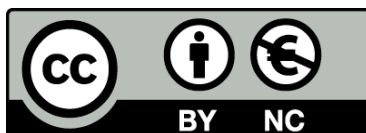




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Serratia marcescens*

Mercedes Berlanga Herranz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS  
QUINOLONAS EN *SERRATIA MARCESCENS*

M.MERCEDES BERLANGA HERRANZ

1999

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITARIES  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

CURS DE DOCTORAT: MICROBIOLOGIA APLICADA (1993/95)

TITOL DE LA TESI: MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS  
QUINOLONAS EN *SERRATIA MARCESCENS*

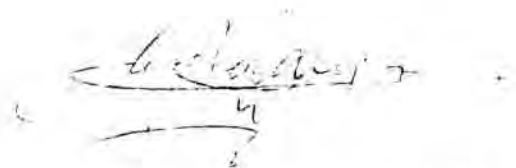
PER OPTAR AL TITOL DE DOCTOR EN BIOLOGIA PER L'  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

NOM DEL DOCTORANT : M. MERCEDES BERLANGA HERRANZ

NOM DELS DIRECTORS : Dr. M.VIÑAS Y Dr. J. HERNANDEZ-BORRELL

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS  
EN *SERRATIA MARCESCENS*

MEMORIA PRESENTADA POR  
M.MERCEDES BERLANGA HERRANZ  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE  
BARCELONA



BARCELONA, ABRIL 1999

*Agradezco en primer lugar a mis Directores de Tesis Doctoral, Dr. Miquel Viñas y Dr. Jordi Hernández, por poner a mi disposición todos los medios necesarios para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, por haber contribuido a mi formación investigadora y sobretodo por su apoyo. Especialmente al Dr. M. Viñas por haberme aceptado en su grupo de investigación y confianza en mi persona.*

*Al Dr. J.G. Lorén le agradezco que siendo Cap de Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, de la Divisió de Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona, me acceptara como estudiante de Doctorado. Además me gustaria agradecerle el ejemplo que representa como profesor de Universidad, por su integridad personal, pasión por la enseñanza y el constante interés por el conocimiento.*

*A la Dra. Carme Justé por su apoyo continuo y a la Dra. Ana Marqués por su interés y por promocionar mis "cómic de bacterias" tanto en el Departamento como en la Facultat de Farmàcia.*

*Al Dr. Francisco Congregado (Cap de Departament), Dra. Angels Maura y Dra. Mire Mercadé, Dr. Miquel Regué y Dra. Dolors Simón, por su disponibilidad a ofrecerme su ayuda.*

*A todos los compañeros del laboratorio de microbiología por su amistad y buenos momentos compartidos, especialmente a Gloria, M<sup>te</sup> Jesús y Arun.*

*A Pilar Oriús, Neus Ruiz y Natalia Mulet, por su inestimable apoyo personal desde los tiempos de la carrera y su amistad, por haber compartido conmigo el trabajo de cada día, con "sus glorias y penas".*

*A Lali Vendrell, Laura Sánchez, Marta Puig, Sonia Leranoz, Julio Palomar y Rafael Montilla, por su ayuda desinteresada y sobretodo por su amistad. Especialmente, me gustaria agradecer a Sonia Leranoz y a Rafael Montilla por haberme enseñado las actitudes básicas de trabajo en mis comienzos como investigadora.*

*A la Dra. Teresa Montero y José Luis Vázquez, por ofrecerme su amistad, interés desinteresado, conocimientos científicos y por haber tenido la suerte de colaborar con ellos.*

*Dr. Ricardo Pérez, Dr. Jordi Domingo, Eva, Carmen, Beatriz, Sira, Motse, Marc y Dani, no tengo palabras para agradecerles su incondicional ayuda, apoyo, amistad, buenos ratos... En fin, y resumiendo: sin ellos todo este tiempo en Bellvitge no hubiese sido lo mismo.*

*Al Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultat de Farmàcia, y especialmente a la Dra Teresa Altabella, por el buen trato recibido durante tantos ratos pasados frente al fluorímetro.*

*Al Servei Científicotècnic de la Universitat de Barcelona, por la secuenciación de las regiones 2RDR de la subunidad A de la DNA girasa de las cepas de *Serratia marcescens* estudiadas.*

*Agradezco a los laboratorios CENENSA, Reus, España, por haber podido utilizar sus fluorocinolonas, sin las cuales no se podría haber realizado este trabajo.*

*Agradezco a mis padres y hermana por apoyarme constantemente durante todo este tiempo.*

*A la Universidad de Barcelona por la concesión de la ayuda predoctoral de la División de Ciencias de la Salud (1994/95) y, posteriormente de la Beca predoctoral durante los años 1996/97; 1997/98 y 1998/99, que me ha permitido dedicarme completamente a la realización de esta tesis doctoral.*

*A la Direcció General de Investigació Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación del proyecto PB 94-0910.*

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABC (*ATP-binding cassette*).

Acr (acriflavina).

BI (índice bactericida).

Butil-cip (butil ciprofloxacino).

CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona).

Cip (ciprofloxacino).

Cl (cloranfenicol).

Cv (cristal violeta).

2,4-DNP (2,4-Dinitrofenol).

E (eritromicina).

EDTA (ácido etilendiamino tetraacético).

EOP (*efficiency of plating*).

Etil-cip (etil ciprofloxacino).

HCl-cip (clorhidrato de ciprofloxacino).

KCN (cianuro potásico).

Kn (kanamicina).

Log P (coeficiente de reparto termodinámico en octanol/agua).

LPS (lipopolisacárido).

MDR (*multidrug resistance pumps*).

Metil-cip (metil ciprofloxacino).

MF (*major facilitator*).

MFP (*membrane fusion proteins*).

MIC (concentración mínima inhibitoria).

NA (ácido nalidíxico).

Nor (norfloxacino).

OBC (concentración óptima bactericida).

OMP (proteína de membrana externa).

PBS (tampón fosfato).

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

PRC (paracetamol).

Propil-cip (propil ciprofloxacino).

QRDR (*quinolone resistance determining region*).

RND (*resistance nodulation division*).

SA (ácido salicílico).

SDS (dodecil sulfato sódico).

SDS-PAGE (gel de acrilamida/bisacrilamida desnaturalizante)

SLS (lauril sarcosinatosódico).

SMR (*Staphylococcus multidrug resistance*).

TAE (tampón Tris-acetato).

TE (tampón Tris EDTA).

Te (tetraciclina).

TEMED (N,N,N',N'tetrametilendiamina).



*A mis padres  
y hermana*

---

ÍNDICE

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 3  |
| 1.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS .....  | 3  |
| 1.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS .....   | 5  |
| 1.1.1a ANTIMICROBIANOS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARED CELULAR .....  | 6  |
| 1.1.1b ANTIMICROBIANOS QUE ACTÚAN SOBRE LAS MEMBRANAS .....   | 8  |
| 1.1.1c ANTIBIÓTICOS QUE INHIBEN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS .....  | 9  |
| 1.1.1d ANTIBIÓTICOS QUE INHIBEN LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....                                     | 11 |
| 1.1.1e ANTIBIÓTICOS COMO INHIBIDORES METABÓLICOS .....  | 12 |
| 1.2. QUINOLONAS .....   | 15 |
| 1.2.1 RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS<br>Y SU ACTIVIDAD .....                         | 19 |
| 1.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS .....   | 22 |
| 1.2.2a Entrada de las quinolonas en la célula bacteriana .....  | 23 |
| 1.2.2b La DNA-girasa como diana de las quinolonas .....   | 23 |
| 1.2.2c Efectos pleiotrópicos de la inhibición de la síntesis de DNA<br>por acción de las quinolonas ..... | 26 |
| 1.2.3 FARMACOCINÉTICA DE LAS QUINOLONAS .....   | 26 |
| 1.2.4 EFECTOS ADVERSOS DE LAS QUINOLONAS .....  | 28 |
| 1.2.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS .....   | 29 |
| 1.3. EL GÉNERO <i>SERRATIA</i> .....  | 32 |
| 1.3.1 <i>SERRATIA</i> COMO AGENTE PATÓGENO .....  | 36 |
| 1.3.2 FACTORES DE VIRULENCIA EN <i>SERRATIA</i> .....   | 39 |
| 1.4. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS .....  | 43 |
| 1.4.1 LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>SERRATIA MARCESCENS</i> .....                               | 47 |
| 1.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS .....   | 49 |
| 1.5.1 TIPOS DE RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS .....   | 55 |
| 1.5.1.1 ALTERACIÓN DE LA DIANA .....  | 56 |
| 1.5.1.2 PREVENCIÓN DEL ACCESO DEL ANTIBIÓTICO A LA DIANA .....  | 60 |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.5.1.2a Disminución de la permeabilidad .....  | 60        |
| 1.5.1.2b Sistemas de reflujo .....  | 62        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>73</b> |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>3.1. CEPAS BACTERIANAS .....</b>   | <b>77</b> |
| 3.1.1 CEPAS BACTERIANAS SENSIBLES AL CIPROFLOXACINO .....                             | 77        |
| 3.1.2 CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES AL CIPROFLOXACINO .....                           | 77        |
| <b>3.2. MEDIOS DE CULTIVO .....</b>   | <b>77</b> |
| 3.2.1 CALDO DE TRIPTONA Y SOJA (TSB) .....  | 77        |
| 3.2.2 AGAR DE TRIPTONA Y SOJA (TSA) .....   | 78        |
| 3.2.3 MEDIO DE CONSERVACIÓN (CONGELACIÓN): CALDO DE TRIPTONA<br>SOJA-GLICEROL .....   | 78        |
| <b>3.3. SUBSTANCIAS EMPLEADAS .....</b>   | <b>79</b> |
| 3.3.1 ANTIBIÓTICOS .....  | 79        |
| 3.3.2 ANALGÉSICOS .....   | 80        |
| 3.3.3 COLORANTES .....  | 80        |
| 3.3.4 INHIBIDORES METABÓLICOS .....   | 81        |
| <b>3.4. OBTENCIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS RESISTENTES AL<br/>CIPROFLOXACINO .....</b> | <b>81</b> |
| 3.4.1 EN MEDIO SÓLIDO .....   | 81        |
| 3.4.2 EN MEDIO LÍQUIDO .....  | 82        |
| <b>3.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>   | <b>82</b> |
| 3.5.1 AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA .....                              | 82        |
| 3.5.2. SDS-PAGE. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES .....                | 83        |
| 3.5.2.1 SOLUCIONES Y TAMPONES .....   | 84        |
| 3.5.2.1a Tampón de muestra (sample buffer) .....                                      | 84        |
| 3.5.2.1b Composición del gel separador .....  | 85        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.2.1c Composición del gel iniciador .....  | 86        |
| 3.5.2.1d Tampón de recorrido electroforético .....                                      | 87        |
| 3.5.2.1e Solución de azul de Coomasie .....   | 87        |
| 3.5.2.1f Solución de fijación .....   | 87        |
| 3.5.2.1g Solución de rehidratación .....  | 87        |
| <b>3.6. ANÁLISIS DEL LIPOPOLISACÁRIDO .....</b>   | <b>88</b> |
| 3.6.1. SOLUCIONES Y TAMPONES .....  | 89        |
| 3.6.1a Solución de proteinasa K .....   | 89        |
| 3.6.1b Composición del gel separador (15% acrilamida/bisacrilamida) .....               | 89        |
| 3.6.1c Solución de lavado I .....   | 90        |
| 3.6.1d Solución de lavado II .....  | 90        |
| 3.6.1e Solución de tinción de plata .....   | 90        |
| 3.6.1f Solución de revelado .....   | 90        |
| 3.6.1g Solución de parada .....   | 90        |
| 3.6.1h Solución de conservación del gel .....   | 90        |
| <b>3.7. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA A LOS<br/>ANTIBIÓTICOS .....</b> | <b>91</b> |
| 3.7.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA<br>INHIBITORIA (MIC) .....               | 91        |
| 3.7.2 CURVA DE CINÉTICA DE MUERTE BACTERIANA .....                                      | 91        |
| 3.7.3 CÁLCULO DEL ÍNDICE BACTERICIDA .....  | 92        |
| 3.7.4 DETERMINACIÓN DE LA EOP ( <i>EFFICIENCY OF PLATING</i> ) .....                    | 93        |
| 3.7.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA BACTERICIDA .....                        | 93        |
| <b>3.8. MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE QUINOLONAS EN CÉLULAS<br/>BACTERIANAS .....</b>   | <b>94</b> |
| 3.8.1 SOLUCIONES Y TAMPONES PARA LOS ENSAYOS DE FLUORIMETRÍA .....                      | 95        |
| 3.8.1a Tampón fosfato (PBS) .....   | 95        |
| 3.8.1b Solución de glicina-HCl pH 3.0 .....   | 96        |
| 3.8.2 ACUMULACIÓN DE QUINOLONA SIMULTÁNEAMENTE CON OTROS<br>ANTIBIÓTICOS .....          | 96        |
| 3.8.3 ACUMULACIÓN DE CIPROFLOXACINO CON CÉLULAS TRATADAS .....                          |           |

|  |            |
|--|------------|
| CON DETERGENTE .....   | 96         |
| 3.8.4 ACUMULACIÓN DE QUINOLONA EN EXPERIMENTOS DE REFLUJO .....  | 97         |
| <b>3.9. MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TETRACICLINA .....</b>   | <b>98</b>  |
| <b>3.10. MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ACRIFLAVINA .....</b>   | <b>98</b>  |
| <b>3.11. BIOLOGÍA MOLECULAR .....</b>  | <b>98</b>  |
| 3.11.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSÓMICO .....  | 98         |
| 3.11.2. AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA SUBUNIDAD A<br>DE LA DNA GIRASA POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA<br>POLIMERASA .....  | 100        |
| 3.11.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA .....   | 101        |
| 3.11.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE UN GEL DE<br>AGAROSA: <i>GENE-CLEAN</i> .....  | 101        |
| 3.11.5. PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN .....   | 102        |
| 3.11.6. SOLUCIONES Y TAMPONES EN BIOLOGÍA MOLECULAR .....  | 103        |
| 3.11.6a. 50 x TAE .....  | 103        |
| 3.11.6b. Tampón 20xSSC .....   | 103        |
| 3.11.6c. Tampón TE .....   | 103        |
| 3.11.6d. Glassmilk .....   | 103        |
| 3.11.6e. Wash buffer .....   | 104        |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>107</b> |
| <b>4.1. ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS SOBRE <i>Serratia marcescens</i><br/>NIMA: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL ÁCIDO NALIDÍXICO Y EL<br/>CLORHIDRATO DE CIPROFLOXACINO .....</b> | <b>107</b> |
| <b>4.2. PAPEL DE LA MEMBRANA EXTERNA EN LA ACUMULACIÓN DE<br/>QUINOLONAS EN <i>Serratia marcescens</i> .....</b>   | <b>119</b> |
| <b>4.3. EXTRUSIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y COLORANTES EN</b>  |            |

|  |     |
|--|-----|
| <i>Serratia marcescens</i> : BOMBAS DE REFLUJO .....   | 135 |
| 4.4. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE <i>Serratia marcescens</i><br>RESISTENTES AL CIPROFLOXACINO, SELECCIONADOS <i>IN VITRO</i> .....   | 145 |
| 4.5. ACUMULACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD DE LOS DERIVADOS<br>ALQUÍLICOS DEL CIPROFLOXACINO EN <i>Serratia marcescens</i> .....   | 159 |
| 4.6. EFECTO DE LOS ANALGÉSICOS EN LA ACUMULACIÓN Y<br>SUSCEPTIBILIDAD DE LAS QUINOLONAS EN <i>Serratia marcescens</i> .....  | 169 |
| 4.7. ACUMULACIÓN DE CIPROFLOXACINO EN <i>Serratia marcescens</i> ,<br><i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Y <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i> ..... | 179 |
| 5. CONCLUSIONES .....  | 189 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA .....  | 195 |
| 7. ANEXO .....   | 239 |

---

INTRODUCCIÓN



## 1.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS

Cualquier trastorno cutáneo, una erupción, un acné o una vulgar sarna, era considerada como lepra, con lo que se sometía a una vida terrible a un desgraciado que podía haber sido curado en dos o tres días. La única terapia que se empleaba con estos enfermos era ponerles un sombrero de anchas alas y un sayo pardo, colgarles una esquila y proveerles de un farol para que todo el mundo se alejase de su presencia (Gómez, J.L., 1995).

