después en distintos puntos de tiempo (2, 4, 8 y 24 horas). Se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ , sembrándose después en placas de agar-sangre 100  $\mu\text{l}$  de las siguientes diluciones:  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-1}$  y 100  $\mu\text{l}$  del tubo problema sin diluir, subcultivándolas luego a 37°C en atmósfera aerobia. El recuento de ufc/ml se realizó a las 24 horas de incubación.

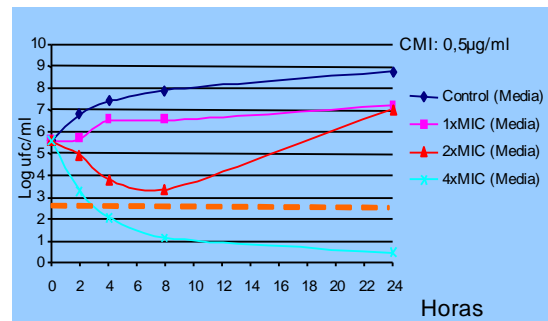
Se consideró que un antimicrobiano era bactericida frente a *A. baumannii* cuando se obtuvo una reducción igual o superior a 3 log<sub>10</sub> en el número de UFC/ml respecto del inóculo inicial (122).

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas siguientes (actividad bactericida marcada por la línea punteada naranja):

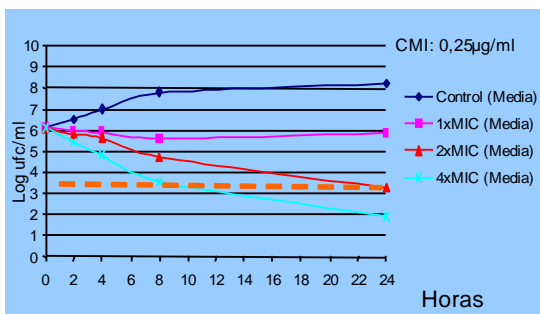
**UB-8902**



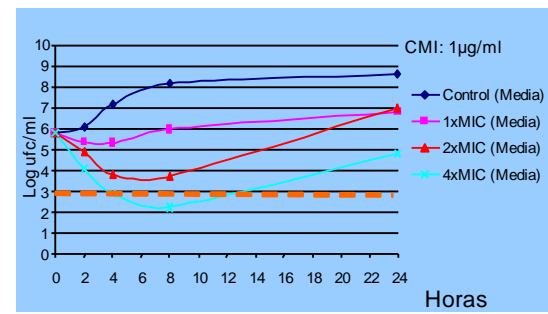
*A. baumannii* 58



*A. baumannii* 661

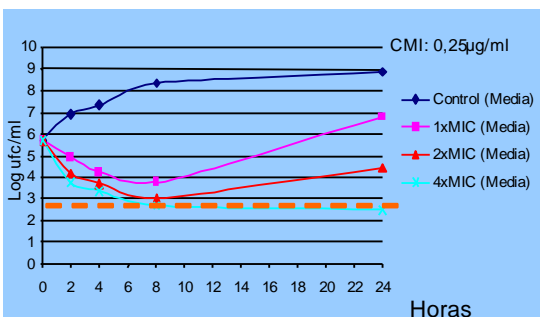


*S. maltophilia* N<sub>26-34</sub>

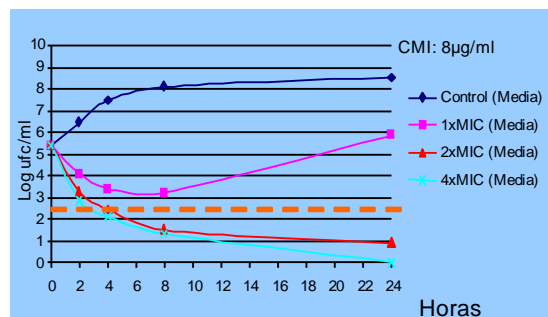


*S. maltophilia* O<sub>27-34</sub>

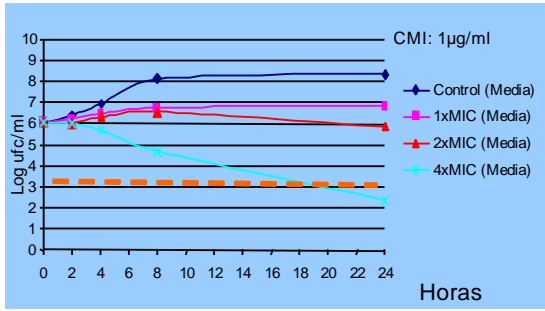
**Ciprofloxacino**



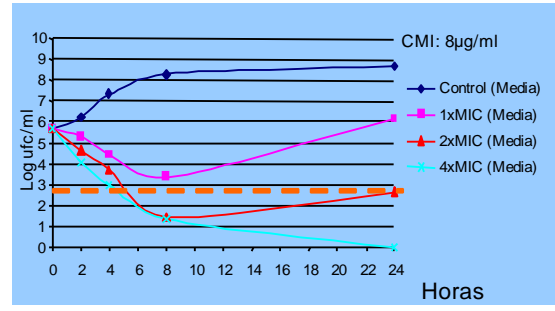
*A. baumannii* 58



*A. baumannii* 661

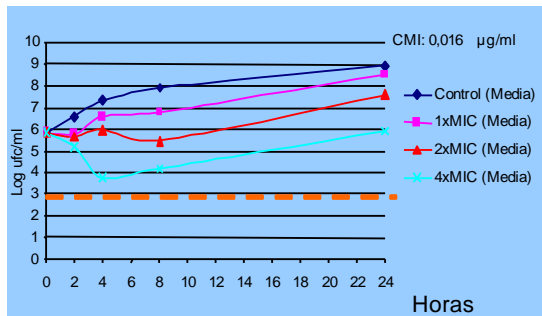


*S. maltophilia* N<sub>26-34</sub>

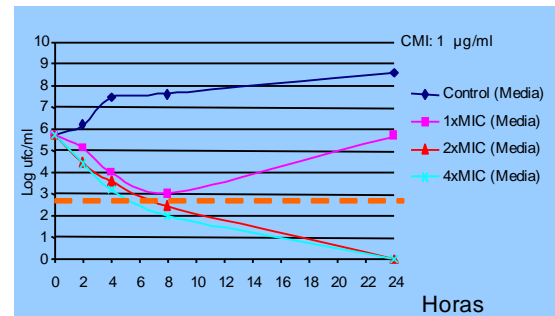


*S. maltophilia* O<sub>27-34</sub>

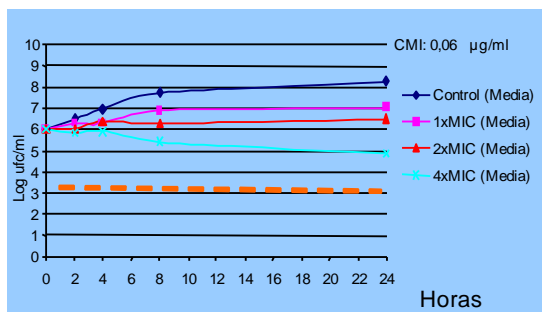
**Moxifloxacino**



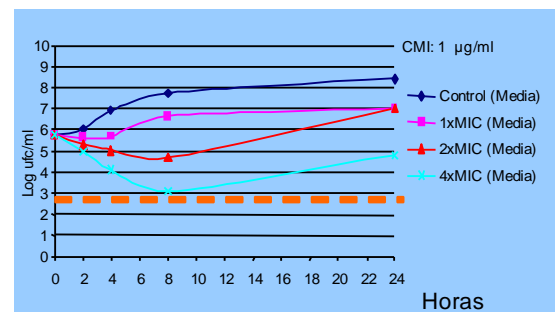
*A. baumannii* 58



*A. baumannii* 661



*S. maltophilia* N<sub>26-34</sub>



*S. maltophilia* O<sub>27-34</sub>

2. Análisis de la toxicidad de la UB-8902

Se calculó la dosis máxima tolerada (DL<sub>0</sub>), la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) y la dosis letal 100 (DL<sub>100</sub>) de UB-8902 en ratones C57BL/6 no infectados, siguiendo la metodología prevista, es decir, grupos de 6 animales sanos recibieron intraperitonealmente dosis de UB-8902, desde 0,5 mg/kg crecientes en base 2 hasta alcanzar un 100% de *exitus*. La supervivencia de los animales se observó durante 7 días.

La  $DL_{50}$  se calculó por el método de Reed and Munich (131), que usa una función de distribución acumulativa estricta para calcular la dosis por encima de la cual el 50% de los animales sobreviven. Los resultados fueron los siguientes:  $DL_0$ : 512 mg/kg;  $DL_{50}$ : 608,5 mg/kg;  $DL_{100}$ : 2048 mg/kg; se observaron síntomas adversos a partir de 128 mg/kg.

### 3. Cálculo de la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ )

Previo a los cálculos de dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ), se realizó la caracterización del modelo de sepsis peritoneal, obteniendo la dosis mínima letal (DML) de cada una de las cepas utilizadas. Se realizaron grupos de 6 animales inoculados intraperitonealmente con 0,5 ml de una concentración bacteriana de  $8 \log_{10}$  ufc/ml mezclada al 50% con mucina porcina (potencialmente letal) y disminuyendo en base 10. Los resultados fueron:

	Ab58	Ab661	Sm N <sub>26-34</sub>	Sm O <sub>27-34</sub>
DML (log ufc/mL)	7,5	7,5	8,5	8,5

Para el cálculo de la  $DE_{50}$  utilizamos grupos terapéuticos de 10 animales cada uno, en los que se había producido una sepsis peritoneal utilizando un inóculo similar a la DML de cada una de las cepas, y a los que se administraron intraperitonealmente dosis únicas de la UB-8902 a las 4 horas de la producción de la infección. Se partió de una dosis de 0,5 mg/kg, aumentando en base 2, hasta alcanzar la  $DL_0$  u obtener un 50% de supervivientes.



La mortalidad se observó durante 7 días. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	Ab58	Ab661	Sm N <sub>26-34</sub>	Sm O <sub>27-34</sub>
DE <sub>50</sub> (mg/kg)	16	128	-	32

No se obtuvo DE<sub>50</sub> para la Sm N<sub>26-34</sub> con ninguna de las dosis toleradas. No se continuaron los estudios con las cepas de *S. maltophilia*.

#### 4. Estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos

Para los estudios farmacocinéticos se realizaron tres grupos de 24 animales sanos para cada fluoroquinolona. Cada grupo recibió una única dosis de 20 mg/kg/ip. En cada punto de tiempo determinado (5', 10', 15', 30', 60', 90', 120', 240'), grupos de 3 animales fueron sacrificados con sobredosis de tiopental intraperitoneal (0,1 ml de tiopental sódico al 0,5 %) y exanguinados mediante incisión en el plexo retro-orbitario. La sangre obtenida en los siete puntos temporales fue centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos. El suero obtenido fue alicuotado y posteriormente congelado a -70° C durante 12-18 horas para la ulterior determinación de niveles plasmáticos de los fármacos (48, 135).

Las concentraciones plasmáticas de UB-8902 se determinaron mediante bioensayo con el método de difusión en placa. La técnica de bioensayo mediante difusión en placa consiste en determinar la concentración del antimicrobiano, estimándola a partir del halo de inhibición que concentraciones conocidas del mismo antibiótico producen en el crecimiento en placa de una cepa de un microorganismo control (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 2762).

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Ciprofloxacino	<i>A. baumannii</i> 58	<i>A. baumannii</i> 661	Moxifloxacino	<i>A. baumannii</i> 58	<i>A. baumannii</i> 661
CMI	0,25	8	CMI	0,016	1
AUC	8,79		AUC	3,56	
C <sub>max</sub>	11,57		C <sub>max</sub>	6,84	
T <sub>1/2</sub>	0,27		T <sub>1/2</sub>	0,34	
AUC/CMI	35,16	1,10	AUC/CMI	222,71	3,56
C <sub>max</sub> /CMI	46,28	1,45	C <sub>max</sub> /CMI	427,5	6,84
ΔT/CMI	1,40	0,73	ΔT/CMI	1,47	1,14

UB-8902	<i>A. baumannii</i> 58	<i>A. baumannii</i> 661
CMI	0,03	0,5
AUC	3,28	
C <sub>max</sub>	7,91	
T <sub>1/2</sub>	0,23	
AUC/CMI	109,18	6,55
C <sub>max</sub> /CMI	263,67	15,82
ΔT/CMI	0,94	0,89

## 5. Modelo de neumonía

Para la evaluación *in vivo* de la nueva fluoroquinolona, se utilizó una modificación del modelo de neumonía murina descrito por Esposito y Pennington (52, 155) con las cepas Ab58 y Ab66. Para ello, tras anestesiarse los ratones (20 a 25 μl de solución de pentobarbital sódico al 5 % por vía intraperitoneal) se administró el inóculo (para cada cepa 4 grupos de 15 animales) por vía intratraqueal. Para ello, suspendimos al animal verticalmente con el cuello hiperextendido. Canalizamos la tráquea del animal por vía oral con una aguja metálica de punta roma conectada a una jeringa Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV, EE.UU.) que contenía 50 μL de un inóculo de suspensión bacteriana al 50% con mucina gástrica porcina (M-2378; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) diluida al 10% en solución salina, dando una concentración final de 10<sup>8</sup> ufc/ml y la aguja se deslizó hasta sentir el contacto con el cartílago traqueal. La inoculación se realizó lentamente, para evitar la asfixia o deglución del inóculo. Al finalizar mantuvimos al animal durante aproximadamente 3 minutos en posición vertical para evitar que el inóculo

pasase a la vía digestiva o al exterior, y posteriormente se colocaron en decúbito lateral a 30° hasta que despertaron.

Los grupos se dividieron en control (no tratados), y tratados cada 8 horas con 20 mg/kg de UB-8902, 20 mg/kg de ciprofloxacino y 20 mg/kg de moxifloxacino respectivamente.

Los resultados para la cepa Ab58 fueron los siguientes:

Tratamiento	Concentración bacteriana en pulmón	% Hemocultivos estériles	% <i>exitus</i>
Control	8,86 ± 0,94 log ufc/g	26,6 %	80 %
UB-8902	*4,24 ± 2,49 log ufc/g	*86,7 %	53,3 %
Ciprofloxacino	*2,67 ± 2,83 log ufc/g	*80 %	*26,6 %
Moxifloxacino	*2,98 ± 2,42 log ufc/g	*86,6 %	*33,3 %

\*p<0,05 respecto al grupo control

Con la cepa Ab661 inicialmente se caracterizó el modelo de neumonía, con un inóculo de 7 y de 8 log ufc/ml, alcanzando una mortalidad del 83% en ambos casos. No obstante, cuando se iniciaron los estudios de eficacia terapéutica, la mortalidad que se obtuvo bajó al 50% y con aclaramiento espontáneo del inóculo inicial en los grupos controles. Por ello, los resultados de eficacia terapéutica en el modelo de neumonía con la cepa Ab661 no se expresan, puesto que no se pudieron realizar por esta pérdida de virulencia de la cepa durante los experimentos. Está previsto realizar los estudios con otra cepa distinta de *A. baumannii* resistente a ciprofloxacino.



