

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



**ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LA
RESISTENCIA A QUINOLONAS EN “HAEMOPHILUS
INFLUENZAE”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Dolores Pérez ázquez

Bajo la dirección del doctor

José Campos Marques

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2516-3



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología

**ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LA RESISTENCIA
A QUINOLONAS EN *Haemophilus influenzae***

**Memoria presentada por María D. Pérez Vázquez para
optar al Grado de Doctor en la Facultad de Farmacia**

Madrid mayo de 2004

El Dr. José Campos Marques,

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral, titulada “**Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a quinolonas en *Haemophilus influenzae***”, que para optar al Grado de Doctor en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid presenta D^a María D. Pérez Vázquez, ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto de Salud Carlos III, hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Madrid, Mayo de 2004-05-14

D. José Campos Marques.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo:

Al Dr. José Campos, por haber confiado en mi para llevar a cabo este proyecto, y por su constante dedicación, su ánimo y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, Belén, Federico, Jesús, Enrique, Gema y Begoña, con los que comparto muchas horas y que han vivido el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rafael Cantón, no sólo por su colaboración en el desarrollo de esta tesis, también por estar siempre pendiente de “sus residentes”.

A todos mis compañeros del Servicio de Bacteriología del Instituto de Salud Carlos III que siempre me han ayudado en todos los momentos en que lo he necesitado.

A mis compañeros y amigos Sylvia Valdezate y David Tarragó, en lo profesional, pero mucho más en lo personal, gracias por vuestro apoyo y muchas veces consuelo.

A mi familia, y especialmente a mis padres que han estado siempre preocupados y pendientes del progreso de esta tesis.

Y gracias a ti, Carlos, por estar a mi lado y hacerme sentir feliz.

La realización de este trabajo fue posible gracias a :

La subvención del Fondo de Investigación Sanitaria (99/0304), Ministerio de Sanidad.

La concesión de una beca del Instituto de Salud Carlos III (02/0056) y de una Beca de la Sociedad Española de Quimioterapia (BECA SEQ 2000).

A la memoria de mi padre

INDICE	PAG
LISTA DE ABREVIATURAS	PAG
INTRODUCCIÓN	PAG
1. CARACTERÍSTICAS BACTERIOLÓGICAS DE <i>H. influenzae</i>	
2. QUINOLONAS	
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Microorganismos	
2. Consumo de antibióticos	
3. Epidemiología molecular	
4. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos.	
5. Caracterización de las qrdr de las topoisomerasas II y IV de <i>H. influenzae</i> .	
6. Análisis de los polimorfismos presentes en <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>gyrB</i> y <i>paEe</i> .	
7. Obtención de transformantes <i>in vitro</i>	
8. Obtención de mutantes <i>in vitro</i> con sensibilidad disminuída a quinolonas	
9. Detección fenotípica de la presencia de un mecanismo activo de bombeo	
10. determinación del fenotipo bacteriano hipermutador.	
11. Fallo terapéutico en un caso de neumonía debida a <i>H. influenzae</i> resistente a levofloxacino	
RESULTADOS	
1. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS CEPAS DE <i>H. influenzae</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE).	
2. RESULTADOS CONSUMO DE QUINOLONAS	
3. PERFIL DE SENSIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>H. influenzae</i> .	
2.1. Sensibilidad a quinolonas	
2.2. Resistencia cruzada a las quinolonas	
2.3. Sensibilidad a otros antimicrobianos	
2.4. Distribución poblacional de las cepas de <i>H. influenzae</i> en función de su sensibilidad a las quinolonas estudiadas	
2.5. Comparación de la sensibilidad a las quinolonas en función de los métodos utilizados	
4. ANÁLISIS DE LAS QRDRs DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV.	
4.1. Análisis de las mutaciones presentes en las secuencias de las QRDR de las topoisomerasas II Y IV	
4.2. Análisis de la mutaciones presentes en las secuencias fuera de las regiones QRDR de las topoisomerasas II Y IV.	

5. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV
6. DETERMINACIÓN DE “PUNTOS DE CORTE MICROBIOLÓGICOS” PARA ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINA , LEVOFLOXACINA Y MOXIFLOXACINA .
7. ANÁLISIS DE LAS QRDRs DE LAS TOPOISOMERASAS EN LOS TRANSFORMANTES OBTENIDOS *in vitro* DE *H. influenzae*
8. ANÁLISIS DE LAS QRDRs DE LAS TOPOISOMERASAS EN LOS MUTANTES OBTENIDOS *in vitro* DE *H. influenzae*
9. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA PRESENCIA DE UN MECANISMO ACTIVO DE BOMBEO
10. ANÁLISIS DEL FENOTIPO BACTERIANO HIPERMUTADOR
11. ANÁLISIS DE UN FALLO TERAPÉUTICO EN UN CASO DE NEUMONÍA DEBIDA *H. influenzae* RESISTENTE A LEVOFLOXACINA

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ARTÍCULOS

- CMI Concentración Mínima Inhibitoria
- CMI₅₀ Concentración de un antibiótico que inhibe el 50% de la población bacteriana
- CMI₉₀ Concentración de un antibiótico que inhibe el 90% de la población bacteriana
- Grupo I Grupo de cepas de *Haemophilus influenzae* cuya CMI es $\geq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina
- Grupo II Grupo de cepas de *Haemophilus influenzae* cuya CMI es $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina
- Kpb Kilobase (mil pares de bases)
- ml Mililitro
- QRDR *Quinolone Region Determinant of Resistance*, Region Determinante de la Resistencia a Quinolonas
- PFGE *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Campos Pulsantes
- ufc Unidades formadoras de colonias
- μg Microgramo
- DNA ácido desoxirribonucleico

- CMI Concentración Mínima Inhibitoria
- CMI₅₀ Concentración de un antibiótico que inhibe el 50% de la población bacteriana
- CMI₉₀ Concentración de un antibiótico que inhibe el 90% de la población bacteriana
- Grupo I Grupo de cepas de *Haemophilus influenzae* cuya CMI es $\geq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina
- Grupo II Grupo de cepas de *Haemophilus influenzae* cuya CMI es $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina
- Kpb Kilobase (mil pares de bases)
- ml Mililitro
- QRDR *Quinolone Region Determinant of Resistance*, Region Determinante de la Resistencia a Quinolonas
- PFGE *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Campos Pulsantes
- ufc Unidades formadoras de colonias
- μg Microgramo
- DNA ácido desoxirribonucleico

1. CARACTERÍSTICAS BACTERIOLÓGICAS DE *H. influenzae*

1.1. MORFOLOGÍA

El género *Haemophilus* está formado por pequeños bacilos o cocobacilos gram negativos pleomórficos, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos.

1.2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Cápsula. De acuerdo con la presencia o ausencia de cápsula, *H. influenzae* puede clasificarse como capsulado (aglutinable con sueros específicos) o no capsulado (no aglutinable). En general, la presencia de cápsula se correlaciona con la mayor virulencia del microorganismo. El serogrupo más frecuentemente aislado de sangre y LCR es el b en niños no vacunados, aunque otros serogrupos como e y f pueden también causar cuadros clínicos similares. La cápsula está compuesta por polisacáridos; el serogrupo b es un polímero de ribosa, fosfato y ribitol (RPR). Diversos antígenos de superficie de otras especies bacterianas han demostrado reactividad cruzada con el polisacárido capsular b de *H. influenzae*, entre ellas *Streptococcus pneumoniae* serogrupos 6, 15, 29 y 35, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* K100. Estas reacciones cruzadas deben tenerse en cuenta al interpretar las pruebas positivas de detección de antígenos en líquidos orgánicos.

Proteínas de la membrana externa. La membrana externa de las bacterias gram negativas contiene proteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos. *H. influenzae* presenta gran número de proteínas de membrana externa. Algunas de estas proteínas se comportan como porinas y son antígenos potentes y por ello posibles candidatas para la preparación de vacunas, sobre todo en infecciones por cepas no capsuladas. Además, se han utilizado como marcadores epidemiológicos.

Lipopolisacárido. La actividad biológica del lipopolisacárido (LPS) de *H. influenzae* produce una reacción de Schwartzman, es letal para el ratón, causa una respuesta febril en conejos, activa los linfocitos B y muestra actividad con el lisado de *Limulus*. En modelos animales contribuye a la capacidad del microorganismo para invadir la mucosa nasal. Los patrones electroforéticos del LPS pueden ser útiles para estudios epidemiológicos, combinados o no con proteínas de membrana externa.

Proteasas IgA. Se trata de enzimas bacterianas cuyo único sustrato conocido es la IgA1, en la que destruye la cadena pesada en sitios específicos. Podría tratarse de un importante factor de virulencia, dado que las defensas de las mucosas son en parte mediadas por IgA. Se ha observado una estrecha correlación entre el serotipo capsular y el tipo de proteasa IgA1 producido.

Fimbria (pili). Son proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana que constituyen uno de los factores de adherencia más estudiados en bacilos gram negativos. Pueden producir hemaglutinación de hematíes, sin estar implicados en la movilidad bacteriana. En el caso del *H. influenzae*, la mayoría de las cepas aisladas de LCR poseen fimbrias.

1.3. METABOLISMO Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Para su desarrollo requieren la adición de factores de crecimiento presentes en la sangre, sobre todo la protoporfirina IX (denominada factor X) y/o nicotinamida dinucleótido (NAD), denominada también factor V. Son parásitos obligados de las mucosas de la especie humana. Pueden aislarse en el aparato respiratorio superior, la boca y también en la vagina y el intestino. En las **Tabla 1** se indican las principales características de las especies que componen el género *Haemophilus*. Los requerimientos de los factores X y V, la prueba de la porfirina y la utilización de azúcares son las propiedades más importantes para su clasificación.

Tabla 1. Identificación fenotípica de las especies más frecuentes de *Haemophilus*.

Especies	Protoporfirina	NAD	Prueba de la porfirina	Fermentación de:		
	IX (factor X)	(factor V)		Glucosa	Sacarosa	Lactosa
H. influenzae	+	+	-	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	+	+	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	+	+	+
H. ducrey	+	-	-	-	-	-
<i>H. segnis</i>	-	+	+	d	d	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	+	+	+	+

Haemophilus influenzae, descrito por Pfeiffer en 1892, fue designado *hemofílico* en virtud de su incapacidad para crecer en medios de cultivo sin la adición de sangre completa o sustancias derivadas de ella. La mayoría de las cepas pueden clasificarse en 6 biotipos diferentes sobre la base de propiedades bioquímicas sencillas. Los biotipos pueden tener cierto interés a efectos epidemiológicos. Según la composición de los polisacáridos capsulares se han identificado 6 serogrupos (designados con las letras a hasta f).

Coloniza la nasofaringe de más del 75 % de los niños sanos. A menudo se aísla en infecciones crónicas del aparato respiratorio superior e inferior, los senos paranasales, el oído medio y la conjuntiva; la mayoría de las cepas no son capsuladas y pertenecen a los biotipos II y III. Las cepas capsuladas del serogrupo b y otros serogrupos causan meningitis en niños y epiglotitis aguda, celulitis, osteomielitis, artritis y neumonía.

1.4. RESPUESTA INMUNE

Una característica sobresaliente de la susceptibilidad natural a la infección por *H. influenzae* serogrupo b es la dependencia de la edad. La mayoría de las infecciones graves producidas por el serogrupo b afectan a niños menores de 4 años. El título de anticuerpos bactericidas anticapsulares varía con la edad de la misma manera que lo hace la actividad bactericida del suero. El recién nacido posee alrededor de 60- 70 ng/mL de anticuerpos anticapsulares contra *H. influenzae* serogrupo b; el nivel desciende rápidamente y se mantiene bajo entre los 5 y 12 meses, edad en la que se registra la máxima incidencia de infecciones graves. A partir del primer año de vida el nivel de anticuerpos asciende, de forma que a partir de los 2 años es ya superior al nivel neonatal y a los 4 años alcanza un título similar al del adulto.

Los anticuerpos anti-RPR promueven la fagocitosis dependiente del complemento y la bacteriólisis *in vitro*. La erradicación o destrucción del microorganismo por el huésped requiere la cooperación de componentes del suero (anticuerpos y complemento) y la fagocitosis. En el calostro y en la leche materna se ha demostrado la presencia casi constante de anticuerpos anticapsulares, predominantemente del tipo IgA, que serían transportados al tracto gastrointestinal del recién nacido.

Después de la infección natural causada por *H. influenzae* se han identificado diversas proteínas de membrana externa con capacidad inmunogénica. Es posible que dichos anticuerpos no fueran protectores en todos los niños, dado que se han observado infecciones recurrentes causadas por el mismo subtipo; sin embargo, dichos anticuerpos son protectores en modelos animales experimentales.

La respuesta inmune natural frente los antígenos capsulares de *H. influenzae* serogrupo b está relacionada con la edad; en niños mayores de 18 meses de vida se ha observado un aumento igual o superior a 4 veces, en comparación con sólo el 15 % en niños más jóvenes. En la mayoría de los casos aparecen asimismo anticuerpos del tipo IgA en la mucosa respiratoria alta

1.5. PATOGENIA

En modelos animales (monos y ratas) *H. influenzae* b causa bacteriemia y meningitis tras la inoculación por vía intranasal. La meningitis es el resultado de la diseminación por vía sanguínea. La patogenicidad incluye la capacidad para: a) colonizar la mucosa nasal; b) penetrar la mucosa y alcanzar la sangre; c) sobrevivir e incluso multiplicarse en ella, y d) causar inflamación en las meninges. La presencia del polisacárido capsular b (RPR) presenta una estrecha correlación con la virulencia en modelos animales.

La inoculación de cepas del serogrupo b en la nariz de animales recién nacidos da lugar a una infección local. El microorganismo es detectable en la sangre entre 12 y 24 h después de la inoculación intranasal en el animal. Esta bacteriemia primaria siembra todas las superficies serosas: peritoneo, pleura, pericardio y meninges. La colonización con los cinco tipos capsulares restantes o con cepas no capsuladas determina una bacteriemia transitoria de baja densidad, incluso utilizando inóculos elevados.

El primer acontecimiento en la secuencia de la acción invasiva de *H. influenzae* es la adquisición del microorganismo. En condiciones no epidémicas, hasta un máximo del 5 % de los niños son portadores de gérmenes del tipo b; sólo uno de cada 100 niños portadores desarrolla una infección grave. Tanto las cepas capsuladas como las no capsuladas pueden adherirse a las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Los factores que determinan que un niño se convierta en portador o enfermo son desconocidos. Los niños con infecciones graves causadas por el serogrupo b podrían ser portadores fecales de *E. coli* K100 con una frecuencia muy inferior a los controles sanos; dicha bacteria posee una cápsula inmunológicamente idéntica a la de *H. influenzae* serogrupo b.

1.6. CUADROS CLÍNICOS

La bacteria causa dos tipos de infecciones: *agudas*, y potencialmente graves, y *crónicas*, en las que parece desempeñar un papel secundario u oportunista. Entre las agudas se incluyen meningitis y otras infecciones septicémicas, como epiglotitis, celulitis, artritis, osteomielitis y neumonía; antes de la vacunación masiva frente a *H. influenzae* b, los microorganismos aislados en la mayoría de estas infecciones pertenecían al serogrupo b y al biotipo I aunque otros serogrupos pueden presentar un cuadro similar. Las cepas no capsuladas se asocian a menudo a casos de bronquitis crónica EPOC, sinusitis, conjuntivitis, otitis media y suelen aislarse en el tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística durante las crisis agudas de la enfermedad. En los adultos desempeña un importante papel en las reagudizaciones de la enfermedad pulmonar crónica.

Hay una relación entre el cuadro clínico producido por *H. influenzae* y la edad del paciente (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principales cuadros clínicos producidos por *Haemophilus influenzae* en relación con la edad del paciente.

Grupo de edad	Patología	Observaciones
Embarazadas	Fiebre puerperal	Cepas no capsuladas
Recién nacidos	Sepsis, neumonía	En general, cepas no capsuladas
Lactantes	Meningitis, sepsis, epiglotitis, neumonía, artritis, celulitis. Fallo vacunal.	La mayoría, cepas capsuladas
Niños	Otitis, sinusitis, conjuntivitis, fibrosis quística	La mayoría cepas no capsuladas
Adultos	Bronquitis crónica, neumonía, sepsis, meningitis	Cepas capsuladas y no capsuladas, a menudo causas predisponentes

1.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El LCR y la sangre son las muestras en las que con mayor frecuencia se aísla el serogrupo b y otros serogrupos. Es obligado transportarlas con rapidez al laboratorio y sembrarlas en medios de cultivo ricos en nutrientes como agar chocolate. Otras muestras en las que se puede aislar el microorganismo incluyen: líquido pleural, aspirado articular, pus y exudados de las vías respiratorias altas, conjuntival, ótico y, más raramente, vaginal. El examen microscópico del LCR es de gran importancia para el diagnóstico rápido de meningitis. Se puede intentar la detección precoz del antígeno RPR mediante el empleo de la técnica de aglutinación con partículas de látex o similar, sin olvidar la posibilidad de reacciones cruzadas.

La aglutinación en porta y la co-aglutinación son los métodos comerciales utilizados para determinar el grupo capsular; ambos pueden dar lugar a casos de falsos positivos y negativos por lo cual se han desarrollado métodos por PCR para el tipado molecular.

Entre los métodos de epidemiología molecular más usados para determinar la identidad epidemiológica de *H. influenzae* se encuentran el análisis de los patrones electroforéticos en campos pulsantes del ADN total cortado con enzimas de restricción (generalmente *Sma*I) (RFLP, según las iniciales en inglés).

1.8. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

La resistencia de *H. influenzae* a ampicilina se describió a mediados de los años 70; desde entonces se ha descrito resistencia a otros beta-lactámicos, cloramfenicol, tetraciclina, aminoglicósidos, co-trimoxazol, rifampicina y fluorquinolonas. Las tasas de resistencia pueden ser muy variables aunque en general las cepas capsuladas son más resistentes que las no capsuladas y las aisladas de procesos respiratorios crónicos más resistentes que las productoras de infecciones agudas. La resistencia a ampicilina se debe generalmente a la producción de betalactamasas del tipo TEM-1 plasmídica; otro mecanismo mucho más raro es la modificación de la afinidad de las proteínas fijadoras de penicilina. La resistencia múltiple se obtiene mediante la combinación de distintos tipos de resistencia tanto plasmídicos como cromosómicos en la misma cepa. En España, el mecanismo más común de la resistencia múltiple entre las cepas de *H. influenzae* tanto capsuladas como no capsuladas, es la presencia de plásmidos grandes conjugativos que transportan diferentes genes de resistencia.

La elección del tratamiento antibiótico apropiado debe basarse en el conocimiento de los patrones de sensibilidad del área geográfica obtenidos por métodos de referencia, generalmente microdilución y Epsilon test en presencia de cepas de referencia de sensibilidad conocida. Ello implica que todas las cepas deben someterse a pruebas de sensibilidad *in vitro* así como a pruebas rápidas de producción de betalactamasa sobre todo las cepas aisladas de procesos infecciosos graves, como meningitis y bacteriemia. Dados los niveles de resistencia a la ampicilina y otros antibióticos clásicos, una cefalosporina de tercera generación, como la cefotaxima o la ceftriaxona, debe ser el tratamiento de primera elección en infecciones graves. En España, *H. influenzae* presenta también niveles elevados de resistencia a la asociación trimetoprima-sulfametoxazol. La combinación de ampicilina y ácido clavulánico es eficaz en las cepas resistentes, productoras de betalactamasa, causantes de infecciones de las vías respiratorias altas (sinusitis y otitis).

La duración del tratamiento de la meningitis y otras infecciones graves es de 7 a 10 días. Las dosis de cefotaxima recomendada en el tratamiento de la meningitis es de 200 mg/kg/24 h (4 dosis) y de 100 mg/kg/24 h para la ceftriaxona (2 dosis).

2. QUINOLONAS

2.1 DESARROLLO HISTORICO DE LAS QUINOLONAS

El primer antecedente relacionado con este grupo se debe a Price (*Price J.R.*), que en 1949 obtuvo una molécula (ácido 1-metil-4-quinolon-3-carbóxico) que no presentaba actividad biológica, a la que denominó quinolona.

En los años siguientes se fueron sintetizando compuestos similares; la primera quinolona con actividad antibacteriana fue descubierta en 1962 por Leshner (*Leshner, 1962*), se trataba de un derivado obtenido por síntesis a partir del antipalúdico cloroquina, el ácido nalidíxico, útil por su actividad sobre algunas bacterias Gram negativas y por lograr concentraciones adecuadas en orina tras su administración oral para el tratamiento de infecciones urinarias.

En las primeras fases del desarrollo aparecieron más derivados que no diferían mucho del ácido nalidíxico en cuanto a su espectro de acción antibacteriana o farmacocinética: ácido oxolínico, cinoxacino, rosoxacino, entre otros (*Lumish, R. M. 1975*).

Diez años mas tarde de la publicación del ácido nalidíxico apareció el ácido pipemídico (*Shimizu, M., 1975*), con una mejor actividad, debido a su mayor capacidad de penetración en los tejidos y un mayor espectro activo que incluye *Pseudomonas spp.* La aparición de mutantes bacterianas resistentes durante el tratamiento y los efectos secundarios también eran menores. Estas primeras quinolonas, dada su principal indicación, se englobaron dentro de los llamados “antisépticos urinarios”.

El desarrollo de las quinolonas no sufre un nuevo impulso hasta el año 1978, cuando se lleva cabo la síntesis del norfloxacin (*Ito, A., 1980*). Esta molécula recogía las mejoras de sus predecesoras al combinar un anillo de piperacina en posición 7 del núcleo de quinolona (al igual que el ácido pipemídico), con un compuesto fluorado en posición 6. Pero aunque norfloxacin presentaba actividad frente a un amplio espectro que incluía Gram negativos y algunos Gram positivos, no era una molécula adecuada para el uso sistémico, al no alcanzar niveles séricos adecuados y penetrar mal en los tejidos. En los tres años siguientes se desarrollaron muchas quinolonas como pefloxacin, enoxacin, ciprofloxacina y ofloxacina, todas estas moléculas presentan un átomo de flúor en posición 6 y por ello recibieron el nombre genérico de fluoroquinolonas (*Albrecht, R., 1977*). Es el desarrollo del conocimiento de la relación estructura y la actividad de estas moléculas, el que permite un rápido avance después de casi 20 años transcurridos entre el desarrollo del ácido nalidíxico y del norfloxacin.

Con la introducción de un anillo ciclopropílico en posición 1 en el caso de la ciprofloxacina, la actividad bactericida mejoró no solo frente a Gram negativos, sino también frente a Gram positivos. Además se mejoraron las propiedades farmacocinéticas (penetración en tejidos y niveles alcanzados en suero), lo cual permitió su uso en el tratamiento de infecciones sistémicas. En 1986, con la comercialización de la ciprofloxacina, el desarrollo de las quinolonas parece ralentizarse.

Esparfloxacina, levofloxacina y grepafloxacina mejoraron su actividad frente a Gram positivos y anaerobios, pero su actividad frente a *Staphylococcus aureus* distaba de ser la ideal. Los retos de las nuevas quinolonas eran aumentar su actividad frente a Gram positivos en general y en particular frente a neumococos y estafilococos, anerobios, patógenos atípicos y microorganismos resistentes a ciprofloxacina. Esto se consiguió con moléculas como clinafloxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina y sitafloxacina. Pero muchas de estas moléculas debido a su toxicidad no podrán corroborar *in vivo* las expectativas que ofrecen los estudios de su actividad *in vitro*.

Actualmente se siguen desarrollando moléculas que puedan cubrir vacíos como los gram negativos no fermentadores, microorganismos resistentes a las antiguas quinolonas, que tengan mejores propiedades farmacocinéticas, que seleccionen resistencias con menor frecuencia y que presenten menos efectos secundarios.

2.2. ESTRUCTURA QUIMICA

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos que presentan como unidad estructural básica un anillo heteroaromático. Este está compuesto por dos anillos, uno de tipo piridona y el otro aromático, bencénico o de otro tipo.

Para que la molécula presente actividad bactericida, la piridona debe presentar un nitrógeno en posición 1, un carboxilo en posición 3 y un grupo carbonilo en posición 4. Estos dos últimos radicales son necesarios para la interacción con el ADN bacteriano. El radical en posición 2 debe ser siempre un hidrógeno debido a su proximidad al lugar de interacción. Y por último entre las posiciones 2 y 3 debe existir un doble enlace.

Según las distintas incorporaciones de mas átomos de nitrógeno se clasifican en cinco grupos diferentes:

- quinolonas (nitrógeno en posición 1)
- cinolonas (nitrógeno en posición 1 y 2)
- naftiridinas (nitrógeno en posición 1 y 8)
- piridopirimidinas (nitrógeno en posición 1,6 y 8)
- quinolicinas (en el anillo de piridona se sustituye el carbono insaturado en posición 5 por un nitrógeno).

Las 2 piridonas son quinolonas en las que el nitrógeno en posición 1 es desplazado a la posición 5 ocupada por un carbono insaturado en el anillo.

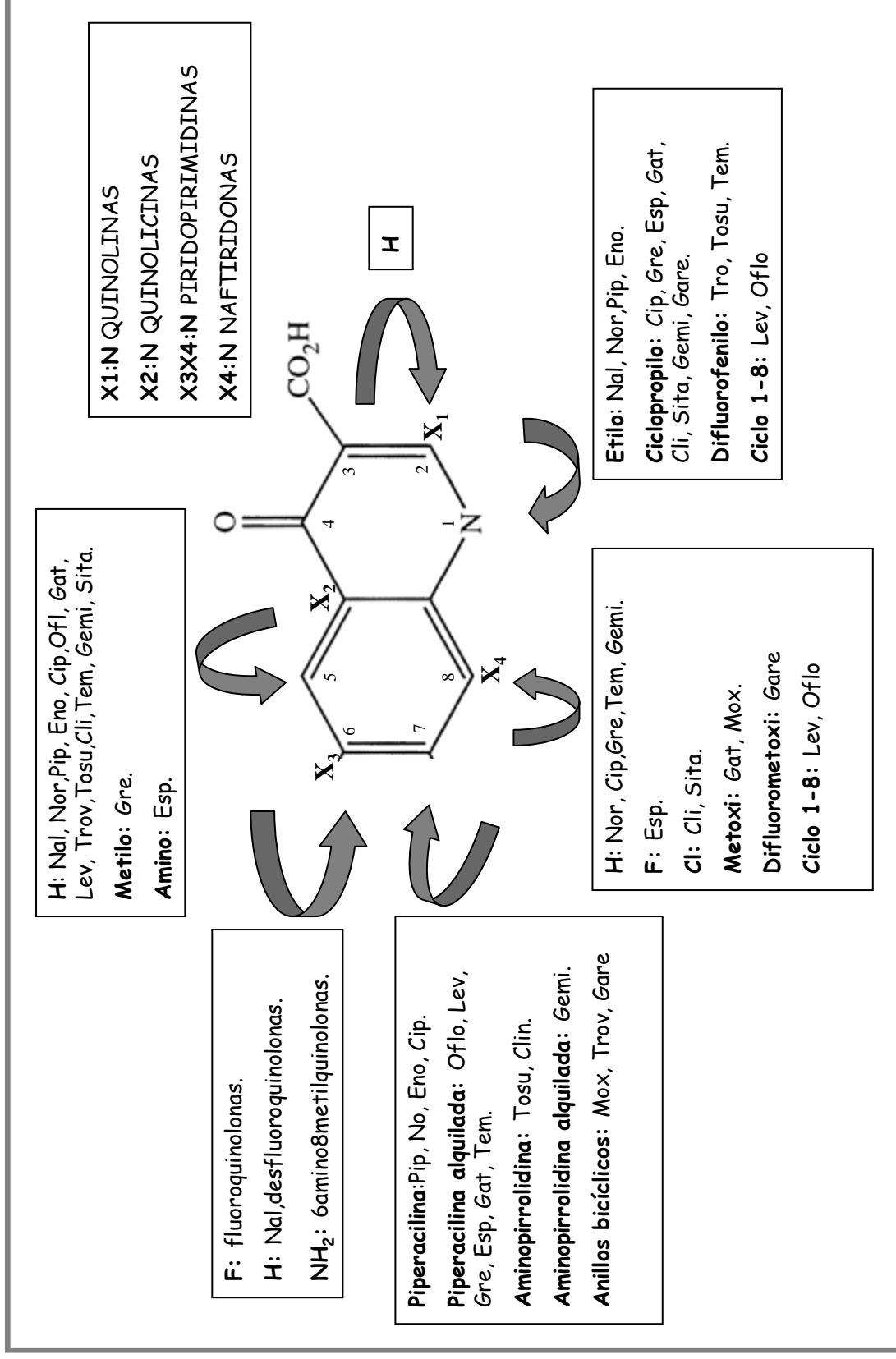


Figura 1. Núcleo elemental de las quinolonas y modificaciones estructurales. Cip, ciprofloxacina; Cli, clinafloxacina; Eno, enofloxacina; Gati, gatifloxacina; Gare, garenoxacina; Gre, grepafloxacina; Lev, levofloxacina; Mox, moxifloxacina; Nal, ácido nalidíxico; Nor, norfloxaacina; Oflo, ofloxacina; Pip, ácido pipemídico; Tem, temafloxacina; Tosu, tosufloxacina; Trov, trovafloxacina; Sita, sitafloxacina

2.3. MODIFICACIONES EN LA ESTRUCTURA BÁSICA DE LAS QUINOLONAS.

2.3.1. Modificaciones en la posición 1

En esta posición necesariamente debe haber un nitrógeno que puede presentar distintos radicales. Los primeros compuestos (ácido nalidíxico, norfloxacin, enoxacin) presentaban un radical etilo, cuando se añadió un grupo apolar mas voluminoso se aumentó la actividad. El radical ciclopropilo está presente en numerosas fluoroquinolonas y es el sustituyente que confiere más potencia.

En el caso de levofloxacin y ofloxacin, un tercer anillo une el nitrógeno 1 y carbono 8 y confiere mayor actividad frente a Gram positivos. Trovafloxacin posee un grupo difluorofenilo que aumenta la actividad frente a Gram positivos y anaerobios, pero es responsable de la toxicidad hepática de este compuesto.

2.3.2. Modificaciones en la posición 2

Esta posición está muy próxima al lugar de unión al ADN, por lo que cualquier radical voluminoso impediría la unión del carboxilo en posición tres con las bases del ADN. El mejor sustituyente es por lo tanto un hidrógeno. La sustitución de este carbono 2 por un nitrógeno da lugar a las cinolonas, que son menos activas que la correspondiente quinolona.

2.3.3. Modificaciones en la posición 5

Un gran número de cambios se han concentrado en esta posición con el fin de aumentar la actividad frente a Gram positivos. Los sustituyentes en esta posición modifican el plano de la estructura de la molécula, lo cual tiene consecuencias en las interacciones en la formación del complejo ADN-enzima-quinolona.

Se ha demostrado que sustituyentes poco voluminosos como el amino, hidroxilo o metilo, aumentan la actividad frente a Gram positivos y *Toxoplasma gondii*, pero sustituyentes voluminosos reducen la actividad al interferir con el lugar de unión al enzima en posición 3-4 (Domagala, J. M., 1994).

La presencia de un grupo metilo (como grepafloxacin) potencia la actividad frente a Gram positivos, pero no frente a Gram negativos (Peterson, L. R., 2001).

Un grupo amino en esta posición aumenta la actividad frente a Gram positivos y Gram negativos, se cree que debido a que permite una mejor penetración en la célula

(Domagala, J. M., 1986). De todas maneras se ha visto que las sustituciones en esta posición que generan un cambio de actividad *in vitro* no siempre se corresponden con el mismo cambio de actividad *in vivo*, como es el caso del esparfloxacin.

Se ha observado que al modificar esta posición con átomos halogenados se producen grandes variaciones en la actividad. La presencia de flúor provoca una menor actividad frente a *Pseudomonas*, mientras que el cloro o bromo aumenta la actividad frente a todos los microorganismos (Miyamoto, T., 1990).

2.3.4. Modificaciones en la posición 6

La incorporación de un fluorilo en esta posición supuso el mayor avance en la actividad de las llamadas fluoroquinolonas respecto a las quinolonas precedentes. Se cree que el átomo de flúor aumenta la actividad de estas moléculas porque facilita su penetración a través de la membrana bacteriana, más que por modificar la interacción con la enzima.

Actualmente están en desarrollo un nuevo grupo de quinolonas, que tienen desplazado el flúor en posición 6 y en su lugar presentan un hidrógeno, son las llamadas 6desfluoroquinolonas. Estudios *in vitro* de estos compuesto demuestran que estas moléculas no mejoran a sus predecesoras en la actividad frente a Gram negativos, pero sí frente a Gram positivos como *S. aureus* resistentes a meticilina (Barry, A. L., 2001). Garenoxacina (BMS-284756) muestra un amplio espectro que cubre *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), *S. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacina, el 60% de *Enterococcus faecium* (incluidos resistentes a vancomicina) y entre el 90% y 100% de Gram negativos no fermentadores (Fung-Tomc, J. C., 2000). Al estudiar la actividad de este compuesto frente a neumococo se observó que era similar a la de la gemifloxacina y diez veces mayor que la de la ciprofloxacina y levofloxacina (Pankuch, G. A., 2002). En cuanto a su actividad frente a cepas de *H. influenzae* con un mecanismo de resistencia caracterizado, se observó que su actividad era similar a la de la ciprofloxacina e inferior que la de la clinafloxacina (Pérez-Vázquez, M., 2003).

Otro novedoso grupo de compuestos, los que presentan un grupo amino en esta posición, las 6-amino 8metil quinolonas, presentan una buena actividad frente a cocos gram positivos.

2.3.5. Modificaciones en la posición 7

En esta posición las modificaciones generan los mayores cambios en la actividad del antibiótico, ya que esta posición interacciona directamente con la enzima.

Los mejores sustituyentes en esta posición son anillos heterocíclicos de 5 a 6 átomos que contienen un nitrógeno como las aminopirrolidinas y las piperacinas. La primera evidencia de este hecho fue la presencia de un anillo piperacina en el ácido nalidíxico, en el que se observó un aumento de la actividad frente a Gram negativos, por el contrario la aminopirrolidina en esta posición potencia la actividad frente a Gram positivos. La alquilación de ambos radicales confiere una mejor actividad frente a Gram positivos, y aumenta la vida media de la molécula y la penetración tisular al aumentar la lipofilia (Tillotson, G. S., 1996).

El anillo piperacina está presente en la norfloxacin, enofloxacin y ciprofloxacina; la grepafloxacin tiene un grupo alquilo en posición 3, la ofloxacin y levafloxacin lo presentan en posición 4 y la esparfloxacina tiene dos grupos alquilo, en posiciones 3 y 5.

El anillo pirrolidina está presente en la tosuflozacina, clinafloxacina y sitafloxacina; la gatifloxacina tiene además un grupo metilo en posición 4.

La moxifloxacina presenta un anillo bicíclico, en el que a la pirrolidina se le fusiona un segundo anillo formando un anillo diazabicíclico que presenta mayor actividad frente a Gram positivos incluyendo *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina y SARM. En el caso de la trovafloxacina, el radical en posición 7 es un azabicíclico, la adición de un grupo metilo en posición 2 o en el amino 6 del anillo azabiciclohexano de la trovafloxacina aumenta su actividad frente a *Toxoplasma gondii* (Peterson, L. R., 2001).

La presencia de radicales voluminosos parece proteger a las moléculas de los sistemas de transporte activo, esto puede explicar que la moxifloxacina no sea un buen sustrato de los sistemas de bombeo susceptibles de inhibición con reserpina.

2.3.6. Modificaciones en posición 8

En esta posición las modificaciones afectan a la configuración de la molécula y por lo tanto a la interacción con el enzima o con el ADN. Las primeras quinolonas tenían en esta posición un hidrógeno, en seguida se vió que los sustituyentes mas favorables en esta posición eran los halógenos, como flúor y cloro, pero se asocian a fototoxicidad y

por ello no han seguido desarrollándose. La presencia de un cloro (clinafloxacina y sitafloxacina) o de flúor (esparfloxacina) aumenta la actividad frente a cocos Gram positivos y anaerobios. En un principio se pensaba que la halogenación en posición 8 favorecía la penetración celular, pero trabajos más recientes sugieren que el aumento de actividad es debida a un mayor efecto sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV (Akasaka, T., 1998).

La presencia de un radical metoxi (moxifloxacina y gatifloxacina) o metilo, además de no inducir los efectos adversos de los sustituyentes halogenados, presentan buena actividad frente a anaerobios y cocos Gram positivos, incluso para aquellas bacterias resistentes a las quinolonas precedentes.

Las sustituciones en esta posición parecen ser determinantes a la hora de definir la enzima diana de la quinolona en cocos Gram positivos. En *S. pneumoniae* una única mutación en *parC* eleva la CMI de ciprofloxacina a niveles superiores a los terapéuticos. Parece que la topoisomerasa IV es la diana principal cuando en la posición 8 existe un hidrogeno. Sin embargo la presencia de un grupo halógeno en esta posición convierte a la girasa en la diana principal de quinolonas como la esparfloxacina. La sustitución del carbono 8 por un nitrógeno, al igual que la presencia de un grupo metil o metoxi, convierten a las moléculas en más efectivas frente a ambas enzimas. De este modo incluso microorganismos que presentan mutaciones en *gyrA* y *parC* siguen siendo sensibles a estos compuestos y en microorganismos no mutantes se previene la aparición de mutantes resistentes.

2.4. CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS

Existen varias clasificaciones propuestas para esta familia de fármacos: la química, la biológica y la de generaciones. Nos referiremos a esta última por tratarse de la más usada en medicina. Por analogía a otras familias de antibióticos se habla de generaciones de quinolonas: la primera abarca desde el ácido nalidíxico hasta el ácido pipemídico y la segunda a partir del norfloxacina, aunque se le podría considerar a ésta como la única quinolona de segunda generación y a las restantes como pertenecientes a la de tercera, pero no hay acuerdo unánime al respecto. Otros sugieren hablar de cuatro etapas:

- 1) El descubrimiento del ácido nalidíxico
- 2) La aparición de compuestos más estables como cinoxacino y ácido pipemídico, pero con espectro similar.

- 3) Las quinolonas con un átomo de flúor en la posición 6 y un grupo piperazina en la posición 7, como norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacina, ofloxacina y lomefloxacina, con amplio espectro de actividad
- 4) Las nuevas quinolonas fluoradas, semejantes a las anteriores, pero que expanden su espectro de actividad sobre Gram positivos, anaerobios e incluso micobacterias.

2.5. ESPECTRO DE ACTIVIDAD

En la **Tabla 3** puede observarse una recopilación sobre la actividad antibacteriana de las quinolonas más usadas frecuentemente en nuestro país.

Tabla 3. Actividad *in vitro* de principales quinolonas usadas en España frente a varios de los patógenos más importantes en la práctica clínica

Patógenos	CMI ₉₀ (µg/ml)					
	Acido nalidíxico	Norfloxacina	Ciprofloxacina	Ofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
<i>E. coli</i>	4	0,12	0,06	0,12	0,12	0,12
<i>K. pneumoniae</i>	8	0,25	0,12	0,25	0,12	0,5
P. mirabilis	8	0,25	0,06	0,25	0,12	0,12
<i>P. vulgaris</i>	8	0,12	0,06	0,25	0,12	0,25
<i>E. cloacae</i>	8	0,25	0,12	0,25	0,25	0,25
<i>C. freundii</i>	8	0,5	0,12	0,5	0,25	0,5
<i>M. morgani</i>	8	0,12	0,06	0,25	0,25	0,25
<i>S. marcescens</i>	>16	2	0,5	1	1	2
<i>P. aeruginosa</i>	>16	4	2	8	4	16
<i>H. influenzae</i>	2	0,06	≤ 0,06	0,12	0,06	0,06
<i>C. jejuni</i>	8	2	0,5	2	2	2
<i>M. catarrhalis</i>	4	0,5	0,12	0,25	0,12	0,12
<i>N. gonorrhoeae</i>	2	0,06	0,01	0,06	0,06	0,06
<i>N. meningitidis</i>	1	0,03	0,01	0,03	0,03	0,06
<i>S. aureus</i>	>16	2	1	0,5	0,5	0,12
<i>S. pneumoniae</i>	>16	16	2	2	1	0,25
<i>E. faecalis</i>	>16	8	4	4	2	2
<i>C. trachomatis</i>	>16	16	2	1	0,5	0,25
<i>C. pneumoniae</i>	-	-	1	1	0,5	0,25
<i>M. pneumoniae</i>	-	8	2	1	1	0,25
<i>Legionella</i>	1	0,5	0,12	0,12	0,06	0,06
B. fragilis	>16	>16	16	8	8	1

Las fluoroquinolonas son claramente más activas frente a bacterias gram negativas que las primeras quinolonas como el ácido nalidíxico o el ácido pipemídico. Además, presentan actividad frente a *P. aeruginosa* y frente a bacterias gram positivas. Frente a gram negativos, la más potente en general es la ciprofloxacina. La levofloxacina y sobre todo la moxifloxacina tienen claramente aumentada su actividad frente a gram positivos (frente a neumococo la más activa es moxifloxacina). La moxifloxacina es además activa frente a anaerobios, a lo cuales otras quinolonas tenían limitada su actividad. Existen fluoroquinolonas activas frente a algunas micobacterias, entre las que se incluye *Mycobacterium tuberculosis*.

2.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Para entender el mecanismo de acción de las quinolonas es necesario tener en cuenta ciertas consideraciones acerca de la estructura del ADN. El ADN bacteriano es una molécula, que para acomodarse al interior de la célula, presenta una estructura condensada mediante superenrollamientos. Cuando la torsión es en el sentido de la hélice del ADN genera un superenrollamiento positivo, si es en el sentido contrario, el superenrollamiento es negativo. El ADN bacteriano está superenrollado negativamente con una frecuencia aproximada de 5 superenrollamientos negativos por cada 1000pb (*Rawl JD, 1989*). Los superenrollamientos negativos generan una tensión torsional que tiende a liberarse mediante la reconversión de esta energía en energía mecánica que rompe los puentes de unión entre nucleótidos de las cadenas complementarias del ADN, dando lugar a desnaturalizaciones locales de la hélice de ADN.

La presencia de ADN de cadena simple es necesario para iniciar un gran número de procesos bacterianos, como la replicación, la transcripción o la reparación del ADN. Durante el proceso de replicación y transcripción del ADN se dan cambios topológicos que generan superenrollamientos positivos que deben ser eliminados. Las enzimas encargadas de la eliminación de los mismos son las girasas. Además estas enzimas introducen superenrollamientos negativos en las hebras hijas que mantienen la estructura y el empaquetamiento del ADN. La topoisomerasa IV separa a las dos hebras hijas en el proceso de decatenación. Estas dos enzimas son las dianas de las quinolonas y pertenecen al tipo II de las topoisomerasas.

Tabla 4. Características de las topoisomerasas bacterianas en *E. coli*.

	Tipo I		Tipo II	
	Topo I	Topo III	Girasa	Topo IV
Estructura	Monómero	Monómero	heterotetrámero	heterotetrámero
Peso molecular (kDa)	105	74	GyrA (97) GyrB (90)	ParC (75) ParE (70)
Gen	<i>topA</i>	<i>topB</i>	<i>gyrA, gyrB</i>	<i>parC, parE</i>
Rotura en el ADN	Hebra simple	Hebra simple	Doble hebra	Doble hebra
Relajación	Si	No	Si	Si
Decatenación	No	Si	Si	Si
Superenrollamiento	No	No	Si	Si
Función:				
Replicación	Si	Si	Si	Si
Transcripción	Si	Si	Si	Si
Segregación cromosoma	No	Si	Si	Si

El ADN es una molécula circular cerrada, y el número de veces que una hebra cruza a la otra solo se puede cambiar mediante la ruptura y el cierre covalente posterior. Las moléculas que modifican la topología del ADN son las llamadas topoisomerasas. Las de tipo II rompen transitoriamente a doble hélice de ADN y pasan a través de la muesca otro segmento de ADN de doble cadena, variando en dos el número de sobrecruzamientos topológicos. Las topoisomerasas de tipo I, sólo rompen una de las hebras de la doble hélice, haciendo pasar la otra a través de la mella, cambiando el número de sobrecruzamientos en uno.

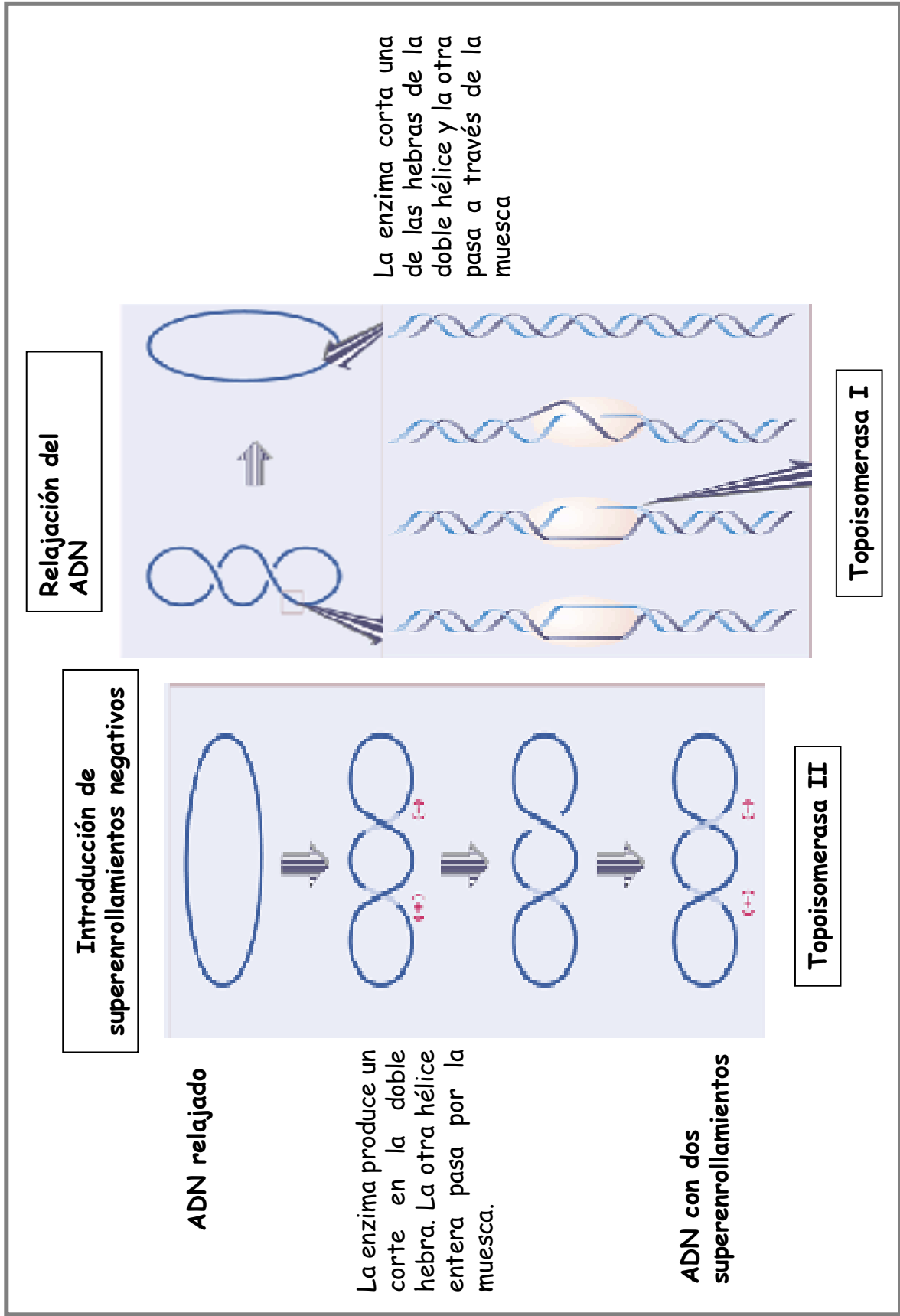


Figura 2. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo I y II. Adaptado de *Lewin B. Genes IV*

2.7. DNA GIRASA O TOPOISOMERASA II.

Se trata de un heterotetrámero con dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. La región carboxilo terminal de las subunidades A se une al ADN envolviendo una región de 130 pb (Schmitz, F. J., 2002), las subunidades B funcionan como ATPasas al hidrolizar el ATP en la región N terminal. Las dos subunidades forman un hueco de 5 nm de diámetro que protege 15-35 pb del ADN que es fragmentado con un desfase de 4 pb entre las hebras complementarias.