La observación de fenómenos de antibiosis se remonta a finales del siglo pasado, el término fue utilizado por primera vez por Vuillein en 1889 para definir el antagonismo entre dos seres vivos (García de Lomas y cols., 1993). La administración de sustancias químicas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y parasitarias era ya conocida desde antiguo, como el empleo de la corteza de quina para el tratamiento del paludismo; sin embargo fue Paul Ehrlich (1854-1915) quien inició una búsqueda empírica de productos químicos de síntesis que tuvieran toxicidad selectiva para los microorganismos patógenos. Acuñó la palabra quimioterapia para describir esta manera de abordar el control de las enfermedades infecciosas (de Kruif, 1960).

El gran avance de la quimioterapia moderna procedió del descubrimiento relativamente fortuito de Alexander Fleming de la penicilina, que fue el primer antibiótico comercializado para uso clínico en la década de los 40 (Macfarlane, 1988).

Inicialmente se denominó antibiótico a toda sustancia producida por microbios capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Sin embargo, esta definición podría llevar a confusión ya que bajo ésta se incluirían también sustancias elaboradas por microorganismos, como ácidos, alcoholes o peróxido de hidrógeno, igualmente capaces de inhibir el

crecimiento de determinados microorganismos, pero que no pueden considerarse como antibióticos en sentido estricto. Por el contrario, en la definición no se incluirían otras sustancias de origen sintético o semisintético, que son realmente antibióticos, tales como aquellas pertenecientes a la familia de las sulfamidas, ciertas  $\beta$ -lactamas, las quinolonas, etc. Por consiguiente, en la actualidad se denomina antibiótico a toda sustancia de origen natural, sintético o semisintético con efecto antimicrobiano, que actúe y ejerza su acción a nivel molecular en un proceso metabólico o en una estructura concreta de un microorganismo (García de Lomas y cols., 1993 ).

Para ejercer su acción los agentes antimicrobianos deben penetrar en el microorganismo y fijarse a sus estructuras diana sobre las que actúan específicamente. El efecto resultante puede ser letal para la bacteria (bactericida) o inhibidor de la multiplicación (bacteriostático).

La característica más relevante de los antibióticos es su actividad y toxicidad selectivas frente a los microorganismos origen de las infecciones, siendo inócuos para las células del huésped. Esta selectividad en el caso de los antibióticos antibacterianos está relacionada con el mecanismo de acción de los antibióticos. La actividad de los cuales tiene lugar en estructuras diana de las células procariotas que, o bien son distintas, o están ausentes de las células eucariotas. En la figura 1.1 se esquematizan ciertas estructuras de la célula procariota donde actúan los antibióticos (Neu, 1992).

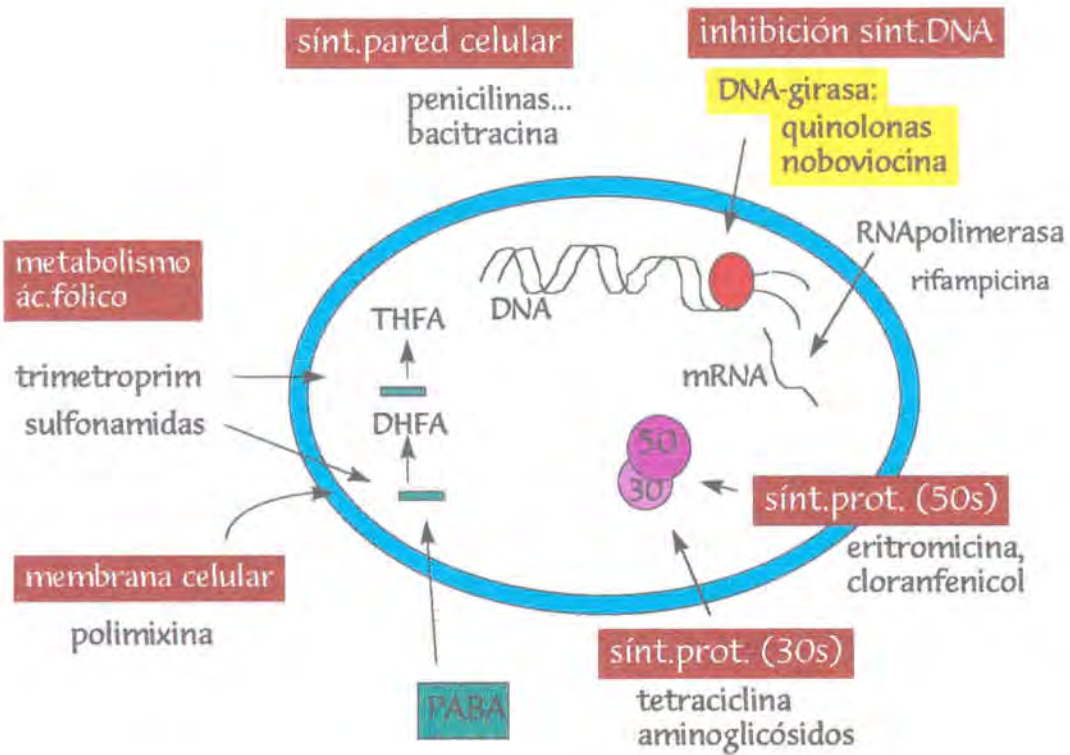


Fig. 1.1 Lugares de acción de ciertos agentes antimicrobianos (Neu,1992).

### 1.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

En general, los antibióticos deben su toxicidad selectiva a las diferencias bioquímicas entre células procariotas y eucariotas, su eficacia tóxica es consecuencia de la inhibición de una reacción bioquímica específica esencial. Los antibióticos más selectivos son aquellos que interfieren con la síntesis de la pared celular, la cual es exclusiva de las eubacterias. Entre los antibióticos que tienen como mecanismo de acción esta estructura podemos citar las penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, la bacitracina, etc. Sin embargo los antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos o los que dañan las membranas celulares no son tan selectivos como los

anteriormente citados; ya que los procariotas y los eucariotas no difieren significativamente ni en el mecanismo de síntesis de ácidos nucleicos ni en la membrana citoplasmática.

### 1.1.1a ANTIMICROBIANOS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARED BACTERIANA

La capa de peptidoglicano es el determinante principal de la forma celular, así como el componente de la pared encargado de contrarrestar la presión de turgencia e impedir con ello la lisis osmótica. No todas las bacterias tienen el mismo tipo de pared. Las eubacterias se pueden dividir en dos grandes grupos denominados Gram positivos y Gram negativos en función del modelo de pared celular que presenten (Figura 1.2).

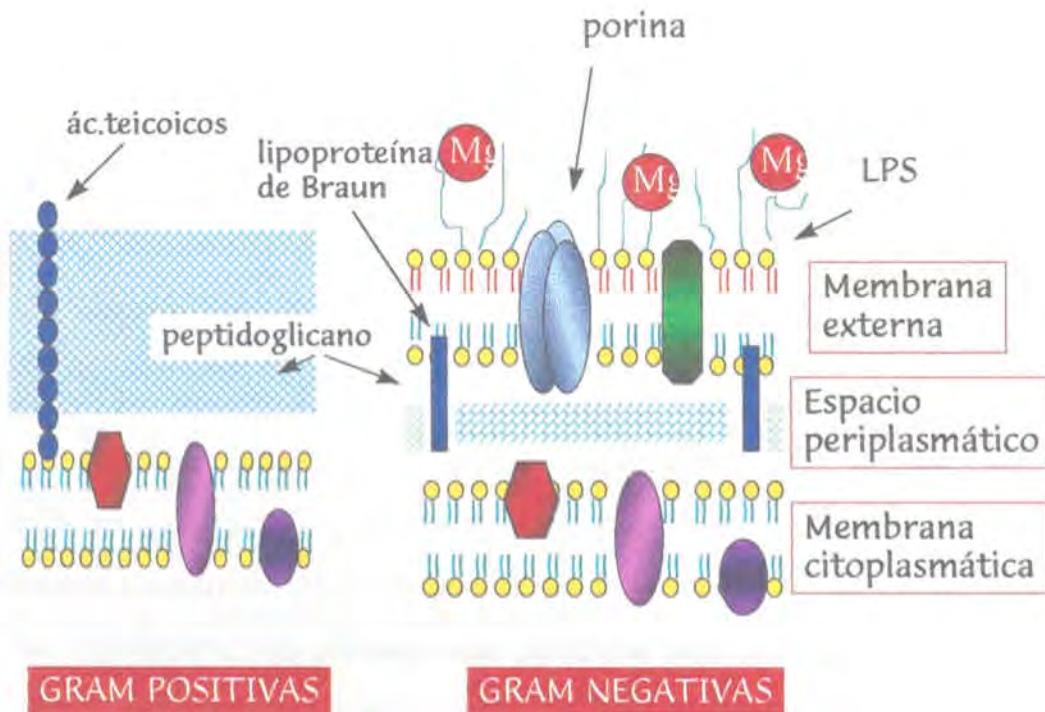


Fig. 1.2. Modelo de pared y membranas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas .

Las bacterias Gram positivas tienen una pared celular constituida básicamente por peptidoglicano que se encuentra inmediatamente por encima de la membrana citoplasmática. Está formada principalmente por unidades de aminoazúcares (N-acetil glucosamina y N-acetil murámico) unidas por enlaces  $\beta$ : 1-4 y por cortas cadenas de aminoácidos. La matriz de peptidoglicano está unida covalentemente a otros componentes, que pueden incluir una amplia variedad de polisacáridos y polímeros de poliolfosfato conocidos como ácidos teicoicos, y constituyen los principales antígenos de superficie de las especies de Gram positivas que los poseen.

Las bacterias Gram negativas tienen una organización de sus envueltas celulares notablemente más compleja, por cuanto se reconocen dos capas perfectamente diferenciadas; por una parte poseen péptidoglicano, pero éste carece de ácidos teicoicos y es cuantitativamente menos importante que el presente en los Gram positivos. Por encima del peptidoglicano se sitúa la membrana externa, la cual será explicada con mayor detalle posteriormente. (Nikaido y Vaara, 1985; Stanier, 1989).

Entre los antibióticos que tienen como modo de acción la síntesis del peptidoglicano podemos destacar los  $\beta$ -lactámicos (Tipper, 1979; Georgopapadaku, 1993) que comprenden las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams; la bacitracina (Russell y Chopra, 1996a); vancomicina (Nagarajau, 1991) y la fosfomicina (Mochales, 1994).

Básicamente, la síntesis del péptidoglicano consta de tres etapas. La primera de ellas tiene lugar en el citoplasma y consiste en la síntesis de las subunidades N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. La segunda etapa consiste en el transporte a través de la membrana de los componentes anteriormente citados y la tercera consiste en el ensamblaje de las subunidades en el espacio periplasmático. En la Figura 1.3, se muestra el

esquema de este proceso y la etapa en la que actúan los antibióticos inhibiendo la síntesis de esta estructura.

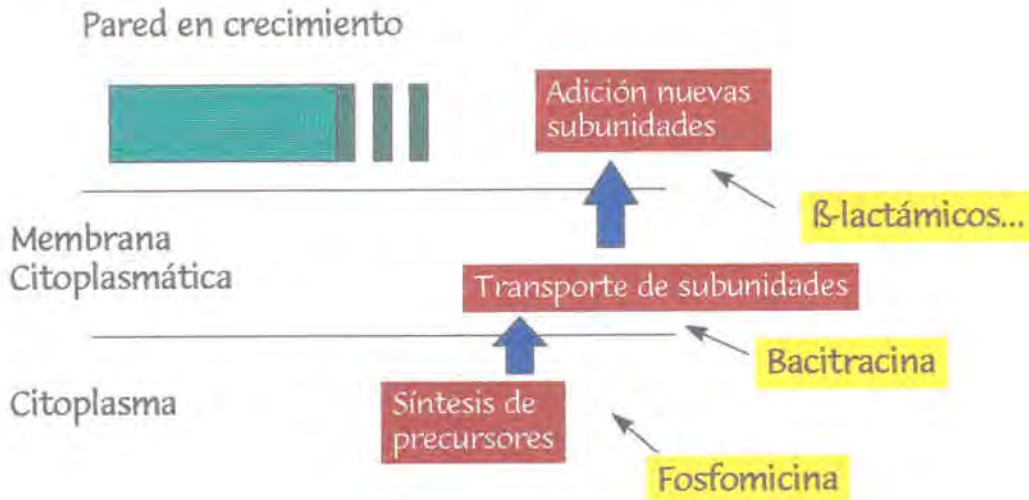


Fig. 1.3 Equema de la biosíntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de los antibióticos que actúan en las diferentes etapas de síntesis de la pared bacteriana.

### 1.1.1b ANTIMICROBIANOS QUE ACTÚAN SOBRE LAS MEMBRANAS

Algunos antimicrobianos polipeptídicos son producidos por el género *Bacillus*. Todos los antibióticos polipeptídicos son relativamente tóxicos, sin embargo dos de ellos, la polimixina B y la polimixina E (colistina) fueron bastante utilizados en el pasado debido a su actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos que eran resistentes a los principios activos disponibles de la época. (Dámaso y cols, 1984a).

Actúan como un detergente catiónico sobre todo tipo de membranas, las cuales desorganizan (Storm y cols., 1977; Vaara y Vaara, 1983; Vaara, 1992; Cajal y cols.,1996). Los pasos secuenciales del mecanismo de acción de

los agentes antibacterianos polipeptídicos serían los siguientes: a) absorción y penetración en la membrana, b) ataque de las porciones hidrofóbicas de las proteínas y de los lípidos, lo que conduce a la desorganización de la membrana, c) salida de metabolitos, d) degradación de proteínas y ácidos nucleicos y e) lisis de la célula por liberación de enzimas degradantes de la pared. (Dámaso y cols, 1984a).