## **7.4 Potenciadores de la actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas**

### **7.4.1 Búsqueda de inhibidores de bombas de expulsión activa a partir de extractos vegetales de plantas de origen Chino**

El consumo de plantas, ya sea como infusión, masticadas o en cataplasmas, para el tratamiento de heridas e infecciones se remonta a la prehistoria. Sin embargo, desde la irrupción de los antibióticos en la década de los 50, el uso de los derivados vegetales como agentes antimicrobianos ha sido virtualmente inexistente (35). El análisis científico de componentes vegetales sigue una ruta lógica. Las plantas se recogen o bien aleatoriamente, o bien siguiendo las indicaciones de los curanderos locales de las regiones en las que estamos realizando la búsqueda. La búsqueda inicial de plantas con posible actividad antimicrobiana comienza típicamente utilizando extracciones acuosas o alcohólicas, y en un paso posterior se pueden utilizar diferentes métodos de extracción orgánicos. Cualquier parte de la planta puede contener compuestos activos (35).

En nuestro caso utilizamos plantas completas a la hora de preparar los extractos. Asimismo utilizamos un método acuoso de extracción, para lo cual las plantas se dejaban a remojo en agua destilada, posteriormente se mezclaba bien y finalmente se tamizaba o filtraba. El filtrado era entonces centrifugado (20.000 X g, 30 minutos) y el precipitado crudo se liofilizaba. Una vez tenemos el extracto liofilizado se resuspendía en agua destilada a la concentración requerida.

En este estudio nos propusimos estudiar diferentes extractos vegetales con el fin de determinar si presentaban alguna actividad inhibitoria sobre algún sistema de expulsión activa que mejorara los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino frente a diferentes cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) con diferente susceptibilidad a ciprofloxacino.

Tabla 7.4.1.1. Valores de CMI a ciprofloxacino de las cepas utilizadas en este estudio (mg/L).

	<i>E. coli</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	EMP5	NorE5	77	77(64)	1199	1199B	wt	mexA-OprM
<b>Ciprofloxacino</b>	0,25	2	2	16	0,5	2	<0,06	0,5

Se utilizaron un total de 24 extractos vegetales obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas estudiadas (Tabla 7.4.2.).

1. Medulla Junci	13. Rhizoma Gastrodiae
2. Flos daturae metelis	14. Rhizoma coptidis
3. Herba Hedyotidis	15. Carapax Trionycis
4. Herba Lophatheri	16. Poria
5. Folium Mori	17. Radix stellariae
6. Radix Paeoniae Rubra	18. Fructus gardeniae
7. Caulis polygoni	19. Radix Polygoni
8. Cortex cinnamomi	20. Colla corii
9. Radix et Rhizoma Rhei	21. Ganoderma Lucidum
10. Rhizoma chuanxiong	22. Ramulus cinnamomi
11. Radix Ginseng	23. Cortex Eucommiae
12. Herba Dendrobii	24. Poria spirit

Figura 7.4.1.1. Nombres de las plantas utilizadas para este estudio.

Se utilizaron placas de microdilución para analizar la actividad antibacteriana de los extractos. En estas placas se inoculaba el microorganismo (inóculo =  $10^8$  ufc/mL), se alicuotaban diferentes concentraciones de ciprofloxacino (de 0,06 a 64 mg/L) y se añadía una concentración fija de cada extracto (concentración de extracto vegetal = 20 mg/L).

La placa se incubaba entonces a 37 °C durante 24 horas y se leían entonces los valores de CMI obtenidos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

- A. Inóculo bacteriano en cada pocillo (1-12)
- B. Ciprofloxacino de 64 (1) a 0,06 (11) µg/mL
- C. Extracto vegetal en cada pocillo, 20 µg/mL (1-12)

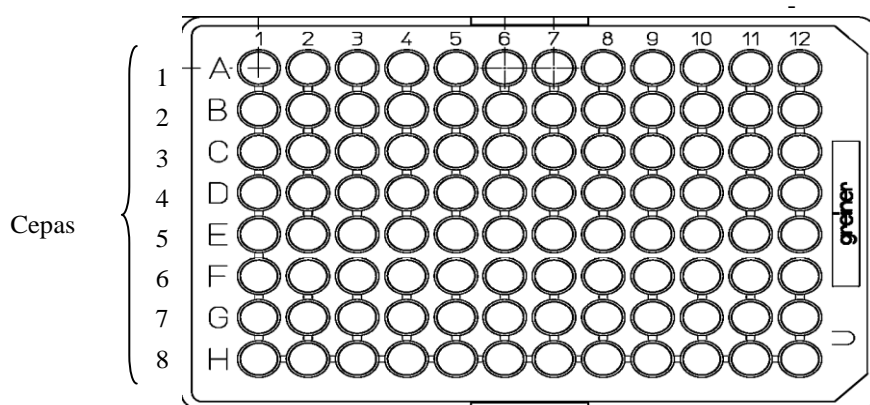


Figura 7.4.1.2. Esquema de la preparación de la placa de microdilución.

Tabla 7.4.1.2. Valores de CMI (mg/L) obtenidos con cada uno de los extractos estudiados.

	<i>E. coli</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	EMP5	NorE5	77	77(64)	1199	1199B	wt	mexA-OprM
<b>Ciprofloxacino</b>	0,25	2	2	16	0,5	2	<0,06	0,5
<b>1</b>	0,25	4	2	8	0,25	2	<0,06	0,25
<b>2</b>	0,25	2	1	16	0,5	4	<0,06	0,25
<b>3</b>	0,25	4	8	16	0,25	4	<0,06	0,25
<b>4</b>	0,5	4	1	8	0,5	4	0,5	0,25
<b>5</b>	0,5	2	2	16	0,5	4	<0,06	0,5
<b>6</b>	0,25	4	4	8	0,25	2	<0,06	0,5
<b>7</b>	0,25	4	8	16	0,5	4	<0,06	0,25
<b>8</b>	0,25	8	8	16	0,25	2	<0,06	0,25
<b>9</b>	0,5	4	4	16	0,25	2	0,5	0,5
<b>10</b>	0,25	4	2	8	0,5	8	<0,06	0,25
<b>11</b>	0,25	4	1	8	0,5	2	<0,06	0,25
<b>12</b>	0,25	4	1	8	0,5	2	<0,06	0,25
<b>13</b>	0,5	4	2	8	0,5	2	<0,06	0,25
<b>14</b>	0,25	4	2	16	0,5	2	<0,06	0,25
<b>15</b>	0,25	4	2	16	1	2	0,25	0,25
<b>16</b>	0,25	4	4	16	0,5	2	0,5	0,5
<b>17</b>	0,25	2	2	16	0,5	8	<0,06	0,25
<b>18</b>	0,25	2	4	16	0,5	4	0,5	0,5
<b>19</b>	0,25	4	2	8	0,5	8	0,12	0,25
<b>20</b>	0,5	4	2	16	0,5	2	0,25	0,25
<b>21</b>	0,5	2	2	16	0,5	2	<0,06	0,25
<b>22</b>	0,25	4	2	16	0,5	8	<0,06	0,25
<b>23</b>	0,25	4	4	16	0,5	8	0,12	0,5
<b>24</b>	0,25	4	4	64	0,5	8	0,5	0,5

Como se puede observar en la tabla anterior, no se encontró ningún extracto que mostrara una reducción significativa en los valores de CMI para ciprofloxacino.

#### 7.4.2 Análisis de la actividad antibacteriana del péptido (VRLPPP)<sub>3</sub>.

La actividad antimicrobiana de un fármaco se ve limitada por la membrana de la bacteria, la cual impide el acceso de ciertos antibióticos. Recientemente se han desarrollado unos péptidos capaces de atravesar membranas (CPP, del inglés “cell-penetrating peptides”), en principio destinados a actuar como transportadores terapéuticos para las células eucariotas. Dado que estos CPPs son catiónicos y generalmente anfipáticos, es posible usar su capacidad de atravesar la membrana para mejorar el acceso de los antimicrobianos a las bacterias. A día de hoy se han estudiado diferentes CPPs como agentes antimicrobianos (TP10 y pVEC) (123). Su actividad comienza con una rápida acumulación sobre la membrana bacteriana seguida de la entrada a la bacteria. Se ha demostrado que TP10 inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, y pVEC inhibe el crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*, en ambos casos a dosis micromolares bajas. Así mismo, aunque TP10 y pVEC entran en todas las células estudiadas, dañan preferentemente a las bacterias, y este efecto es suficiente como para limpiar cultivos de células HeLa de infecciones con *S. aureus* no invasivo. Además, TP10 y pVEC provocan una rápida y letal permeabilización en *S. aureus* y *M. smegmatis* respectivamente, pero no de las células HeLa.

A la vista de estos datos, nos propusimos, conjuntamente con el Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona, estudiar el efecto permeabilizador de otro de estos CPPs, el (VRLPPP)<sub>3</sub>, previamente reportado por Giralt *et al.* (56). El contenido elevado en prolina se ha identificado como clave en varias familias de CPPs.



Propiedades como anfipaticidad, alto contenido en guanidina e hidrofobicidad han sido reportadas como esenciales para obtener un péptido con la capacidad de atravesar la membrana celular. Este péptido pertenece a una nueva familia de CPPs definida con la fórmula general (VRLPPP)<sub>n</sub>, el cual cumple dos de estas propiedades, anfipaticidad y grupos arginina, además de estar ligado a una secuencia poliprolina.

Nosotros nos propusimos estudiar el efecto permeabilizador de este péptido sobre la membrana de diferentes cepas bacterianas con diferente susceptibilidad a ciprofloxacino (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), y estudiar este efecto en los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino.

Tabla 7.4.2.1. Valores de CMI a ciprofloxacino de las cepas utilizadas en este estudio.

	<i>E. coli</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	EMP5	NorE5	77	77(64)	1199	1199B	wt	mexA-OprM
<b>Ciprofloxacino</b>	0,25	2	2	16	0,5	2	<0,06	0,5

Se utilizaron placas de microdilución para analizar la contribución de este péptido en la actividad antibacteriana de ciprofloxacino. Las CMIs se realizaron frente a ciprofloxacino, frente al péptido y frente a la combinación de ciprofloxacino más el péptido. En estas placas se inoculaba el microorganismo (inóculo = 10<sup>8</sup> ufc/mL), posteriormente se alicuotaban en cada caso, diferentes concentraciones de ciprofloxacino (de 0,06 a 64 µg/mL), del péptido (de 0,06 a 64 µg/mL) y de la combinación de ambos (ciprofloxacino de 0,06 a 64 µg/mL y péptido a concentración fija de 20 µg/mL y/o 5 µg/mL).

La placa se incubaba entonces a 37°C durante 24 horas y se leían entonces los valores de CMI obtenidos.

- Inóculo bacteriano en cada pocillo (1-12)
- Ciprofloxacino de 64 (1) a 0,06 (11)  $\mu\text{g/mL}$
- Péptido en cada pocillo, 20  $\mu\text{g/mL}$  (1-12) o 5  $\mu\text{g/mL}$  (1-12) en cada caso

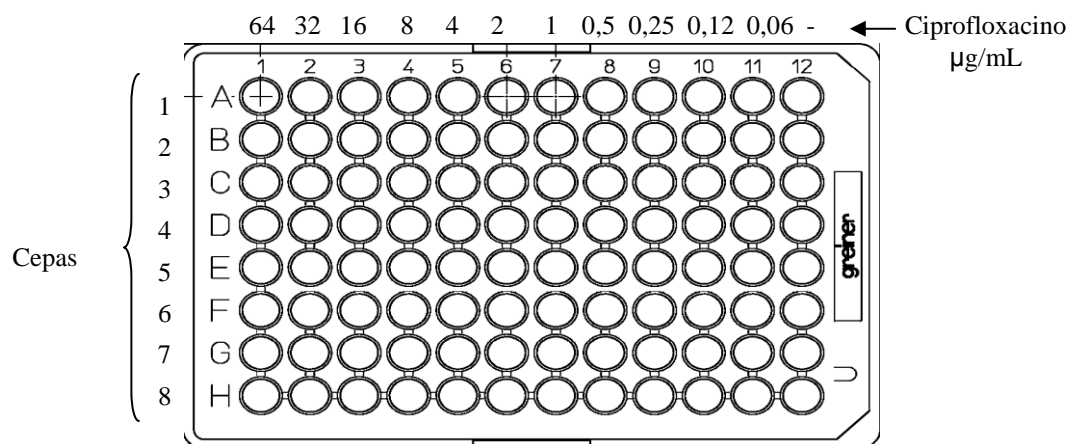


Figura 7.4.2.1. Esquema de la preparación de la placa de microdilución.

	Ciprofloxacino	Péptido	Ciprofloxacino +	
			20 mg/L	5 mg/L
<b>EMP5</b>	0,25	64	0.5	0.25
<b>NorE5</b>	2	>64	4	4
<b>77</b>	2	>64	1	2
<b>77(64)</b>	16	>64	8	16
<b>PA wt</b>	<0,06	64	<0,06	<0,06
<b>PA mexA</b>	0,5	>64	0,25	0,25
<b>1199</b>	0,5	>64	0,25	0,25
<b>1199B</b>	2	>64	4	4

Figura 7.4.2.2 Resultados de CMI (mg/L).

Como se puede apreciar en la tabla anterior, la presencia del péptido, por si sola, no mostraba ninguna actividad antibacteriana. Cuando utilizamos la combinación

de ambos, ciprofloxacino y péptido (VRLPPP)<sub>3</sub>, las CMI<sub>s</sub> obtenidas coinciden con las correspondientes a ciprofloxacino por sí solo. Se observan algunas variaciones, no significativas, de las CMI<sub>s</sub> cuya diferencia respecto a la obtenida sólo con el uso de ciprofloxacino, no varían en más de una dilución.



**DISCUSIÓN**

---



## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Mecanismos de resistencia a quinolonas en bacterias Gram-negativas

Trabajos previos han puesto de manifiesto la gran importancia de las mutaciones presentes en el codón 83 del gen *gyrA* de *E. coli*, así como de las mutaciones secundarias en este mismo gen o/y en el gen *parC*, en la aparición de resistencias a quinolonas. Además, resulta también evidente que otros mecanismos de resistencia asociados a la acumulación de las quinolonas en el interior de la bacteria, ya sea mediante la disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana o bien por el aumento en la expresión de sistemas de expulsión activa, influyen directamente en la modulación final de la CMI de *E. coli* frente a estos agentes antibacterianos. Por último, se han descrito recientemente nuevos mecanismos de resistencia a quinolonas ligados a plásmidos, lo cual les confiere la capacidad de la diseminación. Estos últimos mecanismos, todo y que confieren bajos niveles de resistencia frente a fluoroquinolonas, podrían actuar seleccionando ciertas poblaciones bacterianas que, en etapas sucesivas podrían llegar a adquirir mutaciones adicionales que generarían mayores niveles de resistencia frente a fluoroquinolonas.