En cuanto a lo que se refiere al mecanismo de acción de las topoisomerasas de tipo II (**Figura 3**), (1) al comenzar la reacción los dominios ATPasa se encuentran separados, (2) el ADN de doble cadena entra en el complejo proteico a través de la cavidad formada por las subunidades B y se une a los sitios activos de la subunidad A formando el complejo enzima-ADN. En este momento la unión de ATP (3) a los dominios ATPasa estabiliza el complejo y permite la captura del segundo ADN (que estará en la misma cadena, dando lugar a un superenrollamiento). Al mismo tiempo, la enzima produce una ruptura transitoria en el primer fragmento de ADN el cual se mantiene unido a las subunidades A, a través de dicha ruptura se produce el transporte de la segunda hebra hacia la cavidad central entre las subunidades A (4). Una vez que la segunda hebra ha pasado, la primera es religada y la segunda sale a través de la apertura transitoria que se forma entre las subunidades A (5). La hidrólisis del ATP es necesaria para que la enzima adquiera de nuevo su conformación original.

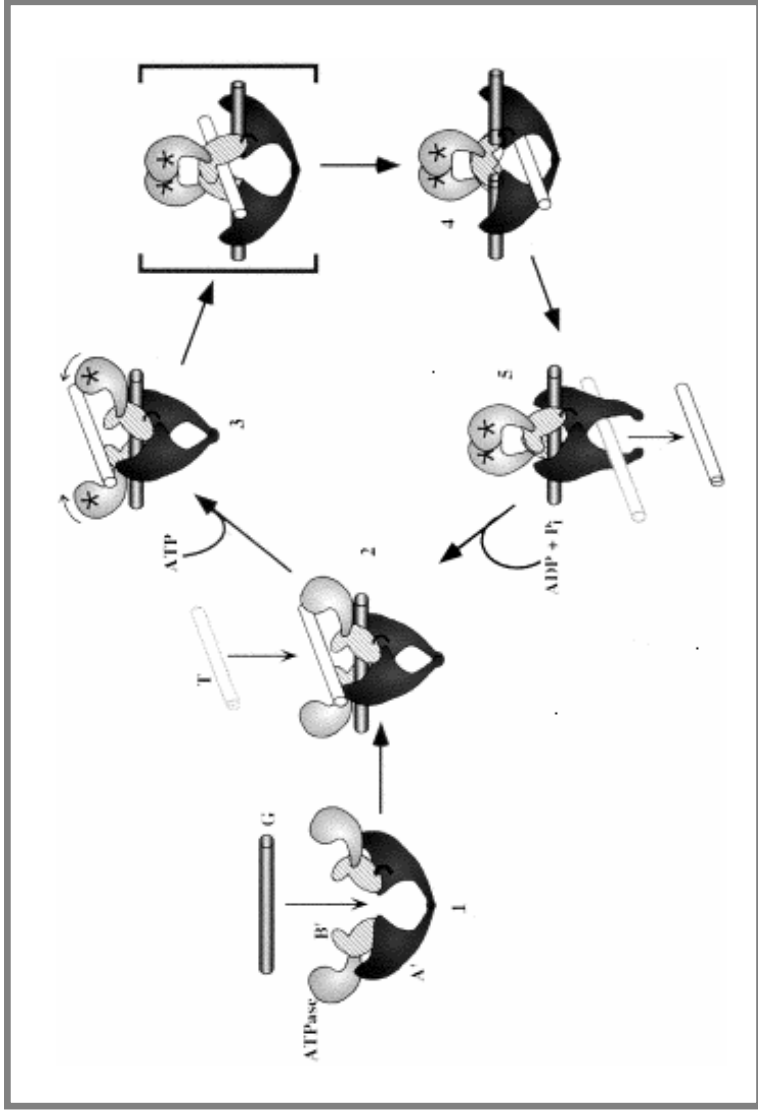


Figura 3. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II. Adaptado de *Wigley, 1996*.

La función celular de la girasa es introducir superenrollamientos negativos que mantengan el grado de empaquetamiento del ADN, esto hace que sus funciones en la célula tengan que ver con los procesos celulares de replicación y transcripción, recombinación y reparación del ADN y empaquetamiento del ADN y decatenación de las cadenas hijas resultantes de la replicación.

2.8. TOPOISOMERASA IV

Estructuralmente es muy similar a la girasa, se trata de un heterotetrámero con dos subunidades ParC y dos ParE codificadas por los genes *parC* y *parE*. En *E. coli* la homología de *gyrA* con *parC* es del 36%, mientras que la de *gyrB* con *parE* es del 40% (Kato, J., 1990). Esta enzima cataliza la relajación de los supergiros, pero a diferencia de la girasa no los genera. También requiere del aporte de ATP para su actividad. La topoisomerasa IV no envuelve dentro de su estructura el ADN y este hecho es el origen de las diferencias funcionales entre ambas enzimas. La función más importante de la topoisomerasa IV es la de separar los cromosomas hijos.

2.9. MECANISMO DE INTERACCIÓN QUINOLONA-TOPOISOMERASA

Como ya se ha comentado, todas las topoisomerasas producen una rotura transitoria en el ADN, uniéndose covalentemente mediante enlace fosfotirosina al extremo 5'-fosfato generado en la rotura. Estos complejos de escisión enzima-ADN son intermedios catalíticos y están presentes a concentraciones bajas, por lo que son bien tolerados por la célula. Las quinolonas convierten a las topoisomerasas en toxinas fisiológicas atrapando el complejo topoisomerasa-ADN y convirtiéndolo en un complejo ternario reversible topoisomerasa-quinolona-ADN. El mecanismo exacto de interacción de las quinolonas con el citado complejo no está totalmente establecido y hay distintas teorías que intentan explicarlo.

Shen (Shen, L. L., 2001) propone un modelo de unión cooperativa: las quinolonas interactúan exclusivamente con el ADN (de cadena simple) a través de los radicales carboxilo 3 y oxo 4 y se unirían cuatro moléculas en el bolsillo generado en la unión ADN-enzima. Esta unión cooperativa se daría entre los anillos aromáticos y entre los sustituyentes del N1. Los radicales presente en el carbono 7 interactuarían con la subunidad B del enzima. En este modelo hay por lo tanto tres dominios funcionales en la quinolona.

Cerdergen (*Palu, G., 1992*) establece un modelo en el que la diana de las quinolonas es el ADN de doble hebra. Son los sustituyentes en R7 y R1 los que determinan la naturaleza de las interacciones hidrofóbicas que estabilizan al complejo al intercalarse en los surcos del ADN. En este modelo el magnesio permite la interacción electrostática entre la quinolona y el ADN, los puntos de unión de la quinolona con el ADN son el carboxilo 3 y el oxa 4. Además en este modelo se incluye la interacción electrostática de 1 residuo serina (GyrA) con el átomo de flúor en R6 y del aspártico con los grupos amino de piperazilina en R7 (*Llorente, B., 1996*).

2.10. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ADN Y EFECTO BACTERICIDA.

Las quinolonas ejercen un efecto bacteriostático al formar un complejo ternario topoisomerasa-quinolona-ADN que es reversible. En este momento la horquilla de replicación se detiene y se paraliza la síntesis de ADN. El hecho de que este efecto sea reversible sugiere que para que se produzca la muerte celular debe producirse un acontecimiento posterior (*Deitz, W. H., 1966*).

Parece que la inhibición de la replicación no es la causa de muerte celular, ésta ocurre cuando el ADN escindido se libera del complejo ternario. Es posible que las quinolonas ejerzan su efecto letal no por anular la actividad de las topoisomerasas, sino por transformarlas en agentes lesivos para el ADN.

2.11. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS

Las quinolonas son potentes inductores de la respuesta SOS, sistema de reparación del ADN. Este sistema mantiene la viabilidad celular a costa de permitir errores en la replicación del ADN. Tres proteínas están implicadas en el proceso de reparación: RecA, LexA y RecBCD. Es el ADN de cadena simple el que desencadena la expresión de RecA, proteasa que actúa sobre el represor LexA. Una vez se ha activado el operón se expresa RecBCD, que precisa de un extremo de ADN de cadena doble. La formación del complejo ADN-enzima-quinolona ejerce los dos requisitos para generar una respuesta SOS: se genera un extremo de ADN de doble cadena que se une a RecBCD y además cadenas de oligonucleótidos que inducen la expresión de RecA.

Este sistema está implicado en la reparación de las lesiones generadas por las quinolonas en el ADN.

2.12. TOPOISOMERASAS COMO DIANAS ENZIMÁTICAS DE LAS QUINOLONAS

Todas las quinolonas presentan actividad frente a la topoisomerasa II y IV, aunque difieren en la actividad relativa frente a ambas enzimas. Aunque las topoisomerasas son enzimas altamente conservados en la evolución, pequeñas diferencias en sus secuencias en distintas bacterias alteran la afinidad de una quinolona por una topoisomerasa, cambiando así su diana principal.

En los primeros estudios se vió que la diana principal en *E. coli* era la ADN girasa, y mutaciones en *gyrA* y *gyrB* conferían resistencia (Hane, M. W. and T. H. Wood, 1969). Para *S. aureus* la primera diana era la topoisomerasa IV. El patrón descrito en *E. coli* parece ser común a todos los Gram negativos, cuya diana principal es la ADN girasa, mientras en Gram positivos la diana principal es la topoisomerasa IV.

2.13. MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

2.13.1. MODIFICACIÓN DE LAS TOPOISOMERASAS

La resistencia a quinolonas se produce debido a modificaciones en la secuencia de aminoácidos en ciertas regiones de las topoisomerasas, denominadas regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (“*Quinolone Resistance Determining Regions*” o QRDRs).

Los aminoácidos de la QRDR están en la superficie de la topoisomerasa cargada positivamente donde se une el ADN. Las mutaciones a este nivel alteran el lugar de interacción del ADN con la girasa, afectando a la afinidad de las quinolonas por el complejo ADN-enzima.

El nivel de resistencia dependerá de si la mutación se produce en una diana primaria o secundaria, generalmente el proceso de mutación es secuencial, primero se afecta la diana primaria y luego la secundaria

2.13.1.1. Modificaciones en la topoisomerasa II

En *E. coli* la QRDR de la subunidad A de la topoisomerasa II se encuentra entre los aminoácidos 67 y 106, cerca de la región de rotura-reunión de esta proteína y de la tirosina activa (Tyr-122). Las posiciones que se afectan con más frecuencia son Ser84 y Asp87. Otras mutaciones que determinan resistencia en otros microorganismos son:

Ala70 a Thr en *C. jejuni*, Ser84 a Tyr y Asp88 a Asn en *H. influenzae*, Ala88 a Val y Asp81 a Asn en *H. pylori*.

En gram positivos, las mutaciones en la topoisomerasa II en las posiciones equivalentes, Ser83 y Asp87 se observan cuando hay una mutación previa en la topoisomerasa IV. Las posiciones que se suelen modificar en gram positivos son: Ser84 a Leu o Tyr, Ser85 a Pro y Glu88 a Lys en *S. aureus*, Ser81 a Phe o Tyr y Glu85 a Lys o Gln en *S. pneumoniae*, Ser83 a Arg o Ile o Asn y Glu87 a Lys o Gly en *Enterococcus* spp.

Las mutaciones en la subunidad B son menos frecuentes, en *E. coli* se han descrito mutaciones asociadas a la resistencia en las posiciones Asp426 y Lys447.

2.13.1.2. Modificaciones en la topoisomerasa IV.

Las mutaciones en la topoisomerasa IV en gram negativos no confieren por sí mismas resistencia a quinolonas. Las mutaciones en ParC y ParE aumentan la resistencia cuando previamente los genes de la ADN girasa han mutado. En *E. coli*, las mutaciones se producen en la Ser80 y Glu84, en otros microorganismos como *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* las mutaciones se producen en las posiciones equivalentes a las anteriores. Otras mutaciones menos frecuentes descritas son Gly78 a Asp (*E. coli*), Gly85 a Cys, Asp86 a Asn, Glu91 a Lys o Gly y Arg116 a Leu (*N. gonorrhoeae*).

En gram positivos la diana primaria es ParC, las mutaciones más repetidamente descritas en *S. aureus* son: Ser80 a Phe o Tyr, Glu84 a Lys, Leu o Val y Ala116 a Glu o Pro. Las mutaciones en ParE son menos frecuentes y algunas de las descritas son Asp 432 a Asn y Asn470 a Asp en *S. aureus*.

2.13.2. PERMEABILIDAD DISMINUIDA

El papel fundamental que ejercen los canales de las porinas en la difusión de las quinolonas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias gram negativas quedó respaldado por la observación de que numerosos mutantes Mar ("*multiple antibiotic resistant*") que mostraban resistencias a estos agentes tenían en común la reducción del número de OmpF, la principal y mayor proteína de las porinas de la membrana externa de *E. coli*. Ello sugiere que las quinolonas hidrofílicas deben entrar en la célula bacteriana, al menos en parte, a través del canal de la porina OmpF.

Estas cepas mutantes *Mar* de *E. coli* expresan resistencias codificadas en genes cromosómicos frente a una gran variedad de antibióticos hidrofóbicos e hidrofílicos estructuralmente no relacionados. Entre los cambios que presentan estos mutantes *Mar* en la membrana externa destaca la importante reducción de la porina OmpF. Estas observaciones implican que la reducción de OmpF requiere mutaciones en la región génica *marA*, es decir, que mutaciones en el locus *marA* confieren resistencia a varios grupos de antibióticos, entre ellos las quinolonas, por un mecanismo que reduce la permeabilidad al disminuir la expresión de la OmpF. Las mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren bajos grados de resistencia a las quinolonas (aumento de 2 a 4 diluciones log₂ de la CMI) y producen habitualmente resistencias cruzadas con otros antibióticos estructuralmente no relacionados.

2.13.3. SISTEMAS DE BOMBEO ACTIVO

Las quinolonas son sustratos de ciertos transportadores que actúan extrayendo el fármaco desde el medio intracelular al extracelular e impide así la acumulación. El sistema de expulsión se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y cataliza un proceso dependiente de energía ligado a un gradiente de protones. En *E. coli* este sistema de transporte, denominado AcrAB, es una bomba de flujo multifármaco que extrae de la célula una amplia variedad de antibióticos, incluidas las quinolonas y otras sustancias.

En las bacterias grampositivas se han identificado bombas de flujo en *Bacillus subtilis* (*Bmr*). Se ha comprobado que un aumento en la expresión del gen *bmr* en este microorganismo genera resistencias elevadas a diversos fármacos, incluidas las quinolonas. Este transporte puede revertirse con reserpina, que se comporta como un inhibidor del transportador *Bmr*. En cuanto a *S. aureus*, algunas de las resistencias pueden asociarse a un aumento de la transcripción del gen *norA*. El gen *norA* codifica las proteínas de membrana participantes en los procesos de expulsión, que pueden dar lugar a resistencias en *S. aureus* y también en *E. coli*. Destaca, pues, que el grado de expresión de este gen determina la sensibilidad tanto de bacterias grampositivas como gramnegativas. El efecto de la expresión del gen *norA* sobre la actividad de las quinolonas depende de su afinidad por el transportador *NorA*, que se manifiesta fundamentalmente para las fluoroquinolonas hidrofílicas y confiere bajo grado de resistencia .

En fecha reciente también se ha descrito un mecanismo de expulsión como causa de bajos grados de resistencia a las quinolonas en *S. pneumoniae*. A la bomba causante de esta acción se la ha denominado bomba PmrA (del inglés "*pneumococcal multidrug resistance protein*"). Se trata también de una proteína asociada a la membrana que se inhibe con reserpina, aunque las bases genéticas de este mecanismo no se conocen.

Se han descrito otros transportadores similares que afectan a la sensibilidad a las quinolonas en otras especies bacterianas, como por ejemplo el gen *mexABoprK* de *P. aeruginosa* que proporciona resistencia a la ciprofloxacina y al ácido nalidíxico.

En resumen, la expresión de los transportadores de expulsión puede determinar la sensibilidad antimicrobiana y está reconocida como causa de resistencia de bajo grado a las quinolonas. Además, algunas quinolonas presentan una baja afinidad por estos transportadores, lo que contribuye a aumentar su potencia.

2.13.4. RESISTENCIA MEDIADA POR PLÁSMIDOS

Recientemente se ha descrito un plásmido en *Klebsiella pneumoniae*, que confiere multirresistencia a aztreonam, cloramfenicol, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, aminoglicósidos, trimetoprim y quinolonas (pMG252). Este plásmido solo confiere resistencia en cepas deficientes en porinas, mientras que en cepas silvestres apenas modifica la sensibilidad a quinolonas. Recientemente se ha purificado el gen *qnr* y por su estructura es un pentapéptido homólogo al de una proteína que protege la ADN girasa de la acción de inhibidores de la replicación, hay autores que sugieren que este gen podría actuar de forma similar. Hay estudios que demuestran que la prevalencia de este gen es muy escasa (Jacoby, G. A., 2003, Wang, M., 2004).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La resistencia a antibióticos es considerada de manera unánime un problema clínico, microbiológico y de salud pública prioritario según la mayoría de las Agencias Internacionales (“*Organización Mundial de la Salud*” OMS, CDC) y, también lo es y de manera muy notable, en España (*Baquero, F., 1996*). Los resultados obtenidos de la investigación de los mecanismos de resistencia en un solo microorganismo son, en su mayor parte, extrapolables y generalizables a otros.

Como es sabido, *Haemophilus* forma parte de la flora respiratoria normal de la especie humana y es una bacteria naturalmente transformable, lo cual facilita enormemente la incorporación de la información genética necesaria para la adquisición de resistencia a diversos grupos de antibióticos, a veces en bloque (*Campos, J., 1989*), sobre todo en presencia de una fuerte presión selectiva en la comunidad, como es el caso bien conocido de España que se encuentra entre los países con mayor consumo de antibióticos del mundo. Una de las características más sobresalientes y preocupantes de las cepas españolas de esta bacteria es la frecuente adquisición y diseminación de resistencia adquirida a múltiples antibióticos bien aisladamente o en grupo, tanto mediante plásmidos conjugativos (ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, estreptomicina, sulfas) como mutaciones cromosómicas (betalactámicos, trimetoprima, ciprofloxacina). Con frecuencia, ambos mecanismos se asocian en cepas clínicas.

Un hecho notable y reciente es la adquisición de resistencia a quinolonas en *Haemophilus*, sobre todo a ciprofloxacina, la más utilizada clínicamente, y descrita previamente por nuestro grupo de trabajo (*Georgiou, M., 1996, Campos, J., 1996*). Las cepas inicialmente descritas parecían suscribirse a casos muy concretos en determinadas patologías, pero se ha visto en seguida que las cepas resistentes se aíslan en casi todos los hospitales de España. En el laboratorio de referencia de *Haemophilus* se dispone en la actualidad de la colección más completa conocida de cepas clínicas con sensibilidad disminuía a ciprofloxacina y/o ácido nalidíxico procedentes en su mayor parte de la Comunidad Autónoma de Madrid (sobre todo de la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Ramón y Cajal) y otras regiones españolas y USA. Una de las cepas incluídas en la colección, fue responsable del primer caso de fracaso terapéutico tras el tratamiento con quinolonas (*Bastida, T., 2003*)

Los objetivos concretos planteados en el presente trabajo fueron los siguientes:

- 1) Analizar la epidemiología molecular de la población de cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes a quinolonas en comparación con controles ajustados mediante edad, patología, procedencia de la cepa y localización geográfica, mediante electroforesis en campo pulsante (“*Pulsed Field Gel electrophoresis*” PFGE).
- 2) Estudiar la sensibilidad antibiótica de cepas *H. influenzae* de control sensibles y resistentes a un número amplio de quinolonas, según métodos normalizados por el NCCLS y E-Test. Comparar diversos métodos de sensibilidad utilizados con el método de referencia propuesto por la NCCLS.
- 3) Establecer si la pérdida de sensibilidad a ciprofloxacina es en realidad una pérdida de sensibilidad de grupo y determinar si es posible inferir la resistencia al grupo completo de quinolonas a partir de los datos de una de ellas.
- 4) Analizar las mutaciones presentes en las QRDRs (“*Quinolone Resistance Determining Regions*”) de GyrA, GyrB, ParC y ParE, y en regiones próximas a éstas y establecer su relación con la resistencia a quinolonas.
- 5) Analizar los SNPs (polimorfismos silentes) en los fragmentos secuenciados de *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*
- 6) Proponer “puntos de corte microbiológicos” de sensibilidad y resistencia, que nos permitan detectar la presencia o ausencia de un mecanismo de resistencia debido a mutaciones en las dos dianas primarias de *H. influenzae* (*gyrA* y *parC*) mediante métodos sencillos de laboratorio.
- 7) Demostrar la implicación en la resistencia a quinolonas de mutaciones en *parE*.
- 8) Determinar la asociación entre el fenotipo hipermutador y la disminución de la sensibilidad a quinolonas en *H. influenzae*.
- 9) Explorar y determinar fenotípicamente la presencia individual y/o asociada de otros mecanismos de resistencia como sistemas de bombeo.
- 10) Describir y caracterizar el mecanismo de resistencia en el primer caso de fracaso terapéutico en una enferma con neumonía y septicemia por *H. influenzae* tras el tratamiento con levofloxacina.

1. MICRORGANISMOS

1.1. Aislamientos bacterianos incluidos en el estudio.

Durante el periodo de tiempo entre 1994 y 2003, en el Laboratorio de Referencia de *Haemophilus* del Instituto de Salud Carlos III, se ha llevado a cabo la vigilancia de la sensibilidad a diversas familias de antibióticos, y entre ellos las quinolonas, de las cepas de *Haemophilus* spp. recibidas desde toda la geografía española (aproximadamente más de 600 cepas anuales). En base a este conocimiento se observó la aparición de cepas con sensibilidad reducida a quinolonas.

La colección de cepas objeto de estudio de la presente tesis la componen:

- **Grupo I**, formado por treinta y cuatro cepas de *H. influenzae*, treinta y una eran aislamientos clínicos de origen español y tres de origen norteamericano (*Barriere, S. L. 1993*) que presentaban sensibilidad reducida a ciprofloxacina (Concentración mínima inhibitoria (CMI) $\geq 0.12 \mu\text{g/ml}$). La numeración de estas cepas va desde 29 al 62.

-**Grupo II o Grupo Control**, formado por veintiocho cepas de *H. influenzae* que presentaban una CMI a ciprofloxacina $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$. La selección de estas cepas se llevó a cabo en base a los siguientes criterios: similar fecha de aislamiento, área geográfica, diagnóstico clínico, origen de la muestra, tipo de cápsula y biotipo que las cepas del Grupo I. Además en este grupo se incluyeron las cepas de referencia *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 y ATCC 51907. La numeración de estas cepas va desde 1 a 28.

La mayoría de las cepas se aislaron de muestras respiratorias de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (en su mayor parte fibrosis quística).

Una de las cepas de *H. influenzae* se aisló de la sangre y aparato respiratorio de una paciente diagnosticada de neumonía y septicemia que falleció, a pesar de haber sido tratada con levofloxacina (*Bastida, T., 2003*). Esta cepa será nombrada como 60FT.

1.2. Identificación bacteriana y biotipado.

La identificación del género *Haemophilus* se realizó de acuerdo con los métodos recomendados (*Campos J, 2001*), e incluyeron la tinción de Gram (identificándose como coco-bacilos pequeños Gram-negativos polimórficos) y las necesidades nutricionales para su desarrollo: factores de crecimiento presentes en la sangre como protoporfirina IX (denominada factor X) y/o nicotinamida dinucleótido (NAD)

(denominada también factor V). La clasificación de las distintas especies del género *Haemophilus* se basó en los requerimientos de los factores X y V, la prueba de la porfirina y la utilización de azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa y ribosa) (**Tabla 1**).

Todas las cepas fueron inicialmente serotipadas mediante la técnica de aglutinación (Phadebact *Haemophilus* Test, Boule Diagnostics AB, Huddinge, Sweden) incluyendo antisueros específicos contra el serotipo “b” y una mezcla de antisueros específicos contra los serotipos “a”, “c”, “d”, “e” y “f”. En el caso de aglutinación positiva se procedió a la determinación del tipo capsular mediante sueros específicos obtenidos tras la vacunación de conejos con cepas de referencia de los serogrupos “a” a “f”. En último término y en caso necesario, se aplicaron técnicas de PCR de uso rutinario en el laboratorio para la identificación del serogrupo por métodos genotípicos (*Falla, T. J., 1994*).

Todas las cepas de *H. influenzae* incluidas en el estudio fueron no capsuladas.

La determinación del biotipo se llevó a cabo según el método descrito por **Kilian** (*Kilian, M., 1976*) basado en la producción de indol, urea y ornitina descarboxilasa (**Tabla 5**).

Tabla 5. Diferenciación de los distintos biotipos de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*.

Especies y biotipo	Indol	Ureasa	Ornitina descarboxilasa
<i>H. influenzae</i>			
Biotipo I	+	+	+
Biotipo II	+	+	-
Biotipo III	-	+	-
Biotipo IV	-	+	+
Biotipo V	+	-	+
Biotipo VI	-	-	+
Biotipo VII	+	-	-
Biotipo VIII	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>			
Biotipo I	-	-	+
Biotipo II	-	+	+
Biotipo III	-	+	-
Biotipo IV	+	+	+
Biotipo VI	+	-	+
Biotipo VII	+	+	-
Biotipo VIII	+	-	-

En la colección de estudio se obtuvo la siguiente distribución de biotipos:

- *H. influenzae*, 16 del biotipo I; 26 del biotipo II; 10 del biotipo III; 1 del biotipo IV; 2 del biotipo V; 2 del biotipo VI y 3 del biotipo VII. La distribución de los biotipos fue similar en los Grupos I y II.

2. CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS

Los datos de consumo de antibióticos, y en especial de quinolonas, se obtuvieron a partir de la base de datos del Ministerio de Sanidad que contienen la información acerca de todas las ventas de productos farmacéuticos financiados por el sistema público de salud español. El total de ventas fue convertido en unidades estándar internacionales (Dosis diarias definidas o DDD) del principio activo de cada antibiótico según la metodología de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). A

continuación se obtuvo el número de DDDs por 1000 habitantes y día (DHD) en función de los registros oficiales de población.

3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Electroforesis en campo pulsado

Se llevó a cabo mediante la técnica de Electroforesis en campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, “PFGE”) las distintas fases de su desarrollo fueron:

A) Obtención del DNA cromosómico. Similar al descrito por Lee (*Lee, J. J. and H. O. Smith, 1988*) para la tipificación de *H. influenzae* pero con las siguientes modificaciones: i) se procedió a la extracción a partir de un cultivo fresco de 18 horas en medio sólido de agar chocolate; ii) se midió, por espectrofotometría a 420 nm, la cantidad de inóculo bacteriano a resuspender en el tampón de lavado (10 mM tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA y 1 M de NaCl, pH 7.5) con el fin de obtener un intervalo de absorbancia 0,9-1,1 (ajustando así la solución a 10^9 ufc/ml); iii) dicha solución se mezcló con agarosa “multipurpose” al 2 % V/V (Roche), para la realización de los bloques; iv) se incubaron con la solución de lisis (250 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1% (w/v) de lauril-sarcosil pH 7.5) y 0.25 mg/ml de proteinasa K, durante una noche a 50° C, con recambio al día siguiente e incubación de tres horas; v) se procedió a realizar al menos 4 lavados de los bloques con TE pH 7,2 y se almacenaron a 4°C.

B) Digestión del DNA. Se cortaron porciones de bloques del DNA contenido en agarosa y se estabilizaron con 100 µl del buffer de la enzima de restricción utilizada, durante 30 min a 4°C. El DNA fue digerido en 100 µl de mezcla de digestión con 10-15 U/ml del enzima *SmaI* (MBI-Fermentas), incubando durante cuatro horas a 30° C y cambiando la mezcla de digestión a las dos horas.

C) Condiciones de electroforesis y visualización del DNA en geles de agarosa. Para la separación de los fragmentos de DNA, se cargaron los bloques en una agarosa multipurpose al 1% (Roche) en tampón TBE 0,5x (TBE 10X: 44,5 mM tris-borato/ EDTA_{Na} 1mM pH8). Se utilizó el equipo de electroforesis CHEF-DRIII (Biorad, Hemel Hempstead, UK), aplicando las siguientes condiciones: pulsos iniciales de 5 segundos y pulsos finales de 50 segundos, 6 voltios/cm², tiempo de corrida 24 horas y temperatura 12° C.

Como control de peso molecular se utilizó el concátmero lambda (PFGE marker I, Roche) con el rango 48,5-97,0 kpb. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) en agua destilada, se visualizaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta y posteriormente se fotografiaron.

D) Definición de los perfiles de PFGE. Los fragmentos de restricción fueron visualmente comparados e interpretados de acuerdo con los criterios de Tenover (*Tenover, F. C., 1995*).

3.2. Análisis de los datos de tipificación obtenidos

A) Índice de discriminación. El índice numérico de discriminación (ID), nos da la probabilidad de que dos cepas no relacionadas, tomadas de la población analizada, se sitúen en diferentes grupos de tipificación y viene determinado por el número de tipos definidos por el método aplicado y la frecuencia relativa de esos tipos. Se calcula por el índice de la diversidad de Simpson (*Hunter, P. R. and M. A. Gaston, 1988*) con la siguiente ecuación:

$$ID = 1 - [\sum n_j (n_j - 1) / N(N-1)]$$

N: número total de cepas en la muestra

S: número total de tipos descritos

n_j: número de cepas pertenecientes al tipo j.

Presenta un valor que oscila entre 0 y 1, un valor de 1 nos indicaría que si se seleccionasen al azar en la población de estudio dos cepas no relacionadas, en el 100% de las repeticiones de la técnica de tipado, estarían en distintos grupos de tipificación.

B) Relación filogenética. El análisis de convergencia genética entre los diferentes tipos genómicos generados por PFGE se realizó por la determinación del grado de similitud entre los perfiles de bandas obtenidos. Mediante la utilización de un método cualitativo que consiste en codificar la presencia o ausencia de bandas en el perfil, como 1 ó 0, respectivamente, sin considerar los tamaños de las bandas (*Millemann, Y., 1995*). Estos datos fueron procesados aplicando el coeficiente de similitud de Dice (*Nei, M. and W. H. Li, 1979*). Dicho coeficiente expresa la proporción de fragmento de DNA compartidos entre dos perfiles, aplicando la siguiente fórmula:

$$S = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

n_x : número total de bandas del perfil x

n_y : número total de bandas de y

n_{xy} : número de bandas comunes entre los dos perfiles

Si se obtiene un valor de $S=1$ indica que los dos perfiles son idénticos. Del análisis resulta una matriz de similitud entre perfiles y un dendograma de similitud o árbol filogenético de similitudes genéticas, que agrupa los perfiles más parecidos.

El índice de correlación de Dice se aplicó mediante el programa Molecular Analyst Software (BioRad, Madrid), representándose mediante UPGMA, método algorítmico de agregación, que permite representar gráficamente las relaciones entre las cepas en orden creciente de similaridad. La posición de tolerancia utilizada fue del 1%. En este análisis computerizado, dado que el número de bandas obtenidas era entre 7 y 10, por lo tanto suficientes para el análisis, sólo se consideraron las bandas correspondientes a fragmentos de peso molecular (pm) superior a 48 kpb con el fin de simplificar el análisis. Además la deficiente resolución de las bandas de pm inferior a 48 kpb dificultaba su interpretación .

C) Cálculo del peso molecular de los fragmentos de DNA.

El cálculo del peso de los fragmentos obtenidos por PFGE se obtuvieron directamente mediante el programa Molecular Analyst Software (Biorad).

4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

4.1. Descripción de métodos utilizados

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de los distintos antimicrobianos en la totalidad de las cepas de *H. influenzae* fue estudiada mediante las técnicas de microdilución en caldo, dilución en agar y E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden).

Según el NCCLS, la técnica de referencia para el estudio de sensibilidad a antibióticos en *Haemophilus* ssp es la microdilución en caldo. Esta se llevó a cabo de acuerdo con las normas descritas por el citado comité (NCCLS, 2001). El medio líquido utilizado fue Haemophilus Test Medium (HTM) que se preparó con caldo Muller-Hinton (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado con HTM Supplement (Oxoid) y extracto de levadura (0.5%) (Difco, Detroit, MI). Las placas de microdilución fueron

inoculadas para obtener una densidad final en el inóculo de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. El volumen final en cada pocillo era de 200 μ l. Las placas una vez inoculadas fueron incubadas entre 20-24 horas a 35°C con 5% CO₂ antes de la lectura de los resultados.

La técnica de dilución en agar fue una modificación del método estandar recomendado por el NCCLS para otros microorganismos. A partir de un cultivo fresco del microorganismo en agar chocolate se realizó un inóculo directo de colonias aisladas en solución salina y se ajustó la turbidez de la suspensión hasta un McFarland 0,5. Las placas de HTM Base (Oxoid) suplementado con HTM Supplement (Oxoid) con antibiótico fueron inoculadas con un replicador de Steers, obteniéndose un inóculo final de 10^5 ufc/depósito. Una vez inoculadas las placas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el depósito del microorganismo estuviese completamente seco. Luego fueron incubadas entre 20-24 horas a 35°C con 5% CO₂ antes de su lectura. La CMI se definió como la concentración más baja de antibiótico que inhibía el crecimiento bacteriano. Las quinolonas estudiadas, al igual que el resto de los antimicrobianos, fueron proporcionados por sus respectivos laboratorios fabricantes, como sustancias valoradas y de potencia conocida.

El método de E-test se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor (AB Biodisk, Solna, Sweden). Para cada cepa se inocularon dos placas de 150 mm con HTM agar (Oxoid) con una suspensión bacteriana ajustada a un McFarland 0.5 y se dejaron secar al aire. En cada placa se pusieron seis tiras de E-test. Las placas se incubaron entre 18-24 horas a 35°C con 5% CO₂. La lectura del valor de CMI se hizo en la inserción entre la elipse de inhibición y la tira, luego se ajustó a la dilución estandar superior más próxima para permitir una adecuada comparación con los otros métodos aplicados.

En todos los métodos se llevó a cabo un recuento bacteriano para asegurarnos que inóculo utilizado era el adecuado. Como cepas control del estudio de sensibilidad se utilizaron las cepas de referencia *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 y ATCC 51907.

La incubación se llevó a cabo en presencia de un 5% de CO₂ debido a que algunas cepas mostraron dificultades de crecimiento en ausencia de CO₂.

Los antibióticos evaluados por cada método descrito se indican en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Antibióticos incluidos en el estudio de sensibilidad

Microdilución	Dilución en agar	E-test
Fluoroquinolonas	Fluoroquinolonas	Fluoroquinolonas
Clinafloxacina	Clinafloxacina	Clinafloxacina
Levofloxacina	Levofloxacina	Levofloxacina
Ciprofloxacina	Ciprofloxacina	Ciprofloxacina
Esparfloxacina	Esparfloxacina	Esparfloxacina
Grepafloxacina	Grepafloxacina	Grepafloxacina
Norfloxacina	Norfloxacina	Norfloxacina
Acido nalidixico	Acido nalidixico	Acido nalidixico
Moxifloxacina	Moxifloxacina	Ofloxacina
Garenoxacina	Gatifloxacina	Pefloxacina
β lactámicos		Enrofloxacina
Amoxicilina		Flerofloxacina
Amoxicilina-clavulanico		Trovafoxacina
Cefuroxima		β lactámicos
Cefixima		Cefalotina
Macrólidos		Macrólidos
Azitromicina		Eritromicina
Eritromicina		Aminoglicósidos
		Gentamicina
		Tobramicina
		Otros
		Cotrimoxazol
		Tetraciclina

4.2. Analisis de los resultados.

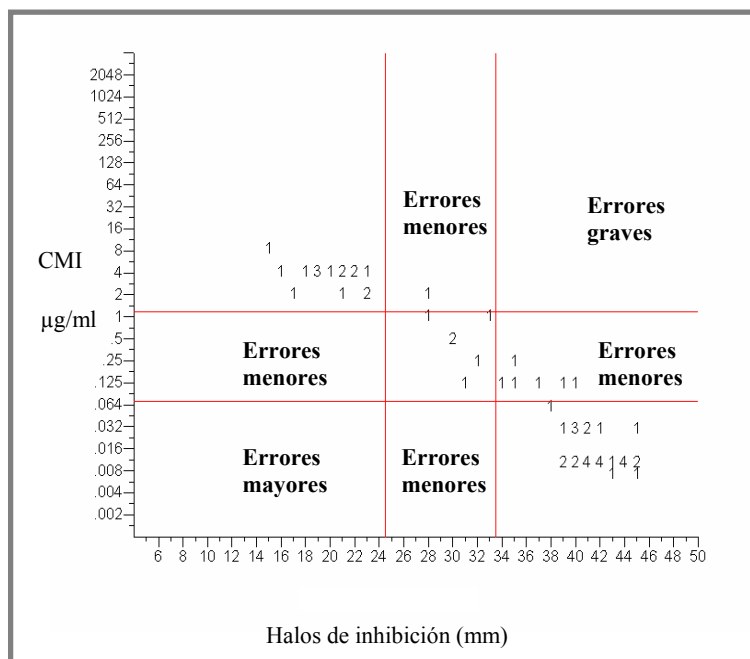
4.2.1. Comparación de los datos de sensibilidad obtenidos con los distintos métodos utilizados. En el estudio comparativo de las CMI's obtenidas por cada método se consideró que había concordancia cuando las CMI's eran idénticas o diferían en una dilución doble.

4.2.2. Correlación de los halos de inhibición, CMI y cambios aminoacídicos en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (*Quinolone-resistance determining region, QRDR*) de GyrA y ParC. Los \log_2 de las CMI de ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina y ácido nalidixico obtenidas por la técnica de microdilución, se representaron frente a los halos de inhibición obtenidos por difusión en disco para cada una de las quinolonas antes citadas. Los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante el método de Pearson.

Para obtener una propuesta de “puntos de corte microbiológicos”, el criterio utilizado para determinar la ausencia del mecanismo de resistencia (“sensible”) fue la CMI mas alta y el halo de inhibición mas pequeño del grupo de cepas que no tenían cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC; para la presencia del mecanismo de resistencia (“sensibilidad reducida”) el criterio fue la CMI mas baja y el halo de inhibición mas grande para los cuales mas de un 70 % de las cepas presentaban dos cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC. Con estos criterios aparece una categoría intermedia que incluye cepas sin mutaciones en las QRDRs de GyrA y ParC y cepas con un único cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA.

Los errores graves se correspondían con aquellas cepas que se clasificaban como sensibles por difusión en disco y con “sensibilidad reducida” por microdilución, los errores mayores eran aquellas que se clasifican como cepas con “sensibilidad reducida” por difusión en disco y sensibles por microdilución, y los errores menores, aquellas cepas que por uno de los métodos de sensibilidad se clasificarían en la zona intermedia y con el otro método podrían ser tanto sensibles como con “sensibilidad reducida” (**Figura 4**).

Figura 4 . Modelo para la comparación de los halos de inhibición y CMI's indicando los posibles errores



5. CARACTERIZACIÓN DE LAS QRDR DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV DE *H. influenzae*.

El estudio de las topoisomerasas II y IV de *H. influenzae* se realizó mediante la técnica de la PCR (Innis, M. A., 1990), que a continuación se describe.

5.1. Amplificación y análisis de las secuencias de las regiones QRDR de las topoisomerasas II y IV de *H. influenzae*.

A) Obtención del DNA y adición de reactivos. Se procedió a suspender una asa del cultivo fresco del microorganismo en 200 µl de H₂O, ajustándose a continuación hasta obtener una absorbancia de 0,3-0,4 a 600 nm en el espectrofotómetro. Posteriormente, se hirvió durante 10 min, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante que fue almacenado a -20°C para cada ensayo.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo los siguientes compuestos:

Agua bidestilada estéril : 20,75 µl

PCR Buffer: 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl (Roche)

MgCl₂: 2 mM MgCl₂ (Roche)

DNTPs: 200 μM dATP; 200 μM dCTP; .200 μM dGTP; 200 μM dTTP (Pharmacia)

Primers: 1 μM de cada primer (Pharmacia Biotech, Orsay, France)

Taq polimerasa: 2.5 U de *Taq* polymerase (Roche)

DNA bacteriano: 5 μl del extracto con DNA

B) Cebadores (“primers”) utilizados y condiciones de amplificación. Los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos QRDR de las topoisomerasas II y IV, fueron diseñados en base a la secuencia conocida de la cepa *H. influenzae* Rd (*Fleischmann, R. D., 1995*). Con el fin de obtener datos no solo de los fragmentos QRDR, sino también de zonas próximas, se amplificó para cada gen un fragmento más grande. Así para *gyrA* amplificamos un fragmento de 404 pares de bases (pb) desde la posición 138 a 542 del gen completo, para *gyrB* 445 pb desde la posición 1252 a 1697, para *parC* 563 pb desde la posición 160 a 723 y para *parE* 347 bp desde la posición 1172 a 1519. Las características de los cebadores específicos utilizados para la amplificación y secuenciación de las regiones QRDR de *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* se indican en la **Tabla 7**.

Tabla 7 . Descripción de los cebadores específicos utilizados en el estudio.

QRDR	Primer	Secuencia nucleotídica	G+C (%)	Nº bases	T _m (°C)
Topoisomerasa II:					
<i>gyrA</i>	GYRA-D	5'-CCGCCGCGTACTATTCTCAAT-3'	52	21	66,9
	GYRA-R	5'-GTTGCCATCCCCACCGCAATACCA-3'	58	24	77,3
<i>gyrB</i>	GYRB-D	5'-CCTGCTCTTCTGAAACTTTAC-3'	41	22	57,3
	GYRB-R	5'-CCATCTAACGCAAGGGTTAATC-3'	45	22	61,6
Topoisomerasa IV:					
<i>parC</i>	PARC-D	5'-TCTGAACTTGGCTTAATTGCC-3'	43	21	62,9
	PARC-R	5'-GCCACGACCTTGCTCATAAAT-3'	45	22	64,9
<i>parE</i>	PARE-D	5'-TCGTTAGTGGCCCTGCATTAC-3'	52	21	65,9
	PARE-R	5'-GAACAGGGCACAGAGTAGGGT-3'	55	22	64,3

F: primers directos; R: primers reversos ; T_m, temperatura de anillamiento

Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn), con las siguientes condiciones de amplificación: i) desnaturalización de las muestras a 94°C durante 5 min; ii) 30 ciclos de amplificación: 94°C durante 1 min; 1 min a 54°C para el anillamiento; 1 min a 72°C para la polimerización; iii) la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 10 min.

C) Electroforesis en gel y visualización del producto. Para observar los resultados de la amplificación, se tomaron 5 µl de las muestras amplificadas y se sometieron a electroforesis convencional en geles de agarosa MS-8 (Pronadisa) al 1% en TE1× durante 30 minutos a 100 voltios. Los geles se tiñeron en una solución de 1 µg/ml de bromuro de etidio en agua y se visualizó el producto amplificado en un transiluminador de luz ultravioleta (300 nm de longitud de onda), para fotografiarse a continuación. El marcador de peso molecular utilizado fue el Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus (MBI Fermentas).

D) Purificación del producto de PCR. Los productos fueron purificados con el equipo de Purificación de PCR (Quiagen, Hilden, Germany).

E) Reacción de Secuenciación. La secuenciación de las QRDRs se realizó en ambas cadenas de DNA con los mismos cebadores utilizados en la amplificación, con el equipo de secuenciación Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos fueron analizados mediante el secuenciador ABI PRISM^R 377 DNA Sequencer.

F) Análisis de las secuencias. El análisis de la secuencia de nucleótidos y su posterior traducción a secuencia aminoacídica se realizó con el soporte informático DNASTAR software (Madison, WI). La comparación de dos secuencias permite identificar los cambios nucleotídicos, deleciones o inserciones que se producen durante el proceso evolutivo. Para comparar dos secuencias deben alinearse, los programas de alineamiento utilizados fueron el DNASTAR y Clustal W.A (European Bioinformatic Institute). Con estos programas se llevó a cabo el análisis de las mutaciones no silentes y las mutaciones silentes.

El alineamiento y análisis filogenético de las secuencias se realizó con los soportes informático MEGA version 3.0 (Kumar 2004) y CLUSTAL W EMBL-EBI.

6. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN *gyrA*, *parC*, *gyrB* y *parE*.

Para cada gen se hizo el cálculo del número de posiciones variables por cada 100 bp tanto para las mutaciones no silentes como en las silentes.

Por otro lado, se consideraron diferentes niveles en la frecuencia de aparición de estos polimorfismos silentes: i) *polimorfismo de baja frecuencia*, como aquel SNP presente en menos de un 25% de las cepas; ii) *polimorfismo de media frecuencia*, SNP encontrado entre el 25% de las cepas y menos del 50%; iii) *polimorfismo de alta frecuencia*, SNP identificado entre un 50% y menos del 75% de las cepas; iv) *polimorfismo de muy alta frecuencia*, en este nivel los SNP estarían presentes en más de un 75% de las cepas secuencias.

También se determinó el número de SNPs acumulados en las distintas secuencias para cada gen estudiado.

Para cada gen, a cada variante de secuencia (incluso en un solo nucleótido) se le asignó un número correlativo, y cada una de las citadas variantes fue considerada un alelo distinto.

Para establecer una representación gráfica de las relaciones genéticas entre los alelos encontrados, se obtuvo un árbol filogenético o dendograma. Para ello es necesario estimar las distancias entre todas las posibles parejas de secuencias y obtener una matriz de distancias. La distancia genética se mide en función del número de nucleótidos sustituidos entre dos secuencias, luego se construye el árbol filogenético aplicando un algoritmo de agregación.

El método de agregación utilizado fue el *Neighbor-joinig*, el cual identifica parejas de secuencias que minimizan la longitud total del árbol. El programa *MEGA* se utilizó para construir el árbol filogenético mediante el método *Neighbor-joinig*. Para determinar la fidelidad del árbol se aplicó el método estadístico *Bootstrap*. Este método construye el árbol consenso a partir de 500 árboles obtenidos reorganizando las distintas secuencias.

7. OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES *in vitro*.

Su finalidad fue determinar el significado de la mutación más frecuente en la QRDR de ParE (Asp 420 a Asn), y que parecía asociarse a la resistencia de alto nivel a quinolonas

A) Caracterización de las cepas receptora y donante. La cepa que se utilizó como donante de DNA fue la 60FT. Esta cepa presenta una CMI a ciprofloxacina por la técnica del E-test de 64 µg/ml y las mutaciones observadas en sus dianas son :

GyrA: Ser 84 a Leu y Asp 88 a Asn

ParC: Ser 84 a Ile

ParE: Asp 420 a Asn

Como cepa receptora se utilizó la cepa 53 que presenta una CMI a ciprofloxacina por la técnica del E-test de 4.0 µg/ml e idénticas mutaciones que la cepa 60FT en GyrA y ParC, es decir:

GyrA: Ser 84 a Leu y Asp 88 a Asn

ParC: Ser 84 a Ile

B) Preparación de células competentes y procedimiento de transformación. Se llevaron a cabo mediante el método descrito por R. M. Herriott (*Herriott, R. M., 1970*). En un primer experimento se utilizó el DNA total de la cepa 60FT, extraído y purificado con el protocolo descrito por Wiley (*Wiley&Sons, J., 1994*). En un segundo experimento se utilizó el producto de PCR resultante de la amplificación de Par E con la mutación de interés obtenido con los cebadores descritos en la Tabla 7 y purificado con equipo de Purificación de PCR (Quiagen, Hilden, Germany).

C) Selección de los transformantes. Se llevó a cabo en placas de HTM con concentraciones de ciprofloxacina de 8 y 16 µg/ml. En todos los transformantes obtenidos se determinó la CMI a ciprofloxacina por E-test y se secuenciaron las cuatro dianas como se ha descrito previamente.

8. OBTENCIÓN DE MUTANTES *in vitro* CON SENSIBILIDAD DISMINUÍDA A QUINOLONAS

A partir de la cepa 53 se obtuvieron mutantes isogénicos *in vitro* de la forma que a continuación se describe:

A) Tras crecimiento de 18 h. en agar chocolate se inoculó un asa de siembra en 6 ml de *Brain Heart Infusión Broth* (BHI) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado con HTM supplement (Oxoid) y extracto de levadura (0.5‰) (Difco, Detroit, MI) incubándose 3 h a 37°C en agitación.

B) Tras centrifugar el sedimento se resuspendió en PBS y se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana en placas de HTM con 8 y 16 µg/ml de ciprofloxacina. Tras incubación a 37°C se hicieron dos lecturas a las 24 y 48 horas dando pase a las colonias obtenidas en agar chocolate.

C) Los mutantes fueron identificados como *H. influenzae* y se determinó su CMI a ciprofloxacina con tiras de E-test y en todos ellos se secuenciaron las QRDRs de *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*.

9. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA PRESENCIA DE UN MECANISMO ACTIVO DE BOMBEO

Para detectar la presencia de un posible mecanismo de bombeo activo (“efflux”) se procedió a determinar los valores de CMI de la ciprofloxacina, norfloxacina y eritromicina en presencia de un inhibidor de la bomba de protones, el carbonil ciano m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) (*Sánchez, L., 1997*). Inicialmente se realizó un cribado de la concentración a utilizar mediante placas de microdilución incluyendo 0,007 hasta 1 µg/ml de CCCP en ausencia de quinolona y observando la concentración más alta que no inhibía el crecimiento bacteriano. Finalmente seleccionamos una concentración de 0,01 µg/ml para el CCCP. Se sospechó la presencia de un mecanismo de eflujo cuando la CMI de la quinolona o eritromicina en presencia de CCCP disminuyó al menos cuatro veces (2 diluciones dobles) con respecto a la correspondiente CMI en ausencia de estos compuestos.

10. DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO BACTERIANO HIPERMUTADOR.

Para determinar la frecuencia de mutación en presencia de rifampicina se suspendió una colonia de cada cepa en 20 ml de BHI (enriquecido con HTM “supplement” y extracto de levadura al 0.5%) y se incubó a 37°C, 24 horas y con agitación. Al día siguiente el cultivo crecido se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos, el sedimento se resuspendió en 1 ml de BHI, posteriormente alícuotas de 100 µl se sembraron en placas de HTM agar suplementado con y sin rifampicina (10 µg/ml). Tras 48 horas de incubación a 37°C con CO₂ se hizo recuento del número de colonias crecidas en las placas con rifampicina. Se determinó la frecuencia de mutación a rifampicina dividiendo el número mutantes obtenidas entre la concentración del inóculo bacteriano inicial, previamente determinado por siembra de diluciones seriadas del mismo en placas de HTM agar sin antibiótico.

Para todas aquellas cepas en las que se obtuvo más de 30 colonias en presencia de rifampicina, se repitió el experimento por triplicado y el resultado final fue la media obtenida entre los tres experimentos. Consideramos que aquellas cepas que presentaban una frecuencia de mutación superior a 10⁻⁷ tenían un fenotipo hipermutador (*Oliver, A., 2000, Roman, F., 2004*).

11. FALLO TERAPÉUTICO EN UN CASO DE NEUMONÍA DEBIDA A *H. influenzae* RESISTENTE A LEVOFLOXACINO.

11.1. Caso clínico

La paciente era una mujer de 71 años, que el 15 de Febrero de 2002 ingresó en el Hospital del Esperit Sant (Santa Coloma de Gramenet, Barcelona), con febrícula, tos y cansancio. La radiografía de tórax mostró infiltrados en el lóbulo superior, medio e inferior derecho y en el lóbulo basal izquierdo. Se diagnosticó de neumonía adquirida en la comunidad y se sometió a tratamiento antibiótico con levofloxacin (500 mg / día) y teicoplanina (400 mg / día). La paciente era alérgica a penicilina.

Tres meses antes de ser hospitalizada, la enferma recibió tratamiento con eritromicina y dos meses antes de su ingreso fue tratada con moxifloxacina oral durante cinco días.

Durante su ingreso, su estado clínico empeoró. A pesar de las numerosas pruebas practicadas, no se pudo diagnosticar ninguna otra enfermedad responsable de su deterioro clínico. Después de siete días de tratamiento con levofloxacina, su estado clínico no mejoró. En dos hemocultivos que se recogieron después de un episodio de fiebre de 38,5°C, se aisló una cepa de *H. influenzae* resistente a fluorquinolas (cepa 32602 o 60FT). El tratamiento se cambió entonces a cloramfenicol (1 g/6 h), al que la cepa era sensible, pero en ese mismo día y debido a que la paciente sufrió una insuficiencia respiratoria severa, fue intubada y transferida a la unidad de cuidados intensivos del Hospital de la Creu Roja (L'Hospitalet, Barcelona) donde de nuevo se aisló en sangre una cepa de *H. influenzae* resistente a quinolonas (cepa 35102), y también en un broncoaspirado (cepa 35202). Pese a que el tratamiento antibiótico se cambia a aztreonam (1 g/8 h), la paciente falleció a las 48 horas del ingreso en el segundo hospital.

11.2. Estudio de las cepas.

La identificación de la especie bacteriana, biotipo y serotipo se llevó a cabo como se indica en el apartado (1.2.). La sensibilidad se realizó mediante la técnica de microdilución de acuerdo con las normas de la NCCLS (NCCLS, 2001 #29; NCCLS, 2001 #28) como se indica en el apartado (4.1.). La actividad β -lactamasa se llevó a cabo con la cefalosporina cromogénica nitrocefina. La detección fenotípica de un posible mecanismo de bombeo se llevó a cabo como se indica en el apartado (9).

La amplificación y el análisis de las secuencias de las QRDRs de *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* se realizaron como se indica en el apartado (5).

12. TRATAMIENTO GENERAL DE LOS DATOS Y CÁLCULOS ESTADÍSTICOS.

Se llevaron a cabo con los programas: Whonet (WHO/CSR/DRS/99.1, World Health Organization) y GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Las variables categóricas se compararon utilizando el test exacto de Fisher. Las frecuencias de mutación se compararon mediante el U-test de Mann-Whitney. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Eliminado: grew
Eliminado: fluorq

Eliminado: second hospital (
Eliminado:)

Eliminado: *H. influenzae*
resistant to fluorq

Eliminado: gro

Eliminado: e

Eliminado: wn

Eliminado:

Eliminado:

Eliminado: r

Eliminado: plus ceftriaxone (2 g

Eliminado: r

Eliminado: /day)

Eliminado: was performed by
microdilution methods

Eliminado: o

Eliminado: n

Eliminado: f

Eliminado:

Eliminado: the three isolates
(two from blood and
Eliminado: ational Committee
for Clinical Laboratory Standards

Eliminado: 2

Eliminado:

Eliminado: The

Eliminado: β -lactamase activity

Eliminado: The entire

Eliminado: whole

Eliminado: susceptibility testing
procedure was validated by the
paralle

Eliminado:

Eliminado:

Eliminado: *gyrA*, *gyrB*(en
cursiva?)

Con formato

Eliminado: as

1. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS CEPAS DE *H. influenzae* MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE).

La colección de 62 cepas de *H. influenzae* fue analizada mediante la técnica de PFGE utilizando la endonucleasa *SmaI* para la digestión del DNA cromosómico total. Atendiendo a los perfiles obtenidos, considerando el punto de corte de identidad en 80% de similitud y de acuerdo con los criterios de Tenover (*Tenover, F. C., 1995*), se obtuvieron tantos pulsotipos distintos como cepas estudiadas.

En la **Figura 5** se muestra la resolución obtenida mediante PFGE para el análisis de los distintos perfiles obtenidos en una selección de cepas.

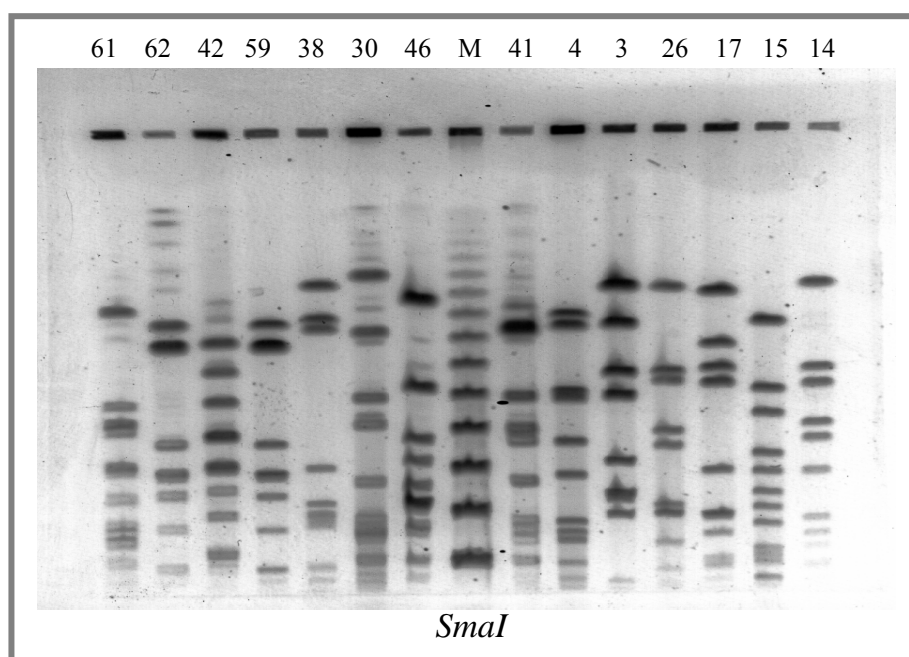
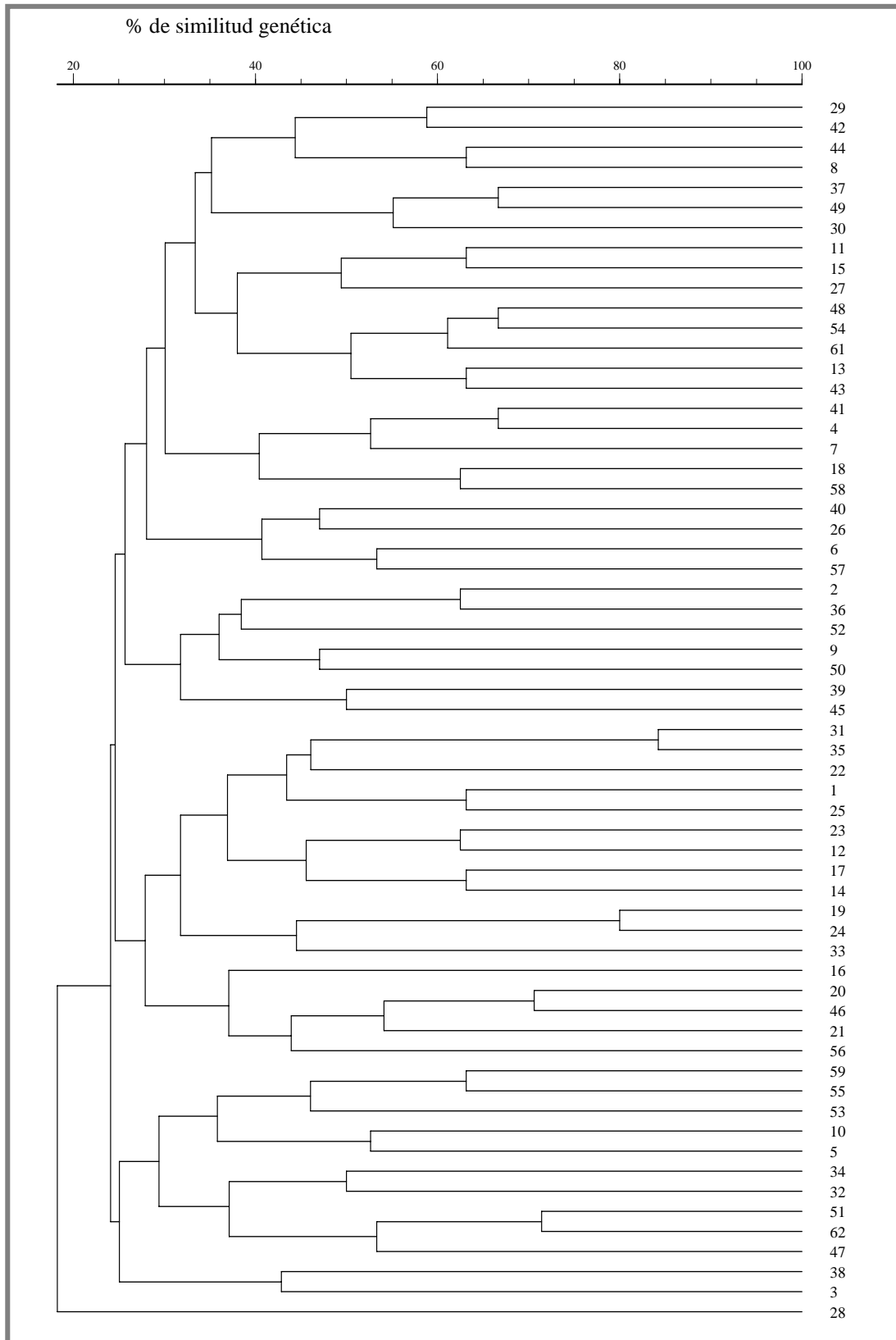


Figura 5. Algunos de los perfiles obtenidos tras digestión con *SmaI*, en la parte superior se identifica la

El índice de discriminación de Simpson, que mide la probabilidad de que dos cepas genéticamente no relacionadas se incluyan en distinto perfil, alcanzó un valor de 1. Para el análisis filogenético se seleccionó la región comprendida entre 48,0 y 97,0 Kpb. El análisis comparativo de los perfiles de bandas mostrados por la totalidad de los pulsotipos fue utilizado para trazar el árbol o dendograma de similitud genética de Dice (**Figura 6**).

El análisis del citado dendograma mostró una gran diversidad genética, lo cual permitió excluir la posible clonalidad de las cepas estudiadas.

Figura 6. Dendograma de similitud genética entre los 61 pulsotipos generados por *Sma I* en las 61 cepas de *H. influenzae* (se incluyen dos cepas de referencia ATCC51907 y ATCC49247)



2. RESULTADOS CONSUMO DE QUINOLONAS

La **Figura 7** muestra el consumo comparado de antibióticos entre 1998 y 2002. Como puede observarse, en un contexto general de disminución de la venta de antibióticos por parte del sistema público español entre 1998 y 2002 (las DHD pasaron de 21,6 a 19,7; -8,8%), el consumo de quinolonas ha progresado constantemente (desde 1,9 a 2,4; +26%).

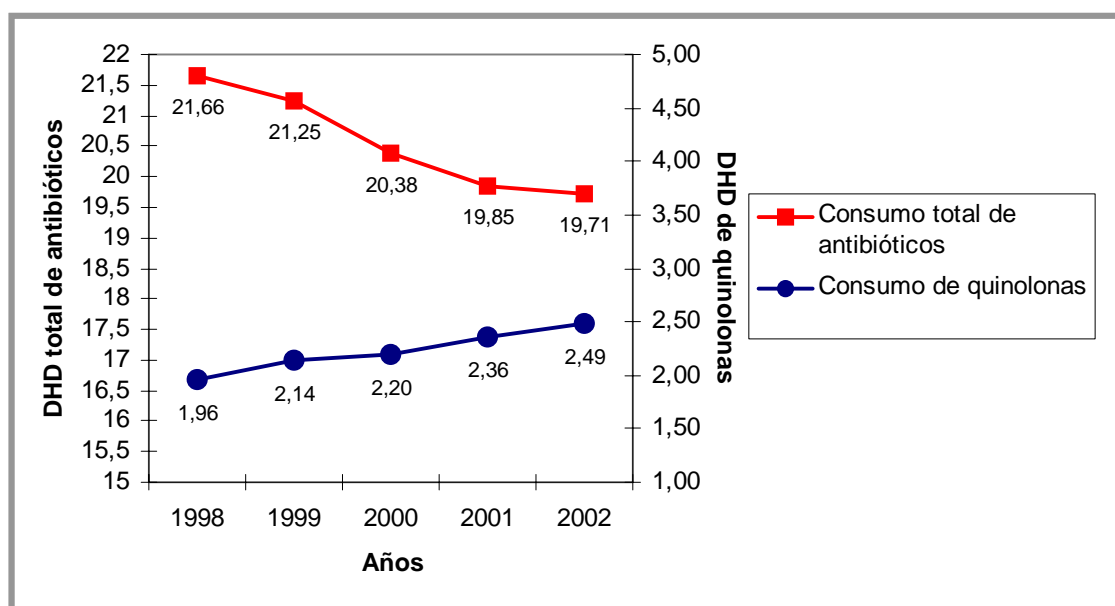


Figura 7. Consumo comparado de antibióticos entre 1998 y 2002.

En relación a las diferentes quinolonas utilizadas, puede observarse (**Figura 8**) que el consumo de ciprofloxacina y norfloxacina ha permanecido relativamente constante; por el contrario, el consumo de las nuevas quinolonas ha aumentado constantemente. El consumo de levofloxacino se ha elevado progresivamente desde que se comercializó en 1999 hasta 2002 y el consumo de moxifloxacino ha crecido también constantemente desde 2000 a 2002, igualando en éste último año al de levofloxacino.

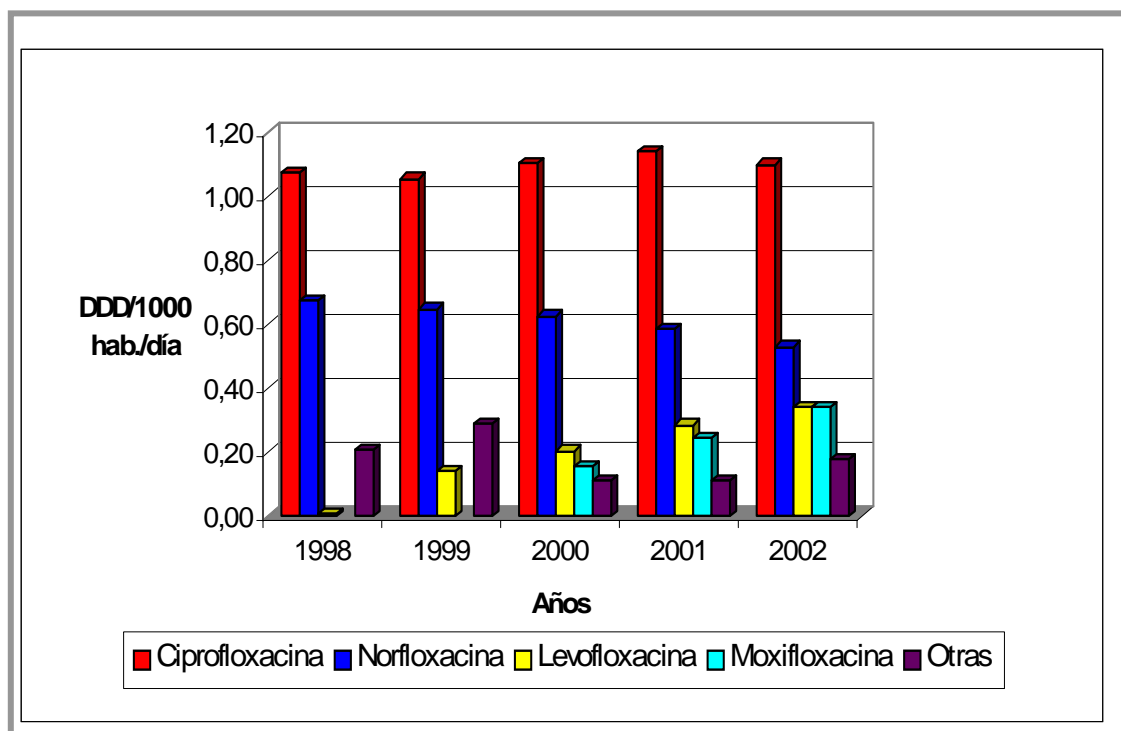


Figura 8. Consumo comparado de distintas quinolonas entre 1998 y 2002.

3. PERFIL DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *H. influenzae*.

3.1. SENSIBILIDAD A QUINOLONAS.

La actividad *in vitro* de las quinolonas estudiadas frente a la colección de cepas se muestra en la **Tabla 8**. Considerando la microdilución como método de referencia (*NCCLS, 2001*), la quinolona más activa fue la clinafloxacin (CMI_{90} 0.25 $\mu\text{g/ml}$), seguida por (en orden decreciente de actividad), levofloxacin y moxifloxacin (CMI_{90} 2 $\mu\text{g/ml}$), ciprofloxacin y garenoxacin (BMS-284756) (CMI_{90} 4 $\mu\text{g/ml}$), grepafloxacin y esparfloxacin (CMI_{90} 8 $\mu\text{g/ml}$), norfloxacin (CMI_{90} 16 $\mu\text{g/ml}$) y ácido nalidíxico (CMI_{90} 128 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla 8. Actividad *in vitro* de las catorce quinolonas estudiadas frente a *H. influenzae*.

Quinolona	Método	RANGO	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀
Ácido nalidíxico	Microdilución	0,5-128	4,0	128
	Dilución en agar	0,5-64	2,0	64
	E-test	0,12-256	0,5	64
Norfloxacin	Microdilución	0,03-32	0,25	16
	Dilución en agar	≤ 0,01-32	0,06	8,0
	E-test	0,03-64	0,12	16
Pefloxacin	E-test	0,03-32	0,12	8,0
	E-test	0,03-256	0,12	8,0
Flerofloxacin	E-test	0,03- >32	0,12	8,0
Ofloxacin	E-test	0,03- >32	0,12	8,0
Ciprofloxacin	Microdilución	0,007-32	0,06	4,0
	Dilución en agar	≤ 0,01-16	0,03	2,0
	E-test	0,003-64	0,03	4,0
Esparfloxacin	Microdilución	0,003-32	0,06	8,0
	Dilución en agar	≤ 0,01-16	0,06	4,0
	E-test	0,003-64	0,12	16
Grepafloxacin	Microdilución	0,003-32	0,06	8,0
	Dilución en agar	≤ 0,01-8	0,06	8,0
	E-test	0,003-64	0,06	8,0
Moxifloxacin	Microdilución	0,01-32	0,06	2,0
	Dilución en agar	≤ 0,01-32	0,007	1,0
Levofloxacin	Microdilución	0,01-32	0,12	2,0
	Dilución en agar	≤ 0,01-32	0,03	1,0
	E-test	0,007-64	0,06	2,0

Trovafloxacin	E-test	0,003- >32	0,03	4,0
Gatifloxacin	Dilución en agar	≤ 0,01-8	0,007	0,25
Clinafloxacin	Microdilución	0,001-4.0	0,007	0,25
	Dilución en agar	≤ 0,01-4.0	0,007	0,25
	E-test	0,001-2.0	0,007	0,25
Garenoxacin	Microdilución	0,001-32	0,06	4,0

En la **Tabla 9** se muestran los datos de sensibilidad a las quinolonas estudiadas de las cepas pertenecientes a los Grupos I y II de estudio. Se puede observar en la citada tabla que, en el Grupo I, todas las quinolonas reducen de forma significativa su actividad con respecto al Grupo II, aumentando su CMI₉₀ entre 7 y 10 diluciones dobles. Las quinolonas que presentan la mejor actividad *in vitro*, como son la gatifloxacin y clinafloxacin, también aumentan su CMI₉₀ pero de forma más reducida (5 diluciones dobles).

Tabla 9. Actividad *in vitro* de las quinolonas frente a los dos grupos de estudio de *H. influenzae*.

Quinolona	Método	Grupo II*			Grupo I*		
		Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
(µg/ml)							
Ácido nalidíxico	Microdilución	0,5-16	2,0	2,0	2,0-128	64	128
	Dilución en agar	0,5-16	1,0	1,0	4,0-64	32	64
	E-test	0,12-8,0	0,25	05	0,5-256	32	128
Norfloxacin	Microdilución	0,03-0,25	0,12	0,12	0,25-32	8,0	32
	Dilución en agar	0,007-0,12	0,03	0,06	0,25-32	4,0	16
	E-test	0,03-0,12	0,06	0,12	0,25-64	8,0	16
Pefloxacin	E-test	0,03-0,12	0,06	0,06	0,25-32	4,0	32
Flerofloxacin	E-test	0,03-0,12	0,06	0,06	0,25-256	4,0	16
Ofloxacin	E-test	0,03-0,12	0,06	0,12	0,25-64	2,0	64
Ciprofloxacina	Microdilución	0,007-0,06	0,01	0,03	0,12-32	2,0	16
	Dilución en agar	0,007-0,03	0,007	0,03	0,06-16	0,5	4,0
	E-test	0,003-0,06	0,01	0,03	0,06-64	2,0	64
Esparfloxacin	Microdilución	0,003-0,06	0,01	0,03	0,06-32	2,0	8,0
	Dilución en agar	0,007-0,06	0,03	0,06	0,12-16	2,0	8,0
	E-test	0,003-0,12	0,03	0,03	0,12-64	4,0	64
Grepafloxacin	Microdilución	0,003-0,06	0,007	0,01	0,06-16	4,0	16
	Dilución en agar	0,007-0,5	0,007	0,007	0,06-8,0	1,0	8,0
	E-test	0,003-0,06	0,01	0,03	0,12-64	2,0	64
Moxifloxacin	Microdilución	0,01-0,12	0,03	0,06	0,06-32	2,0	4,0
	Dilución en agar	0,007-0,007	0,007	0,007	0,03-32	1,0	2,0
Levofloxacin	Microdilución	0,01-0,06	0,03	0,03	0,12-64	1,0	2,0
	Dilución en agar	0,007-0,03	0,007	0,03	0,06-32	0,5	2,0
	E-test	0,007-0,06	0,03	0,03	0,06-64	0,5	64
Trovafloxacin	E-test	0,003-0,06	0,01	0,03	0,01-64	0,5	8,0
Gatifloxacin	Dilución en agar	0,007-0,03	0,007	0,007	0,007-8,0	0,25	0,25
Clinafloxacina	Microdilución	0,001-0,007	0,001	0,001	0,01-4,0	0,12	0,25
	Dilución en agar	0,007-0,007	0,007	0,007	0,007-4,0	0,06	0,25
	E-test	0,001-0,007	0,003	0,003	0,01-2,0	0,12	0,25
Garenoxacin	Microdilución	0,001-0,06	0,01	0,03	0,03-32	1,0	16

* En el Grupo II se incluyen las cepas con CMI para ciprofloxacina ≤ 0.06 µg/ml y en el Grupo I, las cepas con CMI para ciprofloxacina ≥ 0.12 µg/ml.

3.2.RESISTENCIA CRUZADA A LAS QUINOLONAS

Los datos de sensibilidad expresados en la **Tabla 9** sugieren que la pérdida de sensibilidad a ciprofloxacina afecta a las otras 13 quinolonas estudiadas. Para obtener pruebas adicionales de la pérdida de sensibilidad cruzada entre todas las quinolonas y que ésta podría deducirse a partir de los datos de susceptibilidad de una de ellas, se obtuvieron las correlaciones entre los datos de sensibilidad (CMI) obtenidos para cada una de las quinolonas con los datos de sensibilidad de la ciprofloxacina (utilizando en las CMI obtenidas por E-test). Los coeficientes de correlación (r) oscilaron entre 90.2% y 95% (promedio 93%, $p < 0,001$ en todos los casos), excepto para el ácido nalidíxico que era del 82%. Esta diferencia podría deberse a tres cepas que, con unas CMI a ácido nalidíxico de 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, presentaban una CMI de ciprofloxacina de 0,06 $\mu\text{g/ml}$.

Además, cuando se compararon las cepas de *H. influenzae* con CMI a ciprofloxacina bajas ($n=34$, $\text{CMI} \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$, valor de CMI para el que sabemos que no hay cambios aminoacídicos en los QRDRs de GyrA y ParC, vease apartado 4 de *Resultados Tabla 14*) con las que presentaban valores altos de CMI a ciprofloxacina ($n=19$, $\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g/ml}$, concentración para la que sabemos que hay cambios aminoacídicos en los QRDRs de GyrA y ParC, vease apartado 4 de *Resultados Tabla 14*) todas las quinolonas aumentaban su CMI_{90} en este último grupo entre 2^8 a 2^{10} (256 a 1.000 veces, **Tabla 10**), lo que sugiere que la resistencia es cruzada para todas las quinolonas estudiadas. La misma comparación agrupando las cepas según su sensibilidad a ácido nalidíxico ($n=33$ cepas con $\text{CMI} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ para ácido nalidíxico frente a $n=29$ cepas con $\text{CMI} \geq 8 \mu\text{g/ml}$) muestra una mayor variabilidad con incrementos de CMI_{90} entre 2^3 a 2^9 (**Tabla 10**).

Tabla 10. Comparación de los valores de CMI₉₀ obtenidos por la técnica de E-test para diez quinolonas en aislados de *H. influenzae* con CMIs $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina (n=34) frente a aislados con CMIs ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ (n=19) y en aislados con CMIs ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ para ácido nalidíxico (n=33) frente a aislados con CMIs ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ (n=29).

Quinolona	Ciprofloxacina CMI $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$	Ciprofloxacina CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$	Aumento en N° de diluciones
Acido nalidíxico	1	256	8
Norfloxacin	0,12	32	8
Ofloxacin	0,12	64	9
Pefloxacin	0,12	32	8
Flerofloxacin	0,12	128	10
Esparfloxacin	0,12	64	9
Grepafloxacin	0,06	64	10
Trovafloxacin	0,06	64	10
Levofloxacin	0,06	64	10
Clinafloxacin	0,007	2	9
	Acido nalidíxico CMI ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$	Acido nalidíxico CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$	Aumento en N° de diluciones
Norfloxacin	1	16	4
Ofloxacin	0,25	8	5
Ciprofloxacina	0,03	8	8
Pefloxacin	0,5	16	5
Flerofloxacin	0,5	8	4
Sparfloxacin	0,12	64	9
Grepafloxacin	0,12	16	7
Trovafloxacin	0,06	8	7
Levofloxacin	0,12	4	5
Clinafloxacin	0,03	0,25	3

3.3.SENSIBILIDAD A OTROS ANTIMICROBIANOS.

Además de estudiar la sensibilidad *in vitro* a las quinolonas de las cepas de la colección de estudio, también se estudió su sensibilidad a otros antimicrobianos. Estos datos se muestran en la **Tabla 11** (considerando de forma conjunta la colección) y en la **Tabla 12** (desagregando la colección entre los Grupos I y II). Puede observarse en la **Tabla 11** que, de todos los antimicrobianos estudiados el que presenta una mayor actividad frente a *H. influenzae* es la cefixima (CMI₉₀ de 0.25 µg/ml).

Al comparar la actividad entre los dos grupos de cepas se observan diferencias de 2 a 3 diluciones dobles en la CMI₉₀ en el caso de la eritromicina y azitromicina (**Tabla 12**).

Tabla 11. Actividad *in vitro* de otros antimicrobianos frente a las cepas de *H. influenzae* analizadas.

Antimicrobiano	Método	Rango	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀
Amoxicilina	Microdilución	0,06-128	2	128
Amoxicilina-ácido clavulánico	Microdilución	0,06-8	1	8
Cefuroxima	Microdilución	0,12-64	1	16
Cefixima	Microdilución	0,01-0.5	0,01	0,25
Cefalotina	E-test	0,25-512	2	128
Eritromicina	Microdilución	0,25-256	8	32
	E-test	0,5-512	8	32
Azitromicina	Microdilución	0,06-128	4	8
Gentamicina	E-test	1-32	2	4
Tobramicina	E-test	0,007-32	4	4
Cotrimoxazol*	E-test	0,03-64	0,12	64
Tetraciclina	E-test	0,12-16	0,5	8

*La proporción de amoxicilina/clavulánico es de 2/1 y las de trimetropim/sulfametoxazol es de 1/19.

Tabla 12. Actividad *in vitro* de otros antibióticos frente a los dos grupos de estudio (Grupo I y Grupo II).

Antimicrobiano	Método	Grupo II			Grupo I		
		Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
		(µg/ml)					
Amoxicilina	Microdilución	0,12-128	2	128	0,06-128	4	128
Amoxicilina-ácido clavulánico	Microdilución	0,12-8	0,5	4	0,06-8	2	8
Cefuroxima	Microdilución	0,12-16	1	8	0,25-64	2	16
Cefixima	Microdilución	0,01-0,25	0,01	0,12	0,01-0,5	0,06	0,5
Cefalotina	E-test	0,25-512	1	64	0,25-512	2	128
Eritromicina	Microdilución	2-16	8	16	0,25-256	16	64
	E-test	2-8,0	4	8	0,5-512	8	512
Azitromicina	Microdilución	1-8	4	8	0,06-128	4	32
Gentamicina	E-test	1-4	2	4	1-32	2	4
Tobramicina	E-test	2-8	2	4	1-32	4	4
Cotrimoxazol	E-test	0,03-64	0,12	64	0,06-64	8	64
Tetraciclina	E-test	0,25-8	0,5	1	0,12-16	0,5	1

En el Grupo II se incluyen las cepas con CMI para ciprofloxacina ≤ 0.06 µg/ml y en el Grupo I, las cepas con CMI para ciprofloxacina ≥ 0.12 µg/ml.

Los porcentajes comparados de cepas resistentes a los distintos antibióticos en los Grupos I y II se muestran en la **Figura 9**.

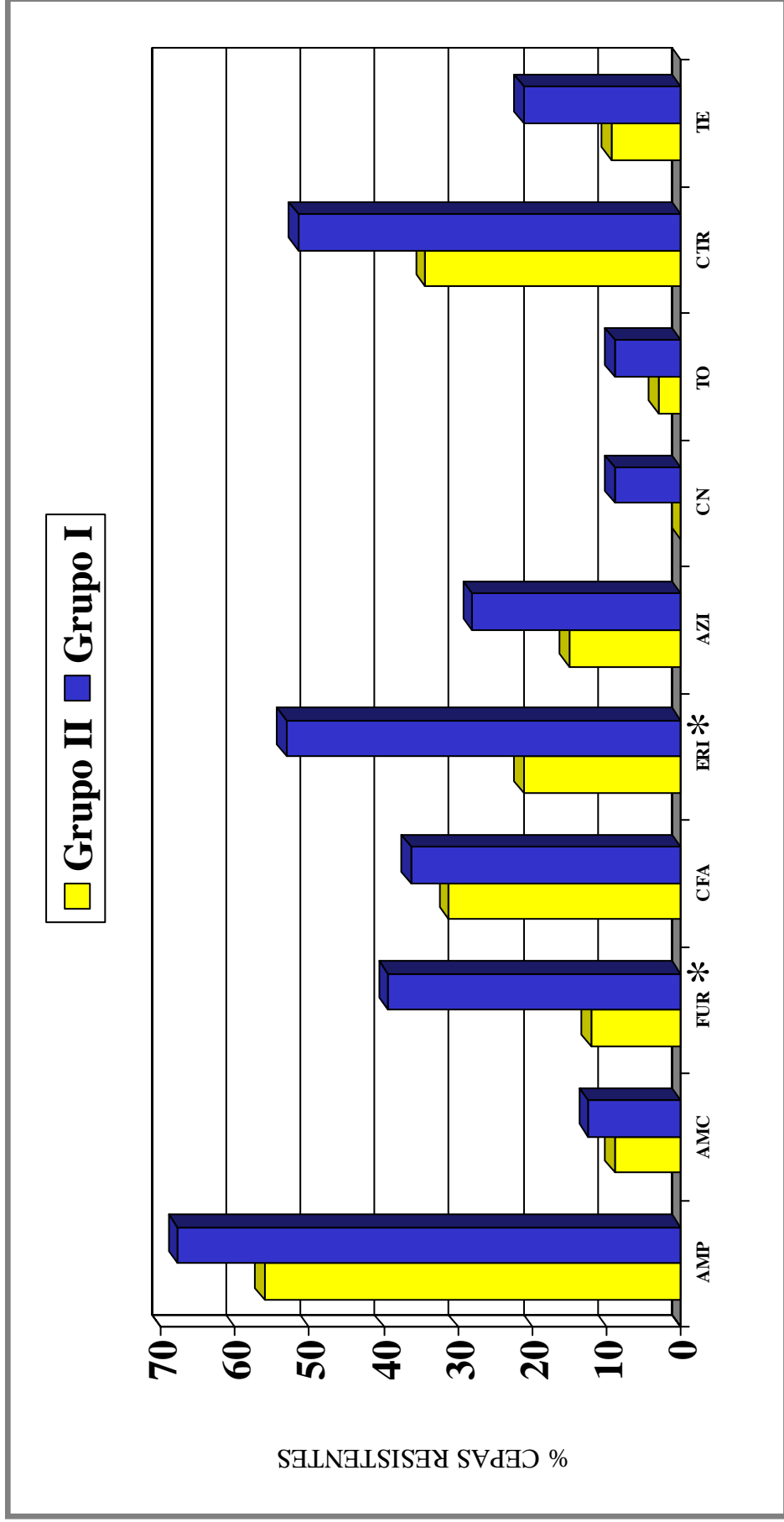


Figura 9 . Porcentajes de cepas de *H. influenzae* resistentes a los antibióticos indicados, según la distribución de las cepas entre los Grupos I y II.

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-clavulanico, FUR: cefuroxima, CFA: cefalotina, ERI: eritromicina, AZI: azitromicina, CN: gentamicina, TO: tobramicina, CTR: cotrimoxazol y TE: tetraciclina.

El asterisco indica aquellos antibióticos en los que la diferencia era estadísticamente significativa.

Puede observarse una tendencia general de las cepas del Grupo I a presentar mayor porcentaje de resistencia que las del Grupo II a todos los antibióticos estudiados (Test de Chi-cuadrado para la tendencia 12,92, $p=0.0003$).

Para la resistencia a eritromicina (utilizando como punto de corte $\geq 16 \mu\text{g/ml}$) existe una diferencia estadísticamente significativa, independientemente del método de sensibilidad utilizado (E-test: Test exacto de Fisher 14,27, $p=0,0001$; Microdilución: Test exacto de Fisher 7,10, $p=0,01$) ya que el 53,1% de cepas del Grupo I fueron resistentes a eritromicina en comparación con el 21,2% en el Grupo II. También para la resistencia a cefuroxima (según los puntos de corte del NCCLS y agrupando las cepas intermedias y resistentes) se observa una diferencia significativa (Microdilución: Test exacto de Fisher 6,418, $p=0,02$), encontrando en este caso un porcentaje de resistencia en el Grupo I de 39,4% frente a 12,1% en el Grupo II. El mismo tipo de análisis para ampicilina ($p=0,4$), amoxicilina-clavulánico ($p=0,7$), cefalotina ($p=0,8$), azitromicina ($p=0,24$), gentamicina ($p=0,24$), tobramicina ($p=0,61$), cotrimoxazol ($p=0,21$) y tetraciclina ($p=0,3$), mostró que las diferencias individuales en estos antibióticos, no fueron estadísticamente significativas.

3.4. DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LAS CEPAS DE *H. influenzae* EN FUNCIÓN DE SU SENSIBILIDAD A LAS QUINOLONAS ESTUDIADAS.

La distribución poblacional basada en la distribución de las CMI's de las quinolonas estudiadas por los distintos métodos de sensibilidad se muestra en las **Figuras 10a y 10b**. Para todas las quinolonas con excepción del ácido nalidíxico y con todos los métodos de sensibilidad utilizados, se obtiene una distribución poblacional similar. Esta distribución muestra básicamente un acúmulo de cepas agrupadas en la zona de CMI's bajas (que equivale a las cepas sensibles del Grupo II previamente seleccionado), otro grupo de cepas clínicas en la zona de CMI's altas (que se corresponde con las cepas más resistentes), y un grupo de cepas intermedio. En el caso del ácido nalidíxico, la población bacteriana total aparece distribuida esencialmente en dos grupos de cepas, sensibles o bien resistentes.

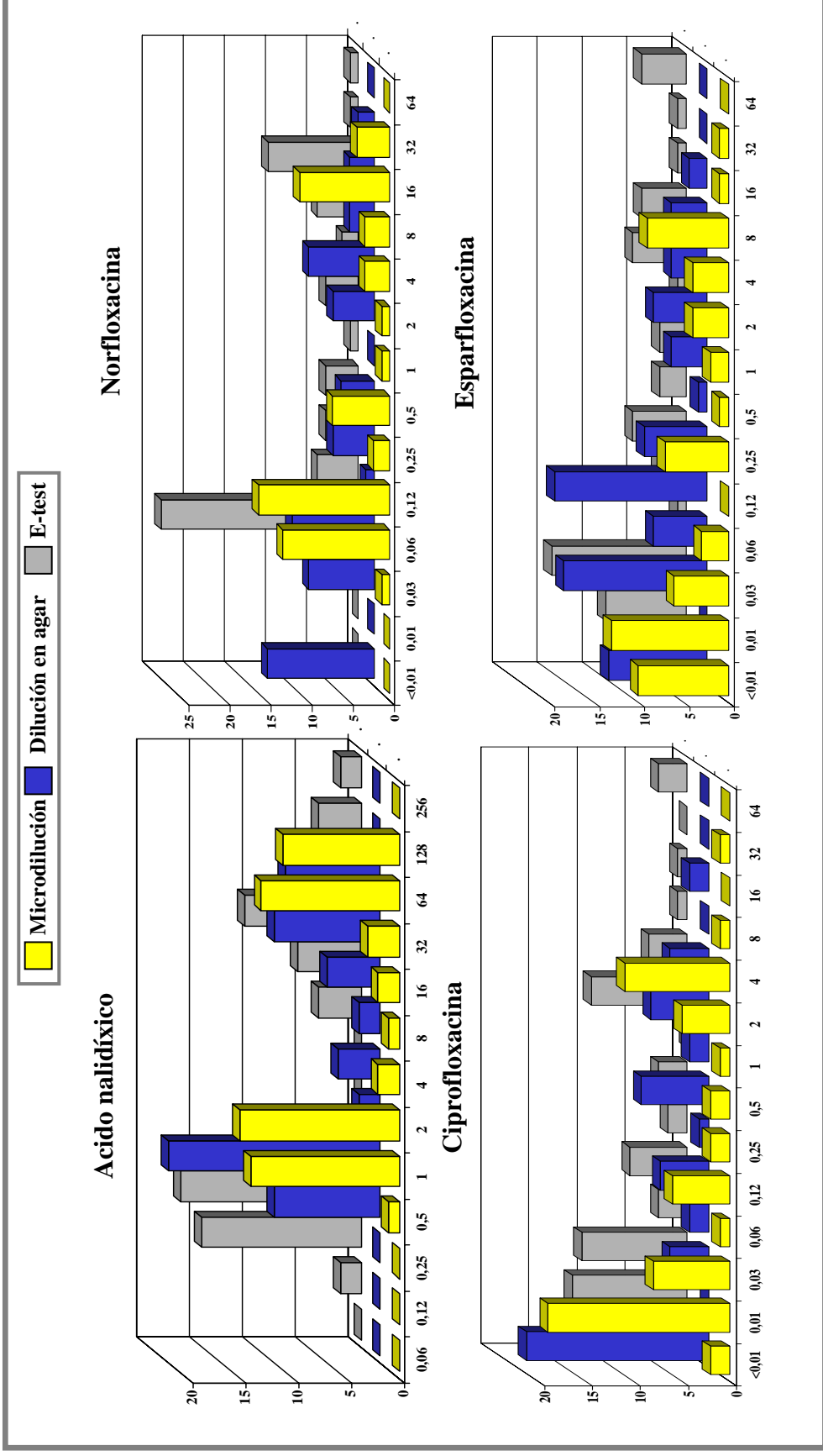


Figura 10a. Distribución poblacional en función de los valores de CMI para algunas de la quinolonas estudiadas indicando el método de sensibilidad utilizado (en ordenadas se representa el número de cepas) .

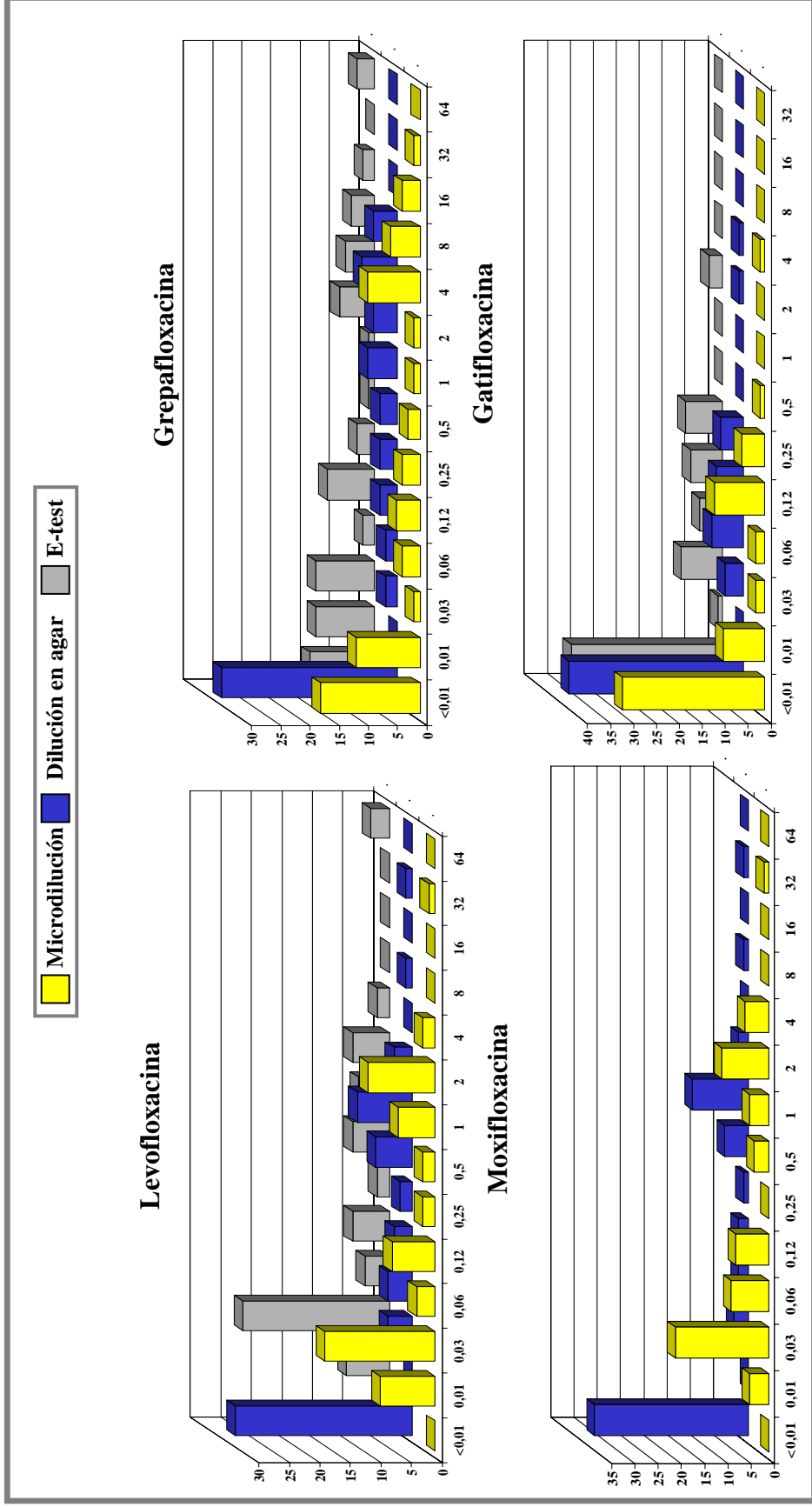


Figura 10b. Distribución poblacional en función de los valores de CMI para algunas de la quinolonas estudiadas indicando el método de sensibilidad utilizado (en ordenadas se representa el número de cepas) .