### 1.1.1c ANTIBIÓTICOS QUE INHIBEN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS A NIVEL RIBOSÓMICO

La síntesis de proteínas es un fenómeno crucial para la supervivencia de todo ser vivo. Aunque el mecanismo de síntesis de proteínas es similar en los procariotas y eucariotas, los ribosomas de los primeros difieren substancialmente de los segundos por su forma, tamaño, tamaño de sus subunidades y composición molecular; los ribosomas eucarióticos están constituidos por dos subunidades, de 40S y 60S que unidas forman un ribosoma de 80S; mientras que el procariota es de 70S, con dos subunidades de 30S y 50S (Rusell y Chopra, 1996b). Las diferencias estructurales se traducen en diferencias funcionales lo que explicaría la selectividad de los agentes antimicrobianos, entre los cuales podemos destacar: Los aminoglicósidos (estreptomina, kanamicina, tobramicina...), las tetraciclinas, el cloranfenicol y los macrólidos (eritromicina, clindamicina).

El paso final de la expresión génica es la síntesis de proteínas o traducción. A partir de una secuencia de nucleótidos de mRNA se pasa a una secuencia de aminoácidos o cadena polipeptídica.

El primer estadio de la síntesis de proteínas es la activación del aminoácido, proceso en el cual se une a una molécula de tRNA. La síntesis de proteínas se divide en tres etapas: a) Iniciación, la cual en la mayoría de

bacterias empieza con un aminoacil-tRNA modificado, el formilmetionil-tRNA; mientras que en las células eucariotas (excepto en las mitocondrias y cloroplastos) así como en las arqueobacterias, el iniciador es el metionil-tRNA. b) Elongación, que a su vez consta de las siguientes fases: unión de los aminoacil-tRNA, reacción de transpeptidación catalizada por la peptidil transferasa (localizada en la subunidad 50S) con formación del enlace peptídico. A continuación se producen una serie de reacciones complejas que en conjunto reciben el nombre de translocación; c) la terminación, cuando el ribosoma alcanza un codón "especial" denominado sin sentido (UAA, UAG, UGA), produciéndose la hidrólisis entre el péptido y el tRNA. El tRNA vacío se libera del ribosoma (Harvey y cols, 1995).

La tetraciclina inhibe la transcripción del mensajero genético al impedir la unión del aminoacil-tRNA (incluyendo el de iniciación, el formilmetionina-tRNA) con el sitio aceptor de la subunidad 30S del ribosoma. Este antibiótico evita la iniciación de la cadena polipeptídica (Chopra y cols., 1992). El cloranfenicol impide la polimerización de los aminoácidos a polipéptidos, es decir bloquea la formación de los enlaces polipeptídicos (Rusell y Chopra, 1996b). El mecanismo de acción de los macrólidos, representados por la eritromicina, es la de impedir la traslocación de los restos de aminoacilos en la subunidad del ribosoma bacteriano 50S, con lo que se inhibe la síntesis de proteínas. Cuando el aminoacil-tRNA llega al ribosoma se une a un locus, desde el cual el aminoacilo es trasladado a otro donde se engarza en la cadena polipeptídica de la proteína en formación. Los macrólidos tienen afinidad por este sitio compitiendo con los aminoacilos impidiendo su fijación y traslocación (Brisson-Noel y cols., 1988; Kirst y Sides, 1989). Los aminoglicósidos, representados por la estreptomicina bloquearían la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S deformándola, la distorsión ocasionada impide que el aminoacil-tRNA pueda unirse al sitio aceptor (Davis, 1987; Hancock,



1981). En la figura 1.4, se esquematizan las dianas de los antibióticos que actúan a nivel de ribosoma.

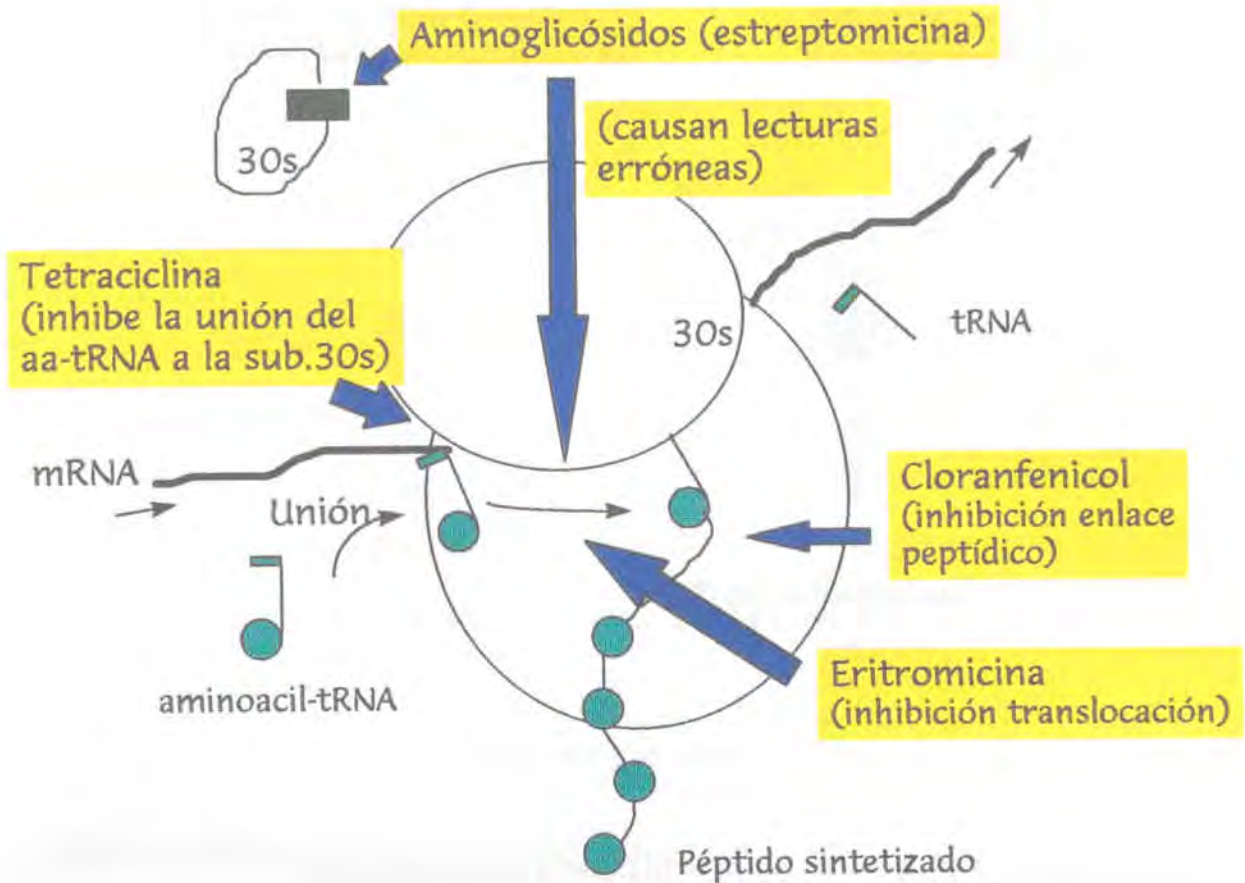


Fig. 1.4 Esquema de la función ribosómica y antibióticos que actúan sobre ella (Baron y cols., 1993).

#### 1.1.1d ANTIBIÓTICOS QUE INHIBEN LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una de las enzimas implicadas en la replicación del DNA es la DNA-girasa (topoisomerasa II), la cual tiene un interés particular por ser la diana de acción de algunos antibióticos, como las quinolonas (Hooper, 1995) y la novobiocina (Neil y cols., 1980). La DNA-girasa está constituida por 4 subunidades, dos subunidades A y dos subunidades B codificadas por *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. La rifampicina (Russell y Chopra, 1996c) interfiere

en la transcripción, específicamente en la función de la RNA polimerasa dependiente de DNA (figura 1.5).

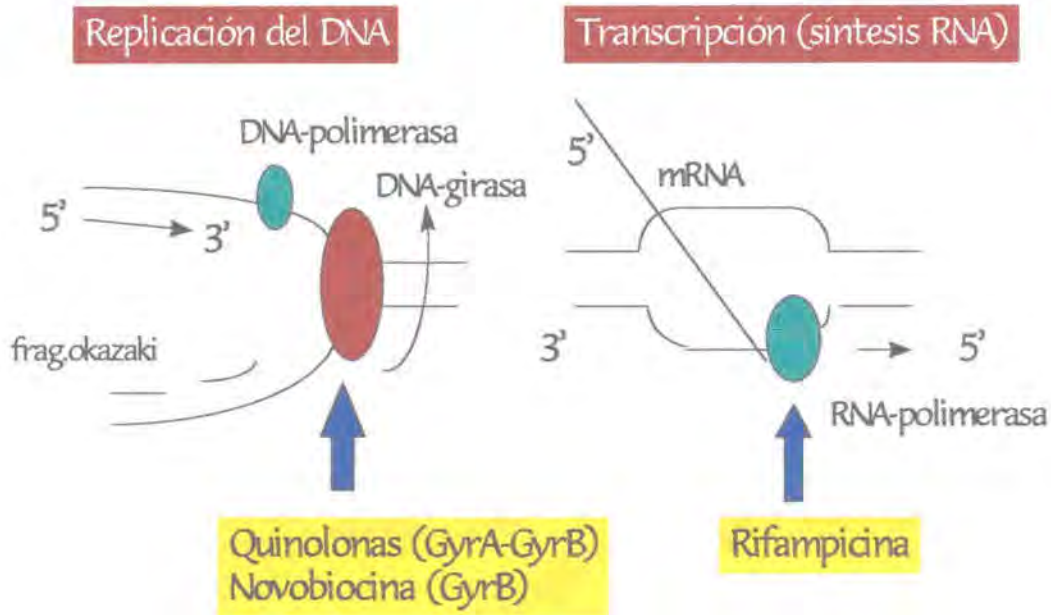


Fig. 1.5 Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.

### 1.1.1e ANTIBIÓTICOS COMO INHIBIDORES METÁBOLICOS

Una buena vía de inhibir o destruir patógenos es la utilización de compuestos que son análogos estructurales, es decir, moléculas que son estructuralmente similares a los intermediarios metabólicos. Estos análogos compiten en el proceso metabólico, pero son lo suficientemente distintos para inhibir la ruta metabólica celular. El primer grupo de quimioterápicos utilizado fue el de las sulfonamidas, que son análogas del ácido p-aminobenzoico, substrato utilizado en la síntesis de ácido fólico.

Cuando la sulfanilamida u otra sulfonamida entra en la célula, compete con el ácido p-aminobenzoico por el sitio activo del enzima implicado en la síntesis del ácido fólico (dihidropteorato sintasa) de tal

manera que la concentración de ácido fólico disminuye. El ácido fólico es esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas, las bases nitrogenadas utilizadas para la síntesis de DNA y RNA. El resultado de la inhibición de esta ruta metabólica conduce a la parada inmediata del crecimiento y muerte del patógeno. Otro antibiótico que actúa sobre la síntesis del ácido fólico es el Trimetoprim, que tiene su acción inhibidora de la hidrofolato reductasa. La combinación de sulfonamida y trimetoprim, conocida como cotrimoxazol, podría ofrecer ventajas terapéuticas respecto a los mismos agentes por separado debido al doble bloqueo de la vía de síntesis del ácido fólico. Sin embargo el supuesto sinergismo parece depender de la exposición de una correcta relación de sulfonamida y trimetoprim, situación difícil de lograr *in vivo* debido a las diferencias en las propiedades farmacocinéticas de los dos compuestos (Russell y Chopra, 1996c).

La toxicidad selectiva se basa en el hecho de que los mamíferos carecen de esta ruta metabólica y el aporte de ácido fólico es a partir de la dieta; mientras que los microorganismos son incapaces de captarlo. En la figura 1.6, se esquematiza la vía biosintética del ácido tetrahidrofólico en mamíferos y en bacterias.

La inhibición del trimetoprim de la DHFR (dihidrofolato reductasa) bacteriana es 10000 veces más potente que en la humana (del Villar, 1993).

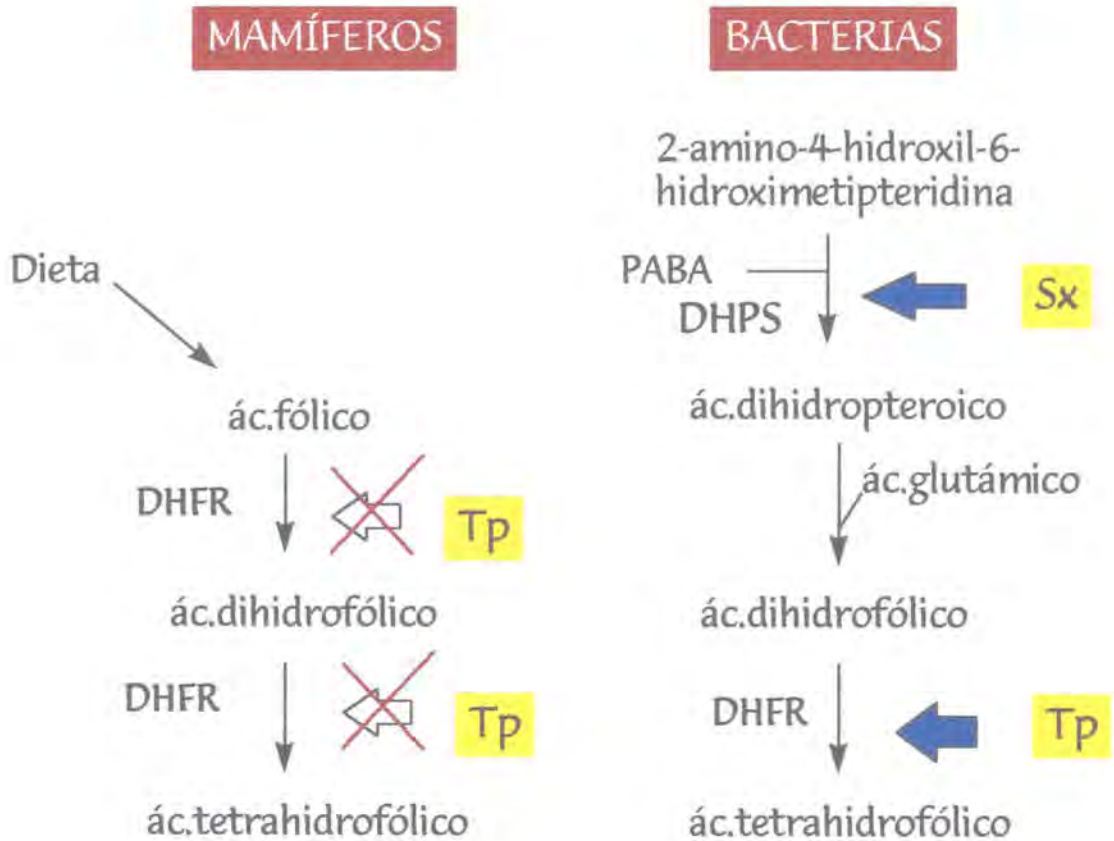


Fig. 1.6 Vía biosintética en mamíferos y bacterias del ácido tetrahidrofólico. PABA (ácido p-aminobenzoico); DHPS (dihidropteroato sintasa); DHFR (dihidrofolato reductasa); Sx (sulfametoxazol); Tp (trimetoprim). Las flechas indican a que nivel inhiben los antibióticos la ruta metabólica. (Rusell y Chopra, 1996c).