Así pues, partiendo de esta base, se hace necesario el estudio de otras especies bacterianas relacionadas con *E. coli*, con el fin de verificar si es posible extrapolar los conocimientos que de los mecanismos de resistencia a quinolonas se tienen en *E. coli*. En nuestro trabajo hemos utilizamos dos especies bacterianas pertenecientes al género Enterobacteriaceae, *Yersinia enterocolitica* y *Citrobacter freundii*, para analizar la implicación de las mutaciones en el gen *gyrA* y de los sistemas de expulsión activa en su resistencia a quinolonas. Así mismo, se utilizaron diferentes especies de bacilos Gram-negativos para estudiar la prevalencia del gen *qnr* en nuestro entorno.

### 8.1.1 Mecanismos de resistencia a quinolonas en *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* es un bacilo Gram-negativo causante de infecciones gastrointestinales fundamentalmente. Habitualmente no se requiere tratamiento antibiótico en este tipo de infecciones, sin embargo, éste se hace necesario para el tratamiento de infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos (24). Se ha visto que las fluoroquinolonas muestran buena actividad *in vitro* frente a este microorganismo (13).

Las mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) de los genes *gyrA* y *parC* son consideradas como uno de los mecanismos más importantes implicados en el desarrollo de la resistencia a quinolonas en bacterias Gram-negativas (190). Esta es la primera vez que las RDRQ han sido secuenciadas en *Y. enterocolitica*, encontrándose una elevada homología con las de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* (98,8% de homología en ambos casos). En nuestro trabajo encontramos mutaciones en los codones Ser-83 y Asp-87 del gen *gyrA* de los aislamientos de *Y. enterocolitica* resistentes al ácido nalidíxico. Nuestros resultados concuerdan con los publicados para *E. coli* y otras Enterobacterias, en los que encuentran que una mutación en el codón Ser-83 es la más frecuentemente encontrada en aislamientos clínicos y está relacionada con un moderado nivel de resistencia a fluoroquinolonas pero con un elevado nivel de resistencia frente al ácido nalidíxico (163, 164, 190).

Las fluoroquinolonas han sido situadas, después del ácido amoxicilina-clavulámico, como los agentes antimicrobianos más ampliamente utilizados tanto en los hospitales españoles como en la comunidad (11). Así pues, esta situación, unida a la utilización de antibióticos en la alimentación animal, podrían explicar el incremento en los niveles de resistencia a quinolonas en los aislamientos clínicos de *Y. enterocolitica*.



Nuestros resultados sugieren la diseminación clonal de una cepa de *Y. enterocolitica* susceptible al ácido nalidíxico, que mediada por la presión selectiva ejercida por el uso de fluoroquinolonas ha acabado adquiriendo diferentes mutaciones que han generando la resistencia al ácido nalidíxico.

### 8.1.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas en *Citrobacter freundii*

En general, en la familia *Enterobacteriaceae* las mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC* así como un descenso en la acumulación del agente antibacteriano, juegan un papel importante en la adquisición de resistencia a quinolonas. Este último efecto está asociado fundamentalmente a la sobreexpresión de una bomba de expulsión activa. En *E. coli* el sistema de expulsión activa predominante está codificado por los genes *acrAB-tolC*, y se ha visto que cuando se genera una delección del locus *acrAB*, la cepa resultante (incluso aquellas con mutaciones en el gen *gyrA*) pasa a ser susceptible a fluoroquinolonas y otros antibióticos (132). Se ha sugerido recientemente que la expresión constitutiva de un sistema de expulsión activa, probablemente AcrAB, podría generar un bajo nivel de resistencia intrínseco al ácido nalidíxico y al cloranfenicol (166). Se requieren mutaciones múltiples en los genes *gyrA* y *parC* y la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa para alcanzar niveles elevados de resistencia frente a fluoroquinolonas.

Nosotros hemos caracterizado el locus *acrAB* de *C. freundii*, observando una sobreexpresión de este operón en un aislamiento clínico de *C. freundii* con un alto nivel de resistencia a ciprofloxacino. Se analizaron dos aislamientos isogénicos de *C. freundii* que mostraban las mismas mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* pero presentaban diferentes CMI's para ciprofloxacino y cloranfenicol. Estos aislamientos presentaban diferente acumulación de ciprofloxacino, la cual fue complementada cuando la acumulación fue calculada en presencia de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona

(CCCP), un compuesto que disipa el gradiente de protones, lo cual implicaba la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa. En primer lugar se utilizaron microchips de ADN, constituidos por genes de *E. coli*, para detectar diferencias en los niveles de expresión de los genes de la cepa más resistente a ciprofloxacino comparados con los de la cepa menos resistente. El análisis de los chips de ADN mostró la sobreexpresión de los genes *acrA* y *acrB*, la cual fue posteriormente confirmada mediante RT-PCR. Sin embargo, el tercer componente de este sistema de expulsión, la proteína de membrana externa TolC, no fue detectada en el análisis con los chips de ADN. Esto podría deberse a: i) una baja homología entre el gen *tolC* de *E. coli* respecto al de *C. freundii*; y ii) a diferencias en la estabilidad de la transcripción. Estudios previos en *E. coli* han mostrado una activación coordinada de TolC y AcrAB (7) y por otro lado, Barbosa y Levy (15) demostraron la sobreexpresión de este gen mediante chips de ADN en un aislamiento de *E. coli* que expresaba *marA*.

Se ha demostrado que el sistema AcrAB juega un papel importante en la resistencia a quinolonas en diversas Enterobacterias. En nuestro estudio, la sobreexpresión de AcrAB generaba un incremento de la resistencia a fluoroquinolonas y cloranfenicol. De tal manera que en la cepa 1.38 la CMI a cloranfenicol sufría un descenso de 32 mg/L a 1 mg/L en presencia de fenilalanina arginina  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N) un inhibidor de bombas de expulsión activa, el cual se ha visto que tiene efecto sobre el sistema AcrAB-TolC (108). Estos datos muestran además una expresión moderada del operón *acrAB* en la cepa 1.44, la cual presentaba una CMI a cloranfenicol de 4 mg/L y una CMI de 1 mg/L en presencia de PA $\beta$ N. Nuestros resultados concordaban con los presentados previamente por Baucheron *et al.* (17), donde se indicaba que estos sistemas de expulsión podían incrementar el nivel de resistencia a quinolonas, cloranfenicol y tetraciclina en cepas multirresistentes de *Salmonella*

*enterica* serovar Typhimurium. En este mismo artículo sus autores exponían el efecto sinérgico en la resistencia a cloranfenicol y tetraciclina resultante de la expresión simultánea de AcrAB-TolC, FloR (confiere resistencia a cloranfenicol) y Tet(G) (confiere resistencia a tetraciclina). Estos mecanismos de resistencia son bombas de expulsión pertenecientes a la familia MFS. Por otro lado, Mazzariol *et al.* (114) también mostraron la sobreexpresión de AcrAB-TolC en *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* resistentes a quinolonas. En *K. pneumoniae* la mayor CMI registrada frente a ciprofloxacino (64 µg/mL) se explicaba por la presencia concomitante de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* más la sobreexpresión de AcrAB.

De entre los genes que presentaban un descenso en su expresión en la cepa 1.38 respecto de la 1.44, cabe destacar el gen *nmpC*, que codifica para una proteína de membrana que funciona como porina. No se ha descrito ninguna relación entre la permeabilidad a antibióticos y la porina NmpC, sin embargo, esta proteína de membrana podría remplazar funcionalmente el papel de las porinas OmpF u OmpC (79). Serán necesarios nuevos estudios para determinar la implicación de esta porina en la penetración de ciertos agentes antibacterianos a través de la membrana externa y en la interacción potencial entre esta porina y la sobreexpresión de AcrAB.

En resumen, esta es la primera vez que se describe el operón AcrAB en *C. freundii*, el cual muestra una elevada homología con el descrito para *E. coli*. La sobreexpresión de *acrA* y *acrB* posiblemente juega un papel importante en la modulación de la CMI final frente a fluoroquinolonas junto a las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*.

### 8.1.3 Mecanismos de resistencia a quinolonas de transmisión plasmídica

Después del descubrimiento inicial del gen *qnr* en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* en 1994 varios estudios han intentado determinar la prevalencia de estos determinantes Qnr en todo el mundo. QnrA, el determinante Qnr más extendido, ha sido encontrado a lo largo de los cinco continentes y en las Enterobacterias más comunes (30, 152). Por otro lado, se han notificado casos de los determinantes QnrB y QnrS en diferentes países en Europa, Asia y América, todos ellos en Enterobacterias (22, 89, 152, 201), y además, por primera vez, se ha encontrado recientemente un determinante QnrS en *Aeromonas* spp. (31). En un estudio llevado a cabo en EEUU en el que se estudiaron 313 Enterobacterias resistentes a ceftazidima, la prevalencia del gen *qnrB* fue del 6%, 20% y 2% en *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *E. coli*, respectivamente (154). En otro estudio, llevado a cabo en Israel, Strahilevitz *et al.* (175) hallaron de entre 100 aislamientos estudiados, que 19 aislamientos de *Enterobacter* spp. y 6 aislamientos de *K. pneumoniae* eran portadores del gen *qnrB*. De ellos, 16 *Enterobacter* spp. (no relacionados epidemiológicamente) y 2 *K. pneumoniae* eran susceptibles a ciprofloxacino. Además, otros estudios en Corea muestran la elevada prevalencia del gen *qnrB* en *C. freundii*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* productoras o no de BLEE, y en menor medida en *E. aerogenes* y *S. marcescens* (95, 136, 138). El gen *qnrB* ha sido descrito además en varias cepas de *Salmonella enterica* (68), *C. koseri* (89) y *C. werkmanii* (93).

Así mismo, en España varios han sido los trabajos en los que se ha intentado reflejar la prevalencia de estos genes (28, 99, 152). En un estudio realizado por Cano *et al.* (29) en el que se estudiaron 202 aislamientos clínicos de *E. cloacae* y *E. aerogenes*, encontraron que 22 *E. cloacae* eran portadores del gen *qnrS*. De entre estos 22 aislamientos positivos para QnrS se obtuvieron cinco diferentes perfiles de REP-PCR,

en los cuales se encontró el determinante QnrS en 14, 4, 2, 1 y 1, respectivamente. Todos ellos fueron resistentes a ciprofloxacino excepto cuatro aislamientos relacionados clonalmente por REP-PCR que fueron susceptibles a ciprofloxacino y al ácido nalidíxico y un aislamiento resistente al ácido nalidíxico que mostraba una resistencia intermedia frente a ciprofloxacino. Lavilla *et al.* (99) analizaron la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en 306 aislamientos de Enterobacterias. Encontraron que 15 aislamientos eran portadores de algún determinante Qnr, entre los cuales, 14 correspondían al gen *qnrA1* y 1 al gen *qnrS1*. Las cepas positivas correspondieron a *K. pneumoniae* (7), *E. cloacae* (6) y *E. coli* (2). En un reciente estudio, de entre 55 aislamientos clínicos de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino y causantes de cistitis, han encontrado que tres de esas cepas contenían un gen *qnrB*-like, lo que ha supuesto la primera descripción de un determinante QnrB en España (28).

En el artículo número IV identificamos por primera vez un gen *qnrS* en un aislamiento clínico de *Aeromonas veronii*. El gen *qnr* fue identificado como *qnrS2* y estaba contenido en un plásmido de un tamaño aproximado de entre 48.5 y 97 Kb. Los valores de CMI que presentaba esta cepa fueron de >256, 8 y 12 mg/L para el ácido nalidíxico, el ciprofloxacino y el norfloxacino, respectivamente. Como ya se ha publicado previamente, las mismas mutaciones fueron encontradas en una cepa que mostraba una CMI a ciprofloxacino de 0,5 mg/L (72). Así pues el nivel de resistencia frente a estos agentes antimicrobianos podría explicarse por la combinación de las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* más el efecto aditivo de la presencia del gen *qnrS2*, previamente sugerido por Martínez-Martínez *et al.* (111). Como ya se ha comentado, hasta la fecha, los genes *qnr* habían sido encontrados únicamente en bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (99, 138, 152, 175, 195, 201), excepto en el caso de los aislamientos ambientales recientemente reportados en *A.*

*caviae* (*A. punctata*) y *A. media* (31). La identificación del gen *qnrS2* en un aislamiento clínico no perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* enfatiza la versatilidad de estos genes para propagarse entre diferentes especies bacterianas con el consecuente riesgo potencial que ello comporta para la salud humana.

Por otro lado, en el artículo número III, nuestro grupo ha reportado la existencia de una nueva variante del gen *qnrB*, el gen *qnrB16*. Cabe señalar además la elevada prevalencia del gen *qnrB* en nuestro hospital (80% de los *qnr* encontrados) comparada con la de *qnrA* (0%) y *qnrS* (20%), y así mismo la alta prevalencia del gen *qnrB* en *Citrobacter* spp. (4 de los 5 aislamientos positivos para *qnr*), similar a la encontrada en Corea (138).

La nueva variante QnrB16 encontrada en nuestro trabajo difiere de la variante inicial QnrB1 en cuatro aminoácidos: S79A, I142M, A144T y V212I (87). Ninguna de éstas posiciones correspondía con la 115, la cual ha sido postulada como una posición potencial de unión entre los determinantes Qnr y el ADN o las topoisomerasas tipo II (32). La caracterización de la interacción entre Qnr y el ADN y/o las topoisomerasas tipo II resulta una tarea de suma importancia para una mejor comprensión del mecanismo de acción de estos determinantes a partir de la cual se podrían diseñar nuevos agentes antibacterianos capaces de contrarrestar su actividad.

Esta es también la primera vez que se describe el gen *qnrS2* en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae*. Hasta la fecha, el gen *qnrS2* había sido descrito únicamente en un plásmido transferible (pGNB2) aislado de una comunidad bacteriana procedente del fango activo de una depuradora de aguas residuales en Alemania (22), en una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Anatum* (68), en un aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y en una cepa de *Aeromonas punctata* (31).