3.5. COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS QUINOLONAS EN FUNCIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS

En la **Tabla 13** se comparan los datos de sensibilidad a las quinolonas obtenidos con los tres métodos de sensibilidad utilizados. Los datos obtenidos por E-test y dilución en agar (HTM) se comparan con los obtenidos con el método de microdilución en HTM caldo, considerado actualmente como método de referencia. (NCCLS, 2001).

(insertar tabla 13)

El porcentaje de concordancia con la técnica de referencia fue del 86,4 % para el E-test (rango: 30,6-100%) y 82,1 % para la técnica de dilución en agar (rango: 58,0-90%). El coeficiente de correlación (r) fue de 0.96 para las dos técnicas comparadas con el método de referencia. Tanto el método del E-test para el ácido nalidíxico como la dilución en agar para la norfloxacin dieron valores de CMIs mas bajos que la técnica de referencia. Las discrepancias observadas con la técnica de E-test, son en su mayoría debidas al ácido nalidíxico, ya que el porcentaje de concordancia con la técnica de referencia excluyendo los datos del ácido nalidíxico, pasa del 86,4% al 95.1% (**Tabla 13**).

Tabla 13. Comparación entre los resultados de CMI obtenidos según los métodos de E-test y dilución en agar utilizando la microdilución como método de referencia.

Método Quinolona (No) ^a	N° de cepas indicando su discrepancia de CMI por los distintos métodos respecto a CMI de referencia (log ₂)							% Concordancia	Coeficiente de correlación (Ec. de regresión)
	>-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2		
E-test									
Acido nalidíxico (62)	15	28	9	8	2	-	-	30,6	
Norfloxacin (62)	-	-	33	28	1	-	-	100	
Ciprofloxacina (62)	1	3	21	30	7	-	-	93,5	
Esparfloxacina(62)	1	-	10	28	19	4	-	92,0	
Grepafloracina (62)	1	1	14	26	20	-	-	96,8	
Levofloxacina (62)	1	1	23	28	9	-	-	96,8	
Clinafloxacina (62)	-	-	5	25	29	3	-	95,2	
Total (434)	19 (4,4) ^b	33 (7,6)	115 (26,5)	173 (39,9)	87 (20,0)	7 (1,6)	- (0,0)	86,4	0,961 (y=0,886X-0,363)
Dilución en agar									
Acido nalidíxico (59)	2	6	36	15	-	-	-	86,4	
Norfloxacin (57)	1	22	25	9	-	-	-	58,0	
Ciprofloxacina (58)	2	3	21	27	3	2	-	88,0	
Esparfloxacina (59)	-	3	7	31	12	5	1	85,0	
Grepafloracina (59)	1	5	15	30	5	1	2	85,0	
Moxifloxacina (59)	1	9	38	10	-	-	1	81,3	
Levofloxacina (59)	1	4	32	20	1	1	-	90,0	
Clinafloxacina (30)	-	3	6	14	5	1	1	86,2	
Total (440)	8 (1,8)	55 (12,5)	180 (40,9)	156 (35,4)	26 (5,9)	10 (2,3)	5 (1,1)	82,1	0,959 (y=0,907X-0,574)

^a Los valores entre paréntesis es el número de combinaciones organismo- agente antimicrobiano.

^b Los valores entre paréntesis son los porcentajes de cepas indicando su discrepancia de CMI por los distintos métodos respecto a CMI de referencia (log₂).

4. ANÁLISIS DE LAS QRDRs DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV.

La amplificación mediante PCR de los fragmentos de ADN de las regiones que incluyen las QRDRs de la topoisomerasa II (*gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) produjeron amplicones (**Figura 11**), que posteriormente se purificaron, secuenciaron y se analizaron.

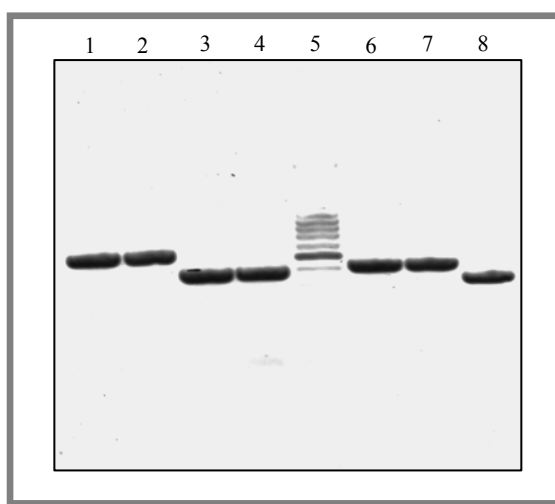


Figura 11. Análisis electroforético de los fragmentos amplificados correspondientes al QRDR de *gyrA* (carril 3 y 4), *gyrB* (carril 6 y 7), *parC* (carril 1 y 2) y *parE* (carril 8). El carril 5 corresponde al marcador de pesos moleculares entre 100 y 3000 bp, la banda más intensa corresponde al fragmento de 500 bp.

En *gyrA* se consideró como QRDR el fragmento comprendido entre las posiciones 67 a 106, en *parC* entre las posiciones 98 a 107 (homólogos a los descritos en *E. coli* Weigel, L. M., 2002).

Para *gyrB* y *parE* se consideró como QRDR una región altamente conservada en múltiples microorganismos y homóloga para ambos genes, en la que se han encontrado mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas, se cree que es un dominio responsable de las interacciones con *gyrA* y *parC*, respectivamente (Breines, D. M., 1997). Dicha región en *gyrB* comprende desde la posición 404 a la 490 y en *parE* desde la posición 395 a 460.

4.1. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES PRESENTES EN LAS SECUENCIAS DE LAS QRDR DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV.

Se realizó el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de las distintas subunidades de las topoisomerasas entre la cepa estándar *H. influenzae* Rd sensible a las quinolonas (Fleischmann, R. D., 1995) y las 62 cepas incluidas en el estudio que presentaban distintos niveles de sensibilidad a fluoroquinolonas.

Los cambios en las secuencias de ADN que condujeron a sustituciones aminoacídicas en la secuencia de las QRDRs de las topoisomerasas II o IV se indican en la **Tabla 14**

N° de cepa	Aminoácidos en la posición indicada dentro de las QRDRs																				
	CMI (µg/ml)					Aminoácidos en la posición indicada dentro de las QRDRs															
	NAL	CI	LE	MO		GyrA			GyrB				ParC			ParE					
83	84	88	88	88	440	464	467	469	489	472	82	83	84	88	88	405	420	444	452	458	460
Asp	Ser	Asp	Asp	Asp	Asp	Met	Ser	Glu	Asp	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Glu	Gly	Asp	Ile	Pro	Ser	Glu
55	28	4,0	2,0	4,0	-	-	-	-	-	Ile	-	-	Ile	-	-	-	-	-	-	-	-
56	128	4,0	2,0	4,0	-	-	-	Asp	-	-	-	-	Ile	-	-	-	-	-	-	-	-
57	128	8,0	4,0	4,0	-	-	-	-	-	Ile	-	-	Ile	-	-	Asn	-	-	-	-	-
58	128	8,0	4,0	4,0	-	-	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	-	-	-	Ser	Ala	-
59	32	16	F	F	-	-	-	-	-	Ile	-	-	-	Lys	-	Asn	-	-	-	-	-
60	64	16	16	8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Ile	-	Asn	-	-	-	-	-	-
61	2,0	32	32	32	-	-	-	-	-	-	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	64	32	32	32	-	-	-	-	-	Ile	-	-	-	Lys	-	Asn	-	-	-	-	-

*Cepas ATCC, 1 ATCC 51907 Rd, 19 ATCC 49247, - no existen cambios respecto a *H. influenzae* 51907 Rd, NA: ácido nalidíxico, CI: ciprofloxacino, LE: levofloxacino, MO: moxifloxacino.

4.1.1. Mutaciones presentes en la secuencia proteica del QRDR de la topoisomerasa II.

Del total de las 62 cepas secuenciadas en 31 de ellas no se observó ningún cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA, 20 cepas presentaban un único cambio y 11 cepas, dos cambios. Las únicas posiciones en que se encuentran modificaciones son Asp83, Ser84 y Asp88 (**Tabla 14**).

En las cepas que presentaban un único cambio la posición que se modifica con más frecuencia es Asp88 (65%), y los cambios encontrados son Asp88 a Asn (69.2%), Asp88 a Tyr (23%) y Asp88 a Ala (7.7%). La otra posición que se ve modificada es Ser84 (35%), y los cambios encontrados son Ser84 a Phe (43%) y Ser84 a Leu (57%).

En las cepas con dos cambios la combinación mas frecuente es Ser84 a Leu junto con Asp88 a Asn (45,5%), seguida de Ser84 a Tyr y Asp88 a Asn (18,2%), y con igual frecuencia (9%) Asp83 a Gly y Ser84 a Asp, Ser84 a Ile y Asp88 a Asn, Ser84 a Leu y Asp88 a Tyr, Ser84 a Phe y Asp88 a Tyr. La mayoría de las cepas con dos sustituciones en GyrA presentan una CMI para ciprofloxacina superior a 2 µg/ml.

Del total de las cepas secuenciadas, en 45 no hay ningún cambio aminoacídico en la QRDR de GyrB. En 16 cepas se observa un único cambio y en dos cepas, dos. Las posiciones afectadas por dichas modificaciones son seis: Asp440, Met464, Ser467, Glu469, Asp489 y Thr472. La mutación que aparece con mas frecuencia es Thr472 a Ile (43.75%), seguida de Glu469 a Asp (31.25%), Ser467 a Phe (6.25%), Asp440 a Asn (6.25%), Asp489 a Asn (6.25%) y Thr472 a Ile (6.25%). Todas las cepas que presentan cambios en el QRDR de GyrB, excepto dos con una CMI para ciprofloxacina de 0.12 µg/ml, tiene también modificaciones en el QRDR de GyrA (**Tabla 14**).

4.1.2. Mutaciones presentes en la secuencia proteica del QRDR de la topoisomerasa IV.

Del total de las 62 cepas secuenciadas, en 38 de ellas no se detectó ningún cambio aminoacídico en la QRDR de ParC y en 24 se encontró un cambio. Cuatro fueron las posiciones en que se hallaron cambios: Gly82, Asp83, Ser84 y Glu88 (**Tabla 14**).

La posición que se modifica con más frecuencia es Ser84 (62,5%). En dicha posición se detectan dos cambios a Ile y Arg, de los que el más frecuente es el primero. En la posición Glu88 se detecta un único cambio a Lys (17%), en la posición Asp83 se

detectan dos cambios a Asn y Gly. En la posición Gly82 se detecta un cambio a Asp (12,5%). Todas las cepas con modificaciones en la QRDR de ParC, tienen también mutaciones en la QRDR de GyrA, y además poseen una CMI para ciprofloxacina superior a 0,5 µg/ml.

En 54 de las cepas secuenciadas no encontramos ningún cambio aminoacídico en la QRDR de ParE, en 7 observamos un único cambio y en una dos cambios. Las posiciones en que se observaron los citados cambios son seis: Gly405, Asp420, Ile444, Pro452, Ser458 y Glu460 (**Tabla 14**).

La posición que se modifica con más frecuencia es Asp420 a Asn (57.1%); otros cambios observados son Gly405 a Asn, Glu460 a Lys e Ile444 a Phe. La combinación de dos modificaciones detectada en una única cepa era Pro452 a Ser y Ser458 a Ala.

Todas las cepas con modificaciones en la QRDR de ParE tienen también modificaciones en la QRDR de GyrA, y una CMI para ciprofloxacina superior a 0,5 µg/ml. Solo hay una cepa claramente sensible a ciprofloxacina (nº 19, ATCC 49247) en la que se observa una mutación (Gly405 a Asn). La modificación mas frecuente en ParE es Asp420 a Asn, encontrada en cuatro cepas cuya CMI a ciprofloxacina osciló entre los 4 y 32 µg/ml (**Tabla 14**).

4.2. ANÁLISIS DE LA MUTACIONES PRESENTES EN LAS SECUENCIAS FUERA DE LAS REGIONES QRDR DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV.

Todas las mutaciones que condujeron a una sustitución aminoacídica en las secuencias fuera de las QRDRs de la topoisomerasa II o IV se indican en la **Tabla 15**.

El análisis del fragmento de GyrA secuenciado mostró que solo en cinco cepas apareció una única mutación fuera de la QRDR en la posición Gly142 cambiando a Lys, esta mutación aparece tanto en cepas con sensibles a ciprofloxacina (cepa 6) como en cepas resistentes (cepa 61).

En ParC las posiciones que muestran cambios aminoacídicos fueron ocho: Pro113, Ser133, Asn138, Thr144, Ala196, Val197, Gly206 y Val210. La posición más frecuentemente sustituida fue Gly206. Un total de 32 cepas tuvieron una única mutación, doce dos mutaciones, una tres y otra cuatro. En las cepas con una mutación, la más frecuente fue Gly206 a Arg (90,6%), esta mutación aparece tanto en cepas sensibles a ciprofloxacina como en cepas con sensibilidad reducida. La otra mutación única fue Asn138 a Ser (9,4%). Las combinaciones de dos cambios aminoacídicos que se encontraron fueron cuatro distintas: Gly206 a Arg y Val210 a Ile; Ser133 a Ala y Gly206

a Arg; Ser133 a Ala y Gly206 a Lys; Asn138 a Ser y Ala196 a Thr. La cepa que presentaba tres modificaciones, estas fueron: Pro113 a Ala, Val197 a Asp y Gly206 a Lys y en la cepa con cuatro cambios estos fueron: Pro113 a Gln, Asn138 a Ser, Thr144 a Ala y Gly206 a Arg (**Tabla 15**).

*Cepas ATCC, 1 ATCC 51907 Rd, 19 ATCC 49247, - no existen cambios respecto a *H. influenzae* 51907 Rd, NA: ácido nalidíxico, CI: ciprofloxacino, LE: levofloxacino, MO: moxifloxacino.

A partir de los fragmentos secuenciados de *gyrA*, *gyrB*, *parC*, y *parE*, se obtiene un dendograma de similitud genética entre las secuencias proteicas (**Figura 12a, 12b, 12c, 12e**). En el que se observa que para GyrA y ParC se agrupan claramente las cepas con pérdida de sensibilidad a quinolonas, pero esto no sucede en GyrB y ParE.

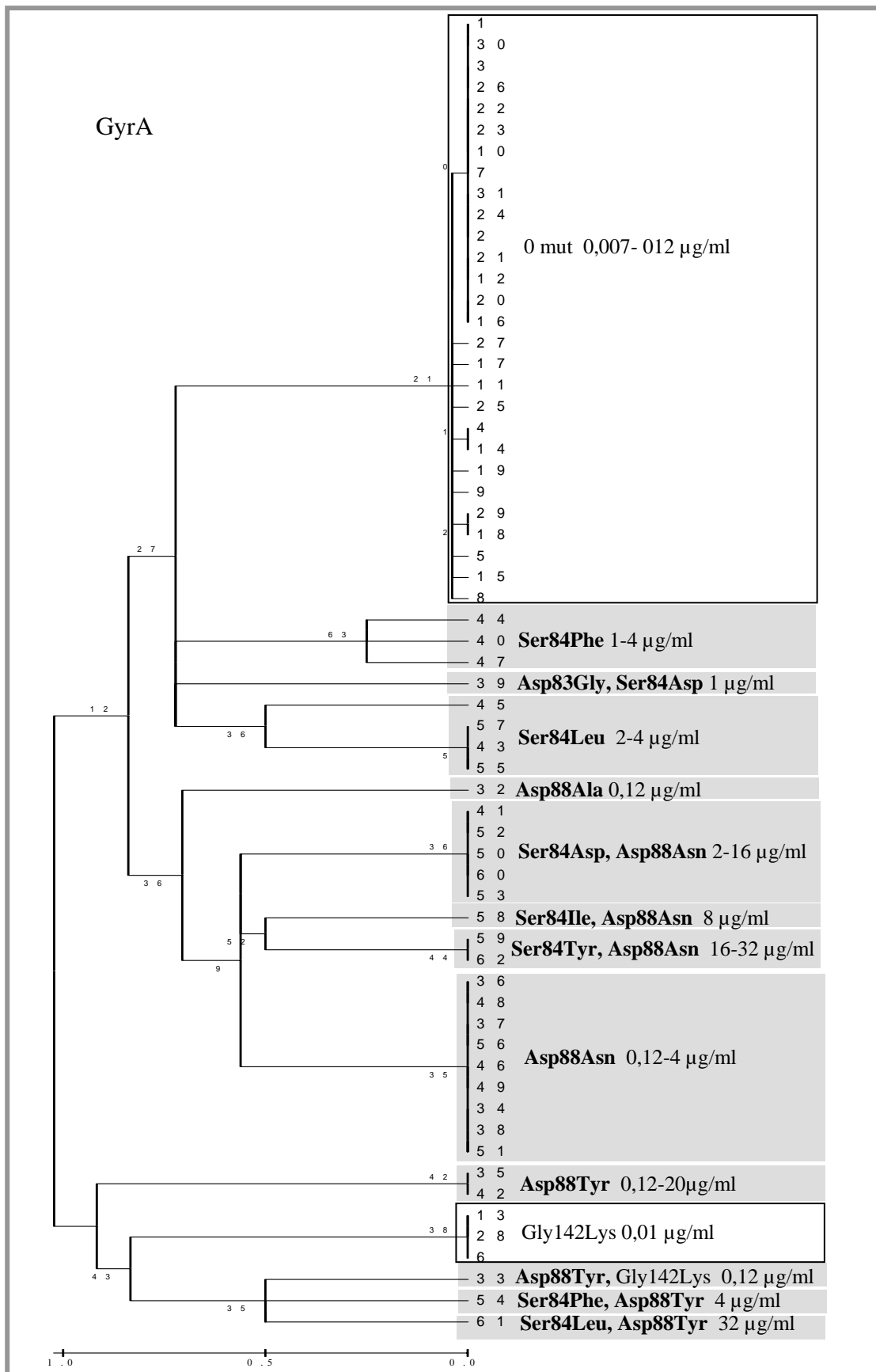


Figura 12a. Dendrograma que muestra la similitud genética entre las secuencias proteicas de GyrA. En sombra gris se indican las cepas del Grupo I y sin sombra las del Grupo II. En negrita se resaltan las mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas.

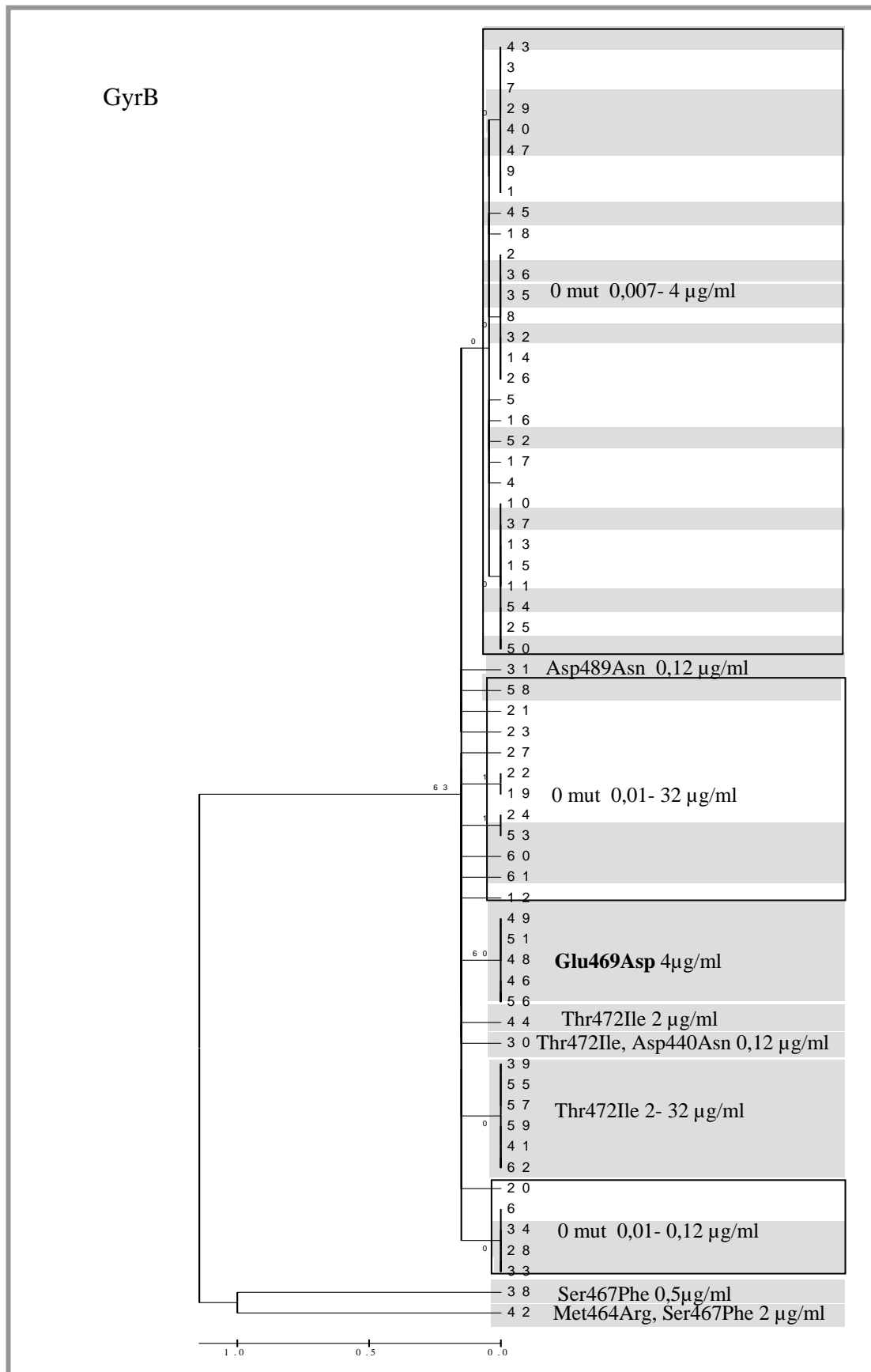


Figura 12b. Dendrograma que muestra la similitud genética entre las secuencias proteicas de GyrB. En sombra gris se indican las cepas del Grupo I y sin sombra las del Grupo II. En negrita se resaltan las mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas.

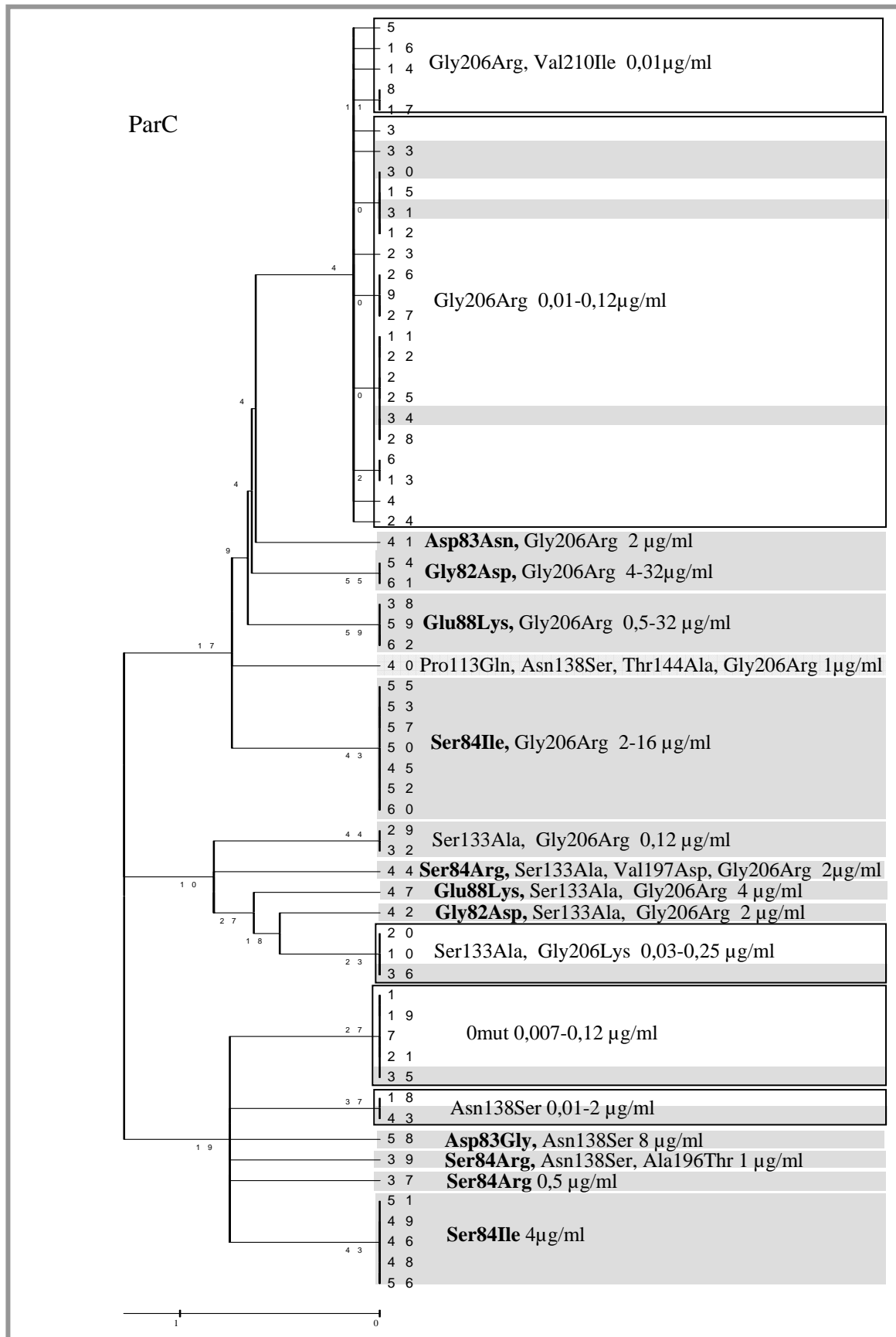


Figura 12c. Dendrograma que muestra la similitud genética entre las secuencias proteicas de ParC. En sombra gris se indican las cepas del Grupo I y sin sombra las del Grupo II. En negrita se resaltan las mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas.

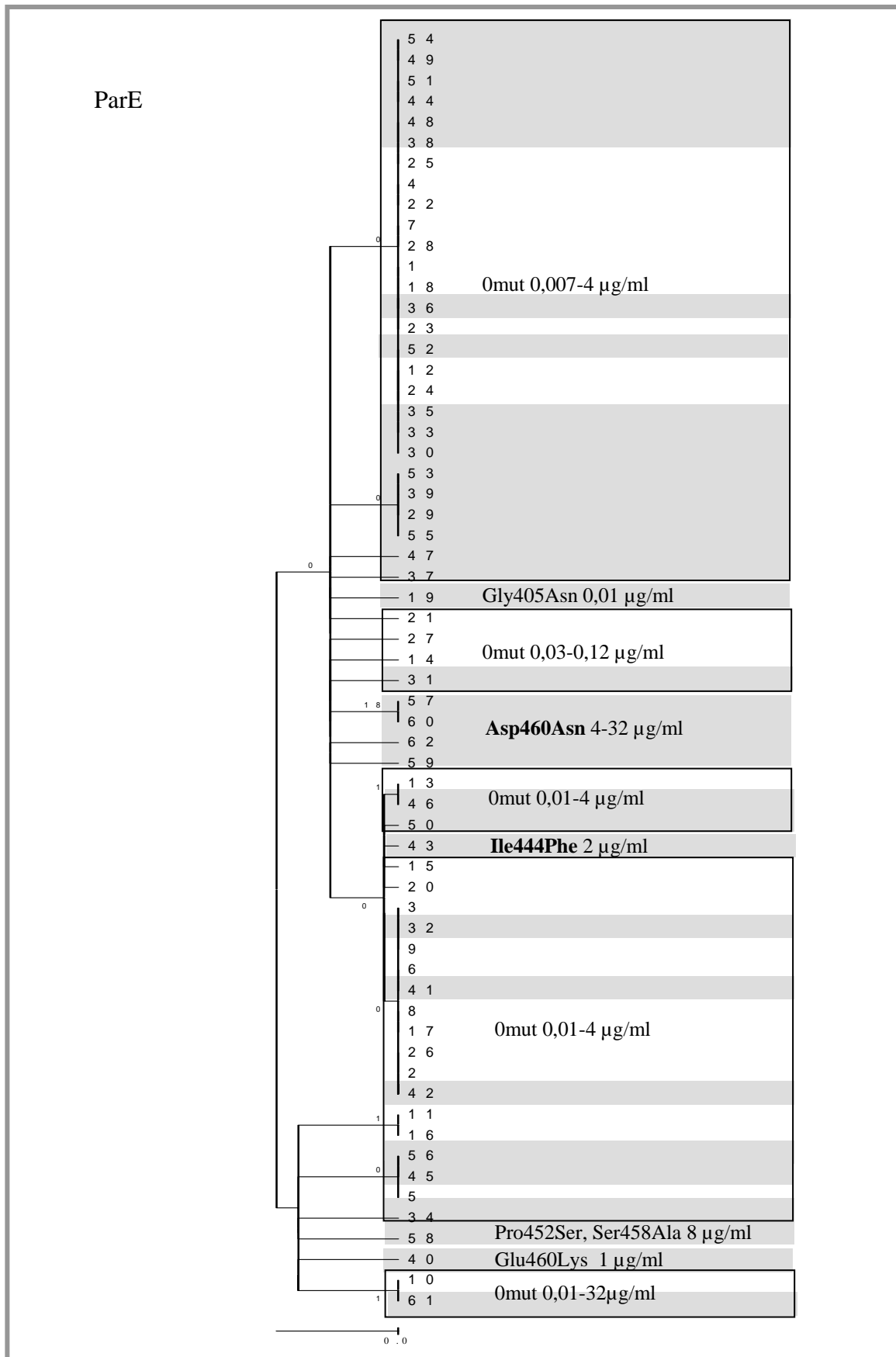


Figura 12e. Dendrograma que muestra la similitud genética entre las secuencias proteicas de ParE. En sombra gris se indican las cepas del Grupo I y sin sombra las del Grupo II. En negrita se resaltan las mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas.

5. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV

Los aminoácidos que constituyen las subunidades A y B de las dos topoisomerasas II y IV de las cepas clínicas de *H. influenzae*, eran frecuentemente codificadas por distintos codones a los descritos en la cepa estándar ATCC 51079 Rd. Estas diferencias en los codones se producían en un único nucleótido del triplete, denominándose SNP (“*single nucleotide polymorphisms*”). Algunas de ellas no originaban cambios en la estructura proteica de estas enzimas esenciales en la topología del DNA bacteriano, por lo que se denominan *mutaciones silentes* o también “*synonymous SNPs*” (sSNPs) (Cargill, M., 1999), otras sí generaban un cambio en la estructura proteica a las que denominaremos *mutaciones no silentes* que en su mayoría se asociaban a resistencia a quinolonas. En adelante, nos referiremos a estas mutaciones silentes como SNPs, tras la aclaración anterior y se hará una descripción de las halladas.

Al analizar el porcentaje de variabilidad debido a mutaciones silentes de los genes estudiados, *gyrA*, *parC*, *gyrB* y *parE* en comparación con la cepa 51097 Rd (Fleischmann, R. D., 1995), se observó que todos ellos presentaban una variabilidad similar en torno al 8-10% (referida en número de posiciones variables por cada 100 pb), como se indica en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Número de sitios polimórficos y porcentaje de variabilidad en cada uno de los genes estudiados.

Gen	Tamaño (pb)	N° de sitios polimórficos		% de variabilidad (100 pb)	
		Silentes	No silentes	Silentes	No silentes
<i>gyrA</i>	323	26	18	8	5,6
<i>parC</i>	508	47	27	9,2	5,3
<i>gyrB</i>	402	35	10	8,7	2,5
<i>parE</i>	306	30	11	9,8	3,6

En lo que se refiere a la frecuencia de aparición de los citados SNPs, la mayor parte eran de baja frecuencia de aparición (**Tabla 17**). Para los cuatro genes, los polimorfismos de alta frecuencia de aparición se distribuyen en toda la colección de cepas, tanto en el Grupo I como en el Grupo II, como se puede observar en la **Figura 13**.

Tabla 17. Frecuencia de aparición de los diferentes polimorfismos silentes detectados en los fragmentos secuenciados de las topoisomerasas II y IV.

Gen	Frecuencia de aparición de los polimorfismos (Nº de SNPs)			
	Baja (<25%)	Media (25%- 50%)	Alta (50%- 75%)	Muy alta (≥75%)
<i>gyrA</i>	17	6	3	0
<i>parC</i>	38	6	3	0
<i>gyrB</i>	20	9	6	0
<i>parE</i>	25	4	1	0

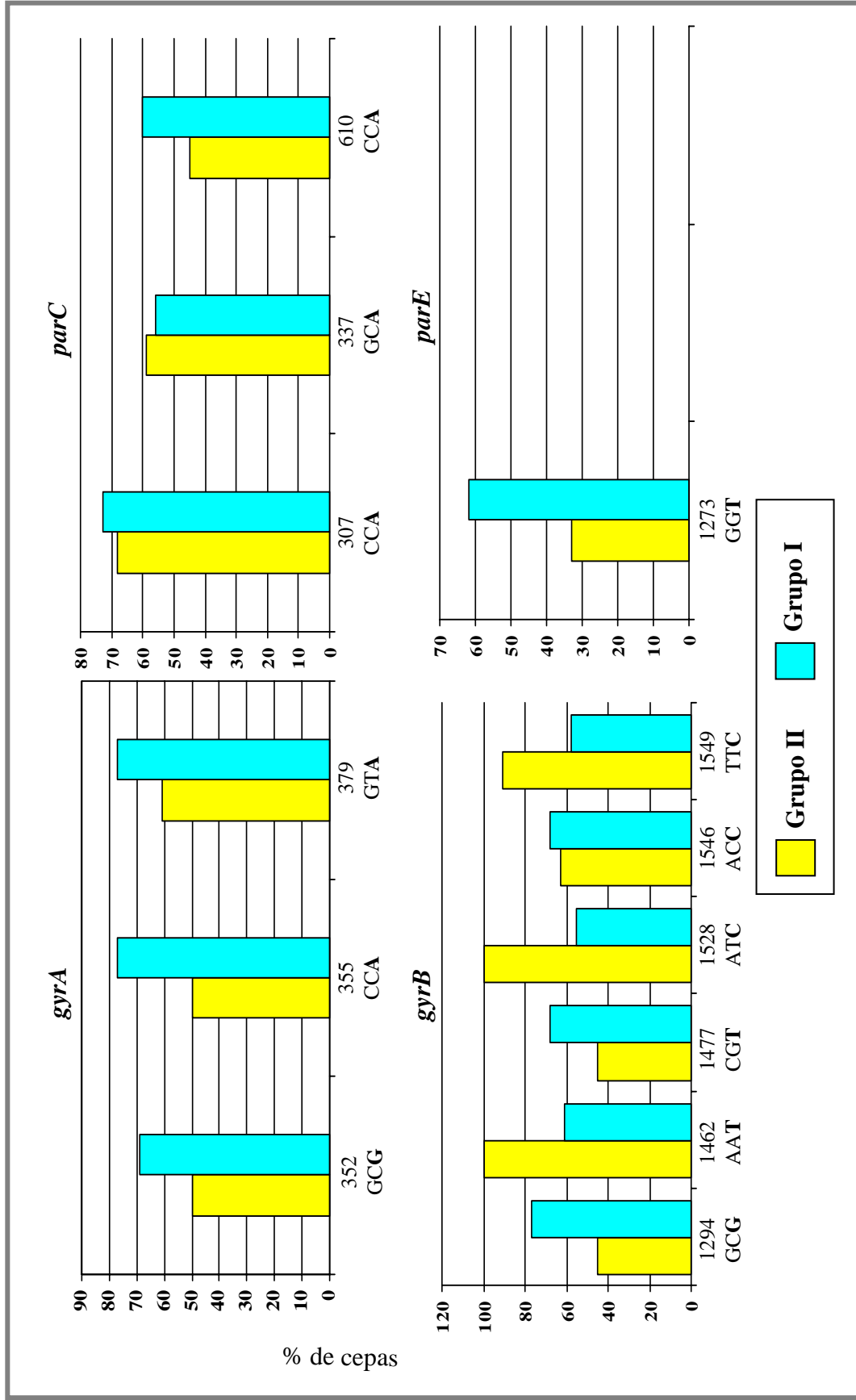


Figura 13. Relación de los polimorfismos de alta frecuencia identificados en *gyrA*, *parC*, *gyrB*, y *parE* y la contribución a cada uno de ellos de las cepas de los Grupos I y II. En abscisas se indica la posición numérica del nucleótido que cambia y el codón en que se encuentra.

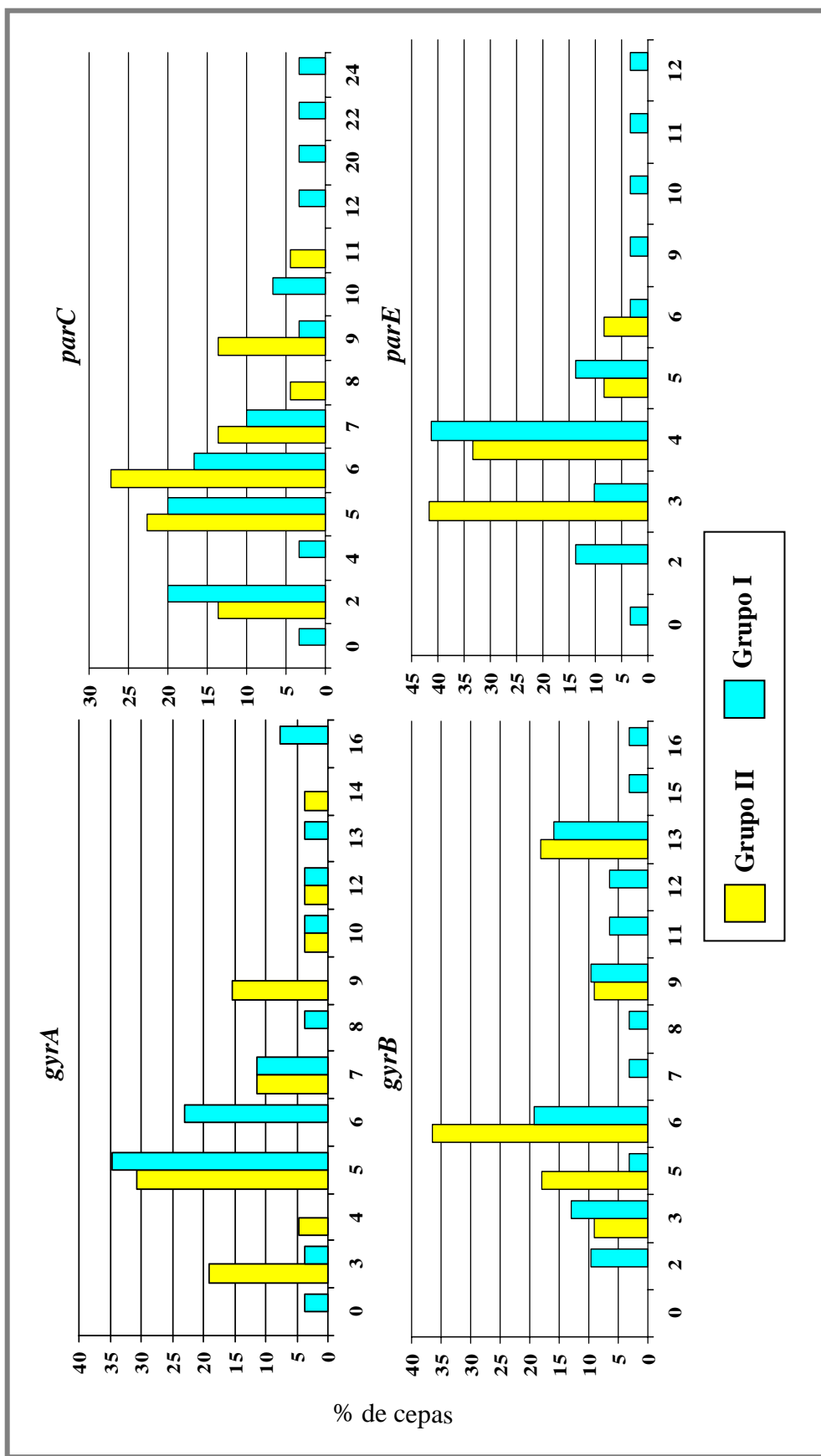


Figura 14. Distribución de las cepas de estudio en función del número de SNPs encontrados en *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. En abscisas se representa el número de SNPs.

El número de SNPs que se acumulaban por cepa para *gyrA*, oscilaba entre 0 y 16, en *parC* entre 0 y 24, en *gyrB* entre 2 y 16 y en *parE*, entre 0 y 12. En la **Figura 14** se representa la distribución de cepas del estudio en función del número total de SNPs encontrados al analizar sus secuencias en cada uno de los genes estudiados.

Para *parC* las cuatro cepas que presentaban más de 20 SNPs acumulados tenían una CMI a ciprofloxacina $> 1 \mu\text{g/ml}$ y pertenecían todas al fenotipo hipermutador; para *parE*, las cuatro cepas con más de 9 SNPs acumulados pertenecían al Grupo I de estudio y todas menos la que presentaba 11 SNPs eran hipermutadoras. Esto no sucedía para *gyrA* y *gyrB*, ya que las cepas con valores de SNPs acumulados altos, eran cepas de ambos grupos de estudio (Grupo I y II).

Al analizar los SNPs en los fragmentos secuenciados de cada cepa, el número de alelos distintos para cada gen fue, en *gyrA* 18 (34.6%), en *parC* 25 (48 %), en *gyrB* 25 (59%) y en *parE* 21 (51%). El gen que presentaba una mayor variabilidad de perfiles alélicos era *gyrB*, seguido por *parE*, *parC* y *gyrA*, en orden decreciente. El grado de similitud genética entre los distintos alelos de cada gen así como su frecuencia de aparición se muestra en las **Figuras 15a .y 15b** (para cada gen cada alelo distinto se ha identificado con un número correlativo).

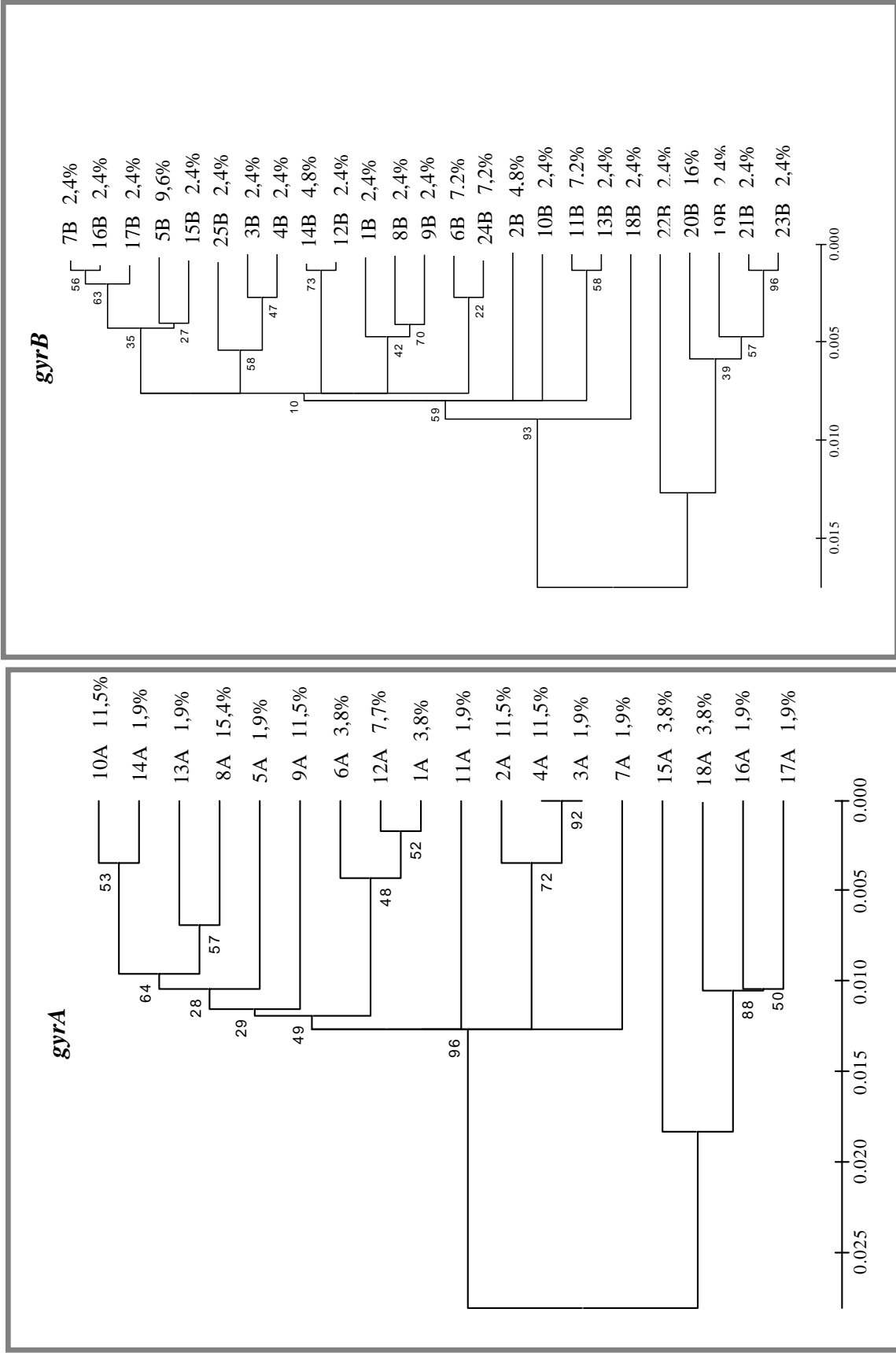


Figura 15a. Dendrograma de similitud genética entre las distintas secuencias alélicas observadas en *gyrA* y *gyrB*, indicando la frecuencia de aparición de cada una de ellos.