## 1.2 QUINOLONAS

Las quinolonas son agentes antimicrobianos de síntesis química, cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de la DNA-girasa y la topoisomerasa IV. Las quinolonas gozan de amplio uso terapéutico, disponibles para el tratamiento de pacientes aquejados con diferentes tipos de infecciones. Las fluoroquinolonas (4-quinolonas o quinolona-ácido carboxílico) son análogos del ácido nalidíxico, el primer agente antibacteriano de esta familia desarrollado.

En el campo de la medicina las quinolonas constituyen un grupo relativamente nuevo de antimicrobianos, con menos de 40 años de antigüedad. La historia comienza con la obtención en 1949 por Price de una molécula sin actividad biológica, por degradación de alcaloides, a la que se le llamó quinolona. En los 10 años siguientes se fueron sintetizando más de 80 moléculas similares, muchas con poder antibacteriano, pero sin aplicación clínica. En 1962, Leshner y cols., publicaron el descubrimiento de una nueva quinolona, el ácido nalidíxico, obtenido por síntesis a partir de la cloroquina, que por ser activa sobre algunas bacterias Gram-negativas y capaz de alcanzar altas concentraciones en orina, se destinó al tratamiento de infecciones localizadas en las vías urinarias (Hooper y Wolfson, 1989). En los años siguientes se fueron desarrollando más derivados como el ácido oxolínico, ácido piromídico, la cinoxacina, la flumequina, etc., que no diferían mucho del ácido nalidíxico, ni en cuanto a su espectro de acción ni en cuanto a su farmacocinética. En 1973 fue sintetizado el ácido pipemídico (Shimizu y cols., 1975; Ito y cols., 1980), al cual se le introdujo un grupo piperacínico en la posición 7 de la estructura base de la quinolona, lo que le confería una actividad y espectro mayor sobre los Gram-negativos. Su mejor farmacocinética permitía administrar dosis más reducidas que las de

compuestos anteriores, 400 mg dos veces al día en adultos , en vez de los 3-4 g de ácido nalidíxico fraccionado en 4 tomas (Gobernado y Santos, 1993). Los efectos secundarios y la aparición de mutantes resistentes bacterianos al antimicrobiano durante el tratamiento también eran menores. Con la síntesis de la norfloxacin en 1978, se abrió la etapa de las fluoroquinolonas, al incorporar un flúor en la posición 6 del anillo base.

Por analogía con otras familias de antibióticos, en la actualidad también se habla de generaciones de quinolonas. La primera abarcaría desde el ácido nalidíxico hasta el ácido pipemídico (Figura 1.7).

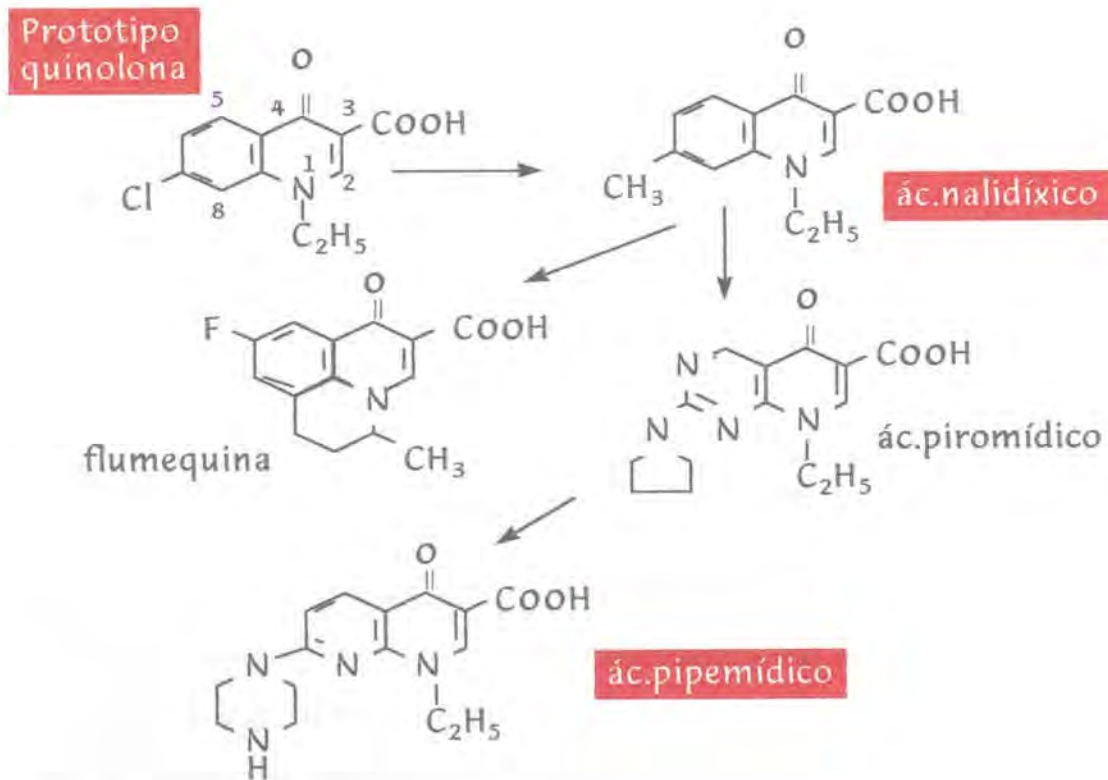


Fig. 1.7 Evolución de las quinolonas de primera generación; desde el ácido nalidíxico hasta el ácido pipemídico.

De la segunda generación de quinolonas, se dispone de más información e incluyen el norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino, enoxacin y pefloxacino (figura 1.8). Estos compuestos son bastante más potentes *in vitro* y de mayor espectro antibacteriano que el ácido nalidíxico. Además poseen unas propiedades farmacocinéticas que permiten una dosificación menor y mejor distribución por los tejidos del paciente tratado.

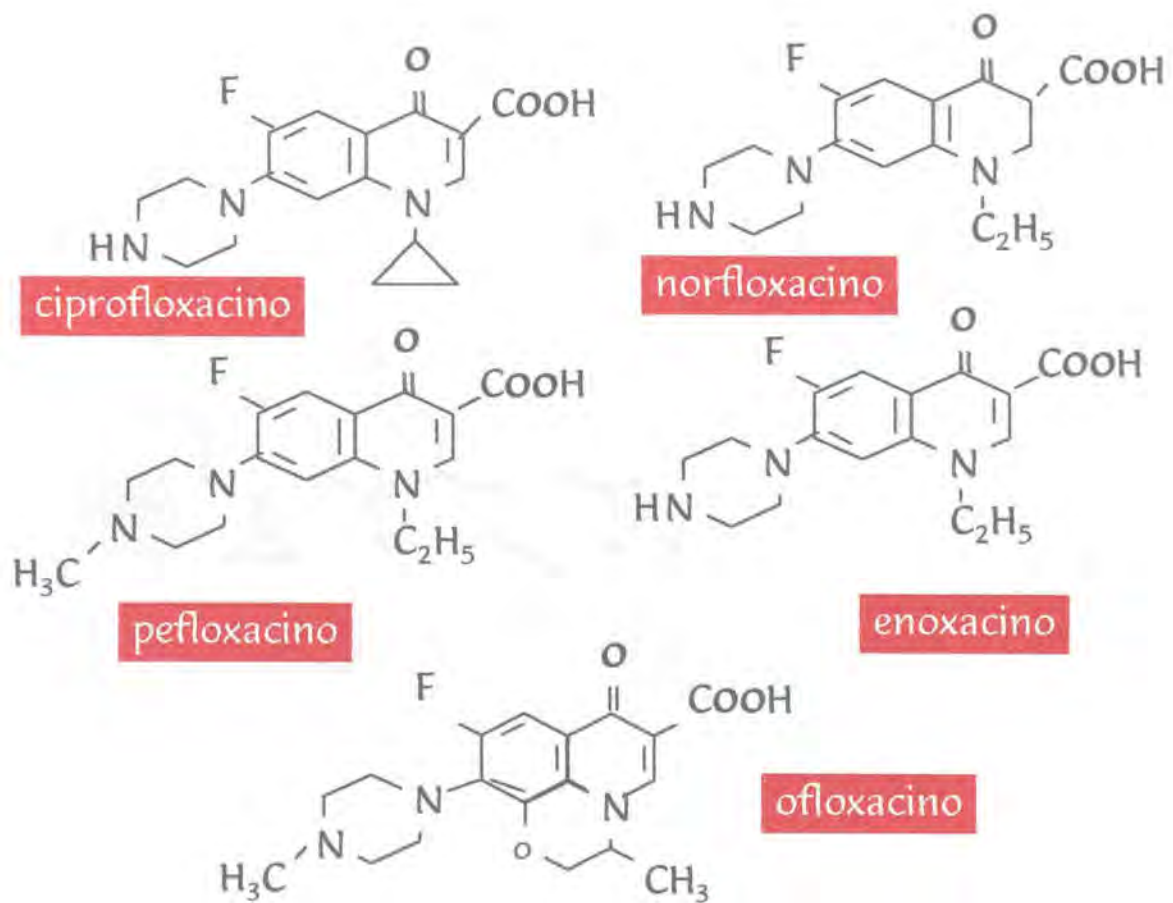


Fig. 1.8 Fórmulas químicas de las quinolonas de segunda generación.

La tercera generación de quinolonas, las más recientemente desarrolladas, mantienen las propiedades de la segunda generación, y además algunos principios activos como el lomefloxacino y el sparfloxacino presentan un tiempo de vida medio mayor lo que permite la administración de dosis únicas diarias (Hooper y Wolfson, 1993) (figura 1.9).

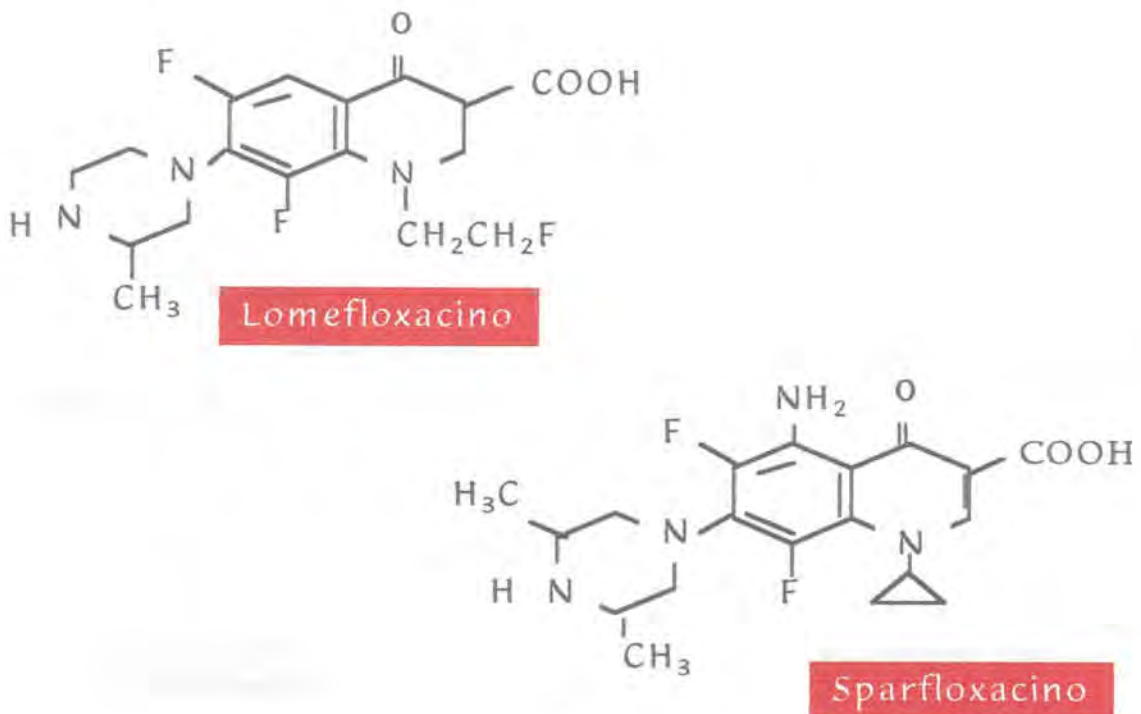


Fig. 1.9 Fórmulas químicas de las quinolonas de tercera generación.



### 1.2.1 RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS Y SU ACTIVIDAD.

Las distintas quinolonas comparten un esqueleto común, representado en la Figura 1.10, es el ácido 1,4-dihidro-4-oxo-piridin-3-carboxílico (Chu y Fernandes, 1989).

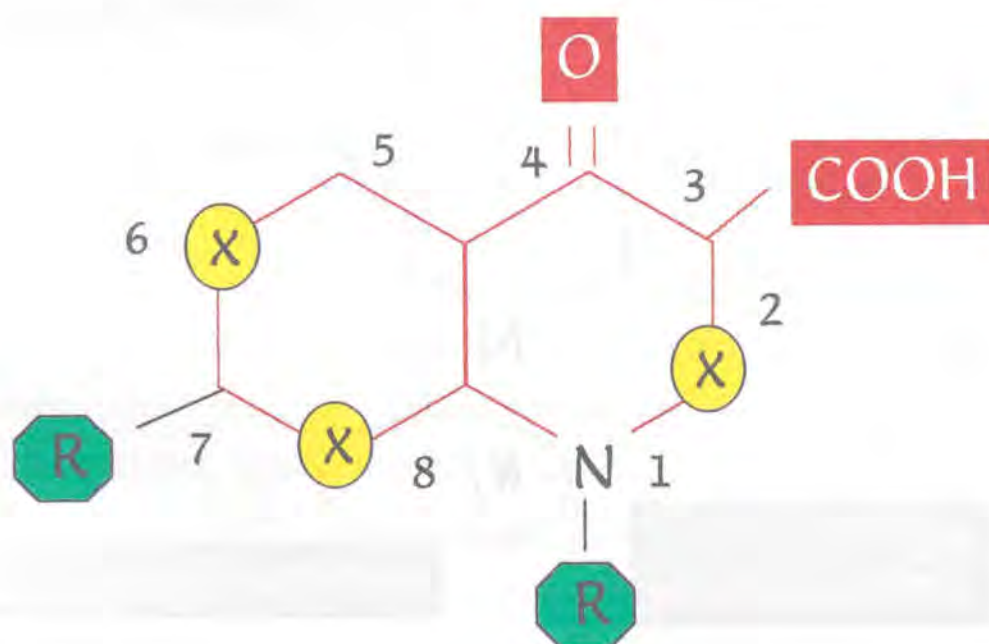


Fig. 1.10 Estructura básica de las quinolonas.