Sólo las cepas 21112 de *C. freundii* y la cepa 46408 de *K. pneumoniae* se mostraron resistentes al ácido nalidíxico. La cepa 21112 de *C. freundii* era portadora del gen *qnrB6* además de una mutación en el gen *gyrA* (Thr83Ile) y una mutación en el gen *parC* (Ser80Ile), todo lo cual explicaría la elevada CMI al ácido nalidíxico (>256 mg/L) y además la CMI a ciprofloxacino (3 mg/L). La cepa 46408 de *K. pneumoniae* era portadora del gen *qnrS2* y no contenía mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*. En otro estudio, un aislamiento de *Salmonella* portador de un gen *qnrS2* mostraba unas CMIs a ciprofloxacino y al ácido nalidíxico de 0,5 y de 16 mg/L, respectivamente (68). Además, el gen *qnrS2* encontrado en *Aeromonas punctata* (31), una vez transferido a una cepa *E. coli* TOP10 confería un bajo nivel de resistencia a quinolonas; de 1 a 4 mg/L frente al ácido nalidíxico y de <0,01 a 0,25 mg/L frente a ciprofloxacino. Dado que no se encontraron mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* en la cepa de *K. pneumoniae* portadora del gen *qnrS2*, podríamos inferir que los elevados niveles de resistencia encontrados frente al ácido nalidíxico (>256 mg/L) y al ciprofloxacino (>32 mg/L) podrían deberse a la combinación del efecto del gen *qnrS2* más algún otro mecanismo de resistencia a quinolonas como por ejemplo cambios en la permeabilidad celular asociados con un descenso en la expresión de alguna porina o la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa para estos agentes antibacterianos, o bien por la coexpresión de otros mecanismos de resistencia a quinolonas de reciente descubrimiento como los codificados por los genes *aac(6')-Ib-cr* y/o *qepA* genes (153, 202). En el resto de los aislamientos portadores de un determinante Qnr como ya se ha reportado con anterioridad, el determinante Qnr por sí solo no confería resistencia a las fluoroquinolonas (109, 111, 195).

El posible origen cromosómico de los genes *qnr* ya había sido propuesto previamente en un estudio con *Shewanella algae* (148). Además, algunos artículos han

sugerido en los últimos años la localización cromosómica de algunos genes *qnr* (93, 156, 195). En nuestro caso, tanto los intentos repetidos de purificación plasmídica como los intentos de conjugación utilizando como cepa receptora una *E. coli* J53Rif<sup>R</sup> generaron resultados negativos en todos los casos. Por otro lado, el análisis genómico mediante Southern-blot utilizando los enzimas *I-CeuI* y Nucleasa S1, apuntaba a la localización genómica del gen *qnrB6* en *C. freundii* y *C. werkmanii* y del gen *qnrB16* en *C. freundii*. Así pues, dado que los intentos de aislar e identificar los plásmidos que supuestamente contenían nuestros genes *qnr* fueron infructuosos y que los estudios de hibridación con sondas para el gen *qnrB* identificaban a estos genes en la región más periférica del gel (tamaño >750 Kb), donde posiblemente se encontraba el ADN cromosómico, concluimos que nuestros genes *qnrB*, tanto *qnrB6* como *qnrB16*, estaban localizados en el cromosoma. Si bien se han descrito plásmidos con tamaños superiores a las 750 Kb, éstos suelen tener una distribución escasa y suelen además encontrarse en bacterias con requerimientos metabólicos especiales y en ambientes extremos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=1&type=7&name=Plasmids>).

Los genes que codifican para QnrA y a veces también, los que codifican para QnrB, han sido encontrados formando parte de integrones complejos de tipo I, que contienen una presunta recombinasa, Orf513 (66, 130), sin embargo, el gen que codifica para QnrS nunca se ha descrito integrado en un integrón, aunque se ha descrito flanqueado por secuencias invertidas repetidas con una secuencia de inserción que podrían ser las responsables de su movilización (68). Los genes *qnrB* mostrados en este trabajo se han encontrado asociados a una estructura similar al integrón recientemente descrito para un gen *qnrB2* en *K. pneumoniae* (51).



## **8.2 Bases moleculares de los mecanismos de unión de las fluoroquinolonas a la región determinante de la resistencia a quinolonas de la ADN girasa**

En el artículo número V nos propusimos determinar los puntos de interacción de varias quinolonas con la ADN girasa, para de esta forma determinar las bases moleculares de su modo de acción y poder explicar cómo mutaciones puntuales pueden contribuir a la resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas. Se han hecho algunas aproximaciones sobre el acoplamiento entre el sitio de unión del ATP de la subunidad GyrB o fuera de la RDRQ de GyrA, pero en este caso hemos realizado ensayos de acoplamiento de la RDRQ del GyrA con diversas fluoroquinolonas. Las quinolonas interaccionan con el complejo ADN/ADN girasa mejor que con la enzima por sí sola, por lo que fue necesario modificar el procedimiento para poder analizar la influencia del ADN sobre la unión de las fluoroquinolonas con la ADN girasa. Se utilizaron para los experimentos tres fluoroquinolonas: ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino. Se aplicó un modelo de acoplamiento en el que las soluciones estaban restringidas a una determinada orientación sobre la superficie de la RDRQ de GyrA.

Los resultados del acoplamiento mostraron un patrón de unión muy similar para ciprofloxacino y levofloxacino. Se sabe que una mutación en el codón que codifica para los aminoácidos Ser83 y/o Asp87 confiere un mecanismo de resistencia bacteriana frente a estas dos quinolonas. Los resultados obtenidos nos permiten racionalizar estas observaciones experimentales ya que, se ha encontrado que el aminoácido Asp87 resulta crítico en la unión a estos agentes antibacterianos. Esto se debe a que el aminoácido Asp87 interacciona con el nitrógeno cargado positivamente de la quinolona. Además, se encontró que el aminoácido Ser83 mostraba contactos con el sustituyente N1 de estos dos antibióticos. Estos contactos pueden explicar la resistencia a estas fluoroquinolonas

cuando aparece una sustitución de la Ser83 por un residuo con una cadena lateral que pueda generar impedimentos estéricos.

En el caso de moxifloxacino la interacción con el aminoácido Asp87 resulta también crítica, mientras que mutaciones en el aminoácido Ser83 son toleradas. Nuestros resultados muestran que esta tolerancia se debe a que esta molécula es capaz de establecer una mejor unión con la ADN girasa. La mejor separación entre átomos positivos y negativos en moxifloxacino parece favorecer la unión con el Asp87 cargado negativamente y con la Arg121 cargada positivamente de la ADN girasa. La distancia entre el átomo de C carboxilado y el átomo de N cargado positivamente de las fluoroquinolonas es de 10.6, 10.7 y 11.3 Å para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino respectivamente. La Ser83 además, mostraba un menor contacto con moxifloxacino comparado con ciprofloxacino y levofloxacino. Así pues, una sustitución de la Ser83 con otro residuo que contuviese una larga cadena lateral podría generar menor impedimento estérico con moxifloxacino que con la otras dos fluoroquinolonas.

Estos datos concuerdan con estudios previos que muestran que una mutación en el codón que codifica para el aminoácido Thr86 (equivalente a la Ser83 en *E. coli*) del gen *gyrA* de *Campylobacter jejuni* genera un ligero incremento en su CMI frente a moxifloxacino pero un gran incremento en la resistencia frente a ciprofloxacino y levofloxacino, y que se requiere una doble mutación en los codones que codifican para los aminoácidos Thr86 y Asp90 (equivalente a Asp87 en *E. coli*) para generar un alto nivel de resistencia frente a moxifloxacino (165).

Para las tres fluoroquinolonas se encontró que el aminoácido Arg121 de la ADN girasa era un importante punto de unión. Sin embargo, nunca se ha establecido una relación entre el aumento de resistencia a fluoroquinolonas y mutaciones en este punto. Este aminoácido se encuentra junto al sitio activo de la tirosina (Tyr122), así pues en

base a los resultados expuestos proponemos que este residuo contribuiría a la unión o escisión del ADN, y que mutaciones en el codón que codifica para el aminoácido Arg121 podrían resultar perjudiciales para la actividad de la ADN girasa hasta el extremo de resultar letales para la bacteria. Esta hipótesis podría explicar porqué nunca se ha encontrado en la naturaleza este posible mecanismo de resistencia sugerido por nuestros ensayos de acoplamiento.

### 8.3 Desarrollo de una nueva fluoroquinolona (UB-8902)

En el artículo número VI se diseñaron y analizaron un conjunto de moléculas derivadas de norfloxacin y ciprofloxacino con la intención de obtener un nuevo derivado con una buena actividad bactericida frente bacterias que ya presentaban cierta resistencia a fluoroquinolonas asociada con mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*. En una primera etapa de este análisis se utilizaron tres aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* (no relacionados epidemiológicamente) con diferentes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a ciprofloxacino, desde sensibles a resistentes.

En esta primera etapa del estudio, de los 14 derivados analizados, 10 derivados de ciprofloxacino y 4 derivados de norfloxacin, el compuesto 38, conteniendo 2 grupos metilo en las posiciones R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> del sustituyente piperazina de la posición 7 del núcleo 1,4-dihidroquinolona, mostró una actividad mucho mejor que la de ciprofloxacino frente a cepas salvajes y mutadas de *A. baumannii* y *S. aureus*, no así frente a *E. coli*. A partir de aquí se sintetizaron nuevas moléculas, análogas del compuesto 38 para tratar de mejorar aún más su actividad. La actividad antibacteriana de estas nuevas moléculas fue analizada frente a los aislamientos clínicos de *A. baumannii*, encontrando que, la molécula 33, en la que se había retirado el grupo metilo de la posición R<sub>3</sub> de la molécula

38, incrementaba la actividad de la molécula 38 frente a las cepas de *A. baumannii* resistentes a ciprofloxacino.

En una segunda parte de este estudio se analizó la actividad de la molécula 33 (llamada entonces **UB-8902**) comparada con la de ciprofloxacino frente a una colección de aislamientos clínicos no relacionados epidemiológicamente de *A. baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Se obtuvo que la CMI<sub>50</sub> de UB-8902 fue 16 veces inferior que la presentada por ciprofloxacino para *A. baumannii* y 8 veces inferior para *S. maltophilia*. La actividad del compuesto 33 comparada con la de ciprofloxacino se incrementaba entre 2 y 8 veces para las cepas salvajes de *A. baumannii*, entre 8 y 64 veces para las cepas de *A. baumannii* que presentaban una mutación en el gen *gyrA* y entre 8 y >32 veces para las cepas con una mutación en el gen *gyrA* y otra mutación en el gen *parC*. La actividad de UB-8902 frente a la mayoría de las cepas de *S. maltophilia* comparada con la de ciprofloxacino se incrementó entre 4 y 533 veces.

En los últimos años las infecciones hospitalarias causadas por microorganismos multirresistentes como *A. baumannii* y *S. maltophilia*, han cobrado una gran importancia. Se han descrito casos de aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a todos los agentes antimicrobianos, incluso a colistina (10, 203). Además, el típico fenotipo de resistencia en *S. maltophilia* es también resistente a todos los agentes antimicrobianos excepto a trimetoprim/sulfametoxazol. Así pues, cada vez se hacen más necesarias nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por estos microorganismos. Resulta básico, por otro lado, el conocimiento íntimo del mecanismo o los mecanismos de resistencia de estos microorganismos para poder desarrollar nuevos agentes antimicrobianos más activos capaces de soslayar esos mecanismos de resistencia. La adquisición de resistencia frente a quinolonas se debe principalmente a mutaciones cromosómicas en los genes, *gyrA* y

*parC*, que codifican para la subunidad A de las proteínas diana ADN girasa y topoisomerasa IV, así como mutaciones capaces de generar una reducción en la acumulación intracelular del antibiótico, ya sea por una disminución de la permeabilidad de la membrana o por un incremento en la expulsión del fármaco (186). El principal determinante de la resistencia a quinolonas en Gram-negativos se localiza en la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) en GyrA. Se han descrito modificaciones aminoacídicas en diferentes posiciones en esta región, siendo la más frecuente la que afecta a la posición 83 de la proteína (186). A pesar de que la combinación entre la disminución de la permeabilidad y la expresión constitutiva de algún sistema de expulsión activa puede generar un bajo nivel de resistencia intrínseco en *A. baumannii*, los mecanismos principales de resistencia a quinolonas son sin lugar a dudas las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican para las subunidades A de la ADN girasa y la topoisomerasa IV respectivamente (187, 188). Por otro lado, en *S. maltophilia*, las cepas sensibles y resistentes a quinolonas presentan una secuencia aminoacídica idéntica en GyrA y ParC (150, 184), lo cual sugiere que, en estos microorganismos, la permeabilidad reducida, la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa, o la combinación de ambos mecanismos pueden jugar un papel relevante en la adquisición de la resistencia a quinolonas (184). Sin embargo, el aminoácido que ocupa la posición equivalente a la 83 en *E. coli* es en el caso de *S. maltophilia* Gln en lugar de Ser o Thr. Esta modificación a nivel de la posición 83 de GyrA podría generar una resistencia intrínseca frente a quinolonas en *S. maltophilia*, lo cual debería ser analizado con más detalle.

En este trabajo, se han sintetizado una serie de derivados de ciprofloxacino y norfloxacino y se ha analizado su actividad antibacteriana. Se eligió la posición 7 de estas moléculas para generar los diferentes derivados debido a que ésta había sido

implicada en la interacción de las quinolonas con la ADN girasa, en especial con la RDRQ donde se localizan las sustituciones relacionadas con la resistencia a quinolonas (137, 169, 186, 189). Así pues, se pensó que la generación de cambios en esta posición podría mejorar la actividad de estas moléculas. De esta manera se encontró que el derivado 7-(4-metil)-piperazina de ciprofloxacino (UB-8902) mostraba una muy buena actividad frente a microorganismos multirresistentes como *A. baumannii* y *S. maltophilia*.

Con el ensayo de superenrollamiento de la ADN girasa frente a ciprofloxacino, moxifloxacino y UB-8902 pretendíamos poner de manifiesto si la causa de la mayor actividad antibacteriana de la molécula UB-8902 comparada con la de ciprofloxacino podría ser debida a una mayor potencia inhibitoria de la primera sobre la actividad de la ADN girasa.

Los resultados obtenidos mediante este experimento reflejaron que el agente antibacteriano con una mayor potencia inhibitoria de la actividad de la ADN girasa era al ciprofloxacino, seguido de la UB-8902 y finalmente el moxifloxacino. En un principio, y a la vista de los resultados obtenidos en el estudio inicial de actividad de UB-8902 frente a *A. baumannii* cabría esperar que la afinidad de UB-8902 y moxifloxacino o lo que es lo mismo la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) fuera mayor que para ciprofloxacino. Sin embargo, estos bajos resultados de CI<sub>50</sub> para UB-8902 podrían explicarse por la ADN girasa utilizada en este estudio. Hemos de tener en cuenta que la ADN girasa incluida en el kit que se utilizó para llevar a cabo este experimento de superenrollamiento de la ADN girasa correspondía a la de *Escherichia coli* y dado que la homología existente entre la ADN girasa de *E. coli* y *Acinetobacter baumannii* es de entre un 50 y un 60% no es de estrañar que el comportamiento pudiera ser diferente. Esto podría explicar el comportamiento de UB-8902 frente a *E. coli*,

donde no se aprecian cambios en cuanto a los valores de CMI obtenidos con ciprofloxacino, ya que aunque la UB-8902 tenga una actividad intrínseca mayor que la de ciprofloxacino, su afinidad por la ADN girasa de *E. coli* es inferior y así, su comportamiento final resulta similar. En el caso de moxifloxacino, si bien su actividad es mayor que la de ciprofloxacino, también frente a *E. coli*, presenta una poder inhibitorio de la ADN girasa inferior a ciprofloxacino. En este caso, sólo se podría explicar su mayor actividad por una mayor acumulación de moxifloxacino en el interior bacteriano.