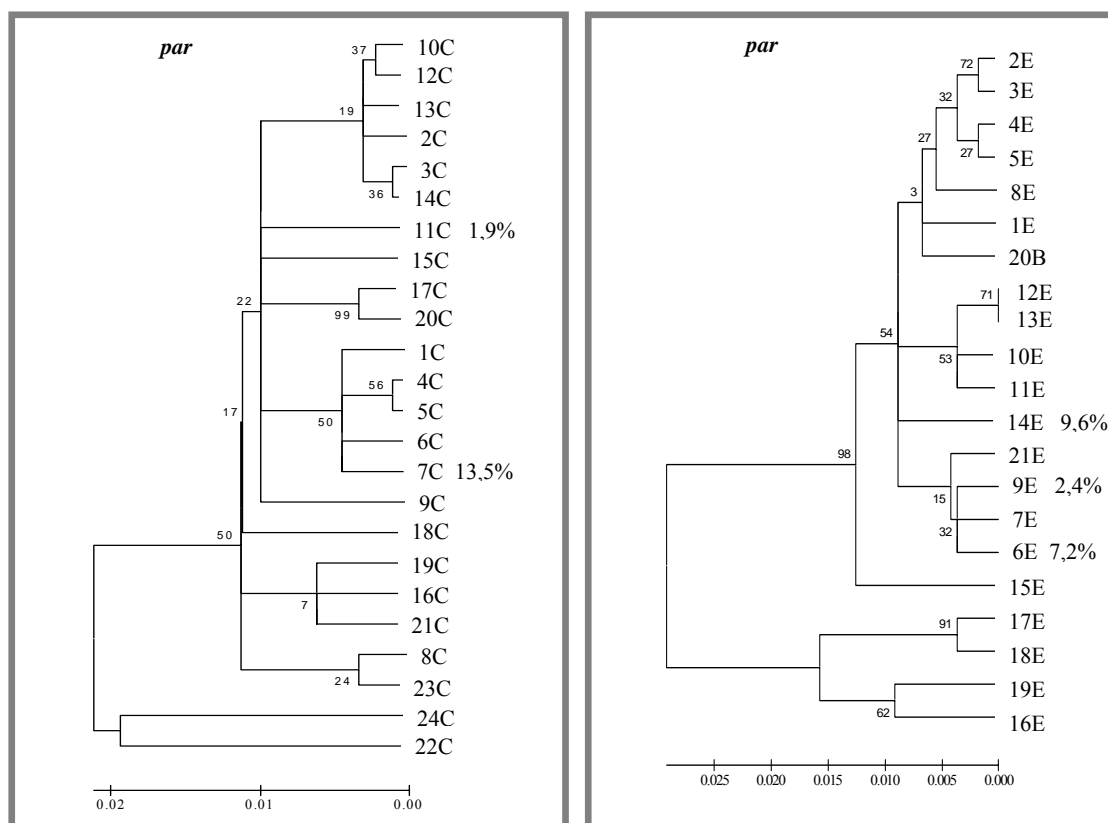


Figura 15b. Dendrograma de similitud genética entre las distintas secuencias alélicas observadas en *parC* y *parE*, indicando la frecuencia de aparición de cada una de ellas.

6. DETERMINACIÓN DE “PUNTOS DE CORTE MICROBIOLÓGICOS” PARA ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINA, LEVOFLOXACINA Y MOXIFLOXACINA.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la colección de cepas de este estudio (**Tabla 14**) así como la literatura publicada al respecto (*Vila, J., 1999, Georgiou, M., 1996*), sugieren que la subunidad A de la topoisomerasa II (GyrA) y la subunidad A de la topoisomerasa IV (ParC) son la primera y segunda diana respectivamente, en el mecanismo de acción de las quinolonas en *H. influenzae*. En base a este hecho hemos intentado establecer “puntos de corte microbiológicos” que permitan diferenciar mediante CMI y/o diámetro del halo de inhibición, las cepas que presentan un mecanismo de resistencia, debido a mutaciones en las QRDRs de GyrA y ParC, de las cepas sin el citado mecanismo de resistencia.

La propuesta de “puntos de corte microbiológicos” para ácido nalidíxico, ciprofloxacina, moxifloxacina y levofloxacina, se basó en combinar datos de sensibilidad a las citadas quinolonas determinados por microdilución (*NCCLS, 2001*), los halos de

inhibición a las mismas y las mutaciones en las QRDRs de GyrA y ParC. Como se puede observar en los datos de la **Tabla 18**, en 34 cepas no hubo cambios aminoacídicos en los QRDRs de GyrA y ParC, mientras que en el grupo de 28 cepas con mutaciones, siete presentaban un único cambio aminoacídico en el QRDR de GyrA (posición 84 o 88), trece tenían una mutación en el QRDR de GyrA asociada con un cambio aminoacídico en el QRDR de ParC y ocho cepas presentaban dos modificaciones en el QRDR de GyrA (afectando a distintas combinaciones de posiciones 83, 84 y 88) asociadas con un cambio en el QRDR de ParC (los datos de la Tabla 18, se han extraído de la Tabla 14, con el fin de facilitar la comprensión de este apartado) .

Tabla 18 . Datos de sensibilidad a cuatro quinolonas y cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC en los aislamientos seleccionados de *Haemophilus influenzae* para la propuesta de “puntos de corte microbiológicos”.

Número de cepas	Rango o CMI (µg/ml)				Aminoácido en la posición indicada en el QRDR de gyrA			Aminoácido en la posición indicada en el QRDR de parC			
	CI	MO	LE	NAL	83	84	88	82	83	84	88
ATCC 51907	0,007	0,03	0,03	0,5	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Ser	Glu
ATCC 49247	0,01	0,03	0,03	2,0	-	-	-	-	-	-	-
34*	0,007-0,12	0,01-0,12	0,01-0,12	1,0-64	-	-	-	-	-	-	-
1	0,12	0,06	0,06	16	-	-	Ala	-	-	-	-
1	0,12	0,06	0,12	2,0	-	-	Tyr	-	-	-	-
1	0,12	0,12	0,12	64	-	-	Tyr	-	-	-	-
1	0,25	0,12	0,12	64	-	-	Asn	-	-	-	-
1	1,0	1,0	1,0	4,0	-	Phe	-	-	-	-	-
1	2,0	2,0	1,0	128	-	Leu	-	-	-	-	-
1	4,0	4,0	2,0	2,0	-	Phe	-	-	-	-	-
1	0,5	0,5	0,5	32	-	-	Asn	-	-	-	Lys
1	0,5	0,5	0,25	128	-	-	Asn	-	-	Arg	-
1	2,0	2,0	1,0	64	-	-	Tyr	Asp	-	-	-
1	2,0	1,0	2,0	64	-	Leu	-	-	-	Ile	-
1	2,0	1,0	1,0	128	-	Phe	-	-	-	Arg	-
1	4,0	1,0	2,0	64	-	-	Asn	-	-	Ile	-
1	4,0	2,0	2,0	64	-	-	Asn	-	-	Ile	-
1	4,0	2,0	2,0	64	-	-	Asn	-	-	Ile	-
1	4,0	2,0	2,0	128	-	-	Asn	-	-	Ile	-
1	4,0	4,0	2,0	128	-	-	Asn	-	-	Ile	-
1	4,0	4,0	2,0	128	-	Leu	-	-	-	Ile	-
1	4,0	4,0	4,0	128	-	Leu	-	-	-	Ile	-
1	4,0	2,0	2,0	64	-	Phe	-	-	-	-	Lys
1	1,0	1,0	0,5	64	Gly	Asp	-	-	-	Arg	-
1	4,0	2,0	2,0	64	-	Leu	Asn	-	-	Ile	-
1	2,0	2,0	2,0	128	-	Leu	Asn	-	-	Ile	-
1	8,0	2,0	2,0	128	-	Leu	Asn	-	-	Ile	-
1	8,0	4,0	4,0	128	-	Ile	Asn	-	Gly	-	-
1	16	8,0	16	64	-	Leu	Asn	-	-	Ile	-
1	16	2,0	1,0	64	-	Leu	Asn	-	Asn	-	-
1	32	32	32	2,0	-	Leu	Tyr	Asp	-	-	-

CI: ciprofloxacina, LE: levofloxacina, MO: moxifloxacina, NAL: nalidixicoácido

* En dos de estas cepas, con una CMI a NAL de 32 µg/nml encontramos mutaciones en el QRDR de GyrB: Asp 489 a Asn y Thr 472 a Ile

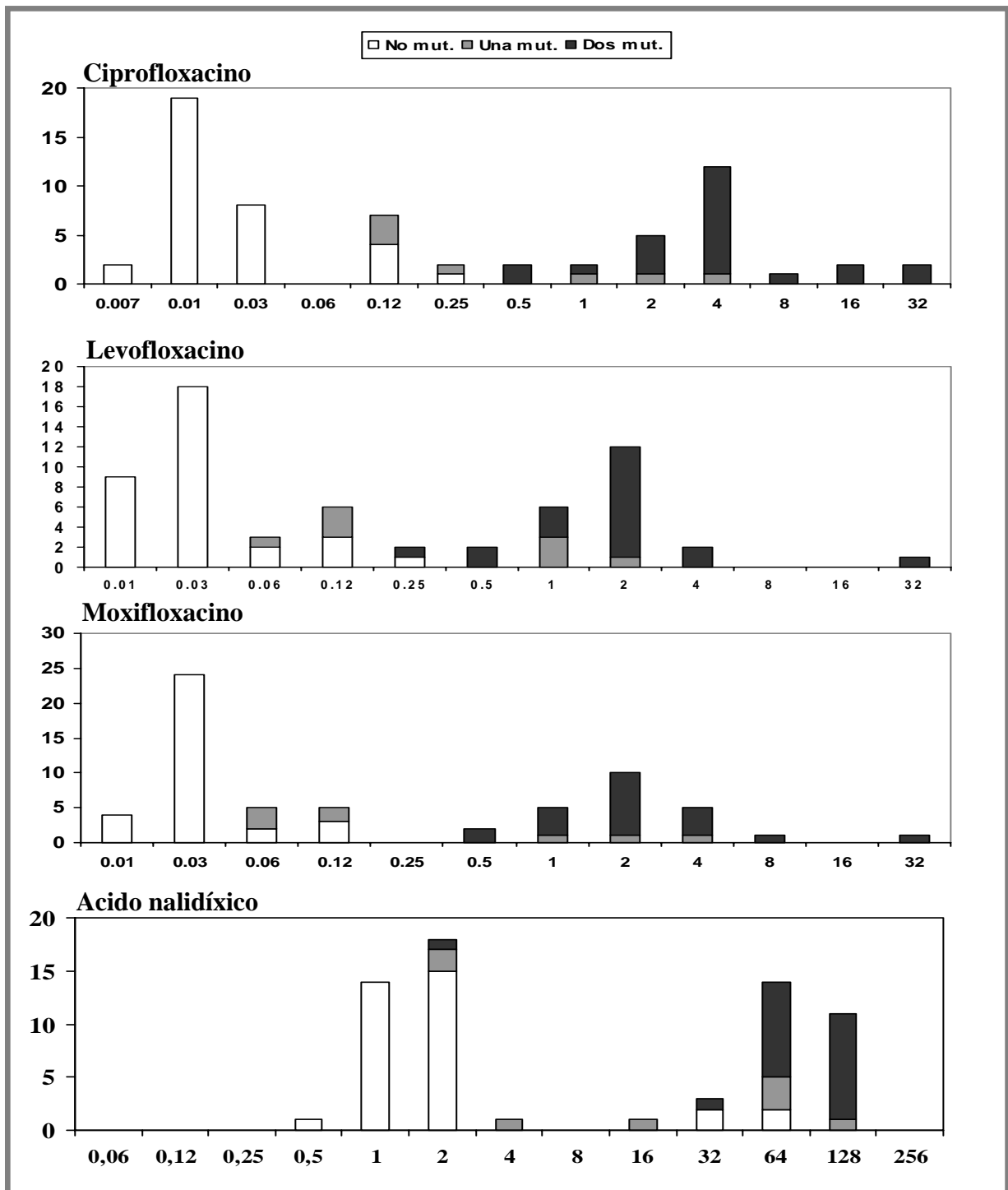


Figura 16. Distribución de los valores de CMI de cuatro quinolonas obtenidos en la colección de *H. influenzae* y cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y Par C (una mutación es siempre en GyrA, dos mutaciones pueden ser ambas en GyrA o bien en GyrA y ParC). Abscisas: CMI (µg/ml) y ordenadas: número de cepas.

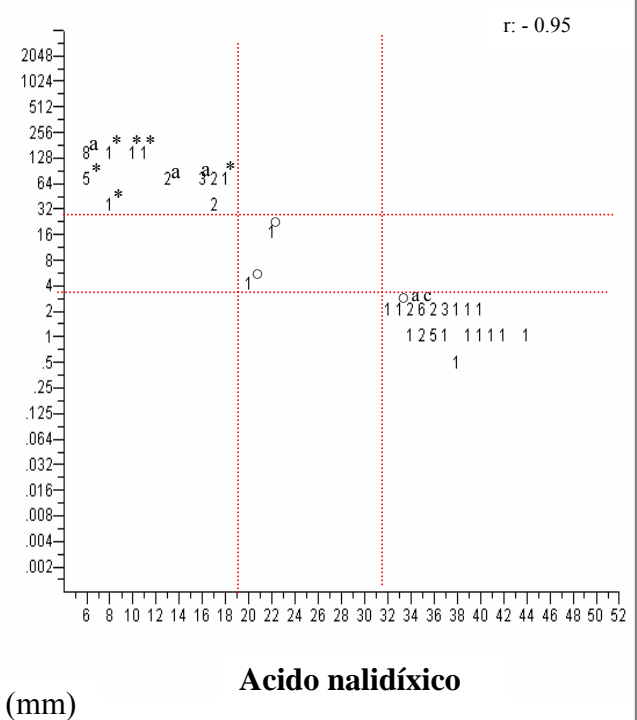
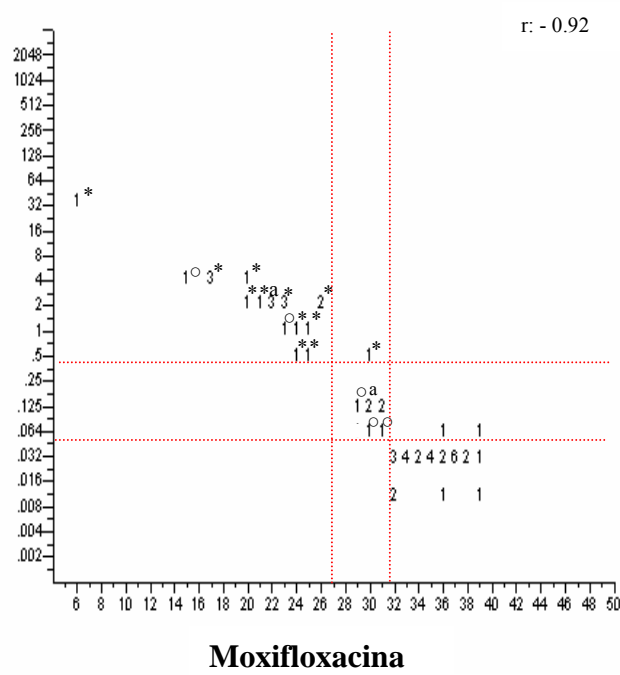
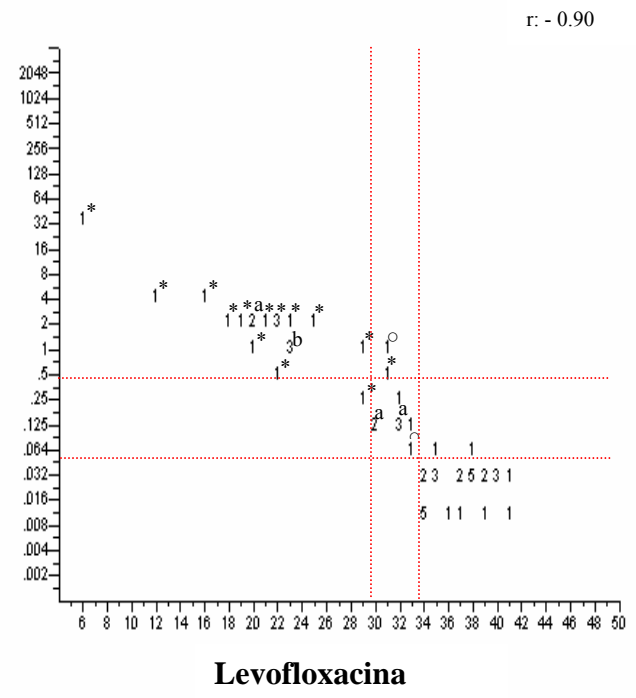
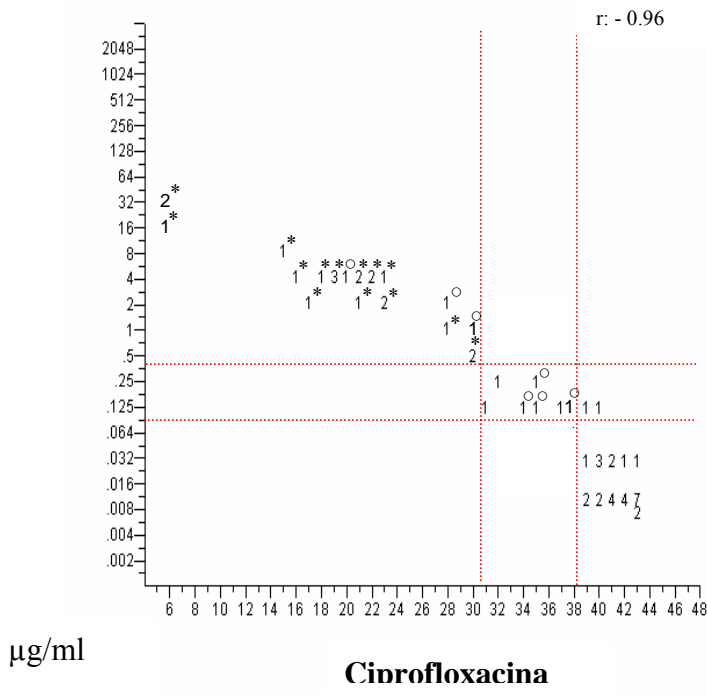
La distribución de las cepas según su sensibilidad a ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y ácido nalidíxico, combinada con los datos de cambios aminoacídicos en los QRDRs de GyrA y ParC se puede observar en la **Figura 16**.

Todas las cepas con CMIs a ciprofloxacina, levofloxacina o moxifloxacina ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ muestran cambios aminoacídicos mientras que no se observa ningún cambio en aquellas cepas con CMIs ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina y ≤ 0.03 $\mu\text{g/ml}$ para levofloxacina y moxifloxacina. Para el ácido nalidíxico todas las cepas con CMIs ≥ 4.0 $\mu\text{g/ml}$, con excepción de tres cepas, presentan cambios aminoacídicos (**Figura 16**).

En el caso del ácido nalidíxico, en cuatro cepas con CMIs entre 32 y 64 $\mu\text{g/ml}$ no se detecta ningún cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA; sus CMIs para ciprofloxacina oscilaban entre 0.06 y 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (estos resultados se confirmaron en tres experimentos por separado). En estas cepas se consideró la posibilidad de la existencia de otro mecanismo de resistencia, por lo que se analizaron además los datos obtenidos de la secuenciación de las QRDRs de GyrB y ParE así como de los fragmentos secuenciados fuera de las QRDRs. Así se observó que una de las cepas tenía un cambio aminoacídico en ParC fuera de la QRDR (Ser133 a Ala), dos cepas presentaban dos cambios aminoacídicos en la QRDR de GyrB (respectivamente, Asp489 a Asn y Thr472 a Ile) y la cepa restante no tenía ningún cambio adicional. Además en estas cuatro cepas las CMIs a norfloxacina y ciprofloxacina no se modificaron en presencia o ausencia de CCCP.

6.1. DETECCIÓN EN EL LABORATORIO DE CEPAS CON CAMBIOS AMINOACÍDICOS EN LAS QRDRs DE GyrA Y ParC.

En la **Figura 17** se muestran la distribución de la población de *H. influenzae* obtenida al comparar los halos de inhibición de cada quinolona con las CMIs obtenidas por microdilución. Los coeficientes de correlación fueron -0.96 para ciprofloxacina, -0.90 para levofloxacina, -0.92 para moxifloxacina y -0.95 para ácido nalidíxico. Además se incluyen en la Figura 17 los datos de presencia o ausencia de mutaciones en las QRDRs de GyrA y ParC.



El asterisco indica cepas con dos cambios aminoacídicos en la QRDR de GyrA y ParC. “o” indica un cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA. “a” de este grupo de cepas solo una tiene una mutación en la QRDR de GyrA. “b” de este grupo de cepas, dos de ellas tienen una mutación en la QRDR de GyrA. “c” de este grupo de cepas una tiene dos cambios aminoácídicos en las QRDRs de GyrA y ParC.

Figura 17. Distribución de las cepas de *Haemophilus influenzae* según las CMI obtenidas por microdilución, los halos de inhibición para ciprofloxacino, moxifloxacino, levofloxacina y ácido nalidíxico y datos de la presencia o ausencia de mutaciones en los QRDRs de GyrA y ParC. Propuesta de “puntos de corte microbiológicos” para detectar la presencia de un mecanismo de resistencia.

Para el ácido nalidíxico cabe destacar tres cepas que presentando mutaciones en la QRDR de GyrA, muestran una CMI para ácido nalidíxico de 2 µg/ml y que por tanto se agrupan con las cepas sensibles a ácido nalidíxico (**Figura 17**). Estas cepas fueron enviadas desde USA (*Barriere, S. L., 1993*) al Laboratorio de Referencia, sus CMIs para ciprofloxacina eran 0,12, 4 y 32 µg/ml; para levofloxacina 0,12, 2 y 32 µg/ml y para moxifloxacina 0,06, 4 y 32 µg/ml, respectivamente.

A partir de los datos de las Figuras 16 y 17 se proponen “puntos de corte microbiológicos”, de los valores de CMIs y halos de inhibición para ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina y ácido nalidíxico, que permitan determinar la presencia o ausencia de cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC como mecanismo de resistencia. Esta propuesta se indica en la **Figura 17** y **Tabla 19**.

Tabla 19. Propuesta de “puntos de corte microbiológicos” en base a datos de sensibilidad para microdilución y difusión en disco para *Haemophilus influenzae*.

Quinolona	CMI en µg/ml (Halos de inhibición en mm)			Error (%)		
	Ausencia de mutaciones en las QRDRs de GyrA o ParC	Ausencia o una mutación en la QRDR de GyrA	Dos mutaciones en las QRDRs de GyrA y/o ParC	Graves	Mayores	Menores
Ciprofloxacina	≤ 0.06 (≥ 39)	0.12-0.25 (31-38)	≥ 0.5 (≤ 30)	0.0	0.0	3.2
	≤ 0.03 (≥ 34)	0.06-0.25 (30-33)	≥ 0.5 (≤ 29)	0.0	0.0	8.5
Levofloxacina	≤ 0.03 (≥ 31)	0.06-0.25 (27-31)	≥ 0.5 (≤ 26)	0.0	0.0	5.0
	≤ 2.0 (≥ 32)	4.0-16 (19-31)	≥ 32 (≤ 18)	0.0	0.0	0.0
Moxifloxacina						
Acido nalidixico						

Como se puede observar en la **Figura 17** o en la **Tabla 19**, se propone un intervalo de valores que incluye tanto cepas con un cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA como cepas que no tienen ninguna modificación. En dicho intervalo, el porcentaje de cepas con una modificación en la QRDR de GyrA varía para cada quinolona y método de sensibilidad utilizado: ciprofloxacina (microdilución 44.5%; difusión en disco 57.1%), levofloxacina (microdilución 27.2%; difusión en disco 40%), moxifloxacina (microdilución 44.4%; difusión en disco 50%) y ácido nalidíxico acid (microdilución y difusión en disco 100%, solo dos cepas). Los porcentajes de errores graves, mayores y menores que derivan de la propuesta de “puntos de corte microbiológicos” se indican en la **Tabla 19**.

Se comparan en la **Tabla 20** los criterios actuales de la NCCLS para cepas de *H. influenzae* sensibles a fluoroquinolonas (NCCLS, 2001) con los diámetros de inhibición y los cambios aminoacídicos obtenidos en este estudio.

Tabla 20. Evaluación de los criterios de sensibilidad a quinolonas de la NCCLS para *H. influenzae* según los “puntos de corte microbiológicos” propuestos en esta tesis.

	Criterio NCCLS*	Halos de inhibición propuestos**	Nº de cepas (%) sin mutaciones en las QRDRs de GyrA y ParC	Nº de cepas (%) con una mutación en la QRDR de GyrA	Nº de cepas (%) con dos mutaciones en las QRDRs de GyA y ParC
<i>Ciprofloxacina</i>	≤ 1	≥28	34 (81)	5 (12)	3(7)
Levofloxacina	≤ 2	≥18	33(60)	7(12,7)	15 (27,3)
Moxifloxacina	≤ 1	≥23	33(76.7)	5 (11,6)	5(11,6)

* Expresa la CMI (µg/ml) del criterio de sensibilidad, el único propuesto

Los diámetros propuestos se basan en la distribución de la población de la **Figura 17.

Con los criterios de sensibilidad de la NCCLS se observa que un porcentaje de cepas con dos cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC, que oscila entre 7% para la ciprofloxacina y 27,3% para la levofloxacina, serían clasificadas como cepas sensibles, esto es tratables clínicamente, pero que claramente poseen un mecanismo de resistencia adquirido en dos dianas primarias.

De acuerdo con el criterio propuesto de “puntos de corte microbiológicos” (**Tabla 19**), también estimamos la sensibilidad y especificidad del ácido nalidíxico para discriminar las cepas de *H. influenzae* con un mecanismo de resistencia debido al menos a dos cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC obteniendo valores de 95,2% y 80%, respectivamente. Si comparamos estos valores con los obtenidos para *Salmonella* (Hakanen, A., 1999), la especificidad era un poco más baja y la sensibilidad era similar. Para el resto de la fluoroquinolonas la sensibilidad oscilaba entre 95 a 100% y la especificidad entre 90,4 a 93,3%.

7. ANÁLISIS DE LAS QRDRs DE LAS TOPOISOMERASAS EN LOS TRANSFORMANTES OBTENIDOS *in vitro* DE *H. influenzae* .

La selección de las cepas utilizadas como donante y receptora se llevó a cabo con el fin de estudiar la implicación en la resistencia a ciprofloxacina de una de las mutaciones que se hallaron con mayor frecuencia en la QRDR de ParE (Asp420 a Asn) (**Tabla 14**).

El experimento se llevó a cabo por triplicado, dos veces con DNA total y una con el producto de PCR resultante de la amplificación de Par E con la mutación de interés. La frecuencia de transformación fue muy baja, ya que con DNA total la frecuencia fue 1×10^{-12} ufc/ml y con el amplificado de ParE, 3×10^{-12} ufc/ml.

En el primer experimento con DNA total obtuvimos un único transformante (T814), en el segundo experimento, también con DNA total, obtuvimos cuatro (TT87, TT88, TT82, TT811) y en el experimento con el amplificado de ParE obtuvimos ocho transformantes (TE86, TE87, TE811, TE812, TE813, TE815, TE817 y TE820). En todos los transformantes la CMI de ciprofloxacina pasó de 4 µg/ml (cepa receptora) a 64 µg/ml, y todos ellos presentaban, además de los cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC de la cepa receptora, el cambio adicional aportado por la cepa donante en la QRDR de ParE. La descripción de los transformantes obtenidos se muestra en la **Tabla 21**.

Cepas	CMI CIP (µg/ml, E-test)	Cambios aminoacídicos en la posición indicada dentro de las QRDRs			
		GyrA	GyrB	ParC	ParE
Donante: 60FT	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Asp420Asn
Receptor: 53	4	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	-
1° experimento de transformación con DNA total: T814	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Asp420Asn
2° experimento de transformación con DNA total: TT87, TT88, TT82, TT811	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Asp420Asn
3° experimento de transformación con el amplificado de ParE: TE86, TE87, TE811, TE812, TE813, TE815, TE817, TE820	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Asp420Asn

Tabla 21. Datos de sensibilidad a ciprofloxacina y cambios aminoacídicos en las QRDRs de las topoisomerasas II y IV en las cepas donante y receptor y en los transformantes obtenidos en cada experimento.

8. ANÁLISIS DE LAS QRDRs DE LAS TOPOISOMERASAS EN LOS MUTANTES OBTENIDOS *in vitro* DE *H. influenzae* .

El experimento de mutación *in vitro* se llevó a cabo por duplicado, la cepa que se sometió a presión selectiva con ciprofloxacina fue la 53 (**Tabla 21**), la frecuencia de mutación obtenida fue de aproximadamente 7×10^{-12} ufc/ml.

La descripción de los mutantes obtenidos se muestra en la **Tabla 22**, dado el bajo número de mutantes obtenido en ambos experimentos (4 y 15 en el primero y segundo, respectivamente), se secuenciaron las QRDRs de las topoisomerasas II y IV en todos ellos.

(insertar tabla 22)

La cepa 53 sometida a presión selectiva con ciprofloxacina adquirió un alto nivel de resistencia (CMI 64 µg/ml) en un solo paso. Sin embargo, del total de 19 cepas mutantes analizadas, en 10 se debió a la adquisición de una mutación adicional en la QRDR de ParC (5 cepas Glu88 a Gly, 3 cepas Glu88 a Lys y 2 cepas Gly82 a Cys) y en 9 cepas la mutación adicional era en la QRDR de ParE (4 cepas Asp420 a Asn, 4 cepas Glu460 a Lys y 1 cepa Ser458 a Leu).(**Tabla 22**).

Tabla 22. Datos de sensibilidad a ciprofloxacina y cambios aminoacídicos en las QRDRs de las topoisomerasas II y IV en las cepas mutantes obtenidas *in vitro*.

Cepas	CMI CIP (µg/ml, E-test)	Cambios aminoacídicos en la posición indicada dentro de las QRDRs			
		GyrA	GyrB	ParC	ParE
Cepa salvaje:53	4	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	-
1º experimento de mutación <i>in vitro</i> :					
M82, M1610	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile Glu88Lys	-
M162, M1611	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile Gly82Cys	-
2º experimento de mutación <i>in vitro</i> :					
M81, M82,PM83, PM86,PM811	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile Glu88Gly	-
PM84	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile Glu88Lys	-
PM85, PM88, PM812, PM813	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Asp420Asn
M86,M820, M165,M822	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Glu460Lys
ME83	64	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Ser458Leu

En negrita se indican las nuevas mutaciones adquiridas

9. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA PRESENCIA DE UN MECANISMO ACTIVO DE BOMBEO

La combinación del CCCP con ciprofloxacina produjo un efecto de reducción de la CMI en dos cepas que presentaban una CMI a ciprofloxacina de 0.12 y 16 µg/ml, las cuales disminuyeron cuatro y seis veces respectivamente en presencia del inhibidor. La combinación con norfloxacina produjo efecto en dos cepas, con CMIs a norfloxacina de 2 y 8 µg/ml que disminuyeron dos y cuatro diluciones dobles. La combinación con eritromicina produjo efecto en seis cepas con CMIs de 2, 4, 16 µg/ml que disminuyeron cuatro de ellas cuatro veces y dos seis veces (**Tabla 23**).

Tabla 23. CMIs a ciprofloxacino, norfloxacino y eritromicina en aquellas cepas que disminuyen su CMI en presencia de CCCP dos o mas diluciones dobles.

N° DE CEPA	CMI (µg/ml)					
	CIP	CIP/CCCP	NOR	NOR/CCCP	ERI	ERI/CCCP
18	0,01	0,01	0,06	0,03	4,0	1,0
32	0,12	0,03	0,12	0,12	16	8,0
38	2,0	1,0	4,0	2,0	16	2,0
39	1,0	1,0	2,0	0,5	64	32
54	4,0	4,0	8,0	8,0	4,0	1,0
51	4,0	4,0	8,0	8,0	16	4,0
59	16	2,0	8,0	0,5	0,25	0,25
62	32	32	32	32	2,0	0,25
61	32	32	16	16	2,0	0,5

CIP: ciprofloxacino, NOR: norfloxacino, ERI: eritromicina, CCCP: carbonil ciano m-clorofenilhidrazona
En negrita se marcan aquellos casos en los que la CMI en presencia de inhibidor disminuye dos o mas diluciones dobles

Para la ciprofloxacina la CMI disminuyó dos veces (una dilución doble) en el 18.2% de cepas estudiadas y se mantuvo sin cambios en el 78.8%; para la norfloxacina la CMI disminuyó dos veces en el 36.4% de cepas y no se modificó en el 60.6%; para la eritromicina la CMI disminuyó dos veces en el 50% de cepas y no se modificó en el 41% de cepas analizadas.

10. ANÁLISIS DEL FENOTIPO BACTERIANO HIPERMUTADOR

El porcentaje de cepas con fenotipo hipermutador en el Grupo I fue 45,1 % en comparación con el 3,1% en el Grupo II ($p= 0,0054$). La distribución de las frecuencias de mutación se muestra en la **Figura 18**. La media de la frecuencia de mutación para el Grupo I fue 3.9×10^{-6} ufc/ml y para el Grupo II, 8×10^{-8} ufc/ml, la frecuencia de mutación es significativamente mayor para las cepas con CMI para ciprofloxacina ≥ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,004$, Test de U Mann-Whitney).

Cuando se analiza el fenotipo mutador en relación a la presencia y ausencia de mutaciones en las QRDRs de las topoisomerasas, se observó que el porcentaje de cepas hipermutadoras era del 42,8% en el grupo de cepas con mutaciones en comparación con el 5,7% en el grupo de cepas que no presentaban mutaciones ($p= 0.006$). Además la media de la frecuencia de mutación en ambos grupos era significativamente distinta, siendo de 6.7×10^{-8} ufc/ml para las cepas sin mutaciones y 4×10^{-6} ufc/ml para las que presentaban modificaciones ($p=0.01$, Test de U Mann-Whitney). La distribución de las frecuencias de mutación se muestra en la **Figura 18**.

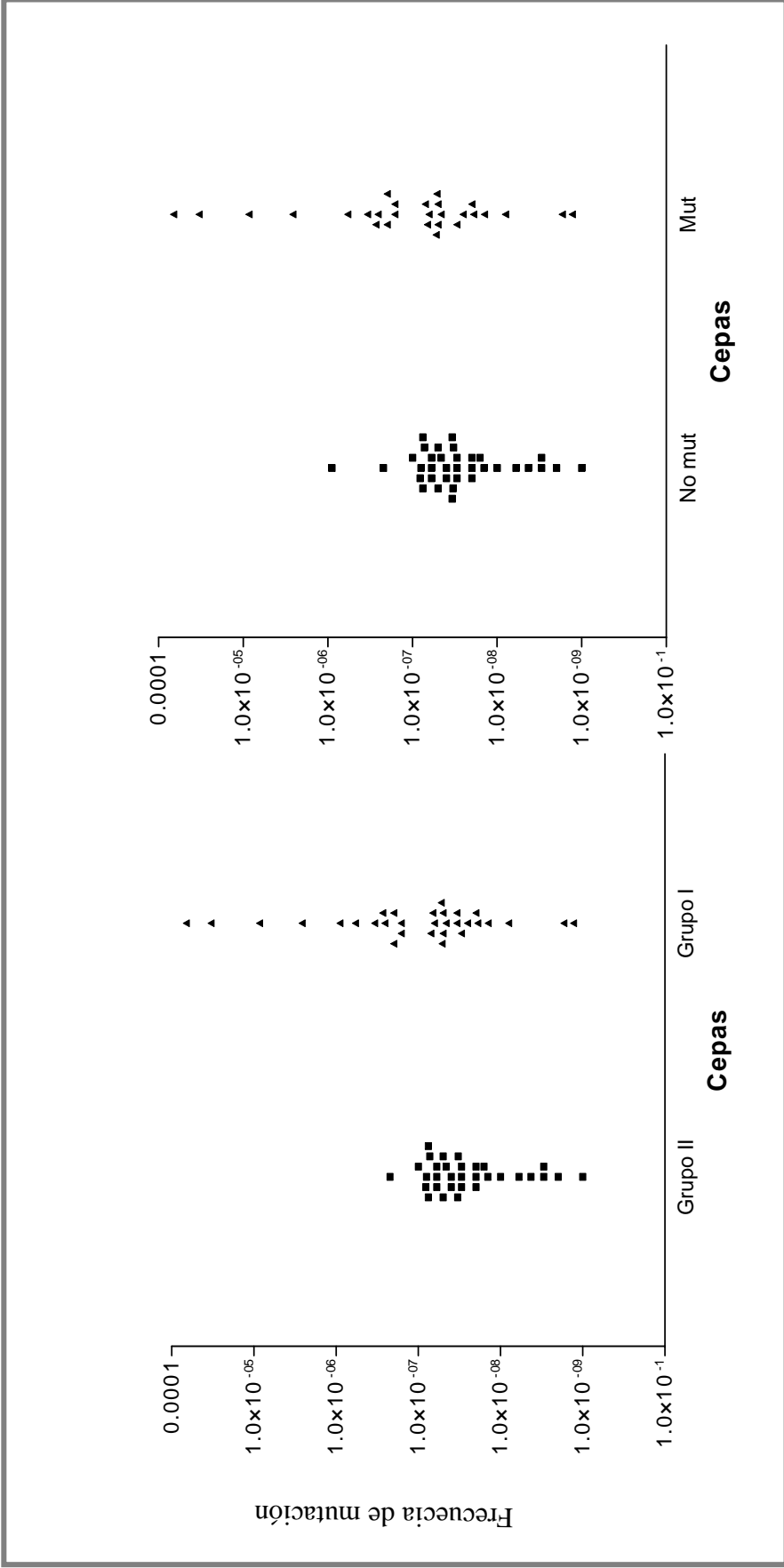


Figura 18. Distribución de la frecuencia de mutación a rifampicina ($10 \mu\text{g/ml}$) en cepas de *H. influenzae* con distintos niveles de sensibilidad a ciprofloxacina, agrupadas en función de sus CMIs a ciprofloxacina (gráfica de la izquierda) o en función de la presencia de mutaciones en las QRDR de las topoisomerasas (gráfica de la derecha).

En la **Tabla 24** se muestran las características de las cepas del fenotipo hipermutador en lo que se refiere a su sensibilidad a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina y a las mutaciones halladas en las QRDRs de GyrA, GyrB, ParC y ParE.

Tabla 24 . Sustituciones aminoacídicas en las regiones QRDR de GyrA, GyrB, ParC y ParE correspondientes a 14 cepas de *H. influenzae* hipermutadoras indicando su sensibilidad a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina (método de microdilución).

N° de cepa	CMI (µg/ml)						Aminoácidos en la posición indicada dentro de las QRDRs																																	
	NAL	CI	LE	MO	GyrA				GyrB				ParC				ParE																							
					83	84	88	Asp	Asp	Met	464	467	Ser	Glu	469	489	472	Thr	82	Gly	83	Asp	84	Ser	88	Glu	405	Gly	420	Asp	444	Ile	452	Pro	458	Ser	460	Glu		
1*	0,5	0,007	0,03	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
10	1,0	0,01	0,03	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
29	64	0,12	0,12	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
30	32	0,12	0,12	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
39	64	1,0	0,5	1,0	Gly	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
40	4,0	1,0	1,0	1,0	-	Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lys	
46	64	4,0	2,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
52	128	4,0	2,0	2,0	-	Leu	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
53	64	4,0	2,0	2,0	-	Leu	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
54	2,0	4,0	2,0	4,0	-	Phe	Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
55	128	8,0	2,0	4,0	-	Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
58	128	8,0	4,0	4,0	-	Ile	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	2,0	32	32	32	-	Leu	Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
62	64	32	32	32	-	Tyr	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*ATCC 51907 Rd, - no existen cambios respecto a *H. influenzae* 51907 Rd, NA: ácido nalidíxico, CI: ciprofloxacina, LE: levofloxacina, MO: moxifloxacina.

11. ANÁLISIS DE UN FALLO TERAPÉUTICO EN UN CASO DE NEUMONÍA DEBIDA *H. influenzae* RESISTENTE A LEVOFLOXACINA.

Los tres aislamientos clínicos se identificaron como *H. influenzae* no capsulado perteneciente al biotipo II. Las tres presentaban el mismo perfil de campo pulsado pese a la gran diversidad obtenida en los otros cuatro aislamientos de la misma área geográfica (Bastida, T., 2003).

Los datos de sensibilidad antimicrobiana y los resultados de la secuenciación de las QRDR de *gyrA*, *parC*, *gyrB* y *parE* se muestran en la **Tabla 25**. Los datos de sensibilidad eran idénticos en los tres aislados de la paciente así como los cambios aminoacídicos en las topoisomerasas II y IV.

Tabla 25. Datos de sensibilidad a fluoroquinolonas y cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA, ParC, GyrB y ParE de las tres cepas de *Haemophilus influenzae* aisladas en el caso descrito.

Cepa N°	CMI (µg/ml): ^a				Cambios aminoacídicos en las posiciones indicadas			
	CIP	LEV	MOXI	GATI	GyrA	GyrB	ParC	ParE
51907 ATCC	0,007	0,03	0,01	0,003	-	-	-	-
32602, 35102, y 35202.	16	16	8	16	Ser84Leu Asp88Asn	-	Ser84Ile	Asp420 Asn

^a CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; MOXI, moxifloxacina; GATI, gatifloxacina. El método de sensibilidad utilizado fué la microdilución.

Las tres cepas aisladas no producían β -lactamasa y sus CMI's a otros antibióticos eran: penicilina, 0,25 $\mu\text{g/ml}$; ampicilina, 0,12 $\mu\text{g/ml}$; amoxicilina-clavulanico 0,12 $\mu\text{g/ml}$; cefuroxima, 0,12 $\mu\text{g/ml}$; cefotaxima, 0,03 $\mu\text{g/ml}$; aztreonam; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; cloranfenicol, 0,12 $\mu\text{g/ml}$; eritromicina, 16 $\mu\text{g/ml}$; claritromicina, 16 $\mu\text{g/ml}$; azitromicina, 8,0 $\mu\text{g/ml}$. La actividad de otras quinolonas que no se indican en la **Tabla 25** son: ofloxacina, 32 $\mu\text{g/ml}$; grepafloxacina, 32 $\mu\text{g/ml}$; clinafloxacina, 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

No se observaron cambios en las CMI's a ciprofloxacina y norfloxacina en presencia y ausencia de CCCP, sugiriendo que es poco probable que en estas cepas exista un mecanismo de bombeo que contribuya a disminuir la sensibilidad a fluoroquinolonas.

Números de acceso a la secuencia nucleotídica: las diferentes secuencias obtenidas de caso de fallo terapéutico (60FT) fueron remitidas al EMBL asignándoles los siguientes números de acceso: AJ508043, AJ508044, AJ508045 y AJ508046.

1. ANÁLISIS DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

La resistencia a fluoroquinolonas de uso en clínica es un problema emergente en patógenos del tracto respiratorio, como son *Streptococcus pneumoniae* (Brueggemann, A. B., 2002, Chen, D. K., 1999, Doern, G. V., 2001, Jones, R. N. and D. J. Biedenbach, 2003) y *H. influenzae* (Biedenbach, D. J. and R. N. Jones, 2003, Bootsma, H. J., 1997, Corkill, J. E., 1994, Gould, I. M., 1994). La población natural de *H. influenzae* es muy sensible a quinolonas, con un porcentaje de resistencia inferior al 1% (García_Rodríguez, J. A., 1999, Biedenbach, D. J. and R. N. Jones, 2000). El nivel de resistencia en aislamientos procedentes de pacientes con infecciones respiratorias crónicas es más alto, ya que éstos se hallan sometidos a tratamientos repetitivos con quinolonas de administración oral (Campos, J., 1996, Groeneveld, K., 1990) y la resistencia puede surgir como consecuencia de la presión antibiótica selectiva mantenida durante un tiempo prolongado. En pacientes de fibrosis quística hasta el 20% de las cepas de *H. influenzae* presentaban resistencia a ciprofloxacina (Roman, F., 2004). En España la prescripción de quinolonas a adultos aumentó un 155% entre 1985 y 1993 (Bremón, A. R., 2000) y en los últimos años (1999 a 2002) ha aumentado sobre todo el consumo de levofloxacina y moxifloxacina como puede observarse en la **Figura 8**.

El primer objetivo planteado en el trabajo era analizar las relaciones epidemiológicas entre las cepas de *H. influenzae* con sensibilidad disminuida a quinolonas. Podemos considerar que la colección de cepas analizada es representativa de las cepas que circulan por la geografía española. El análisis de los perfiles obtenidos mediante PFGE utilizando como enzima de restricción *Sma* I (**Figura 6**) muestra una gran diversidad genética, que también se ha descrito en otros estudios de cepas no capsuladas de *H. influenzae* (Bruant, G., 2003). La diversidad era similar en las cepas con pérdida de sensibilidad a quinolonas y en el grupo control de cepas sensibles, cada cepa se correspondía a un único pulsotipo.

Con los datos obtenidos podemos afirmar que la diseminación de la resistencia a quinolonas en *H. influenzae* no es clonal, estos datos concuerdan con los obtenidos por Biedenbach *et al* (Biedenbach, D. J., 2003). Sin embargo, aunque la dispersión clonal parece descartada con los datos actuales, si que se ha observado el mantenimiento de clones de *H. influenzae* resistentes a quinolonas durante largos períodos de tiempo de hasta siete años en determinadas situaciones clínicas, como es el caso de los enfermos de fibrosis quística (Campos, J., 1996, Roman, F., 2004). Además, en estos pacientes se ha observado que la resistencia a antibióticos, y en especial, a ciprofloxacina se asocia a

la cronificación y persistencia a lo largo del tiempo de determinados clones (Roman, F., 2004).

En otros patógenos como *S. pneumoniae* se han descrito dos posibles situaciones, casos de diseminación clonal (Zhanel, 2003) y otros casos de gran diversidad genética asociada a la resistencia a quinolonas (Davies, T. A., 2003, Zhanel, G. G., 2003). En *Neisseria meningitidis* también se ha descrito la diseminación de un clon resistente a ciprofloxacina (Corkill, J. E., 2003) en Liverpool.

2. SENSIBILIDAD A QUINOLONAS Y RESISTENCIA CRUZADA, COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE SENSIBILIDAD

Los datos de la presente tesis, confirman la excelente actividad de todas las quinolonas frente a la población de cepas sensibles de *H. influenzae* (Grupo II). Con la excepción del ácido nalidíxico, todas las demás quinolonas estudiadas presentaban CMI_s $\leq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$. Las más activas frente a las cepas sensibles fueron clinafloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina, ciprofloxacina, garenoxacina, trovafloxacina y levofloxacina, todas ellas con CMI_s ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$.