Una de las contribuciones más importantes realizadas en la investigación de nuevos productos farmacéuticos consiste en la predeterminación experimental de nuevas moléculas. La actividad antimicrobiana de las quinolonas depende no sólo del esqueleto base

compuesta por un sistema bicíclico heteroaromático, sino de la naturaleza de los sustituyentes periféricos y su relación espacial (Chu y Fernandes., 1989; Mitscher y cols., 1993; Bryskier y Chantot, 1995) Debemos tener en cuenta que la mayoría de estudios se han realizado con las quinolonas de segunda generación, sobre todo con el ciprofloxacino y el norfloxacino. (Figura 1.11).

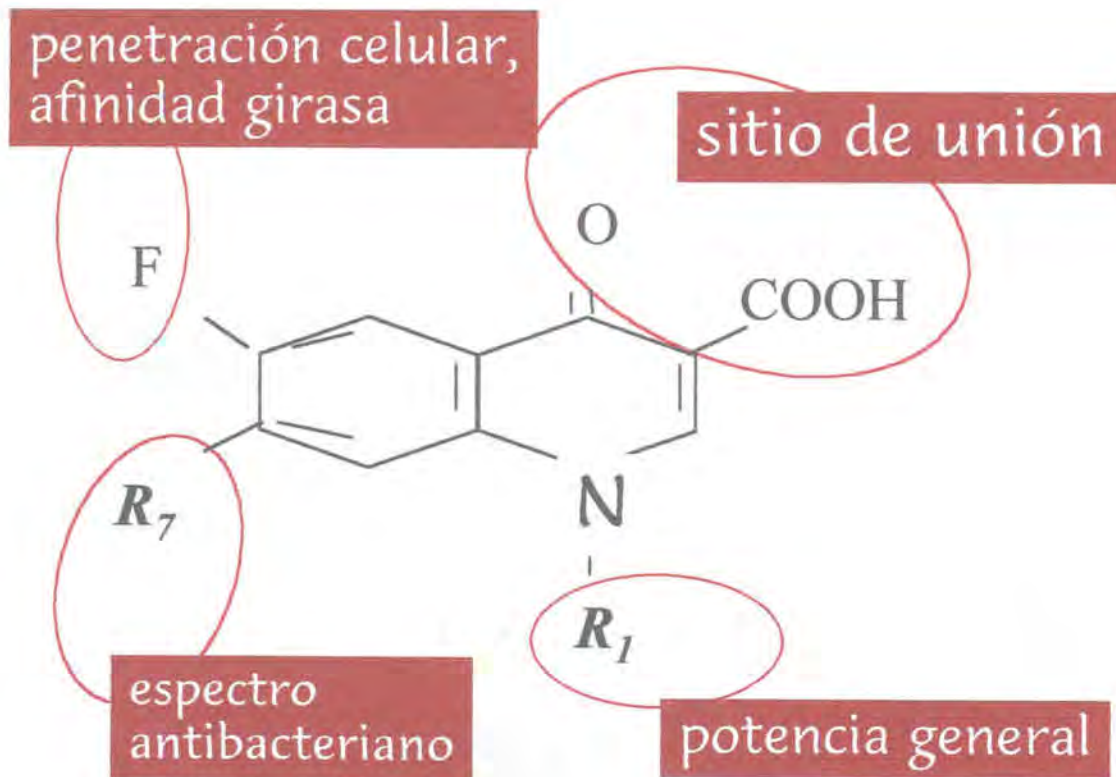


Fig. 1.11 Lugares que determinan la relación entre la estructura química y la actividad de las quinolonas. (Bryskier y Chantot, 1995).

Los grupos 3-carboxílico y 4-carbonilo son esenciales para la actividad bactericida, porque median la unión al complejo DNA-DNA girasa. La actividad quelante de iones magnesio viene determinada por el grupo

carboxílico libre en C-3, que puede ser importante para la penetración a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Nikaido y Thanassi, 1993).

La adición de un átomo de flúor en la posición C-6 parece estar asociado a una mayor potencia antibacteriana respecto a otros sustituyentes presentes en el mismo lugar de la molécula de quinolona (H, Cl, Br, CH<sub>3</sub>, COCH<sub>3</sub>, CN y NO<sub>2</sub>). La inhibición de la girasa y la penetración en la célula está incrementada por la presencia de un átomo de flúor en el C-6 (Chu y Fernandes, 1989). Sin embargo, no se ha observado una correlación entre la concentración de quinolona acumulada intracelularmente y el número de átomos de flúor del núcleo de la quinolona (monofluorada, di o trifluorada) (Asuquo y Piddock, 1993).

La modificación de los sustituyentes en la posición C-7 de la molécula de quinolona ha sido extensivamente estudiada. En general, quinolonas con sustituyentes pequeños lineales en la posición C-7 (H, Cl, CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub> y NHH<sub>2</sub>) poseen moderada actividad biológica, mientras que aquellas quinolonas que tienen un anillo heterocíclico (p.e., pirrolidinilo, pirrolilo, tiazolidinilo, tiomorfolinilo y piperacinilo) presentan una mayor actividad antibacteriana. El sustituyente en C-7 más común es el piperacinilo, el cual lo encontramos en el norfloxacin, ciprofloxacino y enoxacin. Para una serie de compuestos se ha observado que la actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas aumenta en el siguiente orden: 3'-hidroxipirrolidinilo < 4'-metilpiperacinilo < piperacinilo < 3'-aminopirrolidinilo; mientras que para los Gram-positivos la secuencia sería: piperacinilo < 3'-metilpiperacinilo ≤ 4'-metilpiperacinilo < 3'-hidroxipirrolidinilo < 3'-aminopirrolidinilo (Bryskier y Chantot, 1995).

Se ha demostrado que la potencia antibacteriana está enormemente influida por el sustituyente en la posición N-1 (Mitscher y cols., 1993).

En general, los isómeros S de cualquier compuesto son dos órdenes de magnitud más potentes contra las cepas de *E. coli* que sus correspondientes R isómeros. Ambos isómeros se acumulan de igual manera, así pues la diferencia en la actividad debe recaer en su capacidad de unirse al complejo DNA-DNA-girasa (Morrisey y cols.,1996).

### 1.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Los pasos secuenciales de la acción antibacteriana de una quinolona se resumen en: (1) paso a través de las envueltas celulares para alcanzar el citoplasma, (2) inhibición de la diana, DNA-girasa y/o Topoisomerasa IV, (3) inhibición de la síntesis replicativa del DNA y , (4) inducción de la respuesta SOS y otros efectos en la estructura celular y respuesta bioquímica (figura 1.12).

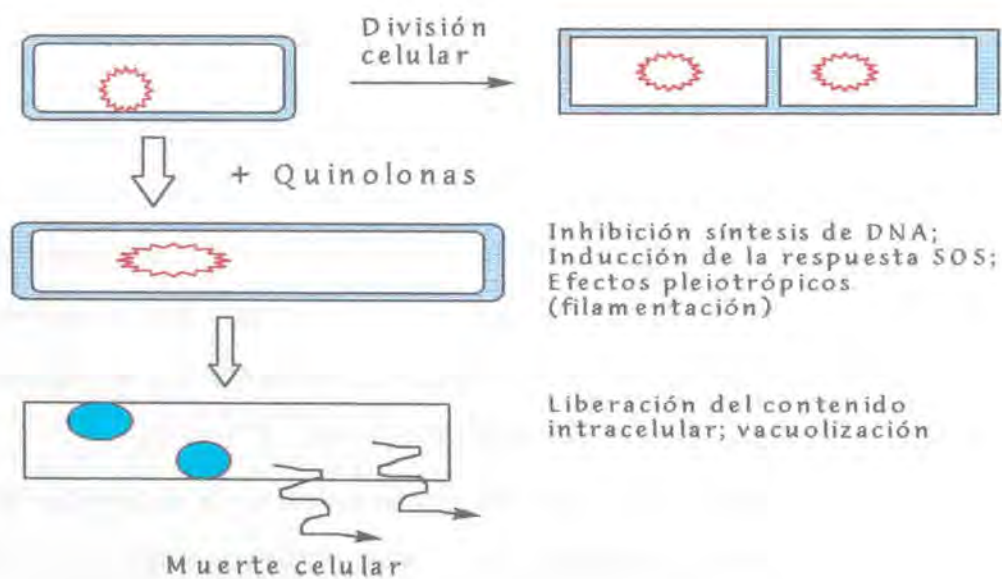


Fig. 1.12 Mecanismo de acción de las quinolonas (Diver, 1989).

### 1.2.2a ENTRADA DE LAS QUINOLONAS EN LA CÉLULA BACTERIANA

Se ha propuesto que las quinolonas pueden penetrar las envueltas celulares por tres rutas: (1) vía hidrofílica a través de las proteínas formadoras de canal, (2) vía hidrofóbica a través de la bicapa de fosfolípido y (3) vía "auto-promovida", en la que hay un desplazamiento de los cationes divalentes que unen moléculas adyacentes de lipopolisacárido (LPS), de tal manera que altera la estructura de la membrana externa (Chapman y Georgopapadaku, 1989; Piddock, 1991).

Se ha observado que el  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$ , disminuyen la entrada de quinolona (Marshall y Piddock, 1994), esto podría ser debido a la formación de complejos quinolona-cación demasiado grandes para difundir a través de las proteínas de membrana externa, por ejemplo la porina de *Escherichia coli* OmpF (Nikaido y Thanassi, 1993), o bien que los cationes estabilizarían la membrana externa mediante la formación de nuevos enlaces iónicos entre las cargas negativas presentes en la molécula de LPS, lo que prevendría el daño que causaría la quinolona al quelar los cationes de la membrana externa y estimularía su propia captación (Chapman y Georgopapardaku, 1989).

### 1.2.2b LA DNA-GIRASA COMO DIANA DE LAS QUINOLONAS

La topoisomerasa II bacteriana o DNA-girasa es un enzima que contiene dos subunidades A (GyrA) y dos subunidades B (GyrB) codificadas por el gen *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Todas las actividades del enzima requieren ambas subunidades, aunque cada una realiza diferentes funciones. La GyrA, media la ruptura de una hebra de DNA formando con el aminoácido tirosina (Tyr-122) una unión transitoria fosfotirosina; mientras que la GyrB media la actividad ATPasa del enzima. La actividad ATPasa de la

DNA-girasa puede ser inhibida por la novobiocina y derivados, los cuales no están estructuralmente relacionados con las quinolonas (Sugino y cols., 1978).

Las quinolonas presentan un marcado efecto sobre la DNA-girasa y la célula bacteriana. Algunas de las consecuencias de la exposición de la bacteria a las quinolonas fueron determinadas para el ácido nalidíxico antes del descubrimiento de la DNA-girasa. Goss, Deitz y Cook., publicaron en los años 60, que el ácido nalidíxico era selectivamente antagonista con la síntesis de DNA, y producía la degradación del DNA e inducía la filamentación de la bacteria. El antibiótico era bactericida pero su efecto podía ser bloqueado por la presencia de cloranfenicol, ausencia de aminoácidos, etc.; todas aquellas situaciones en las cuales tenía lugar una inhibición de la síntesis proteica.

En 1977, Gellert y cols., y Sugino y cols., idearon experimentos en los que demostraron que la subunidad A de la DNA-girasa era la principal diana del ácido nalidíxico y del ácido oxolínico.

Más recientemente, se han obtenido resultados similares en otras especies bacterianas, por ejemplo en *Bacillus subtilis* (Sugino y Bott, 1991), *Enterococcus faecalis* (Nakanishi y cols, 1991), *Staphylococcus aureus* (Okuda y cols. 1991), *Campylobacter jejuni* (Gootz y Martin, 1991), *Serratia marcescens* (Masecar y Robillard, 1991), *Pseudomonas aeruginosa* (Masecar y cols., 1990), que constatan que la subunidad A de la DNA-girasa es la diana de acción de las quinolonas. Las mutaciones en *gyrA* que determinan la resistencia a las quinolonas, se han localizado en una región conservada en el extremo N-terminal de la GyrA, entre los aminoácidos 67 y 106. Esta zona se ha denominado QRDR (*quinolone resistance determinant region*) (Weigel y cols., 1998).

Sin embargo, también se han encontrado dos mutaciones que codifican resistencia para el ácido nalidíxico en la subunidad B de la DNA-girasa (Inoue y cols., 1978; Yamagishi y cols., 1981; Yamagishi y cols., 1986). Una de estas mutaciones denominadas *nalD*, causa un aumento de la resistencia a las "nuevas" quinolonas; mientras que la otra mutación, la *nalC*, provoca mayor susceptibilidad a aquellas quinolonas que tienen un grupo piperacínico en el C-7 del núcleo de la quinolona. (Smith, 1984a). Así pues, tanto la subunidad A como la B son la diana de las quinolonas.

La acción de las quinolonas *in vitro* sobre la topoisomerasa IV sugiere la posibilidad que este enzima sea también una diana de estos antibióticos *in vivo* (Ruiz y cols., 1997; Vila y cols., 1997); aunque la concentración de quinolona para inhibir la topoisomerasa IV de *E.coli* purificada es de 2 a 10 veces mayor que para la inhibición de la DNA-girasa purificada (Hoshino y cols., 1994). La topoisomerasa IV también está constituida por 4 subunidades: dos codificadas por el gen *parC* (que presentan un 36% de homología con la *gyrA*) y dos subunidades codificadas por el gen *parE* (con una homología del 40% con el *gyrB*).

Mutaciones en *parC* y *parE* en *E.coli* y otras bacterias Gram negativas contribuyen a la resistencia de las quinolonas, pero sólo en presencia de mutaciones en *gyrA*. Cambios en *parC* y *parE* no producen resistencia fenotípica en cepas que tienen la DNA-girasa "intacta" (*wild type*) (Breines y cols., 1997); lo que sugiere que en estos microorganismos la topoisomerasa IV constituye la segunda diana de las quinolonas.

A diferencia de *E. coli*, en *Staphylococcus aureus* y otras bacterias Gram positivas como *Streptococcus pneumoniae*, la primera diana de estas sustancias es la topoisomerasa IV (Yamagishi y cols., 1996; Pan y cols., 1996).

### 1.2.2c EFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE DNA POR LA ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas inducen la síntesis de la proteína RecA y la respuesta celular SOS (Piddock y cols., 1990), que representa un intento celular para movilizar nuevos mecanismos reparadores que permitan a la célula continuar con la replicación del DNA. Entre los efectos de la respuesta SOS se encuentra la debilitación de las funciones normales de prueba de lectura de la DNA polimerasa, permitiendo que estas enzimas lean rápidamente secciones dañadas del DNA sin esperar su corrección por escisión y sustitución de bases. Como consecuencia se da un elevado número de inexactitudes en el apareamiento de las bases.

La filamentación de las células tras el tratamiento con quinolonas, probablemente es debida a la inducción del sistema de reparación SOS, el cual induce el gen *suIS* (*sfIA*), cuyo producto antagoniza con SulB (codificado por el gen *suIB*) que es necesario para la división celular (Walker, 1984).