Así pues, la mayor actividad de UB-8902 en *A. baumannii* cuando se compara con ciprofloxacino se podría seguir explicando por una mayor afinidad de UB-8902 por la ADN girasa de *A. baumannii*, lo cual se podría demostrar haciendo este mismo ensayo de superenrollamiento pero utilizando una ADN girasa purificada de *A. baumannii*. Otra posible justificación de la mayor actividad de UB-8902 frente a *A. baumannii* cuando se compara con ciprofloxacino sería una mayor acumulación de la primera en el interior de la bacteria, ya sea por una mayor permeabilidad de la membrana bacteriana a este agente antibacteriano o bien por la inexistencia de un sistema de expulsión activa específico para la misma. Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo el experimento que se comenta a continuación.

A parte de los ya mencionados mecanismos de resistencia que involucran mutaciones en los genes diana de las quinolonas, *gyrA* y *parC*, existen otras mutaciones que afectan a la acumulación de la quinolona. Estas mutaciones incluyen a aquellas que afectan a la expresión de las porinas (119) o el lipopolisacárido (117), o a la expulsión activa de los agentes antibacterianos del interior de la bacteria (146). En este contexto, en estudios previos se ha descrito la contribución de una acumulación disminuida de fluoroquinolonas en mutantes de *Escherichia coli* con un fenotipo de resistencia a

múltiples antibióticos (mutantes Mar). Este fenotipo sería el resultado de una expresión reducida de la porina OmpF y de la sobreexpresión de sistemas de expulsión activos (34, 134).

Se puede extrapolar, observando los resultados obtenidos a nivel global que en principio ciprofloxacino es la fluoroquinolona que más se acumula en cualquiera de las tres cepas estudiadas cuando se compara con moxifloxacino y UB-8902. Sin embargo, existen ciertos datos que merecen ser analizados. En lo que respecta a *E. coli*, la mayor actividad de ciprofloxacino se explicaría, además de por una mayor actividad inhibitoria de esta fluoroquinolona sobre la ADN girasa (**Resultados adicionales 7.3.2**), por su mayor acumulación en el interior de la bacteria. Sin embargo, en el caso de moxifloxacino, pese a presentar una mayor actividad *in vitro* frente a *E. coli* exhibe, por un lado menor acumulación que ciprofloxacino en el interior de la bacteria y además es, de las tres fluoroquinolonas ensayadas, la que presentaba una menor  $CI_{50}$  (**Resultados adicionales 7.3.2**). En el caso de UB-8902, su acumulación en el interior de la bacteria registra los valores más bajos. Además, y como sugerían los resultados del ensayo de superenrollamiento de la ADN girasa, su afinidad por la misma era inferior a la de ciprofloxacino. En este sentido, resulta curioso que ciprofloxacino, la fluoroquinolona con menor actividad antibacteriana de los agentes antibacterianos ensayados, frente a *E. coli*, presente la mayor afinidad ( $CI_{50}$ ) hacia la ADN girasa y sea además, la que se acumula en mayor cantidad dentro del interior celular.

En lo que respecta a la acumulación de estas fluoroquinolonas en *A. baumannii*, ya sea en la cepa salvaje o la mutada, se mantiene el mismo patrón, siendo ciprofloxacino la que presenta una mayor acumulación seguida de moxifloxacino y UB-8902. En este caso, la explicación de la menor actividad antibacteriana de



ciprofloxacino cuando se compara con las otras fluoroquinolonas podría reducirse a una menor afinidad ( $CI_{50}$ ) de ciprofloxacino por la ADN girasa de *A. baumannii*.

Por otro lado, al analizar el efecto del carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) en la acumulación de estas fluoroquinolonas podemos destacar algunos resultados. En *E. coli* sólo se observan cambios notables en la acumulación en presencia de CCCP en los casos de moxifloxacino y UB-8902. De ello podemos extrapolar que en esta cepa deben de existir mecanismos de expulsión activa, específicos para moxifloxacino y UB-8902 y no así para ciprofloxacino. En el caso de *A. baumannii* sólo moxifloxacino presenta cambios significativos en su acumulación, por lo que estas cepas tendrían algún sistema de expulsión activa específico para moxifloxacino, pero no dispondrían de ninguno capaz de detectar y expulsar ni ciprofloxacino ni UB-8902.

Llegados a este punto, no podemos dar una explicación total al comportamiento de UB-8902 cuando lo comparamos con ciprofloxacino y moxifloxacino. Si bien su actividad antibacteriana es claramente superior a la de ciprofloxacino (191), los parámetros estudiados para justificar esta mayor actividad han dado resultados contradictorios. Ni los ensayos de superenrollamiento de la ADN girasa ni los de acumulación en el interior de *E. coli* y *A. baumannii* han conseguido justificar esa mayor potencia antibacteriana. Si bien los resultados no esperados del ensayo de superenrollamiento podrían explicarse por la utilización de una ADN girasa de *E. coli* en lugar de la de *A. baumannii* (homología 55-60%), la especie sobre la cual UB-8902 ha demostrado su mayor actividad, los ensayos de acumulación no clarifican la situación.

Continuando con los estudios de evaluación de la nueva fluoroquinolona, UB-8902, nos propusimos realizar dos nuevas aproximaciones: i) por un lado la acumulación y actividad intracelular de la fluoroquinolona UB-8902 en leucocitos

polimorfonucleares humanos (PMN), ii) y por el otro la optimización y estudios pre-clínicos del derivado de ciprofloxacino UB-8902.

### **8.3.1 Penetración intracelular de UB-8902 en linfocitos polimorfonucleares humanos**

La entrada de los agentes antimicrobianos dentro de las células fagocíticas resulta esencial para su actividad frente a microorganismos intracelulares. Así pues, el uso de agentes antimicrobianos capaces de alcanzar elevadas concentraciones intracelulares y permanecer activos en los fagocitos resulta de gran utilidad en la terapia de infecciones causadas por bacterias intracelulares facultativas (27). La mayor parte de las nuevas quinolonas son capaces de penetrar y alcanzar elevadas concentraciones intracelulares en diferentes células fagocíticas. Entre ellas, norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino han mostrado su efectividad frente a patógenos intracelulares facultativos típicos como *Mycobacteria* o *Legionella* spp., y frente otras bacterias como *Staphylococcus aureus*, que en ciertas circunstancias son capaces de sobrevivir en el interior de las células fagocíticas (67, 73, 143).

Sin embargo, y a pesar de todo ello, la aparición de resistencias a las quinolonas mantiene un crecimiento constante. Como ya se ha comentado la resistencia a quinolonas se asocia principalmente con mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (186). El desarrollo de nuevas quinolonas puede lograrse a partir de modificaciones de moléculas ya conocidas (50). El derivado 7-(4-metil)-piperazina ciprofloxacino (UB-8902), ha sido diseñado para tratar de modular la especificidad de ciprofloxacino frente a microorganismos resistentes mediante la modificación de la naturaleza química de este sustituyente. Como se ha visto, UB-8902 presenta una muy buena actividad frente a microorganismos multirresistentes tales como *A. baumannii* y *S. maltophilia* (191). El propósito de este trabajo fue evaluar la penetración intracelular de la nueva quinolona

UB-8902 en células polimorfonucleares humanas (PMN), así como los mecanismos involucrados en la penetración de este agente antibacteriano en las células PMN humanas. Así mismo, también se estudió la actividad intracelular de UB-8902 frente a tres cepas isogénicas de *S. aureus* que presentaban resistencia a quinolonas asociada a la presencia de mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*.

La acumulación de UB-8902 en las células PMN fue rápida, alcanzando concentraciones intracelulares de más de 6 veces superiores a las concentraciones extracelulares después de 20 minutos de incubación a 37°C ( $6,5 \pm 0,8$ ). La relación C/E para UB-8902 fue similar a las descritas para ofloxacino, gemifloxacino y lomefloxacino (61, 62, 145) y ligeramente inferior a la observada en otras quinolonas como DX-619, trovafloxacino y moxifloxacino (60, 139, 140). La expulsión de UB-8902 de las células PMN humanas fue también rápida, ligeramente inferior a la presentada por moxifloxacino en estudios previos (139). Una vez que se retiró el antimicrobiano del medio, la concentración de UB-8902 asociada a PMN disminuyó un 70% después de 5 minutos de incubación a 37°C. El efecto de diferentes concentraciones extracelulares (2, 5, 10, 25 y 50 mg/L) en la acumulación de UB-8902 en los PMN fue también evaluada. Se encontró que la acumulación de UB-8902 asociado a los PMN se saturaba a concentraciones extracelulares mayores 10 mg/L ( $C/E \leq 3$ ), en contraste con los resultados obtenidos con moxifloxacino y esparfloxacino, donde no se observó saturación a ninguna de las concentraciones ensayadas (63, 139).

La penetración de UB-8902 no se vio afectada cuando se utilizaron bajas temperaturas (4°C) (relación C/E  $6,3 \pm 1,5$ ) ni tampoco cuando se utilizaron células muertas ( $7,6 \pm 1,3$  frente al control  $6,5 \pm 1,5$ ), como ya se observó en el caso de esparfloxacino (63), lo cual podría inducir a pensar en un mecanismo pasivo para su penetración. Sin embargo, su acumulación se incrementó significativamente a pH ácido

(pH6; C/E =  $8,6 \pm 1,6$ ). En el caso de moxifloxacino, estudios previos mostraban que su penetración celular tampoco se veía afectada por la viabilidad celular, pero se observó que pHs de 5, 6 y 8 disminuían su ratio C/E, así mismo, esta penetración se veía alterada a 4°C (139). De entre los inhibidores utilizados, sólo el cianuro sódico alteraba significativamente la penetración de UB-8902 ( $3,3 \pm 1,4$ ) tal y como se ha descrito para moxifloxacino y BAY Y 3118 (65). Resulta interesante que el cianuro sódico, un inhibidor del metabolismo oxidativo mitocondrial, disminuyera significativamente la penetración intracelular de UB-8902, dado que las células PMN humanas tienen pocas mitocondrias, debido a que no dependen del metabolismo oxidativo como fuente de energía. La preincubación de las células PMN con fluoruro sódico, un inhibidor de la glicólisis, la mayor fuente de energía para las células PMN, con m-clorofenilhidrazona, un inhibidor del gradiente de protones, y con 2,4- dinitrofenol, un desacoplador de la fosforilación oxidativa, no afectaron a su acumulación. Así mismo, como ya se ha descrito para otras quinolonas (63, 139, 140) ni la estimulación celular con acetato de forbol miristato (PMA), ni la ingestión de *S. aureus* opsonizado afectaron a la acumulación de la droga (C/E razón:  $7,1 \pm 0,8$  y  $7,0 \pm 1,0$  respectivamente).

Para estudiar la actividad intracelular de UB-8902 se incubaron las células PMN que contenían *S. aureus* intracelularmente en presencia de la fluoroquinolona. Se utilizaron tres cepas de *S. aureus*, una que no presentaba mutaciones en los genes diana de las fluoroquinolonas (*gyrA* y/o *parC*), y otras dos con diferentes mutaciones en estos genes. Se evaluó la actividad intracelular de UB-8902 comparada con la de moxifloxacino. A todas las concentraciones extracelulares analizadas (0,125, 1 y 5 mg/L), UB-8902 producía un descenso significativo de la supervivencia intracelular de la cepa *S. aureus* 5-61. La reducción de la supervivencia intracelular de las cepas mutadas, *S. aureus* 5-61 G8 (Ser80) y *S. aureus* 5-61 M14 (Glu88 y Ser80), sólo fue

significativa a concentraciones extracelulares superiores a 1 mg/L. UB-8902 no mostró diferencias significativas en su actividad intracelular frente a las cepas mutadas. Resultados similares se obtuvieron con moxifloxacino, tanto en la cepa salvaje como en las mutadas. Si comparamos la actividad intracelular de ambos antimicrobianos, la reducción de la supervivencia intracelular mostrada por moxifloxacino fue ligeramente superior a la de UB-8902. Este efecto podría ser debido en parte tanto a su mayor actividad intrínseca frente a *S. aureus*, como a su mayor acumulación intracelular cuando se compara con UB-8902 (C/E=10 para moxifloxacino; C/E=7 para UB-8902).

En definitiva podemos decir que UB-8902 penetra en las células PMN humanas alcanzando concentraciones varias veces por encima de la concentración extracelular. Podría existir además un mecanismo pasivo involucrado en la acumulación de UB-8902 en las células PMNs humanas. A concentraciones extracelulares mayores de 1 mg/L, la UB-8902 continúa siendo activa intracelularmente frente a cepas de *S. aureus* salvajes y mutantes que presentan una resistencia a quinolonas asociada con la presencia de mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*.

### 8.3.2 Optimización y estudios pre-clínicos de UB-8902

En esta parte de nuestro estudio nos propusimos evaluar la actividad *in vivo* de la fluoroquinolona UB-8902 frente a *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*, utilizando un modelo de sepsis murina y otro de neumonía.

Las continuas actividades de investigación centradas en la mejora del espectro antimicrobiano de nuevas quinolonas han generado algunos grandes avances. Hasta la fecha y a grandes rasgos, el compuesto más exitoso y mejor estudiado ha sido el ciprofloxacino, una potente quinolona de amplio espectro que es efectiva tanto oralmente como parenteralmente frente a gran variedad de infecciones bacterianas provocadas tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos (168). No

obstante, se siguen buscando nuevas quinolonas capaces de mejorar sus parámetros farmacocinéticos y expandir su espectro microbiológico.