En el grupo de cepas con pérdida de sensibilidad a ciprofloxacina (Grupo I), todas las quinolonas estudiadas disminuyeron su actividad, y solamente la clinafloxacina y gatifloxacina preservaron su buena actividad *in vitro* (CMI₉₀ 0,25 $\mu\text{g/ml}$) y en menor medida, moxifloxacina y levofloxacina (CMI₉₀ 1 $\mu\text{g/ml}$). En el grupo de cepas más resistentes, las que se corresponden al tercer pico en la figura en que se representa la distribución de la población en función de las CMI_s a ciprofloxacina (rango: 2-32 $\mu\text{g/ml}$, **Figura 10a** y **10b**), ninguna de las quinolonas estudiadas presenta buena actividad y probablemente éstas no deberían usarse en la práctica clínica cuando se aíslan este tipo de cepas (Stein, G. E., 1996).

Al establecer la comparación entre tres de los métodos de sensibilidad más comunmente usados en los laboratorios de microbiología, se encuentra una concordancia muy alta. El método del E-test, presenta la ventaja, frente a los otros dos métodos utilizados en este estudio (microdilución y dilución en agar), de ser menos laborioso; además de eso y debido a la buena correlación con el método propuesto como de referencia por el NCCLS para *H. influenzae*, consideramos que se trata de un método simple para detectar la pérdida de sensibilidad a quinolonas en *H. influenzae*. Este sistema que permite una detección rápida e individual de pérdida de sensibilidad puede tener gran utilidad en los programas de seguimiento de resistencia a antimicrobianos.

A partir de los datos de sensibilidad obtenidos en este estudio, y al establecer correlaciones entre las CMI de ciprofloxacina y el resto de las quinolonas obtenidas por el método de E-test, se obtiene un porcentaje de correlación medio del 93%. Este hecho nos indica que la pérdida de sensibilidad a ciprofloxacina se correlaciona con la disminución de sensibilidad al resto de quinolonas incluídas en el estudio, además la pérdida de sensibilidad es de la misma magnitud en todas ellas (**Tabla 10**). Aunque la actividad intrínseca de cada quinolona frente a *H. influenzae* es variable (**Tabla 9**).

Los datos de sensibilidad a diferentes familias de antimicrobianos obtenidos en esta tesis, claramente sugieren que la resistencia a quinolonas en *H. influenzae* se acompaña significativamente de la pérdida simultánea de sensibilidad a otros antibióticos (**Figura 9**).

3. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DESCRITAS EN LAS QRDRs DE GyrA, GyrB, ParC y ParE

Las mutaciones puntuales presentes en los QRDR de las topoisomerasas II y IV (GyrA, GyrB, ParC y ParE), constituyen el principal mecanismo de resistencia a las quinolonas. En el presente trabajo se procedió a caracterizar la secuencia nucleotídica de fragmentos que incluyen las QRDRs de *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de aislamientos clínicos de *H. influenzae* mediante la amplificación con cebadores específicos de este patógeno. En bacterias gram-negativas, se ha demostrado que GyrA es la diana primaria implicada en la resistencia a quinolonas (Hooper, D. C., 2001), alterándose de forma secundaria ParC (Heisig, P., 1993).

En estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo se había demostrado que GyrA y ParC se comportaban como diana primaria y secundaria respectivamente en la adquisición de resistencia a quinolonas en *H. influenzae* (Georgiou, M., 1996). Este comportamiento es similar al que se ha encontrado en otros microorganismos gram negativos como *E. coli* (Bagel, S., 1999).

En el presente estudio se muestran los datos de una amplia colección de cepas con distintos niveles de sensibilidad a quinolonas, en lo que se refiere a los cambios aminoacídicos encontrados en el fragmento estudiado de GyrA, las posiciones en las que se acumulan la mayor parte de las mutaciones son Ser84 y Asp 88 (equivalentes a la Ser83 y Asp87 en *E. coli*). En las citadas posiciones para *H. influenzae* se detectan distintos cambios aminoacídicos, así la Ser84 cambia a Leu, Tyr, Phe, Asp e Ile y el Asp88 cambia a Asn, Tyr y Ala.

En las principales mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a quinolonas que se han descrito en la posición 83 en *E. coli* y en *P. aeruginosa* (Yoshida, H., 1990), se reemplaza un aminoácido polar por un residuo no polar, reduciéndose la afinidad del complejo DNA-girasa por la quinolona y bloqueando la accesibilidad del antimicrobiano. Así sucede en *E. coli* al sustituirse la Ser83 por Leu o Trp (Cullen, M. E., 1989, Oram, M., 1991), conduciendo a un incremento en la CMI a ácido nalidíxico y en menor grado la CMI a ciprofloxacina. Esta posición de Ser83 también se halla afectada en otros gram negativos como *Acinetobacter baumannii* que cambia a Leu (Vila, J., 1995), a Phe en *Salmonella typhimurium* (Ruiz, J., 1997) y a Tyr en *Enterobacter cloacae* (Dekitsch, C., 1999). De forma semejante, la Thr-83 cambia a Ile en *P. aeruginosa* (Yonezawa, M., 1995) y en *Campylobacter jejuni* (Wang, Y., 1993) incrementándose la resistencia a quinolonas. Además del cambio en el residuo aminoacídico localizado en la posición 83, un segundo cambio puede acontecer en la posición 87 (equivalente a Asp88 en *H. influenzae*), reemplazándose el Asp por Asn, Gly, His, Val, o Tyr conduciendo a un aumento en el nivel de resistencia (Heisig, P., 1993, Vila, J., 1995)

Heisig *et al* (Heisig, P., 1994) demostraron en experimentos *in vitro* que en *E. coli* la primera posición que se ve modificada es Ser83 y posteriormente se modifica Asp87, además un único cambio en Ser83 parece ser suficiente para generar un alto nivel de resistencia a ácido nalidíxico, mientras que la segunda mutación en Asp87 actúa de forma complementaria en el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas (Lehn, N., 1996). Como hemos visto en este trabajo en *H. influenzae* hay cepas que presentan una única mutación en la posición Asp88 y muestran una CMI a ciprofloxacina entre 0.12 y 0.25 µg/ml y también hay cepas que poseen un única mutación en la posición Ser84 y presentan un rango de CMIs a ciprofloxacina más alto entre 1 y 4 µg/ml . Esto podría indicar que en *H. influenzae* , a diferencia con *E. coli*, no hay una posición que se modifique primero parece que ambas posiciones, Ser84 y Asp88, pueden afectarse de igual manera como primera diana si bien la mutación en la Ser84 parece generar un mayor nivel de resistencia a ciprofloxacina (**Tabla 18**).

La otra posición que se modifica en la colección de estudio de *H. influenzae* es Asp83, concretamente Asp cambia a Gly. Esta mutación ha sido descrita en *E. coli* y cuando aparece sola se asocia con un bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas pero no con resistencia a ácido nalidíxico (Truong, Q. C., 1997). En la colección de estudio

esta mutación tiene una baja prevalencia ya que se observa en una única cepa y asociada a otra mutación en Ser84.

Se ha encontrado una mutación fuera de la QRDR de GyrA (Gly142 a Lys), esta aparece en cepas con una CMI a ciprofloxacina entre 0,01 y 32 µg/ml (**Tabla 15**) con lo que es muy posible que no se asocie con la adquisición de resistencia a quinolonas.

Se han descrito otras mutaciones localizadas en posiciones fuera de la QRDR de GyrA en *E. coli*, como, por ejemplo, las correspondientes a Ala67 y Gln106, en las que el cambio Gln106 a Arg (Hallett, P.I., 1991) incrementaba la resistencia a fluoroquinolonas y en menor grado al ácido nalidíxico. Se ha identificado también en *S. typhimurium* una mutación exterior a la QRDR, Ala119 a Glu o Val, que contribuiría en la resistencia al ácido nalidíxico (Griggs, D. J., 1996). La identificación reciente de mutaciones en zonas externas al QRDR de *E. coli* (Hallett, P., 1991, Friedman, S. M., 2001) hace pensar en la necesidad de la ampliación del QRDR relacionado con la resistencia a quinolonas.

Tras el análisis del fragmento secuenciado de ParC en *H. influenzae*, se observa que las posiciones que se afectan con mas frecuencia son Ser84 y Glu88. Todas las mutaciones que se encuentran en la QRDR de ParC han sido descritas en cepas de *H. influenzae* con pérdida de sensibilidad a quinolonas (Georgiou, M., 1996, Biedenbach, D. J., 2003, Pérez-Vázquez, M., 2004). La modificación Ser84 a Arg se ha descrito asociada a altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* (Heisig, P., 1994), pero en el presente trabajo dicha mutación parece asociarse a un rango de CMIs a ciprofloxacina más bajo que la modificación Ser84 a Ile, ya que Ser84 a Arg aparece en un rango de CMIs a ciprofloxacina 0,5 – 2 µg/ml y Ser84 a Ile en un rango de 2 –16 µg/ml (**Tabla 14**).

Las mutaciones en la QRDRs de ParC se asocian siempre al menos a un cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA y aparecen siempre en cepas con CMIs a ciprofloxacina > 0,5 µg/ml, lo que corrobora que al igual que en *E. coli* el desarrollo de altos niveles de resistencia a quinolonas requiere de al menos una mutación en ParC en adición a las modificaciones única o dobles en GyrA (Heisig, P., 1994, Breines, D. M., 1997, Kumagai, Y., 1996).

Dado que hay cepas que poseen una única modificación en la QRDR de GyrA y una en la QRDR de ParC, es muy posible que el orden de adquisición de mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas en *H. influenzae* sea, una primera mutación en la QRDR de GyrA (preferentemente en las posiciones Ser84 o Asp88) seguida de una

segunda mutación en la QRDR de ParC (afectando sobre todo a las posiciones Ser84 o Glu88). La siguiente mutación afectaría a la posición que no se viera modificada en el primer cambio, esto es Ser84 o Asp88 de la QRDR de GyrA (**Tabla 18**).

En la colección de aislamientos clínicos de *H. influenzae* no se ha encontrado ninguna cepa que presente dos mutaciones en la QRDR de ParC.

En lo que se refiere a las mutaciones que aparecen fuera de la QRDR de ParC, muchas de ellas aparecen tanto en las cepas con sensibilidad disminuida a quinolonas como en cepas sensibles, lo que sugiere que muy probablemente no se asocian a la resistencia a quinolonas (Gly206 a Arg o Lys, Asn138 a Ser o Val110 a Ile, **Tabla 15**).

En GyrB y ParE se ha considerado la QRDR una región altamente conservada y homóloga en ambas proteínas, en la que se han encontrado mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas en *E. coli* (Breines, D. M., 1997). Esta región en GyrB se encuentran muy separada del sitio activo (Tyr122) a través del que se une la enzima al ADN. Pero se ha visto que ciertos residuos que se encuentran en este fragmento altamente conservado (Asp426 y Lys447 en *E. coli*) forman cuando la proteína adquiere su conformación, una especie de “bolsillo” con la QRDR de GyrA y cambios en estos impiden la interacción con la quinolona (Heddle, J., 2002). En *E. coli*, los cambios en GyrB que originan una resistencia de bajo nivel son: Asp426 a Asn y Lys447 a Glu (Yoshida, H., 1991). En *S. typhimurium* (Gensberg, K., 1995) y *P. aeruginosa* (Mouneimne, H., 1999), se han encontrado mutaciones en otras posiciones que se asocian con bajo nivel de pérdida de sensibilidad a quinolonas (Ser463 a Tyr en *S. typhimurium* y Ser46 a Phe en *P. aeruginosa*).

Las posiciones equivalentes a Asp426, Lys447 y Ser463 en *H. influenzae* son Asp429, Lys450 y Ser467; como puede observarse en la **Tabla 14**, en las citadas posiciones, solo se muestra una mutación Ser467 a Phe que aparece en dos cepas con CMI a ciprofloxacina de 0,5 y 2 µg/ml. El resto de las mutaciones que se encuentran en Gyr B no se han descrito en otros microorganismos; en especial, la mutación Glu469 a Asp que se describe en cepas con una CMI para ciprofloxacina de 4 µg/ml (**Tabla 14**), y parece tener relación con la pérdida de sensibilidad a quinolonas. Además esta mutación parece asociarse a una mutación en la posición 88 de GyrA (Asp88 a Asn) y a una mutación en la posición 84 de ParC (Ser84 a Ile). Todas las mutaciones en GyrB con posible implicación en la resistencia a quinolonas aparecen en cepas que ya presentan alteraciones previas en GyrA y ParC.

Dada la homología entre las QRDRs de GyrB y ParE, las posiciones en parE equivalentes a las que se han descrito en GyrB asociadas a la pérdida de sensibilidad a quinolonas en *E. coli* son Asp420, Lys441 y Ala457 (Breines, D. M., 1997). Estas posiciones en *H. influenzae* son Asp420, Arg441 y Gly457, la única que se ha visto modificada en la colección de estudio es Asp420 que cambia a Asn, esta mutación aparece en cuatro cepas que presentan CMI a ciprofloxacina entre 4 y 32 µg/ml.

La implicación de esta mutación (Asp420 a Asn) en la resistencia a quinolonas se demuestra mediante transformación (**Tabla 21**), en la que, partiendo de una cepa receptora con las mismas mutaciones en GyrA y ParC que la donante, ésta adquiere la mutación Asp420 a Asn y su CMI alcanza un valor de 64 µg/ml (aumenta cuatro diluciones dobles). Mediante obtención de mutantes *in vitro* se demuestra que aparte de la mutación Asp420 a Asn, hay otras dos mutaciones en la QRDR de ParE que se asocian con resistencia a quinolonas, éstas son Glu460 a Lys y Ser458 a Leu (**Tabla 22**). Una de ellas, Glu460 a Lys, aparece en una cepa de la colección de estudio (n°40) que presenta un única mutación en la QRDR de GyrA (Ser84 a Phe) y que no debería ser responsable de la CMI tan alta que presenta a ciprofloxacina (2 µg/ml), sugiriendo que tal vez es la segunda mutación en ParE la responsable de un mayor aumento en la CMI a ciprofloxacina.

El análisis de los mutantes obtenidos *in vitro* sugiere que en *H. influenzae*, una vez que se han modificado GyrA (dos mutaciones) y ParC (una mutación), el siguiente paso en la adquisición de resistencia de alto nivel a quinolonas podría ser una segunda mutación en la QRDR de ParC o bien una alteración en las posiciones indicadas de la QRDR de ParE (Asp420, Glu460 o Ser458, **Tabla 22**).

La contribución de los mecanismos de eflujo en la resistencia a quinolonas fué estudiada fenotípicamente. Se ha confirmado la implicación de estos sistemas en la resistencia a otros antibióticos como macrólidos en *H. influenzae*. y la bomba caracterizada se inhibe por la acción del CCCP (Peric, M., 2003).

En nuestro estudio, se consideró la participación de un mecanismo de eflujo cuando los valores de CMI a ciprofloxacina o norfloxacina disminuyeron al menos 4 veces (dos diluciones dobles) en presencia de un compuesto desacoplante de protones (CCCP). Este fenotipo se observó en 3 cepas de *H. influenzae* que tenían CMI a ciprofloxacina de 0,12, 1 y 16 µg/ml, estas cepas presentaban gran variabilidad en sus CMI a eritromicina (rango 0,25- 64 µg/ml, **Tabla 23**).

Los datos obtenidos parecen indicar que el mecanismo de bombeo no tiene un papel importante en la adquisición de resistencia a quinolonas en *H. influenzae*. Esto concuerda con los datos que se obtienen al estudiar el equivalente a la bomba *acrAB* de *E. coli* en *H. influenzae*, ya que se ha visto que la interrupción de la expresión de los genes que codifican esta bomba en *H. influenzae*, no afecta a la expulsión de los sustratos de este sistema de bombeo (Sanchez, L., 1997).

4. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LAS TOPOISOMERASAS II Y IV

La diversidad bacteriana, la evolución y la filogenia pueden ser estudiadas a distintos niveles, entre especies diferentes o entre aislamientos pertenecientes a una misma especie, mediante técnicas basadas en el análisis de las secuencias nucleotídicas de diferentes tipos de genes. La información aportada por genes codificantes y no codificantes de proteínas (rRNA), es distinta, ya que los primeros tienen que asegurar la funcionalidad de la proteína que se codifica.

Los genes que están siendo analizados con este objetivo, son genes altamente conservados (constitutivos) y codificantes de proteínas implicadas en la supervivencia, adaptación y fisiología celular (Huang, W. M., 1996, Woese, C. R., 1987). La información proporcionada por los genes de las topoisomerasas bacterianas (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) responsables de la resolución de los problemas topológicos de la doble hélice de ADN, ha sido analizada, con estos objetivos, a nivel inter-especies (Huang, W. M., 1996) y dentro de una misma especie (Feddersen, A., 2000). La información proporcionada por la secuencia nucleotídica de la zona del QRDR y una zona adyacente de 120 pb de *gyrA* en *Legionella* permitió discriminar entre diferentes especies, serogrupos y dentro de un mismo serogrupo (Feddersen, A., 2000).

En este trabajo, la secuencia en aminoácidos de los fragmentos estudiados de las topoisomerasas II y IV de las cepas clínicas de *H. influenzae*, siempre de mayor tamaño que el QRDR, mostraron muy escasa variabilidad (si se excluyen las posiciones implicadas en resistencia) del 1% para GyrA, del 2% para GyrB, del 5 % para ParC y del 3 % para ParE, respecto de las secuencias de la cepa estándar ATCC 51097. Sin embargo, esta variabilidad aumenta al analizar las secuencias nucleotídicas de estos genes, debido a cambios en los codones que no se traducen a sustituciones en aminoácidos, es decir son mutaciones silentes, y que se han denominado sSNP o

synonymous single nucleotide polymorphism (Cargill, M., 1999), y que directamente llamaremos SNP (**Tabla 16**)

La presencia de distintos SNPs, la diferente combinación de los mismos y su mayor o menor acumulación en las cepas estudiadas, hace del análisis de la divergencia de los nucleótidos de estos genes una opción más para en el estudio de una población de este organismo con fines de tipificación, de evolución y/o de filogenia.

Cuando se analizan los SNPs de alta frecuencia, nos encontramos que su distribución en la colección de cepas es independiente de la sensibilidad a ciprofloxacina (**Figura 13**). En lo que se refiere al análisis de la acumulación de SNPs en las cepas de la colección de estudio, el número de cepas con un determinado acúmulo de SNPs es similar en los Grupos I y II, sólo para *parC* y *parE* se ha visto que las cepas que poseen un mayor acúmulo de SNPs presentan sensibilidad disminuida a ciprofloxacina (**Figura 14**)

El porcentaje de secuencias alélicas de nucleótidos distintas obtenidas para cada uno de los genes estudiados fue en *gyrA* 34.6%, en *parC* 48 %, en *gyrB* 59% y en *parE* 51%. Mediante el análisis de los cuatro genes en conjunto es muy probable que cada cepa fuese un alelo distinto, con lo que podríamos decir que los SNPs actuarían como “un marcador” filogenético, lo cual sugiere que podría ser interesante la inclusión de estos genes en estudios de MLST (*multilocus sequence typing*) aplicados a *H. influenzae*, debido a su variabilidad génica, pese a que sus secuencias en proteínas se halla muy conservada (Meats, E., 2003).

5. PROPUESTA DE PUNTOS DE CORTE MICROBIOLÓGICOS

Se han hecho varios intentos de proponer puntos de corte para las quinolonas en *H. influenzae* (Barry, A. L., 1992, Corkill, J. E., 1994, Biedenbach, D. J., 2002, Sewell, D. L., 1995), pero el problema de muchas de estas propuestas, es que carecen de una población de aislamientos clínicos con distintos niveles pérdida de sensibilidad. En este trabajo se hace una propuesta de “puntos de corte microbiológicos”, con el objetivo de identificar los aislados que pertenecen a una población que ya ha adquirido un mecanismo de resistencia (mutaciones en la QRDR de GyrA), y que muy probablemente sean responsables de la diseminación de la resistencia a quinolonas (Mouton J.W, 2002), lo cual tiene un interés clínico, microbiológico y epidemiológico.

En el presente estudio, las mutaciones en el QRDR de GyrA se han encontrado en el 100% de cepas con CMI $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ para la ciprofloxacina, levofloxacina y

moxifloxacina; y en un 40% de cepas con una CMI que oscilaba entre 0.12 y 0.25 µg/ml para ciprofloxacina y entre 0.06 y 0.12 µg/ml para moxifloxacina; este porcentaje de cepas con mutaciones en el QRDR de GyrA para CMIs de levofloxacina entre 0.06 y 0.12 µg/ml era del 27%. En el caso del ácido nalidíxico, la mayoría de las cepas con CMIs > 4 µg/ml tenían mutaciones en GyrA.

Cuando se incluyen los datos de la segunda diana (ParC), los puntos de corte aquí propuestos, permiten distinguir entre un grupo de cepas con un único cambio aminoacídico en la QRDR de GyrA y un segundo grupo que presenta dos cambios (ambos en la QRDR de GyrA o bien uno en GyrA y otro en ParC) y que tendría mayor trascendencia clínica. Este último grupo de cepas muestra los valores de CMIs más altos para las quinolonas (CMIs $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacina y moxifloxacina, $\geq 0.25\mu\text{g/ml}$ para levofloxacina y $\geq 32\mu\text{g/ml}$ para el ácido nalidíxico). En este estudio todas las cepas con dos cambios aminoacídicos en la QRDR de GyrA presentan una mutación adicional en el QRDR de ParC y se corresponden con las cepas con los valores más altos de CMIs (**Tabla 18**).

Con esta propuesta de “puntos de corte microbiológicos” se facilitaría la detección en el laboratorio de cepas que presentan un mecanismo de resistencia frente a quinolonas. Además como previamente se ha demostrado la existencia de resistencia cruzada a un amplio número de quinolonas, la propuesta de puntos de corte para una de las quinolonas sería suficiente para detectar la pérdida de sensibilidad a todas ellas en la mayoría de los casos.

De forma clásica, se ha propuesto la utilización del ácido nalidíxico para detectar la pérdida de sensibilidad a fluoroquinolonas en *Enterobacteriaceae*, especialmente en *Salmonella* (Crump J. A., 2003, Hakanen A., 1999). Brenwald *et al* describieron dos cepas de *H. influenzae* con pérdida de sensibilidad a ciprofloxacina (CMIs de 0.06 y 2.0 µg/ml, respectivamente), estas cepas no presentaban halos de inhibición con discos de ácido nalidíxico de 30 µg y ambas tenían mutaciones en GyrA (Ser 84 a Phe), similares a las descritas en este estudio.

Según los datos de la presente tesis, el ácido nalidíxico sería apropiado para detectar la pérdida de sensibilidad a quinolonas, pero con varias excepciones. En la colección descrita, hay tres aislamientos clínicos de origen norteamericano (Barriere, S. L., 1993), que, si sólo se considerara el ácido nalidíxico, serían clasificados de forma errónea como cepas sin mutaciones en la QRDR de GyrA (**Figura 16** y **Figura 17**). Este fenotipo de resistencia no ha sido detectado en los aislamientos de origen español y

probablemente representaría una nueva subpoblación de cepas resistentes a quinolonas. Este fenotipo de resistencia sí ha sido detectado en otros microorganismos como *S. aureus* (Pidcock L. J., 2002) y *E. coli* (Moniot-Ville N., 1991) pero es nuevo en *H. influenzae*. Para explicar el mecanismo de resistencia de este nuevo fenotipo se han propuesto distintos mecanismos como sistemas de bombeo (Pidcock L. J., 2002) o disminución de permeabilidad de la membrana externa (Moniot-Ville N., 1991).

Entre los aislamientos clínicos de origen español había cuatro que presentaban una CMI para ácido nalidixico entre 32 y 64 µg/ml y que no tenían mutaciones en la QRDR de GyrA (**Figura 16** y **Figura 17**). Una de estas cepas tenía una mutación fuera de la QRDR de ParC y dos tenían una mutación en la QRDR de GyrB mientras que otra no presentaba modificaciones en ninguna de las QRDRs estudiadas. En estas cepas la caracterización fenotípica de un posible mecanismo de bombeo era negativa. Con lo cual es necesario proponer otro mecanismo de resistencia alternativo como podría ser la pérdida de permeabilidad.

En aislamientos clínicos de *E. coli* en España se ha descrito una alta prevalencia del fenotipo resistente a ácido nalidixico (CMI > 32 µg/ml) y sensible a ciprofloxacina que se asocia a una mutación en el codon que codifica Ser 83 de *gyrA* (Ruiz J. 2001). En este trabajo se han detectado varias cepas de *H. influenzae* con una CMI a ácido nalidixico \geq 32 µg/ml y a ciprofloxacina de 0.12 a 0.25 µg/ml y que presentaban una mutación en la QRDR de GyrA (Asp 88 to Asn).

6. ANÁLISIS DEL FENOTIPO BACTERIANO HIPERMUTADOR

Se ha descrito en múltiples patógenos como son *Escherichia coli* (LeClerc, J. E., 1996), *Salmonella enterica* ((LeClerc, J. E., 1996), *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver, A., 2000), *S. aureus* (Prunier, A. L., 2003) y *H. influenzae* (Roman, F., 2004), la existencia de cepas que presentan una elevada frecuencia de mutación en presencia de rifampicina y otros antibióticos. Este fenotipo hipermutador se asocia a defectos en el sistema posreplicativo de reparación (MMR), que corrige los errores en las nuevas hebras sintetizadas de ADN y asegura la fidelidad en la replicación del cromosoma bacteriano (LeClerc, J. E., 1996).

La resistencia endógena a antimicrobianos puede surgir como consecuencia de un gran número de mecanismos que implican mutaciones en ciertos genes cromosómicos. Los citados genes cromosómicos suelen ser genes que codifican dianas sobre las que

actúa el antimicrobiano o bien sistemas que afectan a la acumulación del antibiótico (Blazquez, J., 2003).

Se ha visto en estudios previos llevados a cabo en *Pseudomonas aeruginosa* y en *H. influenzae*, que el fenotipo hipermutador se asocia con un mayor nivel de resistencia a antimicrobianos (Oliver, A., 2000, Roman, F., 2004).

En el presente trabajo se ha estudiado la frecuencia de cepas hipermutadoras en los Grupos I y II, y se ha visto que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias medias de aparición de cepas hipermutadoras y la distribución de la frecuencia de mutación en ambos grupos (**Figura 18**). La frecuencia del fenotipo hipermutador es claramente superior en cepas que presentan al menos una mutación en la QRDR de GyrA en comparación con cepas que no poseen mutaciones (42.8% frente a 5,7%). Estos datos sugieren que la resistencia a quinolonas en *H. influenzae* se asocia a una mayor frecuencia de cepas hipermutadoras con respecto a la población sensible.

Los antibióticos producen una situación de “stress bacteriano” que podría en ciertas circunstancias afectar a la frecuencia de mutación. Este hecho se ha demostrado en fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Las quinolonas al detener la replicación del ADN, inducen el sistema SOS, lo cual aumenta la tasa de mutación (Ysern, P., 1990), esto concordaría con los datos de la presente tesis. Además la mayor capacidad de las cepas del fenotipo hipermutador de presentar mutaciones, iría a favor del mecanismo de resistencia a quinolonas que se debe a mutaciones acumuladas en genes cromosómicos constitutivos que codifican las topoisomerasas bacterianas II y IV.

7. FALLO TERAPÉUTICO

Recientemente se han descrito fracasos terapéuticos debidos a la resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae* (Davidson, R., 2002, Doern, G. V., 2001). El desarrollo de resistencia y posterior fallo terapéutico en el tratamiento con quinolonas puede ser debido a cepas que ya presentan el primer paso en el mecanismo de resistencia a quinolonas, esto es mutaciones en la diana primaria, generalmente mutaciones en GyrA para bacterias gram negativas (Deguchi, T., 1997, Piddock, L. J., 2002). En el presente trabajo se describe el primer caso de fracaso terapéutico tras tratamiento con levofloxacina en una paciente con neumonía adquirida en la comunidad debido a *H. influenzae* resistente a quinolonas que se aisló en muestras respiratorias y sangre. La paciente había recibido previamente tratamiento con moxifloxacina durante cinco días.

Esto podría sugerir que la exposición previa a fluoroquinolonas sería una contraindicación para el uso de otra quinolona.

Al caracterizar el mecanismo de resistencia del aislamiento responsable del fracaso terapéutico, se observa que las posiciones en que se encuentran cambios aminoacídicos en las QRDRs de GyrA y ParC son las mismas que aparecen en el resto de las cepas del estudio (**Tabla 14**). La mutación observada en ParE (Asp420 a Asn), solo aparece en cepas que presentan una CMI para ciprofloxacina ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, el perfil de mutaciones que se describe en este aislamiento clínico es único y no aparece en ningún otro aislamiento de la colección.

Para restringir al máximo la selección de mutantes resistentes a fluoroquinolonas, se ha propuesto la administración de dosis de antibiótico que permitan alcanzar una concentración denominada “concentración preventiva de mutantes” ya que se ha visto que las cepas mutantes se seleccionan solo en un rango de concentración denominado “ventana de selección de mutantes” (Zhao, X. and K. Drlica, 2001). La concentración de antibiótico se mantiene en esta ventana con mayor facilidad con los regímenes terapéuticos de administración oral y en dosis única, como es el caso de los tratamientos con moxifloxacina y levofloxacina.

Una diferencia importante entre *S. pneumoniae* y *H. influenzae* es que sus CMIs₉₀ para la levofloxacina son de 1-2 $\mu\text{g/ml}$ y 0.03 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Lode, H., 2002). Este hecho sugiere que los eventos necesarios para alcanzar el mismo nivel de resistencia en *H. influenzae* son más complejos que en *S. pneumoniae*.

La C_{max} de levofloxacina, cuatro horas después de una dosis oral de 500mg, es de unos 4.0 $\mu\text{g/ml}$ (suero) y 11.0 $\mu\text{g/ml}$ (fluidos epiteliales) (Chien, S. C., 1997, Lode, H., 2002) que se encuentra claramente por debajo de la CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$ para la levofloxacina de la cepa aislada.

No está claro cuál es el origen en la enferma de la cepa de *H. influenzae* altamente resistente a quinolonas (60FT). La forma habitual que se describe en *H. influenzae* para adquirir resistencia a quinolonas son mutaciones secuenciales en las dianas primarias GyrA and ParC, la única oportunidad de emergencia de una cepa con sensibilidad reducida a quinolonas es durante el tratamiento oral de una dosis única de moxifloxacina dos meses antes del siguiente tratamiento con levofloxacina. Es posible

que la cepa con sus cuatro mutaciones se seleccionase durante el tratamiento inicial con moxifloxacina, o bien que este tratamiento favoreciese las mutaciones iniciales en GyrA y ParC (1 y 1), y el resto de las mutaciones se produjesen durante el tratamiento posterior con levofloxacina.

- 1) La resistencia a quinolonas en *H. influenzae*, no se debe a una diseminación clonal dada la diversidad genética que se ha encontrado en la población de estudio.
- 2) Todas las quinolonas incluídas en el estudio presentan buena actividad *in vitro* frente a la población de cepas de *H. influenzae* que no muestran alteraciones en las QRDRs de la topoisomerasa II y IV. Las quinolonas más activas fueron clinafloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina, ciprofloxacina, trovafloxacina y levofloxacina. En el grupo de cepas con mutaciones, todas las quinolonas estudiadas pierden su actividad, y solamente la clinafloxacina y la gatifloxacina preservan su buena actividad *in vitro*.
- 3) La pérdida de sensibilidad a ciprofloxacina en *H. influenzae* se correlaciona con la pérdida de sensibilidad a un gran número de quinolonas de distintas generaciones. Además, aunque cada quinolona presenta una actividad intrínseca propia frente a *H. influenzae*, la magnitud de la pérdida de sensibilidad es similar en todas ellas. Esta buena correlación nos permite afirmar que con el uso de ciprofloxacina y ácido nalidíxico sería suficiente para detectar la pérdida de sensibilidad a esta familia de antibióticos.
- 4) La resistencia a quinolonas en *H. influenzae* se acompaña significativamente de la pérdida simultanea de sensibilidad a otros antibióticos.
- 5) Tras el análisis las mutaciones presentes en las QRDRs (“*Quinolone Resistance Determining Regions*”) de GyrA, GyrB, ParC y ParE, podemos inferir que el principal mecanismo de resistencia a quinolonas en *H. influenzae* es la adquisición de mutaciones puntuales en las citadas regiones. El primer paso sería la adquisición de una mutación en la QRDR de GyrA, a la que seguiría una alteración en ParC y de nuevo otra mutación en GyrA.
- 6) El siguiente paso para adquirir un alto nivel de resistencia a quinolonas en *H. influenzae*, una vez que la cepa ha alterado sus dos dianas principales, podría ser una segunda modificación en la QRDR de ParC (no se ha observado en aislamientos clínicos) o bien una mutación en la QRDR de ParE.
- 7) La presencia de distintos SNPs, la diferente combinación de los mismos y su mayor o menor acumulación en las cepas estudiadas, hace que el análisis de la divergencia de los nucleótidos de estos genes sea una opción más para en el estudio de una población de este organismo con fines de tipificación, de evolución y/o de filogenia.

- 8) Es posible a partir de los datos de sensibilidad a ácido nalidíxico, ciprofloxacino, moxifloxacino o levofloxacino obtenidos por microdilución o difusión en disco inferir la presencia o ausencia de mutaciones en las QRDRs de GyrA y ParC.
- 9) El fenotipo hipermutador se asocia a la disminución de la sensibilidad a quinolonas en *H. influenzae*.
- 10) El aumento de la expresión de sistemas de bombeo activo no parece ser un mecanismo que participe en la pérdida de sensibilidad a quinolonas en *H. influenzae*.
- 11) Es muy probable que el tratamiento repetido con quinolonas en pacientes con patologías respiratorias crónicas, favorezca la selección de cepas de *H. influenzae* con altos niveles de resistencia a quinolonas, que presentan alteraciones en múltiples dianas y que pueden generar, si son tratadas con estos antibióticos un fracaso terapéutico.

- Akasaka, T., S. Kurosaka, Y. Uchida, M. Tanaka, K. Sato and I. Hayakawa.** 1998. Antibacterial activities and inhibitory effects of sitafloxacin (DU-6859a) and its optical isomers against type II topoisomerases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.42: 1284-7
- Albrecht, R.** 1977. Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progres Des Recherches Pharmaceutiques*.21: 9-104
- Bagel, S., V. Hullen, B. Wiedemann and P. Heisig.** 1999. Impact of gyrA and parC mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.43: 868-75
- Baquero, F.** 1996. Antibiotic resistance in Spain: what can be done? Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.23: 819-23
- Barriere, S. L. and J. Hindler.** 1993. Ciprofloxacin resistant Haemophilus influenzae in a patient with chronic lung disease. *Annals of Pharmacotherapy*.27: 309-10
- Barry, A. L., P. C. Fuchs and S. D. Brown.** 2001. In vitro activities of three nonfluorinated quinolones against representative bacterial isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.45: 1923-7
- Barry, A. L., J. H. Jorgensen, D. J. Hardy, S. D. Allen and C. N. Baker.** 1992. Haemophilus influenzae ATCC 49766, an alternative quality control strain for monitoring broth microdilution susceptibility tests with selected beta-lactams. *Journal of Clinical Microbiology*.30: 2033-7
- Bastida, T., M. Perez-Vazquez, J. Campos, M. C. Cortes-Lletget, F. Roman, F. Tubau, A. G. de la Campa and C. Alonso-Tarres.** 2003. Levofloxacin treatment failure in Haemophilus influenzae pneumonia. *Emerg Infect Dis*.9: 1475-8
- Biedenbach, D. J. and R. N. Jones.** 2000. Fluoroquinolone-resistant Haemophilus influenzae: frequency of occurrence and analysis of confirmed strains in the SENTRY antimicrobial surveillance program (North and Latin America). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.36: 255-9
- Biedenbach, D. J. and R. N. Jones.** 2002. Evaluation of in vitro susceptibility testing criteria for gemifloxacin when tested against Haemophilus influenzae strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin and ofloxacin. 43: 323-6
- Biedenbach, D. J. and R. N. Jones.** 2003. Five-year analysis of Haemophilus influenzae isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones: prevalence results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*.46: 55-61.
- Blazquez, J.** 2003. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.37: 1201-9
- Bootsma, H. J., A. Troelstra, A. van Veen_Rutgers, F. R. Mooi, A. J. de Neeling and B. P. Overbeek.** 1997. Isolation and characterization of a ciprofloxacin-resistant isolate of Haemophilus influenzae from The Netherlands. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.39: 292-3
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.41: 175-9
- Bremón, A. R., M. Ruiz-Tovar, B. P. Gorricho, P. D. de Torres and R. L. Rodríguez.** 2000. Non-hospital consumption of antibiotics in Spain: 1987-1997. 45: 395-400. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*.45: 395-400
- Bruant, G., S. Watt, R. Quentin and A. Rosenau.** 2003. Typing of nonencapsulated haemophilus strains by repetitive-element sequence-based PCR using intergenic dyad sequences. *J Clin Microbiol*.41: 3473-80.
- Brueggemann, A. B., S. L. Coffman, P. Rhomberg, H. Huynh, L. Almer, A. Nilius, R. Flamm and G. V. Doern.** 2002. Fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae in United States since 1994-1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.46: 680-8
- Campos, J., M. Chanyangam, R. deGroot, A. L. Smith, F. C. Tenover and R. Reig.** 1989. Genetic relatedness of antibiotic resistance determinants in multiply resistant Hemophilus influenzae. *The Journal of Infectious Diseases*.160: 810-7
- Campos, J., F. Román, M. Georgiou, C. García, R. Gómez-Lus, R. Cantón, H. Escobar and F. Baquero.** 1996. Long-term persistence of ciprofloxacin-resistant Haemophilus influenzae in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*.174: 1345-7
- Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley and E. S. Lander.** 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*.22: 231-8

- Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo and D. E. Low.** 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. Canadian Bacterial Surveillance Network. *The New England Journal of Medicine*.341: 233-9
- Chien, S. C., M. C. Rogge, L. G. Gisclon, C. Curtin, F. Wong, J. Natarajan, R. R. Williams, C. L. Fowler, W. K. Cheung and A. T. Chow.** 1997. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.41: 2256-60
- Corkill, J. E., A. J. Komolafe, T. J. Neal, A. Mortimore, A. B. Alawattegama, C. A. Hart, G. G. Zhanel, A. Walkty, K. Nichol, H. Smith, A. Noreddin and D. J. Hoban.** 2003. Molecular epidemiology of endemic ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Liverpool
- Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. *Int J STD AIDS*.14: 379-85.
- Corkill, J. E., A. Percival, P. McDonald and A. I. Bamber.** 1994. Detection of quinolone resistance in *Haemophilus* spp. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.34: 841-4
- Cullen, M. E., A. W. Wyke, R. Kuroda and L. M. Fisher.** 1989. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.33: 886-94
- Davidson, R., R. Cavalcanti, J. L. Brunton, D. J. Bast, J. C. de Azavedo, P. Kibsey, C. Fleming and D. E. Low.** 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *The New England Journal of Medicine*.346: 747-50
- Davies, T. A., R. Goldschmidt, S. Pflieger, M. Loeloff, K. Bush, D. F. Sahm, A. Evangelista, D. J. Biedenbach and R. N. Jones.** 2003. Cross-resistance, relatedness and allele analysis of fluoroquinolone-resistant US clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (1998-2000)
- Five-year analysis of *Haemophilus influenzae* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones: prevalence results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemother*.52: 168-75. Epub 2003 Jul 1.
- Deguchi, T., M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozeki, E. Kanematsu, Y. Nishino, S. Ishihara and Y. Kawada.** 1997. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.40: 543-9
- 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. *Journal of Bacteriology*.91: 768-73
- Dekitsch, C., R. Schein, E. Markopoulos, B. Kuen, W. Graninger and A. Georgopoulos.** 1999. Analysis of mutations to *gyrA* in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Medical Microbiology*.48: 73-7
- Doern, G. V., K. P. Heilmann, H. K. Huynh, P. R. Rhomberg, S. L. Coffman and A. B. Brueggemann.** 2001. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999--2000, including a comparison of resistance rates since 1994--1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.45: 1721-9
- Domagala, J. M.** 1994. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.33: 685-706
- Domagala, J. M., L. D. Hanna, C. L. Heifetz, M. P. Hutt, T. F. Mich, J. P. Sanchez and M. Solomon.** 1986. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *Journal of Medicinal Chemistry*.29: 394-404
- Falla, T. J., D. W. Crook, L. N. Brophy, D. Maskell, J. S. Kroll and E. R. Moxon.** 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*.32: 2382-6.
- Fedderson, A., H. G. Meyer, P. Matthes, S. Bhakdi and M. Husmann.** 2000. *GyrA* sequence-based typing of *Legionella*. 189: 7-11
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick and et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*.269: 496-512.
- Friedman, S. M., T. Lu and K. Drlica.** 2001. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.45: 2378-80
- Fung_Tomc, J. C., B. Minassian, B. Kolek, E. Huczko, L. Aleksunes, T. Stickle, T. Washo, E. Gradelski, L. Valera and D. P. Bonner.** 2000. Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.44: 3351-6
- Garcia_Rodriguez, J. A., F. Baquero, J. Garcia_de_Lomas and L. Aguilar.** 1999. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996-97) multicenter surveillance study. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Infection*.27: 265-7

- Gensberg, K., Y. F. Jin and L. J. Piddock.** 1995. A novel gyrB mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of Salmonella typhimurium. *Fems Microbiology Letters*.132: 57-60
- Georgiou, M., R. Munoz, F. Roman, R. Canton, R. Gomez-Lus, J. Campos and A. G. De La Campa.** 1996. Ciprofloxacin-resistant Haemophilus influenzae strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother*.40: 1741-4
- Gould, I. M., K. J. Forbes and G. S. Gordon.** 1994. Quinolone resistant Haemophilus influenzae. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.33: 187-8
- Griggs, D. J., K. Gensberg and L. J. Piddock.** 1996. Mutations in gyrA gene of quinolone-resistant Salmonella serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.40: 1009-13
- Groeneveld, K., P. P. Eijk, L. van Alphen, H. M. Jansen and H. C. Zanen.** 1990. Haemophilus influenzae infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease despite specific antibodies in serum and sputum. *The American Review of Respiratory Disease*.141: 1316-21
- Hakanen, A., P. Kotilainen, J. Jalava, A. Siitonen and P. Huovinen.** 1999. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in Salmonellas and validation of nalidixic acid screening test. *J Clin Microbiol*.37: 3572-7.
- Hallett, P. and A. Maxwell.** 1991. Novel quinolone resistance mutations of the Escherichia coli DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.35: 335-40
- Hane, M. W. and T. H. Wood.** 1969. Escherichia coli K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. *Journal of Bacteriology*.99: 238-41
- Heddle, J. and A. Maxwell.** 2002. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.46: 1805-15
- Heisig, P., H. Schedletzky and H. Falkenstein_Paul.** 1993. Mutations in the gyrA gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.37: 696-701
- Heisig, P. and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of escherichia coli selected in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.38: 1284-91
- Herriott, R. M., E. M. Meyer and M. Vogt.** 1970. Defined nongrowth media for stage II development of competence in Haemophilus influenzae. *Journal of Bacteriology*.101: 517-24
- Hooper, D. C.** 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.32 Suppl 1: S9-S15
- Huang, W. M.** 1996. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annual Review of Genetics*.30: 79-107
- Hunter, P. R. and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*.26: 2465-6.
- Ito, A., K. Hirai, M. Inoue, H. Koga, S. Suzue, T. Irikura and S. Mitsuhashi.** 1980. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.17: 103-8
- Jacoby, G. A., N. Chow and K. B. Waites.** 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.47: 559-62
- Jones, R. N. and D. J. Biedenbach.** 2003. Comparative activity of garenoxacin (BMS 284756), a novel desfluoroquinolone, tested against 8,331 isolates from community-acquired respiratory tract infections: North American results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2001). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.45: 273-8
- Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga and H. Suzuki.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. *Cell*.63: 393-404
- Kilian, M.** 1976. A taxonomic study of the genus Haemophilus, with the proposal of a new species. *Journal of General Microbiology*.93: 9-62
- Kumagai, Y., J. I. Kato, K. Hoshino, T. Akasaka, K. Sato and H. Ikeda.** 1996. Quinolone-resistant mutants of escherichia coli DNA topoisomerase IV parC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.40: 710-14
- LeClerc, J. E., B. Li, W. L. Payne and T. A. Cebula.** 1996. High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens. *Science*.274: 1208-11
- Lee, J. J. and H. O. Smith.** 1988. Sizing of the Haemophilus influenzae Rd genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*.170: 4402-5
- Lehn, N., J. Stower_Hoffmann, T. Kott, C. Strassner, H. Wagner, M. Kronke and W. Schneider_Brachert.** 1996. Characterization of clinical isolates of Escherichia coli showing high levels of fluoroquinolone resistance. *Journal of Clinical Microbiology*.34: 597-602

Lewin B. Genes IV.

Llorente, B., F. Leclerc and R. Cedergren. 1996. Using SAR and QSAR analysis to model the activity and structure of the quinolone-DNA complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.4: 61-71

Lode, H. and M. Allewelt. 2002. Role of newer fluoroquinolones in lower respiratory tract infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.50: 151-4

Lumish, R. M. and C. W. Norden. 1975. Cinoxacin: in vitro antibacterial studies of a new synthetic organic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.7: 159-63

Meats, E., E. J. Feil, S. Stringer, A. J. Cody, R. Goldstein, J. S. Kroll, T. Popovic and B. G. Spratt. 2003. Characterization of encapsulated and nonencapsulated Haemophilus influenzae and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*.41: 1623-36

Millemann, Y., M. C. Lesage, E. Chalus-Dancla and J. P. Lafont. 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of Salmonella typhimurium and S. enteritidis. *J Clin Microbiol*.33: 173-9.

Miyamoto, T., J. Matsumoto, K. Chiba, H. Egawa, K. Shibamori, A. Minamida, Y. Nishimura, H. Okada, M. Kataoka and M. Fujita. 1990. Synthesis and structure-activity relationships of 5-substituted 6,8-difluoroquinolones, including sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent with improved potency. *Journal of Medicinal Chemistry*.33: 1645-56

Mouneimne, H., J. Robert, V. Jarlier and E. Cambau. 1999. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.43: 62-6

Murray. 7ª edición. Manual of Clinical Microbiology.

Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*.76: 5269-73.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement M100-S12. NCCLS, Wayne, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically - Sixth Edition: Approved standard M7-A5. NCCLS, Wayne, PA.

Oliver, A., R. Canton, P. Campo, F. Baquero and J. Blazquez. 2000. High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. *Science*.288: 1251-4

Oram, M. and L. M. Fisher. 1991. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of Escherichia coli clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.35: 387-9

Palu, G., S. Valisena, G. Ciarrocchi, B. Gatto and M. Palumbo. 1992. Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.89: 9671-5

Pankuch, G. A., K. Nagai, T. A. Davies, M. R. Jacobs and P. C. Appelbaum. 2002. Antipneumococcal activity of BMS 284756 compared to those of six other agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.46: 251-4

Perez-Vazquez, M., F. Roman, B. Aracil, R. Canton and J. Campos. 2003. In vitro activities of garenoxacin (BMS-284756) against Haemophilus influenzae isolates with different fluoroquinolone susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother*.47: 3539-41

Perez-Vazquez, M., F. Roman, B. Aracil, R. Canton and J. Campos. 2004. Laboratory detection of Haemophilus influenzae with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin due to GyrA and ParC mutations. *J Clin Microbiol*.42: 1185-91

Peric, M., B. Bozdogan, M. R. Jacobs and P. C. Appelbaum. 2003. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of Haemophilus influenzae clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.47: 1017-22

Peterson, L. R. 2001. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.33 Suppl 3: S180-6

Piddock, L. J. 2002. Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. *Fems Microbiology Reviews*.26: 3-16

Prunier, A. L., B. Malbruny, M. Laurans, J. Brouard, J. F. Duhamel and R. Leclercq. 2003. High rate of macrolide resistance in Staphylococcus aureus strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *The Journal of Infectious Diseases*.187: 1709-16

Rawn J. D. Bioquímica. 1ª edición, 1989. Ed. McGraw Hill. New York.