La lisis celular inducida por el tratamiento con estas moléculas parece estar asociada a una disminución de la longitud media de la cadena de peptidoglicano, lo que sugiere un papel en la actividad autolítica de los estadios finales de la muerte celular (Vicent y cols., 1991)

### 1.2.3 FARMACOCINÉTICA DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas se absorben por vía oral: el pefloxacino, ofloxacino y el fleroxacino de manera rápida, más del 90% a las 1-2 horas; el norfloxacino y el enoxacino lentamente y en menor cantidad, 35-50%, y el ciprofloxacino de



45-65 %. Los alimentos pueden enlentecer la absorción, pero no disminuyen la biodisponibilidad (Crump y cols., 1983; Wise y cols., 1984; Weidekam y cols., 1987). Con las dosis habituales se alcanzan niveles en sangre al cabo de 1.3 horas entre 1.3  $\mu\text{g/ml}$  para el enoxacino y 5.3  $\mu\text{g/ml}$  respecto al ofloxacino. Con excepción de la unión a las proteínas plasmáticas del ácido nalidíxico y del ácido pipemídico, la del resto de quinolonas es baja, entre el 15 y el 30 %, sin presentar repercusiones clínicas, lo que no dificulta su paso al espacio extravascular. Presentan una buena difusión en los tejidos y una penetración intracelular entre 2 y 10 veces la concentración que presenta en el suero (Gobernado y Santos, 1993).

La mayoría de fluoroquinolonas se eliminan por vía renal (entre el 40 y el 90 %), con la excepción del ácido nalidíxico, que sólo lo hace en un 5 %. Del 25 al 30 % del ácido pipemídico y del norfloxacino se pueden eliminar por la bilis. Las quinolonas pueden sufrir modificaciones enzimáticas en el paciente tratado. Las principales formas de biotransformación son la desmetilación, la oxidación o la rotura del anillo de la molécula o conjugación del ácido carboxílico, dando lugar a sustancias como el oxoenoxacino, oxonorfloxacino, oxociprofloxacino, aminonorfloxacino, etc. Algunos de estos metabolitos son activos desde el punto de vista antibacteriano, como el oxoenoxacino, el oxociprofloxacino y el desmetilpefloxacino (Borner y cols., 1986).

Teniendo en cuenta la vía de entrada y de eliminación, en los casos de insuficiencia hepática grave sólo habrá que modificar las dosis de pefloxacino. Si se trata de insuficiencia renal, el norfloxacino y el ofloxacino se acumulan, mientras que el ciprofloxacino y el pefloxacino no se modifican. Las dos primeras no se pueden eliminar por hemodiálisis, y las otras dos sólo lo hacen en un 20 %. Por lo tanto, no habrá que modificar las dosis de pefloxacino en casos de insuficiencia renal, incluso grave; el enoxacino,

norfloxacin y el ciprofloxacino se administran una sola vez al día cuando el aclaramiento de creatinina está por debajo de 15 ml/min, y el ofloxacino también una vez al día incluso con insuficiencia moderada.

A diferencia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y aminoglicósidos, que penetran mal a través de las membranas eucariotas, las quinolonas penetran bien en los macrófagos y en los leucocitos polinucleares de los animales y humanos (Easmon y Cranc, 1985).

#### 1.2.4 EFECTOS ADVERSOS DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas presentan un bajo nivel de toxicidad. El porcentaje de reacciones adversas es bajo (< 5 %) y afectan sobre todo al aparato digestivo, la piel y el sistema nervioso central (SNC); manifestándose por náuseas, vómitos, diarreas, elevación de las transaminasas, insomnio, cefaleas, temblores, convulsiones y exantema cutáneo (Hooper y Wolfson, 1985). Al parecer, los efectos sobre el SNC se deben a que las quinolonas, a concentraciones tisulares elevadas, inhiben el receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis de la célula nerviosa de los mamíferos (Segev y cols., 1988). Asimismo, algunas quinolonas, como el enoxacino y el ácido pipemídico, pueden tener interacciones con otras sustancias, principalmente la cafeína (Stille y cols., 1987; Mahr y cols., 1992) y la teofilina (Thomsom y cols., 1987; Batty y cols., 1995), retardando la eliminación de antibiótico y como consecuencia, aumentando hasta dos veces sus niveles séricos y favoreciendo sus efectos secundarios (Maesen y cols., 1984). La administración conjunta de antiácidos que contengan aluminio o magnesio entorpecen su absorción (Ratcliffe y Smith, 1983; Flor y cols., 1990; Frost y cols., 1992; Li y cols., 1994). En los animales de experimentación, estas sustancias al ser ácidos

orgánicos, afectan los cartílagos de conjunción, por lo que estaría contraindicado su administración a niños y mujeres embarazadas. Sin embargo, otros estudios con pacientes pediátricos muestran que tienen una tolerabilidad similar a la de los adultos (Kubin, 1993; Hayem y Carbon, 1995; Pradhan y cols., 1995).

### 1.2.5.EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS

El ácido nalidíxico y otras quinolonas similares, tales como el ácido oxolínico, se utilizaron para el tratamiento de las infecciones urinarias principalmente. Sin embargo desde la década de los 80, la introducción de las fluoroquinolonas tales como el ciprofloxacino y el norfloxacino, que presentaban mejores propiedades farmacocinéticas, cambió substancialmente el patrón de uso terapéutico y su aceptación mundial ha conducido a una intensa utilización, lo que ejerce una fuerte selección de cepas resistentes (Davis y cols.,1996).

Las mutaciones espontáneas que confieren resistencia a las fluoroquinolonas tienen una frecuencia alrededor de  $10^{-6}$  a  $10^{-11}$  *in vitro*, dependiendo de la especie bacteriana, del principio activo y de su concentración (Goldstein y Acar, 1995). Se ha observado que la resistencia a las fluoroquinolonas de los patógenos adquiridos en la comunidad es baja, del 97 al 100% de estos microorganismos son susceptibles a estos compuestos. Sin embargo existe un aumento variable en la incidencia de la resistencia en los patógenos nosocomiales, que depende de la política local de administración de antimicrobianos y de factores epidemiológicos (Goldstein y Acar, 1995). Un clon resistente seleccionado podrá dispersarse si la cepa tiene “potencial epidemiológico” y si las condiciones ambientales son favorables, como ha sido demostrado en los casos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Dalhoff, 1994; Kresken y cols., 1994).

En la figura 1.13, se resume un estudio de la susceptibilidad al ciprofloxacino de patógenos urinarios, en el cual se pone de manifiesto las diferencias de las tasas de resistencia entre los aislamientos en la comunidad y los nosocomiales. No obstante, la tendencia en ambos casos es el aumento gradual del número de cepas resistentes. Para el caso de los patógenos adquiridos en la comunidad, esto podría ser consecuencia de un exceso de prescripciones médicas en algunos casos innecesarias, pacientes que no terminan el tratamiento y almacenan las dosis sobrantes para automedicarse, o medicar a familiares o amigos. En cualquier caso, la incorrecta dosificación será incapaz de eliminar al agente infeccioso. Asimismo el abuso de estos antibióticos en veterinaria y agricultura puede estimular el desarrollo de cepas resistentes.

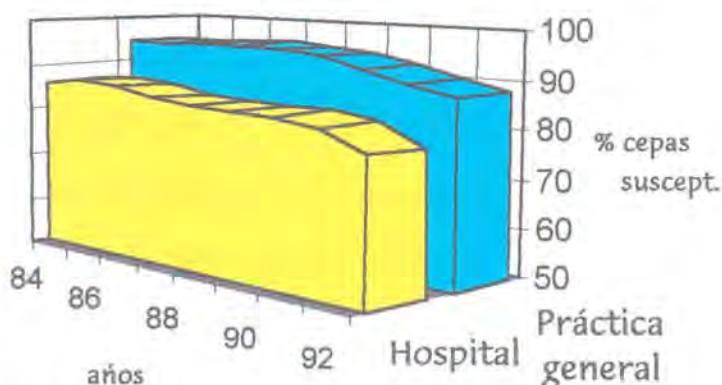


Fig. 1.13 Modelos de resistencia al ciprofloxacino entre los aislados en la comunidad y los nosocomiales (Grüneberg, 1994).

En la figura 1.14 se muestra el porcentaje de cepas resistentes al pefloxacino en patógenos adquiridos en un hospital francés durante un periodo de 10 años (Acar y Goldstein, 1997). La elevada incidencia de la resistencia a las fluoroquinolonas en los Gram positivos MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) es debida a la dispersión horizontal de

unos pocos clones que tienen potencial epidemiológico (Goldstein y Acar, 1995).

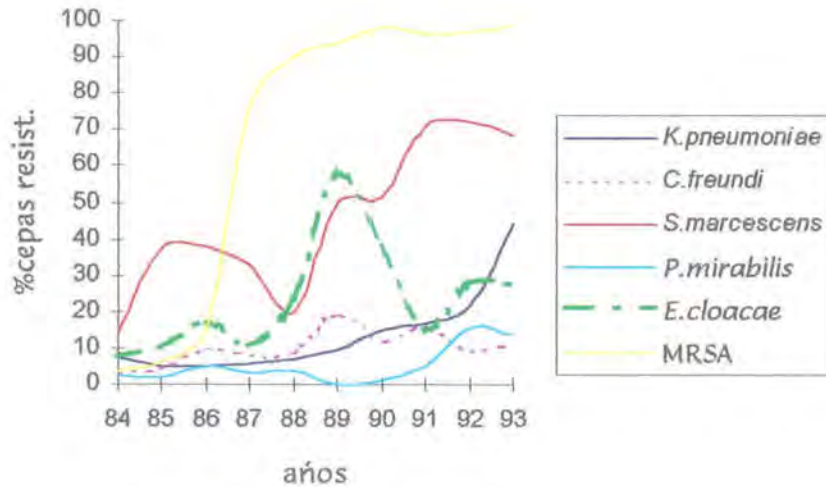


Fig. 1.14 Porcentaje de cepas resistentes al pefloxacino en patógenos nosocomiales, en un período de tiempo de 10 años (Acar y Goldstein, 1997).

Estos datos se correlacionan con otros obtenidos a partir de estudios de diferentes centros hospitalarios españoles (García-Rodríguez y cols., 1995; Mirelis y cols., 1993), en los cuales el género *Serratia* y *Enterobacter*, son los que mayor porcentaje de cepas resistentes a las fluoroquinolonas se han aislado dentro de las enterobacteriáceas.

### 1.3 EL GÉNERO *Serratia*

Los microbios son fuente continua de sorpresas, su invisibilidad contribuye a acrecentar nuestro asombro cuando un microorganismo en particular o su actividad se hace patente por primera vez como es el caso de *Serratia*. La multiplicación de cepas pigmentadas de rojo fueron responsables de la aparición de manchas de "sangre" en diferentes alimentos (pan, polenta) y en las hostias sagradas, lo que conllevó a importantes consecuencias sociológicas

El género *Serratia* es un miembro de la familia de las enterobacteriáceas que coloniza una gran variedad de hábitats. La utilización potencial de un amplio rango de nutrientes determina su capacidad de sobrevivir y multiplicarse en condiciones extremas, incluyendo desinfectantes y antisépticos (Marrie y Costerton, 1981; Sautter y cols., 1984; Barry y cols., 1984; Nakashima y cols., 1987). En general los aislamientos de medios extrahospitalarios (suelos, aguas y vegetales) presentan la capacidad de producir un pigmento rojo no difusible en agua y que corresponde a una estructura química de tripirrol lineal, la prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno). Este pigmento se encuentra ligado a la membrana citoplasmática y su síntesis se produce una vez alcanzada la fase estacionaria, de manera que puede considerarse un metabolito secundario (Williams y Qadri, 1980; Viñas et al., 1983; Viñas et al., 1987; Lorén y Guinea, 1978). La biosíntesis de la prodigiosina depende de las condiciones de crecimiento (Rjazantseva y cols., 1994). La luz visible influye en la pigmentación, en cultivos en oscuridad o iluminados, se observa que el máximo de contenido de prodigiosina se alcanza a los 3-4 y 2-3 días, respectivamente (Hejazi y Falkiner, 1997). Se ha postulado que el pigmento parecer tener un papel en la respiración (Allen, 1967), aunque experimentalmente no se ha demostrado con claridad. Presumiblemente, su

biosíntesis actúa como un mecanismo protector en condiciones desfavorables de crecimiento (Akimenko y Trutko., 1991).

Las cepas pigmentadas fueron las responsables de fenómenos “místicos” y milagrosos desde los albores de las civilizaciones. El primer hecho histórico documentado de la aparición de “sangre” en alimentos fue en 332 a. C. durante el cerco de Tiro por Alejandro Magno; los soldados de éste se asustaron al abrir el pan y encontrar sangre dentro. El sacerdote Areistades, los tranquilizó diciéndoles que esto representaba un buen designio de los dioses (Grimont y Grimont, 1978).

Las citas vuelven a surgir en la Edad Media, esta vez sobre hostias y diversos símbolos religiosos, lo que constituyó el origen de numerosas leyendas y milagros (Hefferan, 1904; 1924) e incluso de dogmas católicos como la transustanciación y, al mismo tiempo de justificación en algunas ocasiones para persecuciones contra los judíos. Estas reacciones fanáticas e intolerantes condujeron en numerosas ocasiones a situaciones violentas (Doyle y Lee, 1986). Scheurlen en 1986, revisando algunos de estos datos concluyó que este microorganismo ha causado a lo largo de la historia más muertos que muchas bacterias patógenas estrictas (Grimont y Grimont, 1978).

El primero en dar una explicación científica a este tipo de manchas fue Bizio, quien en 1823 aisló un microorganismo a partir de polenta contaminada que presentaba estas manchas rojas. Bizio comunicó su descubrimiento (Bizio, 1823) y denominó al microorganismo *Serratia marcescens* en honor a Serafino Serrati. Este aislamiento original no fue conservado y en realidad podría corresponder a cualquier microorganismo productor de pigmentos rojos, incluso a alguna levadura. Años más tarde, en

1848, Ehrenberg comunicó a la Real Academia de las Ciencias de Prusia el aislamiento de un microorganismo de color rojo que denominó *Monas prodigiosa* y, a partir de estos trabajos, Kraft bautizó el pigmento como prodigiosina (Grimont y Grimont, 1978).

El primer aislamiento confirmado de *Serratia* fue realizado por Koch en 1883 en la India, a partir del aparato digestivo de un mono. La cepa denominada por Koch *Bacillus indicus*, se conserva actualmente (ATCC4002). Posteriormente, se realizaron numerosos aislamientos de bacterias productoras de pigmentos rosas y rojos, nombrándose de diferentes manera según el autor del aislamiento. El primer trabajo de agrupación de las diferentes cepas prodigiosenogénicas fue realizado por Hefferan (1904), quien las clasificó en cuatro grupos diferentes, de los cuales sólo uno correspondía a lo que hoy se conoce como el género *Serratia*. El nombre de *Serratia* fue definitivamente aceptado gracias a los trabajos de Breed y Breed (1924) y la adopción de este nombre por la primera edición del manual de Bergey (Bergey y cols., 1923). Casi simultáneamente a la consolidación del nombre se estableció la relación de *Serratia* con otras bacterias como *Escherichia*, *Aerobacter* o *Proteus*, que llevó a la inclusión de este género en la familia *Enterobacteriaceae* a partir de la quinta edición del Bergey's Manual (Grimont y cols., 1977).