El análisis de la actividad antibacteriana *in vitro* de UB-8902 demuestra que esta molécula es extremadamente potente frente a microorganismos multirresistentes como *A. baumannii* y *S. maltophilia* cuando se compara con ciprofloxacino (191). Para poder contrastar los resultados obtenidos *in vivo* se realizaron previamente ensayos de actividad bactericida *in vitro* (curvas de tiempo/muerte) en los que se compararon la actividad de UB-8902 con la de ciprofloxacino y moxifloxacino. Se consideró que los agentes antibacterianos presentaban actividad bactericida cuando se observaba una reducción de al menos 3 log respecto del inóculo inicial. Cuando se analizó la cepa *A. baumannii* 58 (sensible a ciprofloxacino) se observó que ciprofloxacino era bactericida a concentraciones de 4x la CMI a partir de las 8 horas. Moxifloxacino, no fue bactericida a ninguna de las concentraciones estudiadas. UB-8902 mostró actividad bactericida a concentraciones de 4x la CMI a partir de las 8 horas y a concentraciones 2x la CMI a las 8 horas, aunque con recrecimiento a las 24 horas. Frente a la cepa *A. baumannii* 661 (resistente a ciprofloxacino) tanto ciprofloxacino como moxifloxacino se mostraron bactericidas a concentraciones de 2x y 4x la CMI, a partir de las 4 y las 8 horas, respectivamente. UB-8902 mostró actividad bactericida a concentraciones de 4x la CMI a partir de las 4 horas. En un estudio realizado por Higgins *et al.* (78) en el que analizaban la actividad bactericida de siete fluoroquinolonas frente a diferentes especies de *Acinetobacter* encontraban que, al igual que lo expuesto en nuestro trabajo, ciprofloxacino presentaba actividad bactericida frente a una cepa sensible a ciprofloxacino de *A. baumannii*, a concentraciones 4x la CMI a las 24 horas. En cambio, ellos encontraban que moxifloxacino presentaba esa misma actividad bactericida, mientras en nuestro estudio moxifloxacino fue bacteriostático con

recrecimiento a partir de las 8 horas frente a la cepa *A. baumannii* 58 sensible a ciprofloxacino.

En cuanto a la cepa *S. maltophilia* N<sub>26-34</sub>, (sensible a ciprofloxacino) ciprofloxacino fue bactericida a concentraciones 4x de la CMI a las 24 horas, moxifloxacino no fue bactericida a ninguna de las concentraciones ensayadas y UB-8902 fue bactericida a concentraciones 2x y 4x de la CMI a las 24 horas. Finalmente, frente a la cepa de *S. maltophilia* O<sub>27-34</sub> (resistente a ciprofloxacino) ciprofloxacino fue bactericida a concentraciones 2x y 4x a partir de las 8 horas (con recrecimiento a 2x la CMI a las 24 horas), moxifloxacino tampoco fue bactericida en este caso a ninguna de las concentraciones estudiadas y UB-8902 resultó bactericida a las 4 horas con recrecimiento a las 8 horas a concentraciones 4x de la CMI. En cambio, Bonfiglio *et al.* (23) en un estudio *in vitro* en el que analizaban la actividad bactericida de varias quinolonas frente a 3 cepas clínicas de *S. maltophilia* y una cepa control NCT10257, encontraron que ciprofloxacino no alcanzaba actividad bactericida, presentando actividad bacteriostática con recrecimiento bacteriano a las 8 horas.

Tras los estudios *in vitro*, se comenzaron los experimentos *in vivo* para investigar la toxicidad de la nueva fluoroquinolona, alcanzándose una dosis letal (DL<sub>100</sub>) a la concentración de 2048 mg/kg para UB-8902. Los efectos secundarios para esta nueva quinolona se presentaron a partir de una dosis de 128 mg/kg. En un estudio publicado en 1999 por Keutz *et al.* (193), en el que se analizó la toxicidad de moxifloxacino en ratones, ratas y monos, se presentaron los mismos efectos secundarios (escozor violento tras la inoculación, espasmos musculares, sedación, dificultad para respirar, temblores y descoordinación) que los descritos por nuestros experimentos. Además la DL<sub>50</sub> intravenosa que encontraron para moxifloxacino fue alrededor de 9 veces inferior a la obtenida en nuestros experimentos para UB-8902.

La dosis mínima letal bacteriana (DML) fue la misma, 7,5 log ufc/mL, en el caso de las cepas *A. baumannii* 58 y 661, y de 8,5 log ufc/mL para las cepas de *S. maltophilia* N<sub>26-34</sub> y O<sub>27-34</sub>. Para el cálculo de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se utilizó un inóculo similar a la DML de cada una de las cepas. En el caso de *A. baumannii* la DE<sub>50</sub> fue de 16 y 128 mg/kg para las cepas 58 y 661 respectivamente. Si contrastamos estos datos con los obtenidos para la dosis máxima tolerada del fármaco (DL<sub>0</sub>) que era de 512 mg/kg, podemos concluir que UB-8902 presentaba unos valores de DE<sub>50</sub> muy por debajo de su DL<sub>0</sub>, con lo que se autorizaba la evaluación de su eficacia en nuevos experimentos *in vivo* en un modelo discriminativo de neumonía murina. En el caso de las cepas de *S. maltophilia*, no se obtuvo DE<sub>50</sub> para la cepa N<sub>26-34</sub> con ninguna de las dosis toleradas, por lo que no se continuaron los estudios con las cepas de *S. maltophilia*, al no encontrar actividad *in vivo* en este modelo no discriminativo.

Por último, para comparar la eficacia de cada antimicrobiano, realizamos un modelo de neumonía en ratón C57BL/6 causado por la cepa *A. baumannii* 58 sensible a ciprofloxacino. Las tres fluoroquinolonas aclararon la concentración bacteriana en pulmón significativamente frente a los controles (animales no tratados), sin diferencias significativas entre los grupos terapéuticos estudiados. De igual manera, tanto UB-8902 como ciprofloxacino y moxifloxacino produjeron una reducción significativa de la bacteriemia frente a los controles (80% de hemocultivos estériles), sin encontrar tampoco diferencias significativas entre los grupos de estudio. En cuanto a la mortalidad, ciprofloxacino y moxifloxacino redujeron significativamente la encontrada en los controles. Sin embargo, en el caso de UB-8902, aunque el descenso en la mortalidad respecto a los controles fue de aproximadamente un 30%, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.



De todo ello podemos concluir que frente a una cepa de *A. baumannii* 58 sensible a ciprofloxacino, UB-8902 presenta unos valores de actividad *in vitro* muy superiores a los observados con ciprofloxacino. Su actividad bactericida fue mejor que la presentada por ciprofloxacino y moxifloxacino en los estudios de letalidad. En cambio, en el modelo de neumonía murina utilizando esta cepa de *A. baumannii* sensible a ciprofloxacino, UB-8902 no mejoró los resultados obtenidos con los otros antimicrobianos estudiados, siendo incluso menos activa que las otras dos quinolonas en la reducción de la mortalidad. Ello contrasta con los parámetros farmacodinámicos obtenidos para las tres fluoroquinolonas (AUC/CMI y Cmax/CMI). Dado que las fluoroquinolonas exhiben actividad antibacteriana concentración dependiente (36), estos parámetros están considerados como los mejores predictores del éxito terapéutico en este tipo de antimicrobianos (18, 59). Así pues, los resultados de AUC/CMI y Cmax/CMI fueron óptimos tanto para UB-8902 como para las otras dos fluoroquinolonas, siendo incluso mejores para UB-8902 y moxifloxacino frente a la cepa *A. baumannii* 58 que los obtenidos con ciprofloxacino.

En vista de los resultados anteriores, que muestran la actividad *in vivo* de UB-8902 en la reducción de la concentración bacteriana de pulmones y sangre, junto a su actividad bactericida *in vitro* mostrada por esta fluoroquinolona frente a la cepa de *A. baumannii* 661 resistente a ciprofloxacino, creemos que autorizan su evaluación *in vivo* en infecciones experimentales causadas por cepas resistentes a ciprofloxacino, para comprobar si esta nueva fluoroquinolona podría representar una alternativa terapéutica en infecciones causadas por este tipo de cepas, experimentos que serán realizados en el futuro inmediato.

#### 8.4 Búsqueda de potenciadores de la actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas

En esta búsqueda de potenciadores de la actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas nos propusimos dos objetivos: i) por un lado intentar encontrar, a partir de extractos vegetales, algún inhibidor de bombas de expulsión activa y ii) por otro lado, estudiar el efecto permeabilizador del péptido (VRLPPP)<sub>3</sub> sobre las membranas bacterianas y su efecto en la CMI a fluoroquinolonas.

En ambos casos se utilizaron cepas sensibles y resistentes a ciprofloxacino de especies representativas: *E. coli*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Para el caso de los extractos vegetales sólo se encontró que algunos extractos reducían en 2x la CMI de ciprofloxacino para las cepas sensible y resistente de *A. baumannii* y además para la cepa resistente de *P. aeruginosa* (extractos 11 y 12). Si bien son unos resultados positivos, no podemos considerar que una reducción de 2x en la CMI de ciprofloxacino sea una reducción significativa. El estudio de extractos vegetales, como todos aquellos que se realizan “a ciegas” requiere del análisis de un gran número de especímenes, además de la realización de diferentes métodos de extracción para, de esta manera obtener el mayor número de metabolitos posible. Cada tipo de extracción, ya sea acuosa, alcohólica o de cualquier otro tipo, nos va a generar un tipo determinado de metabolitos característicos. Así pues si lo que queremos es ampliar al máximo el abanico de posibilidades para la obtención de un metabolito útil para nuestros propósitos debemos comenzar por obtener la mayor cantidad de metabolitos activos empleando la mayor diversidad de extracciones posible.

Mediante la utilización del péptido (VRLPPP)<sub>3</sub> se consiguió disminuir la CMI de las cepas de *A. baumannii*, tanto sensible como resistente, en 2x respecto a la de ciprofloxacino. Como en el caso de los resultados positivos en el estudio de los

extractos vegetales, esta disminución de la CMI no resulta significativa. Los escasos resultados positivos obtenidos podrían venir dados por una permeabilización insuficiente de la membrana de estas bacterias. Ciprofloxacino podría ser incapaz de atravesar la membrana aun habiendo aumentado su permeabilidad, dado que el péptido (VRLPPP)<sub>3</sub> está diseñado para el anclaje y transporte de ciertas moléculas, su efecto permeabilizador podría revertirse inmediatamente tras superar la membrana bacteriana. Así mismo, estas bacterias, podrían disponer de un sistema de expulsión activa con una expresión basal suficiente como para compensar la mayor entrada de ciprofloxacino.



**CONCLUSIONES**

---



## 9 CONCLUSIONES

1. En *Yersinia enterocolitica* la mutación más frecuente relacionada con la resistencia a quinolonas es la que tiene lugar en el codón que codifica para la Ser83, la cual genera un nivel moderado de resistencia a fluoroquinolonas y un elevado nivel de resistencia al ácido nalidíxico.
2. Esta es la primera vez que se secuencian la región determinante de la resistencia a quinolonas (RDRQ) en *Y. enterocolitica*, la cual muestra una homología del 82,5% respecto a la secuencia de *Escherichia coli*.
3. *Citrobacter freundii* presenta un operón *acrAB* que codifica para el sistema de expulsión activa AcrAB-TolC, el cual muestra una homología de alrededor del 90% respecto de la secuencia aminoacídica de *acrAB* en *E. coli*.
4. La sobreexpresión de los genes *acrA* y *acrB* en *C. freundii* desempeña un papel fundamental en la modulación final de su CMI frente a fluoroquinolonas, junto a las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*.
5. Hemos reportado la nueva variante del gen *qnrB*, el gen *qnrB16*, que confieren una resistencia de bajo nivel frente a fluoroquinolonas en *C. freundii*.
6. Se ha mostrado la alta prevalencia de los determinantes QnrB en nuestro hospital, y en especial en *Citrobacter* spp.
7. Se ha descrito por primera vez la presencia de un gen *qnrS2* en *K. pneumoniae*.
8. Hemos demostrado la presencia de los genes *qnrB6* y *qnrB16* en el cromosoma bacteriano, con lo que se pone de manifiesto la versatilidad de estos genes para transmitirse tanto verticalmente como horizontalmente.
9. Por primera vez hemos descrito la presencia de un gen *qnr* (*qnrS2*) en un aislamiento clínico de *Aeromonas veronii*.

10. Mediante cálculos de acoplamiento (“docking”) hemos encontrado que la mutación en la posición Asp87 de la ADN girasa resulta crítica en la unión de las fluoroquinolonas ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.
11. El papel de la mutación en la posición Ser83-Leu, podía ser explicado mediante los contactos que la cadena lateral de este residuo establece con las moléculas de fluoroquinolona.
12. Nuestros resultados sugieren que la posición Arg121 podría contribuir a la unión de la ADN girasa al ADN, y además, podría jugar un papel fundamental en la unión del antibiótico al gen *gyrA* y determinaría su acoplamiento en la región RDRQ de la enzima.
13. Se ha diseñado y sintetizado un derivado de la molécula de ciprofloxacino (7-(4-metil)-piperazin ciprofloxacino), denominado UB-8902, el cual ha mostrado una muy buena actividad frente a microorganismos multirresistentes como *A. baumannii* y *S. maltophilia*.
14. Mediante un ensayo de superenrollamiento de la ADN girasa pudimos determinar que ciprofloxacino presentaba una mayor potencia inhibitoria sobre la actividad de la ADN girasa de *E. coli* que la observada con UB-8902 y moxifloxacino.
15. Ciprofloxacino ha demostrado presentar mayor acumulación intrabacteriana que UB-8902 y moxifloxacino, en *A. baumannii* y *E. coli*.
16. UB-8902 penetra en las células PMN humanas alcanzando concentraciones varias veces por encima de la concentración extracelular.
17. A concentraciones extracelulares mayores de 1 mg/L, la UB-8902 continúa siendo activa intracelularmente frente a cepas de *S. aureus* salvajes y mutantes



- que presentan una resistencia a quinolonas asociada con la presencia de mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*.
18. Frente a la cepa *A. baumannii* 58 sensible a ciprofloxacino, UB-8902 presenta unos valores de actividad *in vitro* muy superiores a los observados con ciprofloxacino.
  19. La actividad bactericida de UB-8902 fue mejor que la presentada por ciprofloxacino y moxifloxacino en los estudios de letalidad.
  20. En el modelo de neumonía murina utilizando esta cepa de *A. baumannii* sensible a ciprofloxacino, UB-8902 no mejoró los resultados obtenidos con los otros antimicrobianos estudiados, siendo incluso menos activa que las otras dos quinolonas en la reducción de la mortalidad.
  21. Los resultados de AUC/CMI y Cmax/CMI fueron óptimos tanto para UB-8902 como para las otras dos fluoroquinolonas, siendo incluso mejores para UB-8902 y moxifloxacino frente a la cepa *A. baumannii* 58 que los obtenidos con ciprofloxacino.
  22. Los resultados *in vivo* obtenidos con UB-8902 en la reducción de la concentración bacteriana de pulmones y sangre, junto a su actividad bactericida *in vitro* frente a la cepa de *A. baumannii* 661 resistente a ciprofloxacino, autorizan su evaluación *in vivo* en infecciones experimentales causadas por cepas resistentes a ciprofloxacino, para comprobar si esta nueva fluoroquinolona podría representar una alternativa terapéutica en infecciones causadas por este tipo de cepas.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



**10 BIBLIOGRAFÍA**

1. Emerging Infectious Diseases. <http://www.cdc.gov>.
2. A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 1991. *J Antimicrob Chemother* **27 Suppl D**:1-50.
3. **Acar, J. F., and F. W. Goldstein.** 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**:S67-73.
4. **Akalin, H. E.** 1995. Role of quinolones in the treatment of diarrhoeal diseases. *Drugs* **49 Suppl 2**:128-31.
5. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2067-75.
6. **Ambrose, P. G., and R. C. Owens, Jr.** 2000. New antibiotics in pulmonary and critical care medicine: focus on advanced generation quinolones and cephalosporins. *Semin Respir Crit Care Med* **21**:19-32.
7. **Aono, R., N. Tsukagoshi, and M. Yamamoto.** 1998. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **180**:938-44.
8. **Aoyama, H., K. Sato, T. Kato, K. Hirai, and S. Mitsuhashi.** 1987. Norfloxacin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:1640-1.
9. **Appelbaum, P. C., and P. A. Hunter.** 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* **16**:5-15.