Roman, F., R. Canton, M. Perez-Vazquez, F. Baquero and J. Campos. 2004. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by Haemophilus influenzae in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol*.42: 1450-9.

- Ruiz, J., D. Castro, P. Goni, J. A. Santamaria, J. J. Borrego and J. Vila.** 1997. Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*.46: 623-8
- Sanchez, L., W. Pan, M. Vinas and H. Nikaido.** 1997. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol*.179: 6855-7.
- Schmitz, F. J., P. G. Higgins, S. Mayer, A. C. Fluit and A. Dalhoff.** 2002. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*.21: 647-59
- Sewell, D. L., A. L. Barry, S. D. Allen, P. C. Fuchs, J. H. Jorgensen and F. Tenover.** 1995. Tentative criteria for determining the in vitro susceptibilities of *Haemophilus influenzae*, including quality control parameters, to two fluoroquinolones (grepafloxacin and PD 131628). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.21: 175-9
- Shen, L. L.** 2001. Quinolone interactions with DNA and DNA gyrase. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*.95: 171-84
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.8: 132-8
- Stein, G. E.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.23 Suppl 1: S19-24
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. 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: 2233-9.
- Tillotson, G. S.** 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *Journal of Medical Microbiology*.44: 320-4
- Truong, Q. C., J. C. Nguyen_Van, D. Shlaes, L. Gutmann and N. J. Moreau.** 1997. A novel, double mutation in DNA gyrase A of *Escherichia coli* conferring resistance to quinolone antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.41: 85-90
- 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.39: 1201-3
- Vila, J., J. Ruiz, F. Sanchez, F. Navarro, B. Mirelis, M. T. de Anta and G. Prats.** 1999. Increase in quinolone resistance in a *Haemophilus influenzae* strain isolated from a patient with recurrent respiratory infections treated with ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*.43: 161-2.
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.48: 1295-9
- Wang, Y., W. M. Huang and D. E. Taylor.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.37: 457-63
- Weigel, L. M., G. J. Anderson and F. C. Tenover.** 2002. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.46: 2582-7
- Wigley, D B.** 1996. A wasp head with relaxing bite. *Structure*, 4: 117-20.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*.51: 221-71
- W.H.O.** Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. 1999. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index including defined daily doses (DDDs) for plain substances. World Health Organization, Oslo, Norway.
- Yonezawa, M., M. Takahata, N. Matsubara, Y. Watanabe and H. Narita.** 1995. DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.39: 1970-2
- 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.35: 1647-50
- Yoshida, H., M. Nakamura, M. Bogaki and S. Nakamura.** 1990. Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.34: 1273-5

Ysern, P., B. Clerch, M. Castaño, I. Gibert, J. Barbe and M. Llagostera. 1990. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis*.5: 63-6

Zhanel, G. G., A. Walkty, K. Nichol, H. Smith, A. Noreddin and D. J. Hoban. 2003. Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*.45: 63-7.

Zhao, X. and K. Drlica. 2001. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.33 Suppl 3: S147-56

Laboratory Detection of *Haemophilus influenzae* with Decreased Susceptibility to Nalidixic Acid, Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Moxifloxacin Due to *gyrA* and *parC* Mutations

María Pérez-Vázquez,¹ Federico Román,¹ Belén Aracil,¹ Rafael Cantón,² and José Campos^{1*}

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda,¹ and Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid,² Spain

Received 16 July 2003/Returned for modification 2 September 2003/Accepted 18 November 2003

The detection of clinical isolates with decreased fluoroquinolone susceptibilities and a resistance mechanism is of epidemiological and clinical interest. We studied the susceptibilities of 62 clinical isolates and 2 American Type Culture Collection reference strains of *Haemophilus influenzae* to ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and nalidixic acid by the microdilution and disk diffusion methods. The ciprofloxacin MICs for 34 of the isolates were ≥ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (range, 0.12 to 32 $\mu\text{g/ml}$), and the ciprofloxacin MICs for 28 matched control isolates were ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$. In addition, we sequenced the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA* and *parC* of all strains. The \log_2 MICs of all quinolones were plotted against the inhibition zone diameters. The MICs and inhibition zone diameters selected to screen for the resistance mechanism were based on the susceptibility distribution data and the presence or absence of amino acid changes in the QRDRs of GyrA and ParC. Strains for which ciprofloxacin MICs were ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$, levofloxacin and moxifloxacin MICs were ≤ 0.03 $\mu\text{g/ml}$, and nalidixic acid MICs were ≤ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ lacked modifications in the QRDR of GyrA. In contrast, all strains for which ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin MICs were ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and the vast majority of those for which nalidixic acid MICs were ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ exhibited amino acid changes in GyrA and ParC. Nalidixic acid and the other three fluoroquinolones studied could be used to screen *H. influenzae* isolates for the detection of decreased susceptibilities to quinolones due to the acquisition of two amino acid changes in the QRDRs of GyrA and ParC (sensitivity, >95%; specificity, >80%).

Haemophilus influenzae is a common cause of pneumonia and other acute and chronic respiratory infections in children and adults. Although fluoroquinolones remain among the antimicrobial agents that are the most powerful against *H. influenzae* in vitro and are also highly effective as oral treatments for respiratory tract infections (15), resistance has been recognized (1, 7, 16, 25). The emergence of *Streptococcus pneumoniae* and *H. influenzae* isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin and other quinolones appears to be a growing problem worldwide for clinical and public health. Recently, therapeutic failures in patients with community-acquired pneumonia associated with levofloxacin resistance in *S. pneumoniae* (10) and *H. influenzae* (3) have been described.

Cross-resistance to a large number of quinolones has been observed in *H. influenzae* (25), suggesting that testing for susceptibility to one quinolone would be sufficient to ascribe a loss of susceptibility to the entire antibiotic family in the majority of cases. On the basis of results of studies with a small number of isolates, we and others have suggested that subunit A of topoisomerase II (GyrA) and subunit A of topoisomerase IV (ParC) might be the first and second targets of quinolone action in *H. influenzae*, respectively (7, 16, 30).

Nalidixic acid has received special attention for use in a screening test for determination of the susceptibilities of gram-negative bacteria to quinolones (6, 9, 18) and the detection of strains with unique phenotypes of quinolone resistance (21, 26, 27).

We studied a collection of clinical *H. influenzae* isolates with decreased susceptibilities to ciprofloxacin (MIC range, 0.007 to 32 $\mu\text{g/ml}$) and other quinolones in order to (i) study the association of amino acid changes in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of GyrA and ParC and decreased susceptibilities to fluoroquinolones; (ii) propose MICs and inhibition zone diameters for ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and nalidixic acid that might separate strains with reduced quinolone susceptibilities as a result of the acquisition of mutations in the QRDRs of *gyrA* and *parC* as a resistance mechanism; and (iii) compare the abilities of nalidixic acid and other oral fluoroquinolones to be used for screening for reduced fluoroquinolone susceptibility.

MATERIALS AND METHODS

Test isolates. Our collection has been described elsewhere (25). Sixty-two clinical *H. influenzae* isolates and two reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) were included in this study. Three clinical isolates from the United States (1) and 31 Spanish clinical strains from our *Haemophilus* Reference Laboratory collection were selected on the basis of their reduced susceptibilities to ciprofloxacin (MICs, ≥ 0.12 $\mu\text{g/ml}$). The latter group was essentially obtained from respiratory specimens from patients with chronic respiratory infections as a result of surveillance for antibiotic resistance in Spanish clinical isolates. Strain ATCC 49247 was included as a susceptible control, as recommended by the NCCLS (24); ATCC 51907 is a strain whose whole genome has been sequenced (13). Both ATCC strains were included for quality control and comparative purposes.

Twenty-eight strains for which ciprofloxacin MICs were ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ were selected as a susceptible control group and were matched to the clinical strains with reduced susceptibilities according to the following criteria: similar dates of isolation, isolation from similar geographical areas, isolation from patients with similar clinical diagnoses and from similar anatomical sources, and similar encapsulation statuses and biotypes. All clinical strains were nonencapsulated and belonged to different biotypes (16 biotype I, 26 biotype II, 10 biotype III, 1

* Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda a Pozuelo, Km. 2, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Phone: 34 91 822 3650. Fax: 34 91 5097966. E-mail: jcampos@isciii.es.

biotype IV, 2 biotype V, 2 biotype VI, and 3 biotype VII strains). Nineteen of the 62 clinical strains were β -lactamase producers.

Susceptibility testing. All *H. influenzae* strains were studied by the broth microdilution and disk diffusion susceptibility testing methods. The reference broth microdilution method was performed according to the NCCLS guidelines (23, 24). Haemophilus test medium (HTM) was prepared with Mueller-Hinton broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) supplemented with HTM supplement (Oxoid) and yeast extract (5%; Difco, Detroit, Mich.). Microtiter plates were inoculated to produce a final inoculum density of approximately 5×10^5 CFU/ml, which was regularly controlled by counting the colonies. The inoculated plates were incubated at 35°C for 20 to 24 h before interpretation of the results. The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic that inhibited growth. The manufacturers of each of the quinolones supplied the drugs as powders of known potencies. The quinolones evaluated were ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and nalidixic acid.

The agar disk diffusion method was performed by following the NCCLS guidelines (23, 24) by using HTM base (Oxoid) supplemented with HTM supplement (Oxoid). Plates were inoculated with each bacterial suspension, which was adjusted to a McFarland 0.5 standard, and were incubated for 16 to 18 h at 35°C. Standard disks of ciprofloxacin (5 μ g), moxifloxacin (5 μ g), levofloxacin (5 μ g), and nalidixic acid (30 μ g) were purchased from Oxoid.

Amplification and sequence analysis of the QRDRs of *gyrA* and *parC*. Amplification was performed in a 50- μ l final volume containing 5 μ l of DNA template, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 μ M each primer (Pharmacia, Piscataway, N.J.), 200 μ M each deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *Taq* polymerase (Roche, Barcelona, Spain). The PCR program was denaturation at 94°C for 5 min and 30 amplification cycles of 94°C for 1 min, annealing at 54°C for 1 min, and polymerization at 72°C for 1 min; a final cycle of 72°C for 10 min was used to extend the amplicons fully. A 400-bp fragment including the QRDR of *gyrA* was amplified. The specific primers used were GYRA-F (5'-CCGCCGCTACTATTCTCAAT-3') and GYRA-R (5'-GTTGCATCCCCACCGCAATACCA-3'). A 565-bp fragment including the QRDR of *parC* was amplified by using the following specific primers: PARC-F (5'-TCTGAACTGGCTTAATTGCC-3') and PARC-R (5'-GCCACGACCTTGCTCATAAAT-3'). The PCR products were purified with a PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Both strands of the DNA of the fragments were sequenced with a Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer, Warrington, United Kingdom) according to the instructions of the manufacturer. The products were resolved and analyzed with an ABI PRISM 377 DNA sequencer. Nucleotide sequences were analyzed with DNASTAR (Madison, Wis.) software.

Amplification and sequence analysis of the QRDRs of *gyrB* and *parE*. One fragment containing *gyrB* and *parE*, including the QRDRs, was sequenced from each of four nalidixic acid-resistant strains (MICs, 32 to 64 μ g/ml) in which no amino acid modifications in the QRDRs of *GyrA* and *ParC* were detected. The specific primers used were GYRB-F (5'-CCTGCTCTTTCTGAACTTTAC-3'), GYRB-R (5'-CCATCTAACGCAAGGGTTAATC-3'), PARE-F (5'-TCGT TAGTGGCCCTGCATTAC-3'), and PARE-R (5'-GAACAGGGCACAGAGT AGGGT-3'). Sequencing and analysis of the sequences were done by the same method described above for *GyrA* and *ParC*. Determination of an eventual active efflux mechanism of fluoroquinolone resistance in these strains was carried out by determination of the ciprofloxacin and norfloxacin MICs in the presence and absence of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP; 0.01 μ g/ml) and reserpine (8.0 μ g/ml) (28).

Analysis of results. The log₂ MICs of all quinolones were plotted against the zone diameters obtained by the disk diffusion method. The correlation coefficients were determined by the least-squares method. The criteria used to determine the absence of a resistance mechanism (susceptibility) were the highest MICs and the smallest zone diameters for the group of strains that did not present mutations in the QRDRs of *GyrA* and *ParC*; the criteria used to determine the presence of a resistance mechanism (reduced susceptibility) were the lowest MICs and the largest zone diameters for which more than 70% of the strains presented two mutations in the QRDR of either *GyrA* or *ParC*. Along with these criteria there was an intermediate category that included strains without mutations in the QRDRs of *GyrA* and *ParC* and strains with only one amino acid change in the QRDR of *GyrA*. Very major errors were defined as results that indicated susceptibility by disk diffusion and reduced susceptibility by microdilution, major errors were classified as results that indicated reduced susceptibility by disk diffusion and susceptibility by microdilution, and minor errors were defined as results that indicated susceptibility in the intermediate range by one method and susceptibility or reduced susceptibility by the other method. The data were managed and the statistics were calculated by using the Whonet (WHO/CSR/DRS/99.1; World Health Organization) and GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) computer programs.

RESULTS

Quinolone susceptibility and amino acid changes in QRDRs of *GyrA* and *ParC*. The QRDRs of *GyrA* and *ParC* of 64 isolates (62 clinical isolates and 2 ATCC reference strains) were sequenced. Thirty-four strains had no amino acid modifications (Table 1). Among the 28 strains with amino acid substitutions, 7 had one amino acid change in the QRDR of *GyrA* (position 84 or 88), 13 had one amino acid substitution in the QRDR of *GyrA* linked with one amino acid substitution in the QRDR of *ParC*, and 8 had two modifications in the QRDR of *GyrA* (affecting different combinations of positions 83, 84, and 88) linked with one amino acid change in the QRDR of *ParC* (Table 1).

The distribution of the microbial population according to the susceptibilities of the isolates to ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and nalidixic acid, combined with data on the amino acid changes in the QRDRs of *GyrA* and *ParC*, are depicted in Fig. 1. All strains for which ciprofloxacin, levofloxacin, or moxifloxacin MICs were ≥ 0.5 μ g/ml had amino acid modifications, while the opposite (no amino acid substitutions) was true for strains for which ciprofloxacin MICs were ≤ 0.06 μ g/ml and levofloxacin and moxifloxacin MICs were ≤ 0.03 μ g/ml. All but four strains for which nalidixic acid MICs were ≥ 4.0 μ g/ml had amino acid modifications (see below).

For all 21 strains with two amino acid changes in the QRDRs of *GyrA* and *ParC*, ciprofloxacin and moxifloxacin MICs were ≥ 0.5 μ g/ml, levofloxacin MICs were ≥ 0.25 μ g/ml, and nalidixic acid MICs were ≥ 32 μ g/ml (Fig. 1).

Laboratory screening of strains with amino acid changes in the QRDRs of *GyrA* and *ParC*. Figure 2 shows the scattergrams obtained by comparing the inhibition zone diameters with the disks of each quinolone and the MICs obtained by the standard microdilution method. The correlation coefficients of the data obtained by microdilution and disk diffusion were -0.96 for ciprofloxacin, -0.90 for levofloxacin, -0.92 for moxifloxacin, and -0.95 for nalidixic acid. The tentative MICs and disk diffusion zone diameters for ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and nalidixic acid obtained by using the susceptibility data obtained by microdilution and disk diffusion, which allowed us to determine the presence or absence of amino acid changes in *GyrA* and *ParC* as a mechanism of resistance to quinolones, are provided in Table 2 and Fig. 2. There was an interval that included strains either with one amino acid change or without any amino acid changes in the QRDR of *GyrA*. For this interval the percentage of strains with one amino acid change in the QRDR of *GyrA* was different for each quinolone tested, as follows: for ciprofloxacin, microdilution method, 44.5%; disk diffusion method, 57.1%; for levofloxacin, microdilution method, 27.2%; disk diffusion method, 40%; for moxifloxacin, microdilution method, 44.4%; disk diffusion method, 50%; and for nalidixic acid, microdilution and disk diffusion methods, 100% (two strains). The percentages of very major, major, and minor errors derived from the proposed screening values are indicated in Table 2.

We made an attempt to correlate current NCCLS criteria for fluoroquinolone-susceptible *H. influenzae* (23) with the inhibition zone diameters and amino acid changes obtained in this study (Table 3).

Use of nalidixic acid and other fluoroquinolones for screening. For four strains in which no amino acid modifications in

TABLE 1. Quinolone susceptibilities and amino acid changes in GyrA and ParC QRDR fragments of the *H. influenzae* isolates

Strain or no. of strains	MIC or MIC range (µg/ml) ^a				Amino acid at the following positions in QRDR of GyrA:			Amino acid the following positions in QRDR of ParC:			
	CIP	MOX	LEV	NAL	83	84	88	82	83	84	88
ATCC 51907	0.007	0.03	0.03	0.5	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Ser	Glu
ATCC 49247	0.01	0.03	0.03	2.0							
34 ^b	0.007–0.12	0.01–0.12	0.01–0.12	1.0–64							
1	0.12	0.06	0.06	16			Ala				
1	0.12	0.06	0.12	2.0			Tyr				
1	0.12	0.12	0.12	64			Tyr				
1	0.25	0.12	0.12	64			Asn				
1	1.0	1.0	1.0	4.0		Phe					
1	2.0	2.0	1.0	128		Leu					
1	4.0	4.0	2.0	2.0		Phe					
1	0.5	0.5	0.5	32			Asn				Lys
1	0.5	0.5	0.25	128			Asn			Arg	
1	2.0	2.0	1.0	64			Tyr	Asp			
1	2.0	1.0	2.0	64		Leu				Ile	
1	2.0	1.0	1.0	128		Phe				Arg	
1	4.0	1.0	2.0	64			Asn			Ile	
1	4.0	2.0	2.0	64			Asn			Ile	
1	4.0	2.0	2.0	64			Asn			Ile	
1	4.0	2.0	2.0	128			Asn			Ile	
1	4.0	4.0	2.0	128			Asn			Ile	
1	4.0	4.0	2.0	128		Leu				Ile	
1	4.0	4.0	4.0	128		Leu				Ile	
1	4.0	2.0	2.0	64		Phe				Ile	Lys
1	1.0	1.0	0.5	64	Gly	Asp				Arg	
1	4.0	2.0	2.0	64		Leu	Asn			Ile	
1	4.0	2.0	2.0	128		Leu	Asn			Ile	
1	4.0	2.0	2.0	128		Leu	Asn			Ile	
1	8.0	4.0	4.0	128		Ile	Ala		Gly		
1	16	8.0	16	64		Leu	Asn			Ile	
1	16	2.0	1.0	64		Leu	Asn		Asn		
1	32	32	32	2.0		Leu	Tyr	Asp			

^a CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; MOX, moxifloxacin; NAL, nalidixic acid.

^b Additional amino acid changes were detected in the QRDR of GyrB in two strains for which the nalidixic acid MIC was 32 µg/ml: Asp489 to Asn and Thr472 to Ile.

the QRDR of GyrA were detected, the nalidixic acid MICs were between 32 and 64 µg/ml (Fig. 1). The corresponding ciprofloxacin MICs ranged from 0.06 to 0.12 µg/ml. These results were confirmed in at least three separate experiments. We considered the possibility of the existence of another resistance mechanism in these strains, and for this reason we sequenced a DNA fragment that included the QRDRs of GyrB and ParE. We found one amino acid change in ParC outside the QRDR (Ser133 to Ala) in one of the strains, and we detected two amino acid changes in the QRDR of GyrB (Asp489 to Asn and Thr472 to Ile) in two strains; we noticed no additional amino acid changes in the remaining strain. There were no differences in the ciprofloxacin and norfloxacin MICs for these four strains, as determined in the presence and absence of CCCP or reserpine.

Three additional strains presented amino acid changes in the QRDR of GyrA, but the nalidixic acid MIC was 2 µg/ml for all of them. The strains were therefore grouped with the nalidixic acid-susceptible strains (Fig. 2). These three strains were from the United States (1) and were sent to our reference laboratory; the ciprofloxacin MICs for the three strains were 0.12, 4, and 32 µg/ml, respectively; the levofloxacin MICs were 0.12, 2, and 32 µg/ml, respectively; and the moxifloxacin MICs were 0.06, 4, and 32 µg/ml, respectively.

According to the proposed screening criteria (Table 2), we estimated that the sensitivity and specificity of susceptibility tests with nalidixic acid for the discrimination of strains of *H. influenzae* with amino acid changes in the QRDRs of GyrA and ParC were 95.2 and 80%, respectively, which represents a sensitivity lower than that reported for *Salmonella* but a similar specificity (18). For the other fluoroquinolones tested, the sensitivities and specificities for the discrimination of strains with a resistance mechanism due to at least two amino acid changes in the QRDRs of GyrA and ParC were 95 to 100% and 90.4 to 93.3%, respectively.

DISCUSSION

Fluoroquinolone resistance and therapeutic failures have been described in *S. pneumoniae* (10, 12, 19) and other pathogens, including *H. influenzae* (3). The development of resistance and therapeutic failure during quinolone treatment might be due to the presence of infecting strains that have already undergone the initial step in the process of acquiring a mechanism of resistance, generally, the acquisition of GyrA mutations in gram-negative bacteria (11, 14, 26). We have recently reported on the first case of levofloxacin treatment failure in a patient with community-acquired pneumonia due

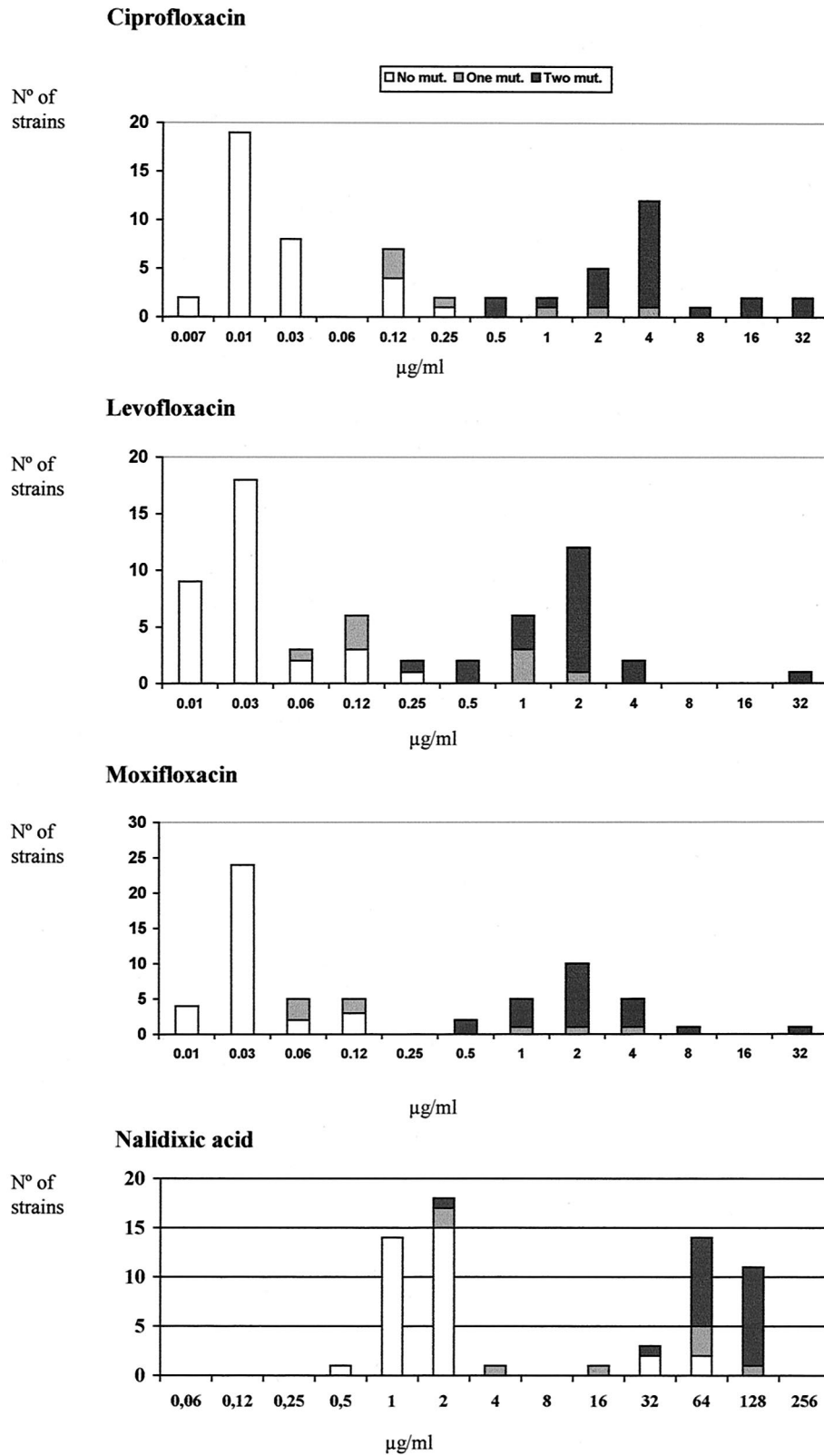


FIG. 1. Distribution of quinolone MICs for the *H. influenzae* strain collection according to the presence or absence of amino acid modifications in the QRDRs of GyrA and ParC. One mutation was always detected in GyrA, and two mutations were detected in GyrA or both GyrA and ParC.

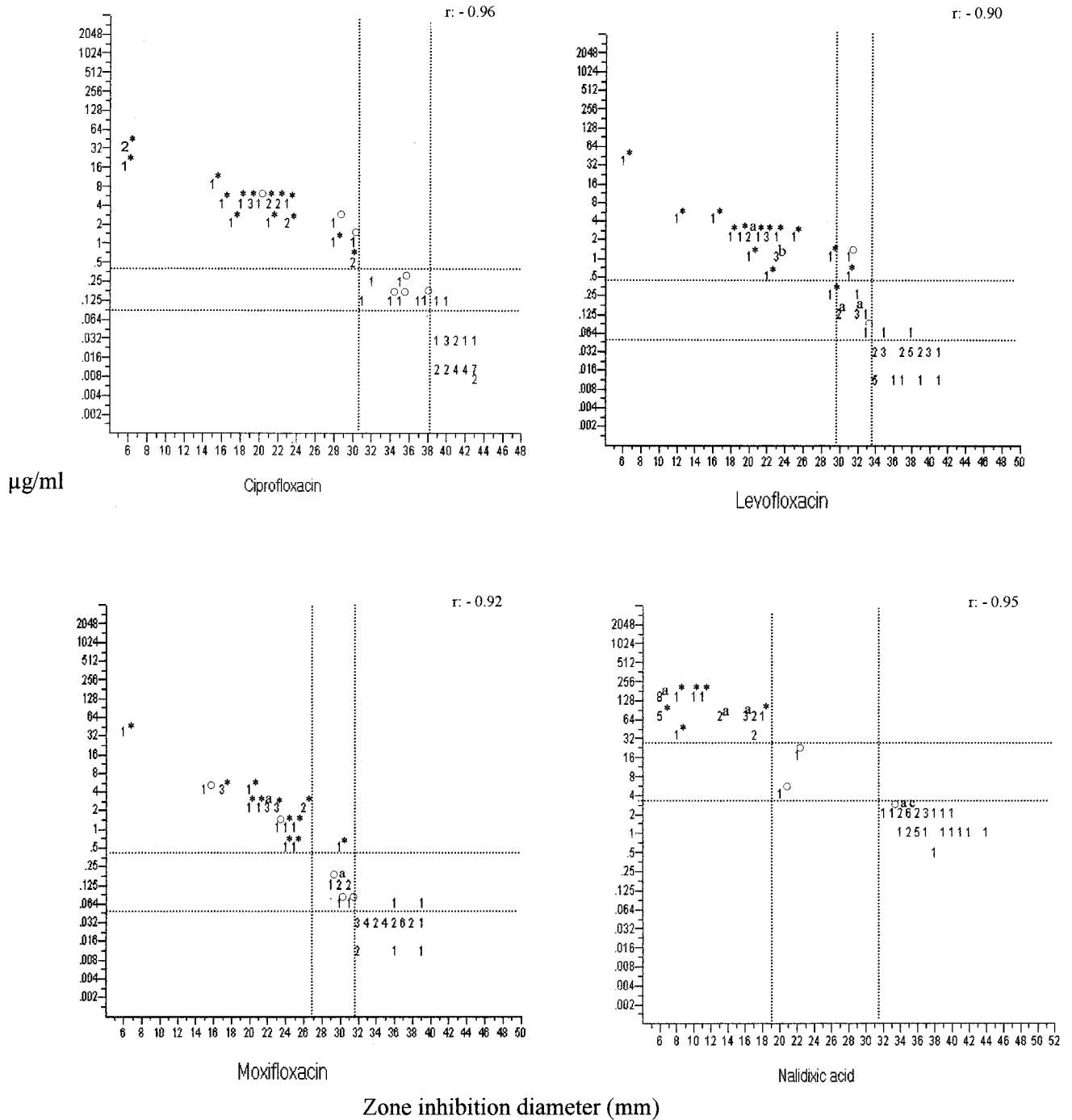


FIG. 2. Tentatively proposed microbiological criteria for ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and nalidixic acid for the microdilution and disk diffusion tests for *H. influenzae* strains with and without amino acid modifications in the QRDR of GyrA. Symbols: *, strains with two amino acid modifications in the QRDR of GyrA and ParC; ○, one amino acid change in the QRDR of GyrA. Letters: a, of these strain groups, only one had one amino acid modification in the QRDR of GyrA; b, of this strain group, two had one amino acid modification in the QRDR or GyrA; c, of this strain group, one had two amino acid modifications in the QRDRs of GyrA and ParC.

to levofloxacin resistance in an *H. influenzae* strain isolated from the patient's blood (3). The patient had previously been treated with moxifloxacin for 5 days. Most general surveillance studies have shown that the rate of resistance to fluoroquinolones in *H. influenzae* is low (15). However, this resistance rate

could be higher among isolates recovered from patients with chronic respiratory infections, as the clinical management of these patients often includes repetitive treatments with oral quinolones (7, 17) and quinolone resistance could be induced as a consequence of this strong antibiotic pressure.

TABLE 2. Tentative microbiological criteria for ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and nalidixic acid for microdilution and disk diffusion tests for *H. influenzae* with and without amino acid changes in QRDRs of GyrA and ParC

Quinolone	MIC ($\mu\text{g/ml}$) criteria (correlated zone diameter [mm])			% Test error		
	No amino acid changes	None or one amino acid change in QRDR of GyrA	Two amino acid changes in QRDRs of GyrA and ParC	Very major	Major	Minor
Ciprofloxacin	≤ 0.06 (≥ 39)	0.12–0.25 (31–38)	≥ 0.5 (≤ 30)	0.0	0.0	3.2
Levofloxacin	≤ 0.03 (≥ 34)	0.06–0.25 (30–33)	≥ 0.5 (≤ 29)	0.0	0.0	8.5
Moxifloxacin	≤ 0.03 (≥ 31)	0.06–0.25 (27–31)	≥ 0.5 (≤ 26)	0.0	0.0	5.0
Nalidixic acid	≤ 2.0 (≥ 32)	4.0–16 (19–31)	≥ 32 (≤ 18)	0.0	0.0	0.0

An increase in the rate of fluoroquinolone use, particularly for the treatment of respiratory tract infections, has been recorded in recent years. In Spain, the numbers of prescriptions of quinolones for adult outpatients increased by 266.6% between 1985 and 2000 (5, 20), probably as a consequence of the introduction of fluoroquinolones with enhanced activities against *S. pneumoniae*. This increment may speed the future emergence of fluoroquinolone resistance in respiratory pathogens, including *H. influenzae*.

There have been several attempts to propose resistance breakpoints for quinolones in *H. influenzae* (2, 4, 8, 29), but the major weakness of those studies was that most of them lacked representative nonsusceptible populations from clinical infections. Our screening proposal criteria are intended to identify microorganisms belonging to subpopulations with a resistance mechanism (mutations in the QRDR of GyrA) that may be responsible for the spread of quinolone resistance (22). In this study, mutations in the QRDR of GyrA were consistently found in strains for which ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin MICs were ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and in about 40% of strains for which ciprofloxacin MICs were between 0.12 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ and moxifloxacin MICs were between 0.06 and 0.12 $\mu\text{g/ml}$ and in 27% of strains for which levofloxacin MICs were between 0.06 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$. In the case of nalidixic acid, the majority of strains for which MICs were ≥ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ had mutations in GyrA. When we include the data for the second target (ParC), our criteria can distinguish between strains with one amino acid change in GyrA from another group with two amino acid changes (either one change each in GyrA and ParC

or two changes in GyrA). The fluoroquinolone MICs were the highest for the latter group of strains: ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for ciprofloxacin and moxifloxacin, ≥ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ for levofloxacin, and ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ for nalidixic acid. In our study, the group of strains with two amino acid changes in the QRDR of GyrA also had an additional mutation in the QRDR of ParC and corresponded to the strains for which the MICs of all quinolones tested were the highest (Table 1).

Levofloxacin and moxifloxacin are recommended for the treatment of community-acquired pneumonia. The criteria suggested in this study should facilitate the laboratory detection of strains with decreased susceptibilities to quinolones. We have previously suggested that cross-resistance to a large group of quinolones is usually found in *H. influenzae* (25); for that reason, the use of the proposed screening for decreased susceptibility to one of the quinolones may be sufficient to detect decreased susceptibilities to all of them in the majority of cases.

Classically, nalidixic acid has been proposed for use in tests for screening for susceptibility in members of the family *Enterobacteriaceae*, especially *Salmonella* (9, 18). Brenwald et al. (6) described two strains of *H. influenzae* with decreased susceptibilities to ciprofloxacin (MICs, 0.06 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively); neither strain presented an inhibition zone in tests with a 30- μg nalidixic acid disk, and both had mutations in GyrA (Ser64 to Phe) similar to those described in this study. According to our data, nalidixic acid would also be appropriate for use in tests of decreased susceptibility in *H. influenzae*, although there are several exceptions. In our series, three U.S. isolates would have erroneously been considered to be free of mutations in the QRDR of GyrA. This resistance phenotype was not detected in Spanish isolates, and isolates with this phenotype may represent a different quinolone-resistant subpopulation. Strains with similar resistance phenotypes have been reported among other bacteria, such as *Staphylococcus aureus* (26) and *Escherichia coli* (21); but this is a new phenomenon in *H. influenzae*. Novel mechanisms of resistance have been proposed for isolates of this phenotype, such as multidrug efflux (26) and decreased outer membrane permeability (21).

Nalidixic acid MICs were between 32 and 64 $\mu\text{g/ml}$ for four Spanish isolates lacking modifications in GyrA; however, one strain had an one amino acid change outside the QRDR of ParC, and two strains each had one amino acid change in the QRDR of GyrB. One strain had no mutations in any of the DNA gyrases or topoisomerases assayed. In addition, the initial phenotypic characterization of an eventual efflux mechanism was negative for these four strains. Other alternative

TABLE 3. Distribution of the strain collection according to current NCCLS criteria for fluoroquinolone-susceptible *H. influenzae* and comparison with data on amino acid modifications in the QRDRs of GyrA and ParC

Quinolone	NCCLS criteria ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Proposed zone diameter (mm) ^b	No. (%) of strains with:		
			No mutation	One mutation in GyrA QRDR	Two mutations in either GyrA or ParC QRDR
Ciprofloxacin	≤ 1	≥ 28	34 (81)	5 (12)	3 (7)
Levofloxacin	≤ 2	≥ 18	33 (60)	7 (12.7)	15 (27.3)
Moxifloxacin	≤ 1	≥ 23	33 (76.7)	5 (11.6)	5 (11.6)

^a The NCCLS criteria are presented in reference 23.

^b These proposed diameters were based on the distribution of the population in Fig. 2.

resistance mechanisms, such as an alteration in outer membrane permeability, may operate in these strains (21). The nalidixic acid-resistant (MICs, >32 µg/ml), ciprofloxacin-susceptible phenotype has been described to be strongly prevalent among clinical *E. coli* isolates in Spain (27). This phenotype is linked to a mutation in the Ser83 amino acid codon of *gyrA*. We have also found several *H. influenzae* strains with a mutation in the QRDR of GyrA (Asp88 to Asn) for which nalidixic acid MICs were ≥32 µg/ml and ciprofloxacin MICs were 0.12 to 0.25 µg/ml.

In summary, in this study we have shown that decreased susceptibility to quinolones in *H. influenzae* is usually associated with amino acid changes in the QRDRs of GyrA and ParC. We have suggested MIC and inhibition zone criteria that may be useful for the separation of clinical isolates of *H. influenzae* that are fully susceptible to ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and nalidixic acid from others with various degrees of decreased susceptibilities to these quinolones as a result of target modifications in GyrA and ParC. Nalidixic acid and other oral fluoroquinolones could be used in tests to screen for the detection of decreased susceptibility to quinolones in *H. influenzae* with a sensitivity of >95% and a specificity of >80%.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maite Camacho and Enrique Moguel for collaboration in this study, as well as the Biopolymers Unit of ISCIII. We thank Janet Hinder for providing us with two quinolone-resistant *H. influenzae* isolates.

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (grant 99/0304), Ministerio de Sanidad of Spain. M. Pérez-Vázquez is a recipient of a grant from the Instituto de Salud Carlos III (grant 02/0056). We also thank the Fundación Ciencias Microbianas (Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain) for its contribution.

REFERENCES

- Barriere, S. L., and J. Hindler. 1993. Ciprofloxacin resistant *Haemophilus influenzae* in a patient with chronic lung disease. *Ann. Pharmacother.* **27**: 309–310.
- Barry, A. L., J. H. Jorgensen, D. J. Hardy, S. D. Allen, C. N. Baker, P. C. Fuchs, and J. C. McLaughlin. 1992. Interpretive criteria and quality control parameters for testing susceptibility of *Haemophilus influenzae* to enoxacin, ofloxacin, and temafloxacin. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3013–3015.
- Bastida, T., M. Pérez-Vázquez, J. Campos, M. C. Cortés-Lletget, F. Román, F. Tubau, A. G. de la Campa, and C. Alonso-Tarrés. 2003. Therapeutic failure in a case of pneumonia due to levofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:1476–1478.
- Biedenbach, D. J., and R. N. Jones. 2002. Evaluation of in vitro susceptibility testing criteria for gemifloxacin when tested against *Haemophilus influenzae* strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin and ofloxacin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**:323–326.
- Bremón, A. R., M. Ruiz-Tovar, B. P. Gorricho, P. D. de Torres, and R. L. Rodríguez. 2000. Non-hospital consumption of antibiotics in Spain: 1987–1997. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:395–400.
- Brenwald, N., J. M. Andrews, G. Jevons, and R. Wise. 2003. Detection of ciprofloxacin resistance in *Haemophilus influenzae* using nalidixic acid and BSAC methodology. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1311–1312.
- Campos, J., F. Román, M. Georgiou, C. García, R. Gómez-Lus, R. Cantón, H. Escobar, and F. Baquero. 1996. Long-term persistence of ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **174**:1345–1347.
- Corkill, J. E., A. Percival, P. McDonald, and A. I. Bamber. 1994. Detection of quinolone resistance in *Haemophilus* ssp. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 841–844.
- Crump, J. A., T. J. Barret, J. T. Nelson, and F. J. Angulo. 2003. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype Typhi and for non-Typhi salmonellae. *Clin. Infect. Dis.* **37**:75–81.
- Davidson, R., R. Calvancanti, J. Brunton, D. J. Bast, J. C. de Acevedo, P. Kibsey, C. Fleming, and D. E. Low. 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **346**:747–750.
- Deguchi, T., T. Kawamura, M. Yasuda, M. Nakano, H. Fukuda, H. Kato, N. Kato, Y. Okano, and Y. Kawada. 1997. In vivo selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1609–1611.
- Doern, G. V., K. P. Heilmann, H. K. Huynh, P. R. Rhomberg, S. L. Coffman, and A. B. Brueggemann. 2001. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, including a comparison of resistance rates since 1994–1995. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1721–1729.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *H. influenzae* Rd. *Science* **269**:449–604.
- Galanakis, N., H. Giamarellou, T. Moussas, and E. Dounis. 1997. Chronic osteomyelitis caused by multi-resistant gram-negative bacteria: evolution of treatment with newer quinolones after prolonged follow-up. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:241–246.
- García-Rodríguez, J. A., F. Baquero, J. García de Lomas, and L. Aguilar. 1999. Antimicrobial susceptibility of 1422 *H. influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain results of 1-year multicenter surveillance study. *Infection* **27**:265–267.
- Georgiou, M., R. Muñoz, F. Román, R. Cantón, R. Gómez-Lus, J. Campos, and A. De la Campa. 1996. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* possesses mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1741–1744.
- Groeneveld, K., L. van Alphen, P. P. Eijk, G. Viscers, H. M. Jansen, and H. C. Zanen. 1990. Endogenous and exogenous reinfections by *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the effect of antibiotic treatment of persistence. *J. Infect. Dis.* **161**:512–517.
- Hakanen, A., P. Kotilainen, J. Jalava, A. Siitonen, and P. Huovinen. 1999. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in salmonellas and validation of nalidixic acid screening test. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3572–3577.
- Jones, M. E., A. M. Staples, I. Critchley, C. Thornsberry, P. Heize, H. D. Engler, and D. F. Sahn. 2000. Benchmarking the in vitro activities of moxifloxacin and comparator agents against recent respiratory isolates from 377 medical centers throughout the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2645–2652.
- Lázaro, E., M. Madurga and F. J. de Abajo. 2002. Evolución del consumo de antibióticos en España, 1985–2000. *Med. Clin. (Barcelona)* **118**:561–568.
- Moniot-Ville, N., J. Guigert, N. Moreau, F. Acar, E. Collatz, and L. Gutman. 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**:519–523.
- Mouton, J. W. 2002. Breakpoints: current practice and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **19**:323–331.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement M100-S12. NCCLS, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard M7-A5. NCCLS, Wayne, Pa.
- Pérez-Vázquez, M., F. Román, M. C. Varela, R. Cantón, and J. Campos. 2003. Activities of thirteen quinolones by three susceptibility testing methods against a collection of *Haemophilus influenzae* isolates with different levels of susceptibility to ciprofloxacin: evidence for cross-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:147–151.
- Piddock, L. J., Y. Fang Jin, M. A. Webber, and M. J. Everett. 2002. Novel ciprofloxacin-resistant, nalidixic acid-susceptible mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2276–2278.
- Ruiz, J., J. Gómez, M. N. Navia, A. Ribera, J. M. Sierra, F. Marco, J. Mensa, and J. Vila. 2001. High prevalence of nalidixic resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42**:257–261.
- Sanchez, L., W. Pan, M. Viñas, and H. Nikaido. 1997. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **179**:6855–6857.
- Sewell, D. L., A. L. Barry, S. D. Allen, P. C. Fuchs, J. H. Jorgensen, and F. Tenover. 1995. Tentative criteria for determining the in vitro susceptibilities of *Haemophilus influenzae*, including quality control parameters, to two fluoroquinolones (grepafloxacin and PD 131628). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:175–179.
- Vila, J., J. Ruiz, F. Sánchez, F. Navarro, B. Mirelis, M. T. Jiménez de Anta, and G. Prats. 1999. Increase in quinolone resistance in *Haemophilus influenzae* strain isolated from a patient with recurrent respiratory infections treated with ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:161–162.

Levofloxacin Treatment Failure in *Haemophilus influenzae* Pneumonia

Teresa Bastida,* María Pérez-Vázquez,†
 José Campos,† María Cristina Cortés-Lletget,‡
 Federico Román,† Fe Tubau,§
 Adela G. de la Campa,†
 and Carles Alonso-Tarrés‡

We describe the first case of failure of oral levofloxacin treatment of community-acquired pneumonia caused by *Haemophilus influenzae*. The strain showed cross-resistance to fluoroquinolones and carried four mutations in quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase and topoisomerase IV genes.

Fluoroquinolones active against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, such as levofloxacin, moxifloxacin, and gatifloxacin, are currently recommended for the treatment of patients with community-acquired pneumonia whose infection may be due to strains resistant to β -lactam and macrolide antimicrobial drugs (1–3). In Spain, both pathogens often display multiple resistance (4,5). The failure of oral levofloxacin treatment in four patients with pneumococcal pneumonia has recently been reported (6).

We describe failure of treatment of *H. influenzae* pneumonia in a patient who died after several days of systemic treatment with levofloxacin. The *H. influenzae* strain, isolated from the blood and the respiratory tract of the patient, was resistant to levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and gatifloxacin and carried several mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDR) of DNA gyrase and topoisomerase IV genes.

Case Report

On February 15, 2002, a 71-year-old woman was admitted to Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, with cough, low-grade fever, and reported fatigue. A radiograph of her chest showed infil-

trates covering the right upper, middle, and lower lobes and the left basal lobe. A systemic, antimicrobial treatment of levofloxacin (500 mg/day) and teicoplanin (400 mg/day) was administered for severe community-acquired pneumonia. (The patient was allergic to penicillin.) Three months earlier, she had received erythromycin. In a second visit, she was treated with inhaled salbutamol and glucocorticoids. In a third visit, 2 months before she became ill, she received oral moxifloxacin for 5 days.

During her hospital stay, the patient's clinical condition worsened. Ventilation and perfusion scintiphotoscans with Tc99m, an echocardiograph, and a high resolution thoracic scan were performed in an effort to identify another illness or a possible nondrained focus; results were negative. After 7 hospital days of systemic levofloxacin therapy, her clinical condition had not improved. Two blood cultures taken after an episode of fever with a temperature of 38.5°C showed that *H. influenzae* was resistant to fluoroquinolones (strain 32602). Treatment was switched to chloramphenicol (1 g/6 h), to which the strain was susceptible. However, on the same day as the treatment change, the patient was intubated during a severe episode of respiratory impairment and transferred to the intensive care unit of Hospital de l'Hospitalet, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona. Fluoroquinolone resistance was confirmed with blood cultures (strain 35102) and a bronchial aspirate (strain 35202). Antimicrobial treatment was then switched to aztreonam (1 g/8 h). The patient died 48 hours later.

The Study

Species identification, biotyping, and serotyping followed recommended protocols (7), including capsule genotyping of six capsular types (types a–f). Susceptibility testing was performed by microdilution methods, following the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (8). β -lactamase activity was determined by the chromogenic cephalosporin test with nitrocephin as substrate. Quality control strains used were *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 51907, and *Escherichia coli* ATCC 25922. Determination of an eventual active efflux mechanism of fluoroquinolone resistance was carried out by MIC determination in the presence and absence of carbonyl cyanide 3-chlorophenyl (CCCP) and reserpine in all three clinical strains (9).

The three test strains and four additional *H. influenzae* biotype II isolates (obtained previously from blood and respiratory specimens from the geographic area where the patient lived) were examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after digestion of bacterial DNA with *Sma*I (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) and separation of the fragments with the CHEF Mapper apparatus (BioRad Laboratories, Hercules, CA) and were visually compared (10).

*Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain; †Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ‡Hospital de l'Hospitalet, Consorci Sanitari Integral, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; and §Hospital "Prínceps d'Espanya" Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Amplification and sequence analysis of the QRDRs of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* was performed in the three clinical test isolates and in the reference strain *H. influenzae* ATCC 51907 (11). These specific primers were used: *gyrA*-f (5'-CCGCCGCGTACTATTCTCAAT-3'), *gyrA*-r (5'-GTTGCCATCCCCACCGCAATACCA-3'), *gyrB*-f (5'-CCTGCTCTTTCTGAAACTTTAC-3'), *gyrB*-r (5'-CCATCTAACGCAAGGGTTAATC-3'), *parC*-f (5'-tct-gaacttggcttaattgcc-3'), *parC*-r (5'-GCCACGACCTTGCT-CATAAAT-3'), *parE*-f (5'-TCGTTAGTGGCCCTGCAT-TAC-3'), and *parE*-r (5'-GAACAGGGCAGAG-TAGGGT-3'). Sequencing was done on both DNA strands with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. The products were resolved and analyzed with an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were analyzed by using sequence analysis software (DNAsar, Inc., Madison, WI).

The three clinical isolates were identified as noncapsulated *H. influenzae* biotype II. The PFGE yielded the same pattern for each, unlike the marked diversity obtained with the four other clinical isolates from the same geographic area (Figure), and the same antimicrobial drug susceptibility testing results (Table). The results of DNA sequencing of the QRDRs of the *gyrA*, *parC*, *parE*, and *gyrB* genes are shown in the Table. All three strains presented identical amino acid substitutions. They did not produce β -lactamase and were fully susceptible to several β -lactam antimicrobial drugs and chloramphenicol. MICs of additional antimicrobial drugs were penicillin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ampicillin, 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$; amoxicillin-clavulanic acid, 0.12/0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$; cefuroxime, 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$; cefotaxime, 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$; aztreonam, 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$; chloramphenicol, 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$; erythromycin, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; clarithromycin, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; and azithromycin, 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Quinolones, other than those depicted in the Table, had the following activity levels: ofloxacin, 32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; grepafloxacin, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; clinafloxacin, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No changes in the MICs of fluoroquinolones were observed either in the presence or absence of CCCP or reserpine, suggesting that active efflux did not contribute to fluoroquinolone resistance in any of the isolates.

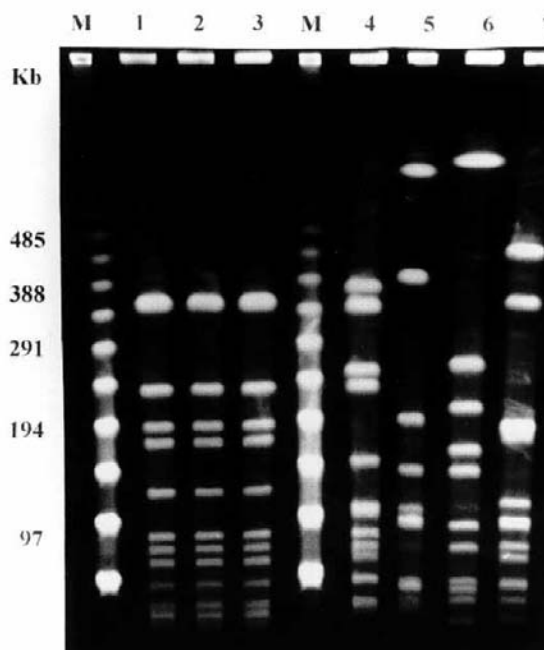


Figure. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of the three clinical isolates of levofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* from the case report (lanes 1 to 3) and four control cases of levofloxacin-susceptible *H. influenzae* biotype II strains isolated from the same geographic area (lanes 4 to 7). Lane 1: strain 32602 (blood); lane 2: strain 35102 (blood); lane 3: strain 35202 (bronchial aspirate); lane 4: pleural fluid isolate; lane 5: blood isolate; lane 6: pleural fluid isolate. M, molecular markers.

Conclusions

This study is the first description of a clinical case of a fluoroquinolone-resistant *H. influenzae* pneumonia and bacteremia, resulting in therapeutic failure and death after systemic levofloxacin treatment. The causative strain is present in cultures from the patient's blood and bronchial aspirate. This finding is consistent with the interpretation of the initial chest x-rays, which indicated a clinical case of severe community-acquired pneumonia. Similar cases of community-acquired pneumococcal pneumonia treated with levofloxacin have recently been reported (6).

We have previously described the emergence of fluoroquinolone-resistant *H. influenzae* in the upper respiratory tract of patients with chronic respiratory infections treated with oral fluoroquinolones (7,12). However, in this patient the only documented exposure to a fluoroquinolone was a

Table. Fluoroquinolone susceptibility and amino acid changes in GyrA, ParC, GyrB, and ParE QRDR fragments of three *Haemophilus influenzae* strains compared with a fully fluoroquinolone-susceptible strain^a

Strain no.	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				Amino acid at specified positions		
	CIP	LEV	MOXI	GATI	GyrA	ParC	ParE
ATCC 51907	0.007	0.03	0.01	0.003	84 Ser 88 Asp	84 Ser	420 Asp
32602, 35102, 35202	16	16	8	16	Leu Asn	Ile	Asn

^aQRDR, quinolone resistance-determining regions; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; MOXI, moxifloxacin; GATI, gatifloxacin. Microdilution used for susceptibility testing (8).

5-day treatment with moxifloxacin 2 months before the pneumonia appeared. This case suggests that exposure to a fluoroquinolone may contraindicate the use of another fluoroquinolone; however, this proposal may not be practical, especially in a patient who is allergic to penicillin.

We have already established that amino acid substitutions in the QRDRs of DNA gyrase and topoisomerase IV accounted for the mechanism of fluoroquinolone resistance in *H. influenzae* (12). The positions and the amino acid substitutions found in GyrA and ParC in this study were also present in the fluoroquinolone-resistant strains previously studied by our group (12). We have also described the Asp420Asn substitution (ParE) in another strain that exhibited high resistance levels to ciprofloxacin and other fluoroquinolones (13). However, the pattern of QRDR mutations found in the clinical strains described in this study is novel.

Use of the “mutant prevention concentration” has been proposed to discourage the selection of fluoroquinolone-resistant mutants, since resistant mutants are selected exclusively within a concentration range known as the “mutant selection window” (14). This “window” may be more easily attained with therapeutic regimes based on oral and once-daily administered doses, as is the case for moxifloxacin and levofloxacin. An important difference between *S. pneumoniae* and *H. influenzae* is that the MIC₉₀'s for levofloxacin are 1.0-2.0 µg/mL and 0.03 µg/mL, respectively (3), a 30-fold difference. This suggests that the events necessary to reach a similar level of resistance in *H. influenzae* are more complex than they are in *S. pneumoniae*.

The peak level of levofloxacin, 4 hours after a 500-mg dose, is approximately 4.0 µg/mL (serum) and 11.0 µg/mL (epithelial fluid) (3,15), which is clearly below the MIC of 16.0 µg/mL shown by these resistant strains. Where these clinical *H. influenzae* strains originated is unknown. Following the patient's oral moxifloxacin treatment 2 months before hospital admission, the *H. influenzae* may have become resistant to fluoroquinolones through a typical, step-by-step mutation process in the primary targets, DNA gyrase and topoisomerase IV, by means of four mutations in *gyrA*, *parC*, and *parE*, genes. The initial treatment also may have resulted in the mutations in *gyrA* only, with additional mutations occurring during the subsequent treatment with levofloxacin.

The *H. influenzae* strain acquired several mutations in the QRDRs and was cross-resistant to all members of a group of assayed fluoroquinolones. We believe that this case may represent an emerging clinical and microbiologic challenge, which may threaten the management of pneumonia and other infections. We recommend that blood cultures taken from patients with community-acquired pneumonia be tested for fluoroquinolone resistance, particular-

ly when the patient has already been given these antimicrobial drugs.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Health, Fondo de Investigaciones Sanitarias (J.C., 304-99 and A.G.C., 00/0258). M.P.-V. is a recipient of a fellowship (02/0056) from the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, Spain.

The DNA sequences obtained in this study have been submitted to GenBank under accession nos. AJ508043, AJ508044, AJ508045, and AJ508046.

Dr. Bastida is a clinical microbiologist in charge of a diagnostic microbiology laboratory in a 165-bed hospital. Her research interests are focused in clinical microbiology.

References

- Ball P, Baquero F, Cars O, File T, Garau J, Klugman K, et al. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:31-40.
- Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, et al. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1730-54.
- Lode H, Allewelt M. Role of newer fluoroquinolones in lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:709-12.
- Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998;36:3447-54.
- Campos J, Chanyangam M, deGroot R, Smith AL, Tenover FC, Reig R. Genetic relatedness of antibiotic resistance determinants in multiply resistant *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1989;160:810-7.
- Davidson R, Cavalcanti R, Brunton JL, Bast DJ, Azavedo JCS, Kibsey P, et al. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med* 2002;346:747-50.
- Campos J, Sáez-Nieto JA. Gram negative infections: *Haemophilus* and other clinically relevant Gram negative coccobacilli. In: Cimolai N, editor. *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001. p. 557-80.
- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS document no. M100-S11); 2001.
- Sánchez L, Pan W, Viñas M, Nikaido H. The acrAB homolog of *H. influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 1997;179:6855-7.
- Campos J, Román F, Georgiou M, García C, Gómez-Lus R, Cantón R, et al. Long-term persistence of ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1996;174:1345-7.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269:496-512.
- Georgiou M, Muñoz R, Román F, Cantón R, Gómez-Lus R, Campos J, et al. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1741-4.

13. Pérez-Vázquez M, Camacho T, Román F, Campos J, Cantón R. Mutations in quinolone-resistant determining regions (QRDR) of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes in *Haemophilus influenzae* clinical isolates. In: Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois; December 16–19, 2001; Abstract 145. Washington: American Society for Microbiology; 2001.
14. Zhao X, Drlaca K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001;33(Suppl 3):S147–56.
15. Chien SC, Rogge MC, Gisclon LG, Curtin C, Wong F, Natarajan J, et al. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2256–60.

Address for correspondence: Carles Alonso-Tarrés, Servei d'Anàlisi Clíniques-Microbiologia, Hospital de l'Hospitalet, Consorci Sanitari Integral, Avda Josep Molins 29-41, L'Hospitalet de Llobregat, 08906 Barcelona, Spain; fax: +34.93.333.45.43; email: Carles.Alonso@chcr.scs.es

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

EID
Online
www.cdc.gov/eid

A Peer-Reviewed Journal Tracking and Analyzing Disease Trends

Vol.9, No.3, March 2003

Search past issues of EID at www.cdc.gov/eid



Influenza (p.304)

In Vitro Activities of Garenoxacin (BMS-284756) against *Haemophilus influenzae* Isolates with Different Fluoroquinolone Susceptibilities

María Pérez-Vázquez,¹ Federico Román,¹ Belen Aracil,¹ Rafael Cantón,² and José Campos^{1*}

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda,¹ and Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid,² Spain

Received 5 May 2003/Returned for modification 29 July 2003/Accepted 1 August 2003

The *in vitro* activity of garenoxacin (BMS-284756) against 62 clinical *Haemophilus influenzae* isolates with different fluoroquinolone susceptibilities was determined by the microdilution susceptibility testing method and compared with the activities of other oral quinolones and nonquinolone oral antimicrobial agents. Cefixime presented the highest intrinsic activity (MIC at which 50% of the isolates tested were inhibited [MIC₅₀], 0.01 µg/ml), followed by garenoxacin, moxifloxacin, and ciprofloxacin (MIC₅₀, 0.06 µg/ml), levofloxacin (MIC₅₀, 0.12 µg/ml), cefuroxime (MIC₅₀, 1.0 µg/ml), and amoxicillin-clavulanate (MIC₅₀, 1.0/0.5 µg/ml), amoxicillin (MIC₅₀, 2 µg/ml), azithromycin (MIC₅₀, 4 µg/ml), and erythromycin (MIC₅₀, 8 µg/ml). In strains with ciprofloxacin MICs of ≤0.06 µg/ml, ciprofloxacin and garenoxacin displayed similar MIC₅₀s and MIC₉₀s, one dilution lower than those of moxifloxacin and levofloxacin. For strains for which ciprofloxacin MICs were ≥0.12 µg/ml, MIC₅₀s were similar for the four quinolones tested, although garenoxacin presented the widest activity range (0.03 to 32 µg/ml) and the highest MIC at which 90% of the isolates tested were inhibited (16.0 µg/ml). For strains without amino acid changes in the quinolone resistance determining region (QRDR) of GyrA and ParC, garenoxacin MICs were ≤0.03 µg/ml; with a single amino acid change in GyrA, garenoxacin MICs were 0.06 to 0.12 µg/ml; with one amino acid change each in GyrA and ParC, garenoxacin MICs were 0.5 to 2.0 µg/ml; one amino acid change in ParC combined with two amino acid changes in GyrA increased the MICs to ≥4 µg/ml for all assayed quinolones. We conclude that garenoxacin has excellent activity against *H. influenzae*, although progressive acquired resistance was observed by step-by-step mutation in the QRDR of *gyrA* and *parC*.

Garenoxacin is a novel des-fluoro(6)-quinolone that differs from earlier quinolones in its lack of a fluorine atom at the C-6 position and an isoindolin-5-yl substitution at the 7 position (17). It has reportedly shown increased activity relative to the other quinolones against gram-positive organisms (3, 15), including methicillin (oxacilin)-resistant staphylococci and some *Enterococcus* spp. (5). Broad antianaerobic coverage and superior activity against fastidious organisms has also been described (9). The difluoromethoxy substituent at position 8, instead of a methoxy group, has been shown to improve bacteriostatic and bactericidal activity and decrease the selection of resistant mutants (10). Garenoxacin has good oral bioavailability (11), and toxicological findings indicate low chondrotoxicity in juvenile rats, making it a potentially suitable therapy for children and adolescents (12).

Little is known about the activity of this compound against *Haemophilus influenzae* strains whether or not they have reduced susceptibility to other fluoroquinolones. Although fluoroquinolones remain among the most powerful *in vitro* antimicrobial agents against *H. influenzae* and are also highly effective as oral treatments of respiratory tract infections (6), resistance to them has been recognized (4, 7, 16). Therapeutic failure in community-acquired pneumonia associated with levofloxacin resistance has recently been described for *H. influenzae* (2). We have previously shown that strains with cip-

rofloxacin MICs of ≤0.06 µg/ml remain free of quinolone resistance determining region (QRDR) mutations in both *gyrA* and *parC*, while the first mutation in *gyrA* appears in strains with ciprofloxacin MICs of ≥0.12 µg/ml (M. Pérez-Vázquez et al., submitted for publication).

On the other hand, it is of interest to study the activities of new compounds that are to be introduced onto the market against well-characterized collections of resistant organisms (8). These studies are useful for defining the intrinsic activities of new drugs, even when resistance mechanisms may compromise these compounds.

Our study was designed to determine the comparative activity of garenoxacin (BMS-284756) and those of other orally administered quinolones and of other nonquinolone antimicrobial agents tested against *H. influenzae* isolates displaying different fluoroquinolone susceptibility values. It also aimed to ascertain the influence of GyrA and/or ParC QRDR amino acid changes on the activity of garenoxacin.

MATERIALS AND METHODS

Test isolates. A total of 62 clinical *H. influenzae* isolates and two reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC 49247 and ATCC 51907) were studied. This batch of strains was distributed into two different groups: (i) group I included two American clinical strains and 30 Spanish clinical isolates from the collection of the *Haemophilus* Reference Laboratory. They were selected on the basis of their reduced susceptibility to ciprofloxacin (MIC, ≥0.12 µg/ml). This group comprised respiratory specimens from patients with cystic fibrosis or chronic respiratory infections, obtained as part of antibiotic resistance surveillance in Spanish clinical isolates. (ii) Group II, which included a fully susceptible control group of 30 strains with ciprofloxacin MICs of ≤0.06 µg/ml, was selected and matched according to the following criteria: similar date of isolation, geographical area, clinical diagnosis, anatomical source, capsulation

* Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda a Pozuelo, Km. 2, 28220 Majadahonda-Madrid, Spain. Phone: 34 91 5097901, ext. 3650 or 3643. Fax: 34 91 5097966. E-mail: jcampos@isciii.es.

TABLE 1. In vitro activities of four quinolones and different nonquinolone antimicrobials against *H. influenzae* isolates with different levels of susceptibility to ciprofloxacin

Drug ^a	MIC (μg/ml)					
	Group I ^b			Group II ^c		
	50%	90%	Range	50%	90%	Range
Fluoroquinolones						
CIP	0.01	0.03	0.007–0.06	2	4	0.12–32
LEV	0.03	0.03	0.01–0.06	1	2	0.12–32
MOX	0.03	0.06	0.01–0.12	2	4	0.06–32
GAR	0.01	0.03	0.001–0.06	1	16	0.03–32
β-Lactams						
AMOX	2	128	0.12–128	4	128	0.06–128
AMX/CLV	0.5	4	0.12–8.0	2	8	0.06–8.0
CXM	1	8	0.12–16	2	16	0.25–64
CFX	0.01	0.12	0.01–0.25	0.06	0.5	0.01–0.5
Macrolides						
ERY	8	16	2.0–16	16	64	0.25–256
AZT	4	8	1.0–8.0	4	32	0.06–128

^a CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; MOX, moxifloxacin; GAR, garenoxacin; AMOX, amoxicillin, AMX/CLV, amoxicillin-clavulanate, CXM, cefuroxime CFX, cefixime; ERY, erythromycin; AZT, azithromycin.

^b CIP MIC, ≤ 0.06 μg/ml.

^c CIP MIC, ≥ 0.12 μg/ml.

status, and biotype. The majority of strains were collected between 1994 and 2002 from patients living in the central area of Spain.

Susceptibility testing. Reference broth microdilution method was performed according to the NCCLS guidelines (13, 14). Haemophilus test medium was prepared with Mueller-Hinton broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) supplemented with HTM supplement (Oxoid) and yeast extract (5%) (Difco, Detroit, Mich.). Microtiter plates were inoculated to produce a final inoculum density of approximately 5×10^5 CFU/ml. This density was monitored at regular intervals by making colony counts. The inoculated plates were incubated at 35°C for 20 to 24 h in ambient air before results were interpreted. The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic that inhibited growth.

Antimicrobial agents. Garenoxacin (BMS-284756) was supplied by Bristol-Myers Squibb laboratories (Madrid, Spain). The other antimicrobial agents, including a β-lactamase inhibitor compound (amoxicillin, azithromycin, cefixime, cefuroxime, ciprofloxacin, erythromycin, levofloxacin, moxifloxacin, nalidixic acid, and clavulanate), were provided by their respective manufacturers or purchased from Sigma (Madrid, Spain).

Amplification and sequence analysis of the QRDR regions of *gyrA* and *parC* genes. One isolate was randomly selected for QRDR analysis from each group of strains with identical garenoxacin MICs (MIC range, 0.007 to 32 μg/ml). Amplification was performed in a 50-μl final volume: 5 μl of DNA template, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 μM (each) primer (Pharmacia), 200 μM (each) deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *Taq* polymerase (Roche). The PCR program applied was as follows: denaturation at 94°C for 5 min; 30 amplification cycles of 94°C for 1 min, annealing at 54°C for 1 min, and polymerization at 72°C for 1 min; and a final 10-min cycle at 72°C to extend amplicons fully.

A 400-bp fragment including the QRDR of *gyrA* and *ParC* was amplified. Specific primers used were the following: GYRA-F (5'-CCGCCGCGTAC TATTCTCAAT-3'), GYRA-R (5'-GTTGCCATCCCCACCGCAATACCA-3'), PARC-F (5'-TCTGAACCTGGCTTAATTGCC-3'), and PARC-R (5'-GC CACGACCTTGCTCATAAAT-3'). PCR products were purified with a PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing of fragments was done on both DNA strands with the Big Dye™ terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions. The products were resolved and analyzed with an ABI PRISM 377 DNA sequencer. Nucleotide sequences were analyzed using the DNASTar (Madison, Wis.) program.

RESULTS AND DISCUSSION

When we compare in vitro activities of different antimicrobial agents against the 62 selected *H. influenzae* isolates in

terms of the MICs at which 50% of the isolates tested were inhibited (MIC₅₀s), which normally represent modal MICs, cefixime had the highest intrinsic activity (0.01 μg/ml). This value was similar to that obtained with ciprofloxacin, moxifloxacin, and garenoxacin (0.06 μg/ml). Amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, and cefuroxime presented similar MIC₅₀s of 1 to 2 μg/ml, and erythromycin and azithromycin were the less active agents, with MIC₅₀s of 8 and 4 μg/ml, respectively. However, a substantial difference was observed in the MICs at which 90% of the isolates tested were inhibited (MIC₉₀s): 0.25 μg/ml for cefixime and 2, 2, and 4 μg/ml for ciprofloxacin, moxifloxacin, and garenoxacin, respectively. For amoxicillin, the MIC₉₀ was 128 μg/ml; for amoxicillin-clavulanate, 8 μg/ml; for cefuroxime, 16 μg/ml; for erythromycin, 32 μg/ml; and for azithromycin, 8 μg/ml.

Table 1 shows the activity of the assayed antimicrobial agents against *H. influenzae* isolates of groups I and II. Levofloxacin, moxifloxacin, and garenoxacin displayed similar MIC₅₀s and MIC₉₀s in group I of *H. influenzae*. For the group II strains, levofloxacin, moxifloxacin, and garenoxacin had markedly decreased activities. Nevertheless, for four isolates belonging to group II, MICs of garenoxacin were lower than those for ciprofloxacin; the MIC for one of them was 0.03 μg/ml for garenoxacin and 0.12 μg/ml for ciprofloxacin, while the MICs for the three additional isolates were 0.06 μg/ml for garenoxacin and 0.12 μg/ml (two strains) and 0.25 μg/ml (one strain) for ciprofloxacin.

Table 2 shows the *gyrA* and *parC* QRDR mutations leading to amino acid substitutions in selected *H. influenzae* isolates of the study collection. These isolates are representative of different garenoxacin MICs from group I and group II. For comparative purposes, other quinolone MICs are also included in this table.

Garenoxacin displayed high intrinsic activity against isolates without *gyrA* or *parC* mutations, with MICs ranging from 0.007 to 0.03 μg/ml, similar to ciprofloxacin, while the moxifloxacin and levofloxacin MIC range was 0.03 to 0.12 μg/ml (Table 2).

TABLE 2. Quinolone susceptibility and amino acid changes in GyrA and ParC QRDR fragments from representative *H. influenzae* isolates^a

Strain no.	MIC (μg/ml)				Amino acid at position:					
	CIP	LEV	MOX	GAR	GyrA		ParC			
					84	88	82	83	84	88
ATCC 51907	0.007	0.03	0.03	0.007	Ser	Asp	Gly	Asp	Ser	Glu
1	0.01	0.01	0.03	0.001						
2	0.01	0.03	0.03	0.007						
3	0.01	0.03	0.03	0.01						
4	0.03	0.06	0.06	0.03						
5	0.12	0.12	0.12	0.06		Tyr				
6	0.25	0.12	0.12	0.12		Asn				
7	0.5	0.5	0.5	0.5		Asn				Lys
8	4	2	2	1		Asn				Ile
9	2	2	1	2		Tyr	Asp			
10	8	4	4	4	Ile	Ala		Gly		
11	4	2	2	8	Leu	Asn			Ile	
12	2	2	1	16	Leu	Asn		Asn		
13	32	32	32	32	Leu	Tyr	Asp			

^a CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; MOX, moxifloxacin; GAR, garenoxacin.

Garenoxacin displayed MICs of 0.06 to 0.12 $\mu\text{g/ml}$ for isolates with a first step in the resistance mechanisms for quinolones (one amino acid change in GyrA). This value was slightly lower than that obtained with ciprofloxacin, moxifloxacin, and levofloxacin (0.12 $\mu\text{g/ml}$). However, the existence of one amino acid change in ParC combined with two amino acid changes in GyrA drastically diminished the *in vitro* activity of the four assayed quinolones (Table 2).

Garenoxacin is a desfluoroquinolone with a broad spectrum of activity against both gram-positive and -negative pathogens, including fastidious strains that commonly cause community-acquired respiratory tract infections (5). The SENTRY antimicrobial surveillance program (2000) demonstrated that the activity of garenoxacin against *H. influenzae* was similar to that of other quinolones, such as ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin (MIC_{90} , ≤ 0.016 to 0.03 $\mu\text{g/ml}$) (1), consistent with data obtained in the present study for strains without amino acid changes in the QRDRs of *gyrA* and/or *parC*.

The *H. influenzae* population tested in our study includes both strains with and without resistance mechanisms for quinolones. The overall activity of garenoxacin was similar to that of ciprofloxacin (MIC_{90} , 4.0 $\mu\text{g/ml}$), but it was slightly lower than those of moxifloxacin and levofloxacin. To gain insight into garenoxacin activity, we separated our *H. influenzae* collection according to its susceptibility to ciprofloxacin; for fully ciprofloxacin-susceptible isolates (group I), ciprofloxacin, levofloxacin, and garenoxacin MIC_{90} s were similar (0.03 $\mu\text{g/ml}$), and for moxifloxacin the MIC_{90} was one \log_2 dilution higher. In group II, garenoxacin was the quinolone with the lowest activity, since its MIC_{90} was at least two \log_2 dilutions higher than that of the other tested quinolones, although in this group, the garenoxacin MIC range included lower values (0.03 $\mu\text{g/ml}$ for garenoxacin, 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for moxifloxacin, and 0.12 $\mu\text{g/ml}$ for ciprofloxacin and levofloxacin). This result is concordant with the fact that the older generation of quinolones (ciprofloxacin and ofloxacin) have relatively low gram-positive activity, and other new generation quinolones (including des-quinolone) were modified to enhance mainly gram-positive activity.

We have shown that the primary target of garenoxacin in *H. influenzae* is DNA gyrase, the same as that of ciprofloxacin (7). A first amino acid modification in the QRDR of GyrA increased the garenoxacin MIC to 0.06 to 0.12 $\mu\text{g/ml}$; a second amino acid change in the QRDR of ParC enhanced its MIC to 0.5 to 2 $\mu\text{g/ml}$; and a double amino acid change in GyrA yielded the highest MICs for the strains in this collection (4.0 to 32 $\mu\text{g/ml}$). This increase in MICs was similar for ciprofloxacin, moxifloxacin, and levofloxacin, suggesting a step-by-step resistance mechanism common to the four quinolones tested.

In summary, we conclude that there was excellent garenoxacin activity against *H. influenzae* strains lacking quinolone resistance mechanisms. However, some amino acid changes in the QRDR region of GyrA and ParC clearly decreased the susceptibility of *H. influenzae* to garenoxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin, reaching a MIC of 32 $\mu\text{g/ml}$ for strains with two modifications in the QRDR region of GyrA and one modification in the QRDR of ParC.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Janet Hinder for providing us with two quinolone-resistant *H. influenzae* isolates.

M. Pérez-Vázquez is a recipient of grant 02/0056 from the Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain. This study was funded by a research grant from Bristol-Myers Squibb and a fellowship (99/0304) from the Spanish FIS agency.

REFERENCES

- Biedenbach, D. J., R. N. Jones, and M. A. Pfaller. 2001. Activity of BMS284756 against 2,681 recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: report from The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000) in Europe, Canada and the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**:245–250.
- Bastida, T., M. Pérez-Vázquez, J. Campos, M. C. Cortés-Lletget, F. Román, F. Tubau, A. G. de la Campa, and C. Alonso-Tarrés. Therapeutic failure in a case of pneumonia due to levofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Emerg. Infect. Dis.*, in press.
- Boswell, F. J., J. M. Andrews, and R. Wise. 2001. Comparison of the *in vitro* activities of BMS-284756 and four fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:446–447.
- Campos, J., F. Román, M. Georgiou, C. García, R. Gómez-Lus, R. Cantón, H. Escobar, and F. Baquero. 1996. Long-term persistence of ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **174**:1345–1347.
- Fung-Tomc, J. C., B. Minassian, B. Kolek, E. Huczko, L. Aleksunes, T. Stickle, T. Washo, E. Gradelski, L. Valera, and D. P. Bonner. 2000. Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3351–3356.
- García-Rodríguez, J. A., F. Baquero, J. García de Lomas, and L. Aguilar. 1999. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *H. influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of 1-year (1996–97) multicenter surveillance study. *Infection* **27**:265–267.
- Georgiou, M., R. Muñoz, F. Roman, R. Cantón, R. Gómez-Lus, J. Campos, and A. De la Campa. 1996. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1741–1744.
- Hartman-Neumann, S., K. DenBleyker, L. A. Pelosi, L. E. Lawrence, J. F. Barrett, and T. J. Dougherty. 2001. Selection and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* mutants resistant to Des-F(6) quinolone BMS-284756. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2865–2870.
- Hoellman, D. B., L. M. Kelley, M. A. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 2001. Comparative antianaerobic activity of BMS-284756. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:589–592.
- Ince, D., X. Zang, L. C. Silver, and D. C. Hooper. 2002. Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T-3811ME), a new desfluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3370–3380.
- Lister, P. D. 2003. Impact of AUC/MIC ratios on the pharmacodynamics of the des-F(6) quinolone garenoxacin (BMS-284756) is similar to other fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:199–202.
- Nagai, A., M. Miyazaki, T. Morita, S. Furubo, K. Kizawa, H. Fukumoto, T. Sanzen, H. Hayakawa, and Y. Kawamura. 2002. Comparative articular toxicity of garenoxacin, a novel quinolone antimicrobial agent, in juvenile beagle dogs. *J. Toxicol. Sci.* **27**:219–228.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. NCCLS document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Pankuch, G. A., K. Nagai, T. A. Davies, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 2002. Antipneumococcal activity of BMS 284756 compared to those of six other agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:251–254.
- Pérez-Vázquez, M., F. Román, M. C. Varela, R. Cantón, and J. Campos. 2003. Activities of thirteen quinolones by three susceptibility testing methods against a collection of *Haemophilus influenzae* isolates with different levels of susceptibility to ciprofloxacin: evidence for cross-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:147–151.
- Takahata, M., J. Mitsuyama, Y. Yamashiro, M. Yonezawa, H. Araki, Y. Todo, S. Minami, Y. Watanabe, and H. Narita. 1999. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1077–1084.

Activities of 13 quinolones by three susceptibility testing methods against a collection of *Haemophilus influenzae* isolates with different levels of susceptibility to ciprofloxacin: evidence for cross-resistance

María Pérez-Vázquez¹, Federico Román¹, M. Carmen Varela², Rafael Cantón² and José Campos^{1*}

¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda a Pozuelo, Km. 2, 28220 Majadahonda, Madrid; ²Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

Received 21 May 2002; returned 8 August 2002; revised 19 September 2002; accepted 19 October 2002

The activities of nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, fleroxacin, sparfloxacin, grepafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin, levofloxacin and clinafloxacin against a panel of *Haemophilus influenzae* strains were assessed by three susceptibility testing methods: Etest, agar dilution and the reference broth microdilution method using *Haemophilus* test medium (HTM) in all cases. The panel included 62 clinical and two reference *H. influenzae* strains; 32 had decreased susceptibility to ciprofloxacin ($MIC \geq 0.12$ mg/L) and 30 were susceptible to this antibiotic ($MIC \leq 0.06$ mg/L). Both Etest and HTM agar dilution results ($r = 0.96$; 86.61% and 82.1% of MICs within + one \log_2 , respectively) correlated well with the reference microdilution method. The MIC_{90} of ciprofloxacin was 4.0 mg/L (range 0.007–32.0 mg/L). Trovafloxacin activity was similar to that of ciprofloxacin but sparfloxacin, grepafloxacin, ofloxacin, pefloxacin and fleroxacin activities were higher (with MIC values one \log_2 dilution lower than ciprofloxacin). The least active were norfloxacin (MIC_{90} 16 mg/L) and nalidixic acid (MIC_{90} 128 mg/L). Levofloxacin and moxifloxacin were more active than ciprofloxacin (MIC_{90} 2 mg/L); clinafloxacin and gatifloxacin were the most active with an MIC_{90} of 0.25 mg/L. Cross-susceptibility among all quinolones was observed ($r > 0.9$). Resistance to ciprofloxacin was associated with a similar magnitude of activity loss to other new and old quinolones. Ciprofloxacin MIC determination should be sufficient to detect the decreased susceptibility to the whole group of quinolones.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, antibiotic resistance, quinolones, susceptibility testing methods

Introduction

Fluoroquinolones remain among the most powerful *in vitro* antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*, and are also highly effective as oral treatments of respiratory tract infections.¹ However, the emergence of *H. influenzae* isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin and other quinolones is of clinical and public health concern, particularly in countries like Spain with high levels of antibiotic resistance to respiratory tract pathogens.

Methods used in routine clinical laboratories to test the activity of antimicrobials against pathogens comprise broth microdilution, agar dilution, Etest and disc diffusion.

The aims of this study were to provide comparative data about the activities of new and old quinolones against *H. influenzae* populations with different ciprofloxacin susceptibility, to compare Etest and agar dilution susceptibility testing methods with the NCCLS standard broth microdilution method for *H. influenzae*, and to assess cross-susceptibility and/or cross-resistance among evaluated quinolones.

*Corresponding author. Tel: +34-91-509-7901, ext. 3650, 3643; Fax: +34-91-509-7966; E-mail: jcampos@isciii.es

Materials and methods

Test isolates

Sixty-two clinical *H. influenzae* isolates and two reference strains from the American Type Culture Collection were included: ATCC 49247, recommended by the NCCLS for susceptibility testing, and ATCC 51907, whose genome has been sequenced.² Two American clinical strains³ and 30 Spanish clinical isolates from the collection of our *Haemophilus* Reference Laboratory were selected according to their reduced susceptibility to ciprofloxacin (MIC \geq 0.12 mg/L) and/or nalidixic acid (MIC \geq 4 mg/L). The last group was obtained from respiratory specimens from patients with cystic fibrosis or chronic respiratory infections, as a result of antibiotic resistance surveillance in Spanish clinical isolates, including the resistant isolates already studied by our group.^{4,5} As a fully susceptible group, we included 30 strains with ciprofloxacin MICs of \leq 0.03 mg/L and nalidixic acid MICs of \leq 2 mg/L. Both ATCC strains were included for quality control and comparative purposes.

Susceptibility testing

All *H. influenzae* strains were studied by the three methods. The reference broth microdilution method was carried out according to the NCCLS guidelines,^{6,7} except that the final test volume in each well was 200 μ L and the inoculated plates were incubated for 20–24 h at 35°C with 5% CO₂ before reading results because many strains did not grow well without these modifications.

Haemophilus test medium (HTM) was prepared with Mueller–Hinton broth (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) supplemented with HTM Supplement (Oxoid) and yeast extract (0.5%) (Difco, Detroit, MI, USA). Microtitre plates were inoculated to produce a final inoculum density of $\sim 5 \times 10^5$ cfu/mL. The agar dilution technique was a modification of the standard method recommended for other organisms by the NCCLS.⁷ HTM Base (Oxoid) supplemented with HTM Supplement (Oxoid) was used. Plates were inoculated to obtain a final inoculum on the agar of $\sim 10^4$ cfu per spot. The inoculated plates were incubated for 20–24 h at 35°C with 5% CO₂. The MIC was defined as the lowest concentration of quinolone that inhibited growth. Quinolones were supplied as powders of known potencies by the following manufacturers: nalidixic acid and norfloxacin (Sigma S.A., Madrid, Spain); ciprofloxacin and moxifloxacin (Bayer Hispania S.A., Barcelona, Spain); sparfloxacin and levofloxacin (Aventis, Madrid, Spain); grepafloxacin (GlaxoSmithKline, Spain); gatifloxacin (Andromaco, Barcelona, Spain); clinafloxacin (Parke-Davis, MI, USA).

The Etest susceptibility method was carried out according to the manufacturer's instructions (AB Biodisk, Solna, Sweden). Two 150 mm HTM (Oxoid) agar plates were inocu-

lated with each bacterial suspension adjusted to a McFarland standard of 0.5 and allowed to air dry. Six Etest strips were placed on to each plate. Plates were incubated for 18–24 h at 35°C with 5% CO₂. Etest MICs were read from the intersection of the inhibition ellipse with the test strip, and then were transformed into the standard double dilution MIC values to permit appropriate comparison with the other methods used.

The quinolones evaluated by each method are indicated in Table 1. In all methods final colony counts were carried out to check bacterial inocula.

Analysis of the results

In the comparative study of MIC values obtained by the standard microdilution, HTM-agar dilution and Etest methods, essential agreement was considered when MICs were identical or within one dilution of the reference microdilution method. Management of data and statistical calculations were carried out using the Whonet (WHO/CSR/DRS/99.1, World Health Organization) and GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) computer programs. Pearson correlation coefficients (*r* values) and regression slope equations were generated for each susceptibility test method.

Results

The *in vitro* activities of the assayed quinolones against a panel of 64 strains of *H. influenzae* are shown in Table 1. If we only consider microdilution as the reference susceptibility testing method, the most active agent was clinafloxacin (MIC₉₀ 0.25 mg/L), followed by (in order of decreasing activity) levofloxacin and moxifloxacin (MIC₉₀ 2 mg/L), ciprofloxacin (MIC₉₀ 4 mg/L), grepafloxacin and sparfloxacin (MIC₉₀ 8 mg/L), norfloxacin (MIC₉₀ 16 mg/L) and nalidixic acid (MIC₉₀ 128 mg/L).

Table 2 shows the comparison of Etest and agar dilution methods for MIC calculations with the standard NCCLS microdilution method. Essential agreement (± 1 log₂ dilution) with the reference technique was 86.4% for Etest (range 30.6–100%) and 82.1% for HTM-agar dilution (range 58.0–90%). The corresponding correlation coefficient values were 0.96 in both cases. Etest and agar dilution techniques gave lower MIC values than microdilution for nalidixic acid (Etest) and norfloxacin (agar dilution). Discrepancies with Etest determinations were essentially due to nalidixic acid; excluding the nalidixic acid results, the essential agreement increases to 95.1% (Table 2).

To determine whether or not the cross-susceptibility to the whole group of assayed quinolones could be inferred from the susceptibility data of one of them, different correlation coefficients of paired results were calculated. The correlation coefficient between ciprofloxacin MICs obtained by the Etest method and each one of the remaining quinolone MICs also

Quinolone activities against *H. influenzae*

Table 1. Activities of 13 quinolones against a panel of 64 strains of *H. influenzae*

Method/antibiotic	Range (mg/L)	MIC ₃₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC (mg/L) ATCC 49247
Etest				
nalidixic acid	0.12–256	0.5	64	0.5
norfloxacin	0.03–64	0.12	16	0.06
sparfloxacin	0.004–64	0.12	16	0.03
perfloxacin	0.03–32	0.12	8.0	0.06
fleroxacin	0.03–256	0.12	8.0	0.06
ofloxacin	0.03–>32	0.12	8.0	0.06
grepafloxacin	0.004–64	0.06	8.0	0.016
ciprofloxacin	0.004–64	0.03	4.0	0.03
trovafloxacin	0.004–>32	0.03	4.0	0.016
levofloxacin	0.008–64	0.06	2.0	0.03
clinafloxacin	0.001–2	0.008	0.25	0.004
Agar dilution				
nalidixic acid	0.5–64	2.0	64	1.0
norfloxacin	≤0.016–32	0.06	8.0	0.06
grepafloxacin	≤0.016–8.0	0.06	8.0	0.008
sparfloxacin	≤0.016–16	0.06	4.0	0.03
ciprofloxacin	≤0.016–16	0.03	2.0	0.008
levofloxacin	≤0.016–32	0.03	1.0	0.008
moxifloxacin	≤0.016–32	0.008	1.0	0.008
gatifloxacin	≤0.016–8.0	0.008	0.25	0.008
clinafloxacin	≤0.016–4.0	0.008	0.25	0.008
Microdilution				
nalidixic acid	0.5–128	4.0	128	2.0
norfloxacin	0.03–32	0.25	16	0.12
sparfloxacin	0.004–32	0.06	8.0	0.008
grepafloxacin	0.004–32	0.06	8.0	0.008
ciprofloxacin	0.008–32	0.06	4.0	0.016
moxifloxacin	0.016–32	0.06	2.0	0.03
levofloxacin	0.016–32	0.12	2.0	0.008
clinafloxacin	0.001–4.0	0.008	0.25	0.001

obtained by Etest was 90.2–95% (average 93%) ($P < 0.001$), except for nalidixic acid, which was 82.0%. This could be due to three strains that had nalidixic acid MICs of 8 and 16 mg/L with ciprofloxacin MICs of 0.06 mg/L.

When *H. influenzae* isolates with lower ciprofloxacin MICs including the ATCC strains ($n = 34$, MIC ≤ 0.06 mg/L, a concentration without amino acid changes in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of GyrA and ParC^{5–8}) were compared with strains with high ciprofloxacin MICs ($n = 19$, MICs ≥ 2 mg/L, a concentration with amino acid changes both in GyrA and ParC^{5–8}), all quinolones increased their MIC₉₀ in the latter group by a magnitude of 2⁸ to 2¹⁰ (256–1000 times), suggesting that cross-resistance to all quinolones was the rule.

Discussion

Fluoroquinolone resistance is an emerging problem in respiratory tract pathogens, including *H. influenzae*.^{9,10}

Natural populations of *H. influenzae* are very susceptible to quinolones; in most general surveillance studies resistance is $<1\%$.^{1–9} However, this resistance rate could be higher in isolates recovered from patients with chronic respiratory infections, as the clinical management of these patients often includes repetitive antibiotic treatments with oral quinolones³ and quinolone resistance could be induced as a consequence of longer antibiotic pressure.

Our data confirm the excellent activities of all quinolones against susceptible populations of *H. influenzae*; with the exception of nalidixic acid, all had MICs ≤ 0.12 mg/L. The most active quinolones against susceptible strains were clinafloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin, ciprofloxacin, trovafloxacin and levofloxacin, all with MICs ≤ 0.06 mg/L. However, with less ciprofloxacin-susceptible strains all assayed quinolones lost activity, and only clinafloxacin and gatifloxacin retained good *in vitro* activity (MIC₉₀ 0.25 mg/L), and to a lesser extent, moxifloxacin and levofloxacin (MIC₉₀ 1.0 mg/L). With the most resistant strains (range 2–32 mg/L),

Table 2. Comparison of Etest and agar dilution susceptibility testing methods using microdilution as reference method

Method Quinolone (no.) ^a	No. of MICs obtained with the evaluated method within indicated log ₂ of reference MIC							% Essential agreement	Correlation coefficient (regression equation)
	>-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2		
Etest									
nalidixic acid (62)	15	28	9	8	2	–	–	30.6	
norfloxacin (62)	–	–	33	28	1	–	–	100	
ciprofloxacin (62)	1	3	21	30	7	–	–	93.5	
sparfloxacin (62)	1	–	10	28	19	4	–	92.0	
grepafloxacin (62)	1	1	14	26	20	–	–	96.8	
levofloxacin (62)	1	1	23	28	9	–	–	96.8	
clinafloxacin (62)	–	–	5	25	29	3	–	95.2	
Total (434)	19 (4.4) ^b	33 (7.6)	115 (26.5)	173 (39.9)	87 (20.0)	7 (1.6)	– (0.0)	86.4	0.961 (y = 0.886x – 0.363)
Agar dilution									
nalidixic acid (59)	2	6	36	15	–	–	–	86.4	
norfloxacin (57)	1	22	25	9	–	–	–	58.0	
ciprofloxacin (58)	2	3	21	27	3	2	–	88.0	
sparfloxacin (59)	–	3	7	31	12	5	1	85.0	
grepafloxacin (59)	1	5	15	30	5	1	2	85.0	
moxifloxacin (59)	1	9	38	10	–	–	1	81.3	
levofloxacin (59)	1	4	32	20	1	1	–	90.0	
clinafloxacin (30)	–	3	6	14	5	1	1	86.2	
Total (440)	8 (1.8)	55 (12.5)	180 (40.9)	156 (35.4)	26 (5.9)	10 (2.3)	5 (1.1)	82.1	0.959 (y = 0.907x – 0.574)

^aValues in parentheses are the number of organism–antimicrobial agent combinations tested.

^bValues in parentheses are the percentages of MICs obtained with the evaluated method within indicated log₂ reference MIC.

none of the quinolones assayed in this study presented good activity.

We found excellent agreement among the three susceptibility testing methods that are commonly used in clinical microbiology laboratories. Etest was a reliable method for the determination of quinolone MICs for *H. influenzae*, and it correlated very well with the NCCLS reference method. In addition, the Etest is less labour-intensive than other susceptibility testing methods, so we consider the utility of this method as a simple way to detect loss of susceptibility to quinolones in *H. influenzae*. The rapid detection of this reduced susceptibility to quinolones in *H. influenzae* is very important in antibiotic resistance surveillance programmes.

In summary, decreased susceptibility to ciprofloxacin in *H. influenzae* strongly correlated with decreased susceptibility to a large number of new and old quinolones; moreover, we have also shown that all quinolones undergo a similar magnitude of activity loss. Therefore, we believe that, for screening purposes, the determination of ciprofloxacin MIC should be sufficient to detect the decreased susceptibility to the whole group of quinolones. Nevertheless, nalidixic acid MIC determination may also be included to detect strains that are nalidixic acid resistant and cipro-

floxacin susceptible (three of 32 resistant strains in this study) as they would be undetected with only ciprofloxacin MIC determination.

Acknowledgements

We thank Maite Camacho and Enrique Moguel for their collaboration. We thank Janet Hindler for donating two quinolone-resistant *H. influenzae* isolates. This work was supported by a grant from the FIS (99/0304), Ministerio de Sanidad (Spain). M. Pérez-Vázquez is a recipient of a grant from the ISCIII (00/0069) and another one from the 'Sociedad Española de Quimioterapia'.

References

- García-Rodríguez, J. A., Baquero, F., García de Lomas, J. & Aguilar, L. (1999). Antimicrobial susceptibility of 1422 *H. influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain results of 1-year multicenter surveillance study. *Infection* **27**, 265–7.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R. *et al.* (1995). Whole-genome

Quinolone activities against *H. influenzae*

- random sequencing and assembly of *H. influenzae* Rd. *Science* **269**, 449–604.
3. Barriere, S. L. & Hindler, J. (1993). Ciprofloxacin resistant *Haemophilus influenzae* in a patient with chronic lung disease. *Annals of Pharmacotherapy* **27**, 309–10.
4. Campos, J., Román, F., Georgiou, M., García, C., Gómez-Lus, R., Cantón, R. *et al.* (1996). Long-term persistence of ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* **174**, 1345–7.
5. Georgiou, M., Muñoz, R., Román, F., Cantón, R., Gómez-Lus, R., Campos, J. *et al.* (1996). Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 1741–4.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A5*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement M100-S12*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
8. Pérez-Vázquez, M., Camacho, T., Roman, F., Campos, J. & Canton, R. (2001). Mutations in quinolone-resistance determining regions (QRDR) of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes in *Haemophilus influenzae* clinical isolates. In *Program and Abstracts of the Forty-first Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, USA, 2001*. Abstract 145, p. 79. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
9. Biedenbach, D. J. & Jones, R. N. (2000). Fluoroquinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: frequency of occurrence and analysis of confirmed strains in the SENTRY antimicrobial surveillance program (North and Latin America). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **36**, 255–6.
10. Bootsma, H. J., Troelstra, A., van Veen-Rutgers, A., Mooi, F. R., de Neeling, A. J. & Overbeek, B. P. (1997). Isolation and characterization of a ciprofloxacin-resistant isolate of *Haemophilus influenzae* from The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**, 292–3.