Actualmente se reconocen como pertenecientes al género *Serratia* las especies: *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. phymuthica*, *S. rubideae*, *S. odorifera*, *S. ficaria*, *S. proteamaculans*, *S. grimesii*, *S. fonticola*, *S. entomophila*; siendo la especie tipo *S. marcescens*. En la Tabla 1.1 se resumen las características fenotípicas principales de las especies de *Serratia*.



Tabla 1.1. Características fenotípicas diferenciales de las especies de *Serratia*

| Características                          | <i>S.mar-<br/>cescens</i> | grupo<br><i>liquefa-<br/>ciens</i> | <i>S.phy-<br/>muthica</i> | <i>S.rubi-<br/>deae</i> | <i>S.odo-<br/>rifera</i> | <i>S.fica-<br/>ria</i> | <i>S.ento-<br/>mophila</i> | <i>S.fon-<br/>ticola</i> |
|--|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Produc. Pigmento                         | d                         | -                                  | v                         | v                       | -                        | -                      | -                          | -                        |
| Olor "patata"                            | -                         | -                                  | -                         | v                       | +                        | +                      | -                          | -                        |
| Crecimiento a 5°C                        | -                         | +                                  | +                         | -                       | +                        | +                      | +                          | +                        |
| Crecimiento a 40°C                       | +                         | -                                  | -                         | v                       | ND                       | ND                     | +                          | ND                       |
| Indol                                    | -                         | -                                  | -                         | -                       | +                        | -                      | -                          | -                        |
| Reducc. tetracionato                     | d                         | +                                  | -                         | -                       | -                        | -                      | -                          | +                        |
| Gas de glucosa                           | -                         | +                                  | v                         | -                       | -                        | -                      | -                          | v                        |
| β-xilosidasa                             | -                         | -                                  | v                         | +                       | +                        | v                      | -                          | +                        |
| Oxidación de:                            |                           |                                    |                           |                         |                          |                        |                            |                          |
| glucosa a gluconato                      | +                         | -                                  | v                         | +                       | +                        | +                      | +                          | -                        |
| 2-cetogluconato a<br>2,5 dicetogluconato | -                         | +                                  | d                         | -                       | -                        | -                      | -                          | -                        |
| Ácido de: Adonitol                       | v                         | -                                  | -                         | +                       | (+)                      | +                      | +                          | +                        |
| L-arabinosa                              | -                         | +                                  | +                         | +                       | +                        | +                      | -                          | +                        |
| Lactosa                                  | d                         | v                                  | (+)                       | +                       | (+)                      | v                      | -                          | +                        |
| D-melibiosa                              | -                         | +                                  | +                         | +                       | +                        | +                      | -                          | +                        |
| D-rafinosa                               | d                         | +                                  | +                         | +                       | d                        | +                      | -                          | +                        |
| L-ramnosa                                | -                         | -                                  | -                         | -                       | +                        | +                      | -                          | v                        |
| D-sorbitol                               | +                         | +                                  | d                         | -                       | +                        | +                      | -                          | +                        |
| Sacarosa                                 | +                         | +                                  | +                         | +                       | d                        | +                      | +                          | -                        |
| D-xilosa                                 | +                         | +                                  | +                         | +                       | +                        | d                      | d                          | d                        |
| Lis descarboxilasa                       | +                         | +                                  | -                         | d                       | +                        | -                      | -                          | +                        |
| Orn descarboxilasa                       | +                         | +                                  | -                         | -                       | d                        | -                      | -                          | +                        |
| Arg descarboxilasa                       | -                         | d                                  | -                         | -                       | -                        | -                      | -                          | -                        |
| Hidrólisis tween 80                      | +                         | +                                  | +                         | +                       | -                        | +                      | +                          | +                        |
| Utilización adonitol                     | +                         | d                                  | -                         | +                       | +                        | +                      | +                          | +                        |
| L-arabinosa                              | -                         | +                                  | +                         | +                       | +                        | +                      | -                          | +                        |
| D-arabitol                               | -                         | -                                  | -                         | +                       | -                        | +                      | d                          | +                        |
| betaína                                  | -                         | -                                  | v                         | +                       | -                        | -                      | -                          | -                        |
| dulcitol                                 | -                         | -                                  | +                         | -                       | -                        | -                      | -                          | +                        |
| meso-eritritol                           | d                         | -                                  | -                         | +                       | d                        | +                      | -                          | +                        |
| maltitol                                 | -                         | +                                  | +                         | +                       | -                        | +                      | -                          | v                        |
| melecitosa                               | -                         | +                                  | +                         | d                       | -                        | +                      | -                          | -                        |
| D-melibiosa                              | -                         | +                                  | +                         | +                       | +                        | +                      | -                          | +                        |

|              |   |   |   |     |   |   |   |   |
|--------------|---|---|---|-----|---|---|---|---|
| palatinosa   | - | + | + | +   | - | + | - | + |
| quinato      | d | - | + | (+) | - | + | d | - |
| L-ramnosa    | - | d | - | -   | + | + | - | + |
| D-sorbitol   | + | + | v | -   | + | + | - | + |
| sacarosa     | + | + | + | +   | d | + | + | - |
| D-tartrato   | - | - | - | d   | d | - | - | v |
| tricarbilato | - | - | - | d   | - | - | - | v |
| trigonecina  | d | - | - | +   | + | v | - | - |

d: variable

ND: no determinado

También se han descrito otros pigmentos característicos de algunas cepas de *Serratia*, particularmente los derivados del catabolismo de compuestos aromáticos. Estas moléculas incluyen pigmentos amarillos y negros que han sido estudiados en cepas procedentes de muestras clínicas de infecciones urinarias, aunque su función en la patogenicidad no ha sido establecida con claridad (Trias et al., 1987a; 1987b; 1988; 1989).

### 1.3.1 *Serratia* COMO AGENTE PATÓGENO

La patogenicidad bacteriana ha sido definida como el conjunto de mecanismos bioquímicos mediante los cuales las bacterias pueden causar enfermedad (Smith, 1968).

El hecho de que las cepas aisladas de muestras clínicas no presenten la capacidad de producir el pigmento prodigiosina y que la bacteria sea desde un punto de vista bioquímico muy similar a otras enterobacterias como *Klebsiella* y *Enterobacter*, hace que en muchos casos y como consecuencia de una identificación errónea, se haya subestimado el papel de *Serratia* como agente patógeno. En un estudio de control de los laboratorios de diagnóstico microbiológico del Departamento de Salud Pública del estado de

Massachusetts, el 60 % de los laboratorios erraron en la identificación de una cepa no pigmentada de *Serratia* (Viñas y cols., 1996).

Su presunta carencia de patogenicidad (y su fácil reconocimiento a causa de la prodigiosina) llevó al ejército americano a bombardear San Francisco con *S. marcescens* para investigaciones epidemiológicas en la guerra bacteriológica (Stanier, 1980). Estas pruebas (conocidas 25 años después, cuando se levantó el secreto de estado) costaron uno de los primeros fallecimientos por *Serratia* conocidos en la literatura médica. Esta aparente falta de patogenicidad también llevó a la realización de numerosos experimentos de infección en humanos utilizando *S. marcescens* (Simberkoff, 1980). No obstante, la bacteria ha ido adquiriendo protagonismo en la microbiología clínica. *S. marcescens* es la única especie del género asociada con la patología humana. Se han descrito algunos casos de aislamientos clínicos de *S. liquefaciens* y *S. rubidea*, pero en ningún caso se ha podido relacionar directamente con la enfermedad (Grimont y Grimont, 1992).

En la mayoría de los casos descritos el origen de las infecciones producidas por *Serratia* es nosocomial y está asociada con la utilización de procedimientos invasivos en el paciente que facilitan las vías de entrada a los microorganismos: instalación de catéteres (Altemeier y cols., 1969), sondas urinarias (Maki y cols., 1973), aparatos de respiración artificial (Cabrera, 1969), operaciones quirúrgicas y otros (Stamm y cols., 1976). En general, todos aquellos procesos en los cuales se abren nuevas vías de entrada, saltándose las barreras de defensa natural del huésped. Normalmente infecta a individuos inmunosuprimidos o a neonatos, causando gran variedad de infecciones, tales como otitis media, infecciones del tracto urinario y respiratorio, meningitis, peritonitis, infecciones oculares, endocarditis y otros. Una de las características de mayor importancia en

clínica es la resistencia de *S. marcescens* a los antibióticos. La elevada frecuencia de aislamientos de cepas multirresistentes sugiere que pueden actuar como reservorio para otros microorganismos aislados de los medios hospitalarios (Boquete y cols., 1996).

En España, este microorganismo ha producido durante los últimos años un inusual elevado número de episodios en los centros de hospitalización, siguiendo en orden de importancia a los tres principales patógenos nosocomiales (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Boquete y cols., 1996).

Las características epidemiológicas a tener en cuenta son: (i) aparecen esporádicamente, los períodos de brote son de corta duración, (ii) en la mayoría de los casos la fuente de la infección proviene de catéteres, conductos de respiración artificial, etc.; (iii) generalmente, las infecciones producidas por *Serratia* afectan a un número relativamente bajo de pacientes y están limitadas a ciertas áreas definidas del hospital, (iv) se manifiestan frecuentemente como infecciones del tracto urinario y respiratorio.

Las infecciones causadas por *S. marcescens* se han agrupado en cinco modelos epidemiológicos:

1. Infecciones “endógenas” no epidémicas. Normalmente se trata de casos esporádicos, ocasionados por cepas muy diversas y en general sensibles a los antibióticos.
2. Infecciones causadas por una única cepa que infecta a varios pacientes (causante de brotes), que pueden ser debidos por cualquier especie de *Serratia*, incluidas las ambientales. El foco de la infección es muy variado, desde una máquina de respiración asistida a una solución antiséptica. En

este caso, la identificación de la fuente permite el control del brote. Las cepas de este origen suelen ser sensibles a los antibióticos.

3. Contagio paciente-paciente. Las cepas de *Serratia* involucradas en este modelo son cepas no pigmentadas, resistentes a una amplia gama de antibióticos y de unos biotipos determinados. El reservorio normalmente es el propio paciente infectado (generalmente afectado de alguna inmunosuficiencia), y la propagación entre los pacientes se realiza a través del personal médico (Maki y cols., 1973; Traub, 1972). La prevención de este modelo epidemiológico es muy difícil, pero podría disminuirse el riesgo de contagio extremando las medidas higiénicas y por la asignación al enfermo de enfermeras propias.

4. Colonización del tracto intestinal en los niños recién nacidos. Normalmente, estas infecciones las causan cepas de *S. marcescens* pigmentadas y sensibles a los antibióticos, que son colonizados a partir de una fuente común, por ejemplo, soluciones antisépticas utilizadas para limpiar al bebé.

5. Pseudoepidemias. De forma ocasional, se ha aislado en pacientes que no mostraban síntomas de presentar infección, en estos casos, se producía por la utilización de material contaminado por cepas ambientales.

### 1.3.2 FACTORES DE VIRULENCIA DE *SERRATIA*

La capacidad de un patógeno para causar una infección se basa en la presencia de factores o sistemas que le permitan: 1) Entrar dentro del huésped, 2) encontrar un único nicho dentro del huésped, 3) inactivar o evadir las defensas del huésped, 4) multiplicarse, 5) salir del huésped de forma que pueda garantizar su transmisión a un nuevo huésped (Falkow 1991). Con este fin, los microorganismos han desarrollado componentes estructurales y sistemas enzimáticos capaces de evadir e inactivar los sistemas de defensa de sus huéspedes.

La naturaleza de los factores de virulencia depende del lugar de acción del microorganismo. Así especies restringidas a una localización extracelular presentan determinantes que les permiten la adhesión a los tejidos y resistencia a la fagocitosis; mientras que los microorganismos que actúan como patógenos intracelulares poseen determinantes para promover su acceso a las células diana y para asegurar su supervivencia después de ser englobados por los fagocitos. Así pues, en la mayoría de los casos, las interacciones patógeno-huésped implican moléculas de superficie, por lo tanto un gran número de factores de virulencia están localizados en las envueltas bacterianas (Brubaker, 1985) y juegan un papel fundamental en la entrada del microorganismo al huésped, adhesión, colonización y resistencia a la acción del suero.

En diversos géneros Gram negativos relacionados con *Serratia* tales como *Escherichia coli* (Sansano y cols., 1985), *Klebsiella* (Tomás, 1986) se ha demostrado que las cadenas O inhiben la acción bactericida del suero. Se han estudiado diversos aspectos relacionados con el papel del lipopolisacárido (LPS) de *S. marcescens* como factor de virulencia. Los mutantes deficientes en antígeno O (AgO) presentan una gran sensibilidad al suero *versus* el tipo parental y la molécula de LPS activa el complemento por la vía alternativa y clásica (Palomar, 1994).

*S. marcescens* frecuentemente produce infecciones adquiridas como consecuencia del uso de prótesis o material quirúrgico supuestamente contaminado con la bacteria. La adherencia de la bacteria a estos instrumentos constituye un fenómeno crucial en la determinación del riesgo de infección por esta especie bacteriana. La eficiencia de adhesión ha sido estudiada por Palomar y cols. (1995) sobre superficies inertes (vidrio, plástico y sondas urinarias) y también sobre células uroepiteliales humanas, así como la hidrofobicidad de las bacterias con la molécula de LPS intacto y

las de LPS mutado. El estudio dio como resultado que los mutantes O<sup>-</sup> presentan niveles de hidrofobicidad superiores que las cepas parentales; las cuales se adhieren con mayor eficiencia sobre superficies de vidrio, sondas urinarias y a las células uroepiteliales que los correspondientes mutantes O<sup>-</sup>, sin embargo, las cepas O<sup>+</sup> se adherieron con una eficiencia menor a las superficies de poliestireno que las cepas O<sup>-</sup>.

Otro factor de virulencia es la presencia de fimbrias. Se han descrito cinco tipos en función de sus dimensiones, presencia o ausencia de canal central y por las propiedades aglutinantes (tipo 1, tipo 3, FGH MR/P, MR/P gruesa y MR/P fina). Cabe notar que sólo tres de estos tipos (1, 3, MR/P) fueron relacionadas con la adhesión a catéteres y células eucariotas (Grimont y Grimont, 1992). Estudios realizados con la cepa *S. marcescens* ATCC43821, aislado clínico productor de un pigmento amarillo, se observó la presencia de un nuevo tipo de fimbria que estaba relacionada con casos de uropatogénesis, denominada MR/T (manosa resistente gruesa) (Leranz y cols., 1996). También se ha observado que *S. marcescens* es capaz de sintetizar una sustancia surfactante, denominada "serrawettin" que ayuda a la colonización de superficies (Matsuyama y cols., 1985; Matsuyama y cols., 1986).