10. **Arroyo, L. A., A. Garcia-Curiel, M. E. Pachon-Ibanez, A. C. Llanos, M. Ruiz, J. Pachon, and J. Aznar.** 2005. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **43**:903-5.
11. **Asensio, A., R. Canton, J. Vaque, J. Rossello, and J. L. Arribas.** 2002. Antimicrobial use in Spanish hospitals (EPINE, 1990-1999). *Med Clin (Barc)* **118**:731-6.
12. **Ashraf, M. M., Z. U. Ahmed, and D. A. Sack.** 1991. Unusual association of a plasmid with nalidixic acid resistance in an epidemic strain of *Shigella dysenteriae* type 1 from Asia. *Can J Microbiol* **37**:59-63.
13. **Auckenthaler, R., M. Michea-Hamzeshpour, and J. C. Pechere.** 1986. *In vitro* activity of newer quinolones against aerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* **17 Suppl B**:29-39.
14. **Ball, P.** 2000. Quinolone-induced QT interval prolongation: a not-so-unexpected class effect. *J Antimicrob Chemother* **45**:557-9.
15. **Barbosa, T. M., and S. B. Levy.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* **182**:3467-74.
16. **Barre, J., G. Houin, and J. P. Tillement.** 1984. Dose-dependent pharmacokinetic study of pefloxacin, a new antibacterial agent, in humans. *J Pharm Sci* **73**:1379-82.
17. **Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3729-35.

18. **Bedos, J. P., E. Azoulay-Dupuis, P. Moine, M. Muffat-Joly, B. Veber, J. J. Pocardalo, and E. Vallee.** 1998. Pharmacodynamic activities of ciprofloxacin and sparfloxacin in a murine pneumococcal pneumonia model: relevance for drug efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* **286**:29-35.
19. **Bergeron, M. G.** 1989. The pharmacokinetics and tissue penetration of the fluoroquinolones. *Clin Invest Med* **12**:20-7.
20. **Blondeau, J. M.** 1999. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin Ther* **21**:3-40; discussion 1-2.
21. **Blondeau, J. M.** 1999. A review of the comparative *in vitro* activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new respiratory quinolones. *J Antimicrob Chemother* **43 Suppl B**:1-11.
22. **Bonemann, G., M. Stiens, A. Puhler, and A. Schluter.** 2006. Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3075-80.
23. **Bonfiglio, G., C. Cascone, C. Azzarelli, V. Cafiso, F. Marchetti, and S. Stefani.** 2000. Levofloxacin *in vitro* activity and time-kill evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* **45**:115-7.
24. **Bottone, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**:257-76.
25. **Breines, D. M., S. Ouabdesselam, E. Y. Ng, J. Tankovic, S. Shah, C. J. Soussy, and D. C. Hooper.** 1997. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:175-9.

26. **Bryskier, A., and J. F. Chantot.** 1995. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs* **49 Suppl 2**:16-28.
27. **Buggy, B. P., D. R. Schaberg, and R. D. Swartz.** 1984. Intraleukocytic sequestration as a cause of persistent *Staphylococcus aureus* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med* **76**:1035-40.
28. **Cagnacci, S., L. Gualco, E. Debbia, G. C. Schito, and A. Marchese.** 2008. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol* **46**:2605-12.
29. **Cano ME, R. M. J., Agüero J, Pascual A, Martínez-Martínez L.** 2006. Detection of *qnrS* in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Spain. *Clin Microbiol Infect* **12**.
30. **Castanheira, M., A. S. Pereira, A. G. Nicoletti, A. C. Pignatari, A. L. Barth, and A. C. Gales.** 2007. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1527-9.
31. **Cattoir, V., L. Poirel, C. Aubert, C. J. Soussy, and P. Nordmann.** 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* **14**:231-7.
32. **Cattoir, V., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2007. *In vitro* mutagenesis of *qnrA* and *qnrS* genes and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* **13**:940-3.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. M100-S18. W., PA.



34. **Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, and S. B. Levy.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1318-25.
35. **Cowan, M. M.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**:564-82.
36. **Craig, W. A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* **26**:1-10; quiz 11-2.
37. **Crumplin, G. C., and J. T. Smith.** 1975. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrob Agents Chemother* **8**:251-61.
38. **Chapman, J. S., and N. H. Georgopapadakou.** 1988. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:438-42.
39. **Chou, J. H., J. T. Greenberg, and B. Demple.** 1993. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J Bacteriol* **175**:1026-31.
40. **Dalhoff, A.** 1999. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* **43 Suppl B**:51-9.
41. **Darouiche, R. O., and R. J. Hamill.** 1994. Antibiotic penetration of and bactericidal activity within endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1059-64.
42. **Davis, R., A. Markham, and J. A. Balfour.** 1996. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs* **51**:1019-74.
43. **De Kruif, P.** 1926. *Microbe hunters*. Blue Ribbon Books, New York.

44. **Deitz, W. H., T. M. Cook, and W. A. Goss.** 1966. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. 3. Conditions required for lethality. *J Bacteriol* **91**:768-73.
45. **Deppermann, K. M., and H. Lode.** 1993. Fluoroquinolones: interaction profile during enteral absorption. *Drugs* **45 Suppl 3**:65-72.
46. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:377-92.
47. **Easmon, C. S., and J. P. Crane.** 1985. Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils. *J Antimicrob Chemother* **16**:67-73.
48. **Edberg SC, B. A., Young LS.** Therapeutic drug monitoring: antimicrobial agents. En: Morello JA, editor coordinador. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology* 20. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1984, p 1-20).
49. **Emmerson, A. M., and A. M. Jones.** 2003. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 1**:13-20.
50. **Escribano, E., A. C. Calpena, T. M. Garrigues, J. Freixas, J. Domenech, and J. Moreno.** 1997. Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1996-2000.
51. **Espedido, B. A., S. R. Partridge, and J. R. Iredell.** 2008. *bla*(IMP-4) in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2984-7.
52. **Esposito, A. L., and J. E. Pennington.** 1983. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. *Am Rev Respir Dis* **128**:662-7.
53. **Everett, M. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and L. J. Piddock.** 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli*

- strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2380-6.
54. **Fang, G. D., C. Brennen, M. Wagener, D. Swanson, M. Hilf, L. Zadecky, J. DeVine, and V. L. Yu.** 1991. Use of ciprofloxacin versus use of aminoglycosides for therapy of complicated urinary tract infection: prospective, randomized clinical and pharmacokinetic study. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1849-55.
55. **Ferguson, J., J. McEwen, H. Al-Ajmi, L. Purkins, P. J. Colman, and S. A. Willavize.** 2000. A comparison of the photosensitizing potential of trovafloxacin with that of other quinolones in healthy subjects. *J Antimicrob Chemother* **45**:503-9.
56. **Fernandez-Carneado, J., M. J. Kogan, S. Castel, and E. Giralt.** 2004. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**:1811-4.
57. **Ferrandiz, M. J., A. Fenoll, J. Linares, and A. G. De La Campa.** 2000. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:840-7.
58. **Fish, D. N., and A. T. Chow.** 1997. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin Pharmacokinet* **32**:101-19.
59. **Forrest, A., D. E. Nix, C. H. Ballow, T. F. Goss, M. C. Birmingham, and J. J. Schentag.** 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1073-81.
60. **Garcia, I., S. Ballesta, C. Murillo, E. J. Perea, and A. Pascual.** 2006. Intracellular penetration and activity of DX-619 in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3173-4.

61. **Garcia, I., A. Pascual, S. Ballesta, P. Joyanes, and E. J. Perea.** 2000. Intracellular penetration and activity of gemifloxacin in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3193-5.
62. **Garcia, I., A. Pascual, S. Ballesta, and E. J. Perea.** 2000. Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int J Antimicrob Agents* **15**:201-5.
63. **Garcia, I., A. Pascual, M. C. Guzman, and E. J. Perea.** 1992. Uptake and intracellular activity of sparfloxacin in human polymorphonuclear leukocytes and tissue culture cells. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1053-6.
64. **Garcia, I., A. Pascual, and E. J. Perea.** 1992. Effect of several antimicrobial agents on ciprofloxacin uptake by human neutrophils. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**:260-2.
65. **Garcia, I., A. Pascual, and E. J. Perea.** 1994. Intracellular penetration and activity of BAY Y 3118 in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:2426-9.
66. **Garnier, F., N. Raked, A. Gassama, F. Denis, and M. C. Ploy.** 2006. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3200-2.
67. **Gay, J. D., D. R. DeYoung, and G. D. Roberts.** 1984. *In vitro* activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. kansasii*. *Antimicrob Agents Chemother* **26**:94-6.
68. **Gay, K., A. Robicsek, J. Strahilevitz, C. H. Park, G. Jacoby, T. J. Barrett, F. Medalla, T. M. Chiller, and D. C. Hooper.** 2006. Plasmid-mediated

- quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. Clin Infect Dis **43**:297-304.
69. **Giamarellou, H., E. Kolokythas, G. Petrikkos, J. Gazis, D. Aravantinos, and P. Sfikakis.** 1989. Pharmacokinetics of three newer quinolones in pregnant and lactating women. Am J Med **87**:49S-51S.
70. **Goa, K. L., H. M. Bryson, and A. Markham.** 1997. Sparfloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability in lower respiratory tract infections. Drugs **53**:700-25.
71. **Goldstein, E. J.** 1996. Possible role for the new fluoroquinolones (levofloxacin, grepafloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin, sparfloxacin, and DU-6859a) in the treatment of anaerobic infections: review of current information on efficacy and safety. Clin Infect Dis **23 Suppl 1**:S25-30.
72. **Goni-Urriza, M., C. Arpin, M. Capdepuy, V. Dubois, P. Caumette, and C. Quentin.** 2002. Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother **46**:350-9.
73. **Greenwood, D., and A. Laverick.** 1983. Activities of newer quinolones against Legionella group organisms. Lancet **2**:279-80.
74. **Griffiths, N. M., B. H. Hirst, and N. L. Simmons.** 1994. Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway? J Pharmacol Exp Ther **269**:496-502.
75. **Griffiths, N. M., B. H. Hirst, and N. L. Simmons.** 1993. Active secretion of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. Br J Pharmacol **108**:575-6.

76. **Hegde, S. S., M. W. Vetting, S. L. Roderick, L. A. Mitchenall, A. Maxwell, H. E. Takiff, and J. S. Blanchard.** 2005. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* **308**:1480-3.
77. **Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:879-85.
78. **Higgins, P. G., K. Coleman, and S. G. Amyes.** 2000. Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter* spp. in vitro. *J Antimicrob Chemother* **45 Suppl 1**:71-7.
79. **Hindahl, M. S., G. W. Crockford, and R. E. Hancock.** 1984. Outer membrane protein NmpC of *Escherichia coli*: pore-forming properties in black lipid bilayers. *J Bacteriol* **159**:1053-5.
80. **Hoffken, G., H. Lode, C. Prinzing, K. Borner, and P. Koeppe.** 1985. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and parenteral administration. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:375-9.
81. **Hooper, D. C.** 1998. Clinical applications of quinolones. *Biochim Biophys Acta* **1400**:45-61.
82. **Hooper, D. C.** 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* **2**:530-8.
83. **Hooper, D. C.** 1995. Quinolone mode of action. *Drugs* **49 Suppl 2**:10-5.
84. **Horowitz, D. S., and J. C. Wang.** 1987. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J Biol Chem* **262**:5339-44.
85. **Hyatt, J. M., P. S. McKinnon, G. S. Zimmer, and J. J. Schentag.** 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet* **28**:143-60.

86. **Ince, D., and D. C. Hooper.** 2003. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J Bacteriol* **185**:6883-92.
87. **Jacoby, G., V. Cattoir, D. Hooper, L. Martinez-Martinez, P. Nordmann, A. Pascual, L. Poirel, and M. Wang.** 2008. *qnr* Gene Nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*.
88. **Jacoby, G. A., N. Chow, and K. B. Waites.** 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:559-62.
89. **Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper.** 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1178-82.
90. **Janoir, C., I. Podglajen, M. D. Kitzis, C. Poyart, and L. Gutmann.** 1999. *In vitro* exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE-parC* region in *S. mitis*. *J Infect Dis* **180**:555-8.
91. **Jones, M. E., D. F. Sahm, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Kohrer, and F. J. Schmitz.** 2000. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:462-6.
92. **Jones, R. N.** 2000. Perspectives on the development of new antimicrobial agents for resistant Gram-positive pathogens. *Braz J Infect Dis* **4**:1-8.
93. **Kehrenberg, C., S. Friederichs, A. de Jong, and S. Schwarz.** 2008. Novel variant of the *qnrB* gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1206-7.

- 
94. **Kidwai, M., P. Misra, and R. Kumar.** 1998. The fluorinated quinolones. *Curr Pharm Des* **4**:101-18.
95. **Kim, M. H., J. Y. Sung, J. W. Park, G. C. Kwon, and S. H. Koo.** 2007. Coproduction of *qnrB* and *armA* from extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Lab Med* **27**:428-36.
96. **Koga, H., A. Itoh, S. Murayama, S. Suzue, and T. Irikura.** 1980. Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J Med Chem* **23**:1358-63.
97. **Krcmery, V., Jr.** 1995. The use of quinolones as therapy in granulocytopenic cancer patients. Comparison with other antimicrobials. *Drugs* **49 Suppl 2**:139-43.
98. **Lamp, K. C., E. M. Bailey, and M. J. Rybak.** 1992. Ofloxacin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* **22**:32-46.
99. **Lavilla, S., J. J. Gonzalez-Lopez, M. Sabate, A. Garcia-Fernandez, M. N. Larrosa, R. M. Bartolome, A. Carattoli, and G. Prats.** 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* **61**:291-5.
100. **Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage.** 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. a New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem* **91**:1063-5.
101. **Lettieri, J. T., M. C. Rogge, L. Kaiser, R. M. Echols, and A. H. Heller.** 1992. Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:993-6.
102. **Lewin, C. S., and S. G. Amyes.** 1990. Bactericidal action of PD127,391, an enhanced spectrum quinolone. *J Med Microbiol* **33**:67-70.



103. **Lewin, C. S., S. G. Amyes, and J. T. Smith.** 1989. Bactericidal activity of enoxacin and lomefloxacin against *Escherichia coli* KL16. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**:731-3.
104. **Lewin, C. S., and J. T. Smith.** 1988. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother* **22 Suppl C**:1-8.
105. **Lieu, P. K., S. C. Tok, N. H. Ismail, and H. H. Chng.** 1997. Ciprofloxacin-induced cutaneous vasculitis. *Allergy* **52**:593-4.
106. **Liu, J. H., Y. T. Deng, Z. L. Zeng, J. H. Gao, L. Chen, Y. Arakawa, and Z. L. Chen.** 2008. Co-prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QepA, Qnr and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA Methylase RmtB-producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs. *Antimicrob Agents Chemother*.
107. **Lode, H., G. Hoffken, K. Borner, and P. Koeppe.** 1989. Unique aspects of quinolone pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* **16 Suppl 1**:1-4.
108. **Mallea, M., A. Mahamoud, J. Chevalier, S. Alibert-Franco, P. Brouant, J. Barbe, and J. M. Pages.** 2003. Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. *Biochem J* **376**:801-5.
109. **Mammeri, H., M. Van De Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, and P. Nordmann.** 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:71-6.
110. **Marti, S., J. Sanchez-Cespedes, E. Oliveira, D. Bellido, E. Giralt, and J. Vila.** 2006. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics* **6 Suppl 1**:S82-7.

111. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, I. Garcia, J. Tran, and G. A. Jacoby.** 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**:1037-9.
112. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-9.
113. **Maxwell, A.** 1992. The molecular basis of quinolone action. *J Antimicrob Chemother* **30**:409-14.
114. **Mazzariol, A., J. Zuliani, G. Cornaglia, G. M. Rossolini, and R. Fontana.** 2002. AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3984-6.
115. **McKinnon, P. S., and S. L. Davis.** 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**:271-88.
116. **Mitsuyama, J., Y. Itoh, M. Takahata, S. Okamoto, and T. Yasuda.** 1992. *In vitro* antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:2030-6.
117. **Moniot-Ville, N., J. Guibert, N. Moreau, J. F. Acar, E. Collatz, and L. Gutmann.** 1991. Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:519-23.
118. **Montero, C., G. Mateu, R. Rodriguez, and H. Takiff.** 2001. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3387-92.

119. **Mortimer, P. G., and L. J. Piddock.** 1993. The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **32**:195-213.
120. **Munshi, M. H., D. A. Sack, K. Haider, Z. U. Ahmed, M. M. Rahaman, and M. G. Morshed.** 1987. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* **2**:419-21.
121. **Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima, and H. Yoshida.** 1989. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:254-5.
122. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Tentative guideline 771 E, N. C. f. C. L. S., Villanova, PA.
123. **Nekhotiaeva, N., A. Elmquist, G. K. Rajarao, M. Hallbrink, U. Langel, and L. Good.** 2004. Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *Faseb J* **18**:394-6.
124. **Nelson, M. L.** 2002. Modulation of Antibiotic Efflux in Bacteria. *Curr Med Chem-Anti-infect Agents* **1**:23.
125. **Neuman, M.** 1988. Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clin Pharmacokinet* **14**:96-121.
126. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **178**:5853-9.
127. **Nikaido, H.** 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1831-6.
128. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-8.

129. **Nikaido, H., and H. I. Zgurskaya.** 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:215-8.
130. **Nordmann, P., and L. Poirel.** 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **56**:463-9.
131. **O'Reilly T, C. R., Squires E.** Evaluation of antimicrobials in experimental animal infection. En Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore, Maryland, 4th ed. Williams & Wilkins; 1996, p. 634.
132. **Oethinger, M., W. V. Kern, A. S. Jellen-Ritter, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 2000. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:10-3.
133. **Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy.** 1998. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2089-94.
134. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**:306-8.
135. **Pachón, J., Gavaldá, J., Miró, J.M.:** "Modelo de neumonía". En: Modelos experimentales en Patología Infecciosa. Coords./Eds.: Miró Meda, J.M., Gatell, J.M. pp. 81-90. Fundación Dr. Antoniio Esteve. 2000.
136. **Pai, H., M. R. Seo, and T. Y. Choi.** 2007. Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum beta-lactamases or plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:366-8.

137. **Palumbo, M., B. Gatto, G. Zagotto, and G. Palu.** 1993. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol* **1**:232-5.
138. **Park, Y. J., J. K. Yu, S. Lee, E. J. Oh, and G. J. Woo.** 2007. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob Chemother* **60**:868-71.
139. **Pascual, A., I. Garcia, S. Ballesta, and E. J. Perea.** 1999. Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:12-5.
140. **Pascual, A., I. Garcia, S. Ballesta, and E. J. Perea.** 1997. Uptake and intracellular activity of trovafloxacin in human phagocytes and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:274-7.
141. **Pascual, A., I. Garcia, and E. J. Perea.** 1992. Entry of lomefloxacin and temafloxacin into human neutrophils, peritoneal macrophages, and tissue culture cells. *Diagn Microbiol Infect Dis* **15**:393-8.
142. **Pascual, A., I. Garcia, and E. J. Perea.** 1989. Fluorometric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:653-6.
143. **Pascual, A., I. Garcia, and E. J. Perea.** 1990. Uptake and intracellular activity of an optically active ofloxacin isomer in human neutrophils and tissue culture cells. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:277-80.
144. **Pascual, A., D. Tsukayama, J. Kovarik, G. Gekker, and P. Peterson.** 1987. Uptake and activity of rifapentine in human peritoneal macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Clin Microbiol* **6**:152-7.

145. **Perea, E. J., I. Garcia, and A. Pascual.** 1992. Comparative penetration of lomefloxacin and other quinolones into human phagocytes. *Am J Med* **92**:48S-51S.
146. **Piddock, L. J.** 1995. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992-1994. *Drugs* **49 Suppl 2**:29-35.
147. **Piddock, L. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and A. E. Asuquo.** 1999. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **43**:61-70.
148. **Poirel, L., J. M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard, and P. Nordmann.** 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3523-5.
149. **Price, J. R.** 1949. Some reactions of 1-methyl-γ-quinolone-3-carboxylic acid, a degradation product of the alkaloids. *Aust J Sci Res* **217**:9.
150. **Ribera, A., A. Domenech-Sanchez, J. Ruiz, V. J. Benedi, M. T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** 2002. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microb Drug Resist* **8**:245-51.
151. **Ridgway, G. L.** 1999. Quinolones in sexually transmitted diseases: state of the art. *Drugs* **58 Suppl 2**:92-5.
152. **Robicsek, A., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* **6**:629-40.
153. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme:

- a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**:83-8.
154. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2006. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2872-4.
155. **Rodriguez-Hernandez, M. J., L. Cuberos, C. Pichardo, F. J. Caballero, I. Moreno, M. E. Jimenez-Mejias, A. Garcia-Curiel, and J. Pachon.** 2001. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* **47**:479-82.
156. **Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel, A. Pascual, and P. Nordmann.** 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in Australia. *Microb Drug Resist* **12**:99-102.
157. **Rohlfing, S. R., J. R. Gerster, and D. C. Kvam.** 1976. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *Antimicrob Agents Chemother* **10**:20-4.
158. **Ronald, A.** 1999. The quinolones and renal infection. *Drugs* **58 Suppl 2**:96-8.
159. **Rose, T. F., R. Ellis-Pegler, J. Collins, and M. Small.** 1990. Oral pefloxacin mesylate in the treatment of continuous ambulatory peritoneal dialysis associated peritonitis: an open non-comparative study. *J Antimicrob Chemother* **25**:853-9.
160. **Rubinstein, E.** 2001. History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* **47 Suppl 3**:3-8; discussion 44-8.

161. **Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* **51**:1109-17.
162. **Ruiz, J., S. Casellas, M. T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** 1997. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* **39**:839-40.
163. **Ruiz, J., J. Gomez, M. M. Navia, A. Ribera, J. M. Sierra, F. Marco, J. Mensa, and J. Vila.** 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* **42**:257-61.
164. **Ruiz, J., F. Marco, P. Goni, F. Gallardo, J. Mensa, A. Trilla, T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** 1995. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **36**:737-8.
165. **Ruiz, J., A. Moreno, M. T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** 2005. A double mutation in the *gyrA* gene is necessary to produce high levels of resistance to moxifloxacin in *Campylobacter* spp. clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* **25**:542-5.
166. **Saenz, Y., J. Ruiz, M. Zarazaga, M. Teixido, C. Torres, and J. Vila.** 2004. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* **53**:544-5.
167. **Schulte, J. M., and G. P. Schmid.** 1995. Recommendations for treatment of chancroid, 1993. *Clin Infect Dis* **20 Suppl 1**:S39-46.



168. **Sedlock, D. M., R. A. Dobson, D. M. Deuel, G. Y. Lesher, and J. B. Rake.** 1990. *In vitro* and *in vivo* activities of a new quinolone, WIN 57273, possessing potent activity against Gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:568-75.
169. **Shen, L. L., L. A. Mitscher, P. N. Sharma, T. J. O'Donnell, D. W. Chu, C. S. Cooper, T. Rosen, and A. G. Pernet.** 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug--DNA binding model. *Biochemistry* **28**:3886-94.
170. **Shimizu, M., S. Nakamura, and Y. Takase.** 1970. Piromidic acid, a new antibacterial agent: antibacterial properties. *Antimicrob Agents Chemother* (Bethesda) **10**:117-22.
171. **Shimizu, M., Y. Takase, S. Nakamura, H. Katae, and A. Minami.** 1975. Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* properties. *Antimicrob Agents Chemother* **8**:132-8.
172. **Sorlozano, A., J. Gutierrez, A. Jimenez, J. de Dios Luna, and J. L. Martinez.** 2007. Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **45**:2740-2.
173. **Stahlmann, R.** 1990. Safety profile of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* **26 Suppl D**:31-44.
174. **Stein, G. E.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **23 Suppl 1**:S19-24.
175. **Strahilevitz, J., D. Engelstein, A. Adler, V. Temper, A. E. Moses, C. Block, and A. Robicsek.** 2007. Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone

- resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3001-3.
176. **Swanson, B. N., V. K. Boppana, P. H. Vlasses, H. H. Rotmensch, and R. K. Ferguson.** 1983. Norfloxacin disposition after sequentially increasing oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* **23**:284-8.
177. **Takei, M., H. Fukuda, R. Kishii, and M. Hosaka.** 2001. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3544-7.
178. **Tavio, M. M., J. Vila, J. Ruiz, J. Ruiz, A. M. Martin-Sanchez, and M. T. Jimenez de Anta.** 1999. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *J Antimicrob Chemother* **44**:735-42.
179. **Teng, R., T. E. Liston, and S. C. Harris.** 1996. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of trovafloxacin in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* **37**:955-63.
180. **Tran, J. H., and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5638-42.
181. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3050-2.
182. **Trias, J., and H. Nikaido.** 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* **265**:15680-4.

183. **Turner, F. J., S. M. Ringel, J. F. Martin, P. J. Storino, J. M. Daly, and B. S. Schwartz.** 1967. Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent. I. *In vitro* and *in vivo* activity. *Antimicrob Agents Chemother* (Bethesda) **7**:475-9.
184. **Valdezate, S., A. Vindel, J. A. Saez-Nieto, F. Baquero, and R. Canton.** 2005. Preservation of topoisomerase genetic sequences during *in vivo* and *in vitro* development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* strains. *J Antimicrob Chemother* **56**:220-3.
185. **Vetting, M. W., S. S. Hegde, J. E. Fajardo, A. Fiser, S. L. Roderick, H. E. Takiff, and J. S. Blanchard.** 2006. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* **45**:1-10.
186. **Vila, J.** 2005. Fluoroquinolone resistance, p. 41-52. *In* A. M. Whitte DG, McDermott (ed.), *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy*. ASM press, washington, DC.
187. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, and T. Jimenez de Anta.** 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **39**:757-62.
188. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, A. Marcos, and T. Jimenez de Anta.** 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1201-3.
189. **Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt, and T. Jimenez de Anta.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:2477-9.
190. **Vila, J., J. Ruiz, and M. M. Navia.** 1999. Molecular basis of quinolone resistance acquisition in Gram-negative bacteria. *In* *Recent Research*

- Developments in Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 3rd edn (Pandalai, S. G., Ed.), pp. 323–44. Trivandrum, India.
191. **Vila, J., J. Sanchez-Cespedes, J. M. Sierra, M. Piqueras, E. Nicolas, J. Freixas, and E. Giralt.** 2006. Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* **28**:19-24.
192. **Vogelman, B., and W. A. Craig.** 1986. Kinetics of antimicrobial activity. *J Pediatr* **108**:835-40.
193. **von Keutz, E., and G. Schluter.** 1999. Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother* **43 Suppl B**:91-100.
194. **Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1515-21.
195. **Wang, M., D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1295-9.
196. **Wang M.H., X. X., Wu S., Zhu D., Wang M.G.** 2008. A new plasmid-mediated gene for quinolone resistance, *qnrC*., 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain.
197. **Wick, W. E., D. A. Preston, W. A. White, and R. S. Gordee.** 1973. Compound 64716, a new synthetic antibacterial agent. *Antimicrob Agents Chemother* **4**:415-20.

198. **Wigley, D. B.** 1995. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**:185-208.
199. **Wolfson, J. S., and D. C. Hooper.** 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **2**:378-424.
200. **Wolfson, J. S., and D. C. Hooper.** 1991. Pharmacokinetics of quinolones: newer aspects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**:267-74.
201. **Wu, J. J., W. C. Ko, S. H. Tsai, and J. J. Yan.** 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1223-7.
202. **Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Konda, and Y. Arakawa.** 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3354-60.
203. **Yoon, J., C. Urban, C. Terzian, N. Mariano, and J. J. Rahal.** 2004. *In vitro* double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:753-7.
204. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura.** 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1271-2.
205. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura.** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1647-50.

206. **Yoshida, H., M. Nakamura, M. Bogaki, H. Ito, T. Kojima, H. Hattori, and S. Nakamura.** 1993. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:839-45.
207. **Zhanel, G. G., K. Ennis, L. Vercaigne, A. Walkty, A. S. Gin, J. Embil, H. Smith, and D. J. Hoban.** 2002. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs* **62**:13-59.
208. **Ziegler, C., A. Stary, H. Mailer, W. Kopp, W. Gebhart, and J. Soltz-Szots.** 1992. Quinolones as an alternative treatment of chlamydial, mycoplasma and gonococcal urogenital infections. *Dermatology* **185**:128-31.