Cuando la bacteria infecta a un ser humano y produce enfermedad, el tratamiento consiste en el empleo de una batería de antimicrobianos; existe una fuerte presión selectiva para la adquisición y retención de plásmidos que confieren resistencia a estas moléculas, así pues no es de extrañar que muchas cepas de *Serratia* sean portadoras de plásmidos. La presencia de plásmidos en las cepas bacterianas es un factor asociado con la virulencia. Los plásmidos no sólo pueden codificar para resistencias a los antibióticos sino también para otros factores de virulencia tales como fimbrias o sistemas de captación de hierro.

Casi todas las cepas de *S. marcescens*, tanto clínicas como ambientales, tienen potentes sideróforos. Producen enterobactina (Reissbrodt y Rabsch 1988) pero raramente sintetizan aerobactina (Martínez y Col., 1987).

La producción de cápsula en *Serratia* no es un factor de virulencia relevante en este género, debido a que es muy poco corriente encontrar cepas de *Serratia* capsuladas (Grimont y Grimont 1992).

*S. marcescens* excreta al medio diferentes enzimas como quitinasas de gran interés biotecnológico como agente antifúngico natural (Monreal y Reese, 1969), proteasas, lipasas y nucleasas (Hines y cols., 1988).

*S. marcescens* produce dos metaloproteasas de 56 y 60 kDa y dos tiolproteasas de 73 kDa (Matsumoto y cols., 1984). Se ha demostrado que estas proteasas tienen un papel importante en el desarrollo de la neumonía y la queratitis experimentales (Lyerly y Kreger 1983). La acción de las proteasas puede causar, entre otros efectos, necrosis de la córnea (Kamoto y col., 1985), degradación de diferentes proteínas del suero (Molla y col., 1989) e inactivación de proteasas involucradas en la regulación de varios mecanismos en cascada ( sistema del complemento, respuesta inflamatoria, fibrinolisis ) ( Virca y cols., 1982).



## 1.4 LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

**M**orowitz subraya que en el medio acuoso en que surgió la vida era necesaria una barrera no acuosa para separar la célula de su entorno. "Ser una entidad distinguible del entorno requiere una barrera contra la libre difusión. La necesidad de aislar termodinámicamente un subsistema es una condición irreductible para la vida... es la clausura de una membrana bicapa y anfifílica en una vesícula lo que representa la transición discreta de la no vida a la vida" (Margullis, 1995) .

La membrana externa como la membrana citoplasmática está constituida por una doble capa lipídica que contiene fosfolípidos y proteínas, así como un lípido característico, lipopolisacárido (LPS), que recubre el delgado saco de peptidoglicano característico de las bacterias Gram negativas. La membrana externa posee un destacado papel en la fisiología de estas bacterias, forma el límite externo del periplasma, la región entre las dos membranas que contiene un elevado número de enzimas. Es una barrera entre el medio y el interior de la célula, los nutrientes y productos de desecho deben atravesar esta bicapa de fosfolípidos y lipopolisacárido, interacciona con moléculas, superficies, otras células y con el medio ambiente. Proporciona un fuerte carácter hidrofílico y carga negativa a la superficie celular lo que determina un importante factor en la capacidad de resistencia de la bacteria frente a determinados mecanismos de defensa del huésped, como la fagocitosis leucocitaria, cierta actividad frente al complemento y la acción de determinadas sustancias como la lisozima, y a una gama de antibióticos hidrofóbicos (novobiocina, rifampicina, etc). La distribución de los lípidos en la membrana externa es altamente asimétrica. El lipopolisacárido se encuentra exclusivamente en la capa más externa,

substituyendo los fosfolípidos de esta región de la membrana (Munford y Osborn, 1983) de manera que estos compuestos los encontramos únicamente en la capa interna (Figura 1.15).

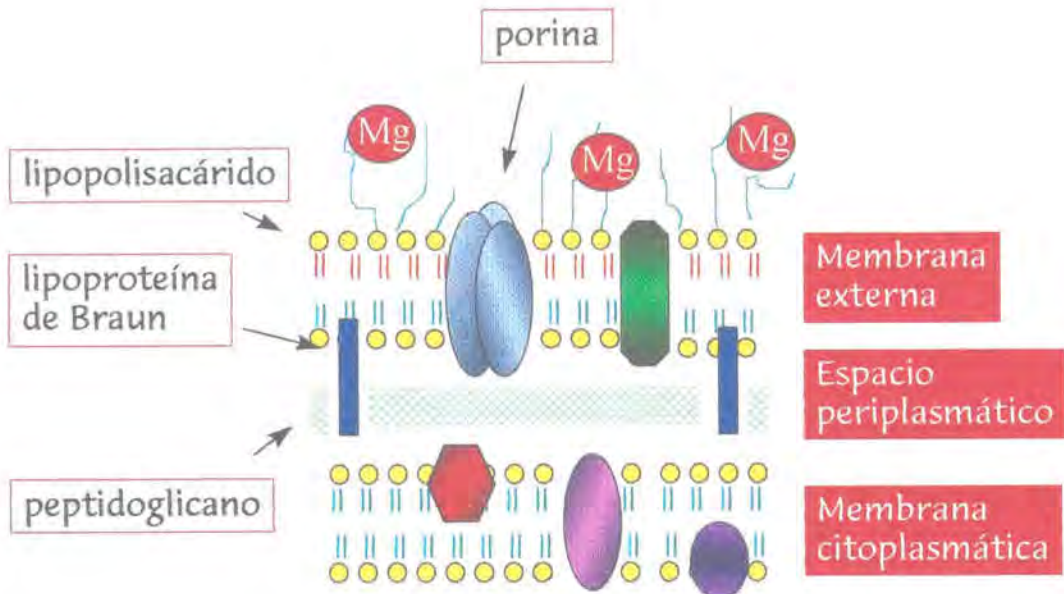


Fig. 1.15 Esquema de las envueltas celulares de una bacteria Gram negativa.

El lipopolisacárido, químicamente, es muy diferente de un fosfolípido, pero tiene propiedades físicas que son bastante similares, de modo que puede participar de forma análoga en la formación de una membrana. Un extremo de la molécula es hidrófobo y el otro hidrófilo, además es una molécula compleja que varía ampliamente en composición química, tanto dentro de un grupo dado como entre grupos diversos de bacterias Gram negativas. El LPS se compone de tres regiones distintas: el lípido A, la región central R (core) y la cadena lateral O.

El lípido A es la región hidrófoba de anclaje del LPS en la membrana y, en vez de tener los dos ácidos grasos típicos de un fosfolípido, la molécula tiene seis o siete unidos a un dímero fosforilado de glucosamida. Todos los ácidos grasos del lípido A son saturados. El lípido A se une a la región central R de oligosacárido: una cadena corta de azúcares que incluye dos azúcares poco frecuentes, el ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) y la heptosa. La región central R se une a su vez a la cadena lateral hidrófila O, compuesta también de azúcares, formada por muchas unidades repetidas de tetra- o pentasacáridos.

La interacción lateral entre las cadenas de lipopolisacárido es muy fuerte. La presencia de cationes divalentes neutralizan la repulsión electrostática entre las cargas negativas del núcleo. También existe en la membrana externa poliaminas que ayudan en esta función (Koski y Vaara, 1981). Esta fuerte interacción junto con la baja fluidez de sus ácidos grasos saturados contribuye a la baja permeabilidad de la monocapa de lipopolisacárido a las moléculas hidrofóbicas (Nikaido y Vaara, 1985).

Las proteínas mayoritarias de la membrana externa incluyen la proteína OmpA, la lipoproteína de Braun y las proteínas de transporte (porinas inespecíficas, poros específicos y sistemas de transporte de alta afinidad).

La proteína OmpA, presenta una estructura proteica rica en láminas  $\beta$  que parece estar organizada en monómeros (Ueki, 1970) y asociada a la lipoproteína (Palva, 1979). Sirve como receptores de fagos y colicinas. Cepas defectivas en OmpA conducen a membranas externas inestables y deficientes en algunas funciones de conjugación (Manning y Achtman, 1979).

Cuando esta proteína se calienta a 100 °C en presencia de detergentes aniónicos como el SDS, ésta presenta un cambio de conformación característico. Esta modificación por calor aumenta el peso molecular aparente de la proteína de 28 a 35 kDa (*Escherichia coli*). El aumento de la temperatura provoca el desdoblamiento del polipéptido, de tal manera que su paso a través de la matriz de acrilamida se ve dificultada (Schnaimant, 1973). Este comportamiento la diferencia de las porinas de *E. coli* las cuales forman oligómeros resistentes al SDS.

La capacidad formadora de poro de esta proteína no se ha demostrado todavía. Mientras que algunos autores defienden la idea de una difusión de pequeños solutos a través de la OmpA (Sugawara y Nikaido, 1992), otros no creen que esta proteína monomérica sea capaz de actuar como un poro en la membrana externa.

La lipoproteína de Braun es una proteína pequeña (7200Da) que está en un alto número de copias por célula ( $7 \times 10^5$ ), aproximadamente 1/3 están unidas de manera covalente al peptidoglicano, mientras que el resto se encuentra como proteína libre (Inouye y cols., 1972). Los mutantes de lipoproteína son viables, pero la estructura de la pared parece ser inestable y provoca la liberación de vesículas de membrana externa y enzimas periplasmáticos (Hirota, y cols., 1977). Su función principal sería la de estabilizar la estructura del complejo membrana externa-peptidoglicano.

Las porinas son canales de difusión de sustancias hidrofílicas. A pesar de ser inespecíficos, la tasa de penetración está influida por las propiedades fisicoquímicas de las mismas así como por el diámetro de poro. Solutos grandes, hidrofóbicos y cargados negativamente tienden a difundir lentamente. En *E. coli*, se ha descrito la regulación recíproca por osmolaridad del medio entre la proteína de membrana externa OmpC y la

OmpF, de tal manera que el número total de estas proteínas se mantiene constante durante la respuesta adaptativa. La expresión de los genes de las porinas también está afectada por otros mecanismos de regulación transcripcional menos específicos como cambios en la temperatura o fuente de carbono; además también hay regulación post-transcripcional, en la traducción y en la inserción de las proteínas en la membrana (Mizuno y cols., 1984).

Otras porinas son inducidas cuando la bacteria crece en condiciones especiales, por ejemplo una limitación de fosfatos conduce a la producción de una proteína anión-selectiva, PhoE en *E. coli* (Van Der Ley, 1987).

La velocidad de difusión de los compuestos a través de los canales inespecíficos (porinas) se ve afectada por las propiedades fisicoquímicas del soluto. Los tres factores principales que afectan a la permeabilidad son el tamaño, hidrofobicidad y la carga eléctrica de la molécula (Nikaido y Vaara, 1985).

#### 1.4.1 LAS PROTÉINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Serratia marcescens*.

A diferencia de *E. coli*, las porinas de *S. marcescens* no han sido bien caracterizadas. En geles de electroforesis SDS-PAGE, se han observado de 1 a 3 porinas con pesos aparentes cercanos a 40 KDa. Malouin y cols., (1990) describieron una única porina de 41 KDa, la caracterización funcional de ésta se realizó mediante "el planar lipid membrane system" obteniéndose un diámetro de poro estimado de 1.1 nm, un valor de conductancia de 1.6 nS, intermedio entre los obtenidos en *E. coli* K-12 de 1.5 y 1.9 nS para la OmpC y OmpF, respectivamente.

En otros estudios han revelado la presencia de 3 porinas mayoritarias (Hazishume y cols., 1993; Puig y cols., 1993); en un tercero, se han identificado dos (Sawai y cols., 1987; Hutsul y Worobe., 1994; Hutsul y Worobe, 1997).

Se ha evidenciado que las porinas de *S. marcescens* en función de las condiciones ambientales, pueden presentar un comportamiento de regulación de la expresión similar al observado con la OmpF y OmpC de *E. coli*. (Puig y cols., 1993; Hutsul y Worobe, 1997).

## 1.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La aparición de microorganismos resistentes se debe a períodos de variación genética seguida de la selección de los mejor adaptados al nuevo ambiente. El descubrimiento de los antibióticos fue una de las grandes revoluciones de la medicina de este siglo. Su introducción en clínica a finales de los años 1940 permitió vencer infecciones que antes eran mortales como las neumonías, meningitis... Sin embargo, 50 años más tarde, el desarrollo y diseminación de cepas multirresistentes constituye un serio problema de salud pública, en el cual la eficacia del tratamiento con antibióticos puede verse anulada.

Las bacterias han estado presentes en nuestro planeta desde hace  $3.5 \times 10^9$  años. Durante este tiempo, la población microbiana ha sobrevivido algunas catástrofes, tales como la acumulación de oxígeno en la atmósfera. Sin embargo, la catástrofe más reciente (desde el punto de vista de nuestro conocimiento) ha sido la exposición de los microbios a una variedad de productos químicos sintetizados por el hombre: residuos industriales, insecticidas, herbicidas y la introducción de los antibióticos (Davies, 1996).

El descubrimiento de los antibióticos fue una de las grandes revoluciones de la medicina de este siglo. Su introducción en el tratamiento clínico a finales de los años 1940 permitió vencer infecciones que antes eran mortales (neumonías, meningitis, sífilis, tuberculosis...). Cincuenta años más tarde, el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos adquiere unas dimensiones tales que lo convierten en una amenaza para la salud pública. La aparición y diseminación de bacterias multiresistentes es un serio problema en el cual la eficacia del tratamiento con antibióticos puede verse disminuida e incluso en algunos casos anulada. Los agentes antibacterianos, además de destruir organismos competidores, proporcionan una ventaja selectiva a los microorganismos resistentes para

causar enfermedad y persistir en el hospedador durante largos períodos de tiempo o propagarse y conducir a un aumento en la incidencia de una enfermedad.

Se denomina resistencia a la sensibilidad disminuida o nula de una cepa bacteriana a un antimicrobiano, o de forma práctica, cuando su desarrollo solamente se inhibe con concentraciones superiores a las que ese antibiótico puede alcanzar en el lugar de la infección (García y García, 1997). La resistencia es uno de los factores responsables de los cambios en los agentes etiológicos que han existido en las infecciones, especialmente a nivel nosocomial, tras la introducción de la terapia antimicrobiana. Las cepas resistentes se hacen predominantes gracias a la presión selectiva de estas sustancias que hacen desaparecer las bacterias sensibles. En su aparición y selección no sólo están implicados los antimicrobianos usados en medicina, sino también los empleados en veterinaria (con fines profilácticos, terapéuticos y de engorde) (Figura 1.16).

Después de la observación de la figura 1.16 se concluye que la consecuencia del abuso de antimicrobianos es la aparición de resistencias en bacterias de interés veterinario, que pueden jugar un papel en la transferencia de resistencias a bacterias de interés humano y en términos generales, a una selección de poblaciones bacterianas resistentes a los antibióticos. Los hospitales, la comunidad humana o los animales no son "ecosistemas" separados sino que se dan amplias oportunidades para el intercambio de genes de resistencia (Piddock, 1995; Johnson, 1997; Chadwick y Goode, 1997).



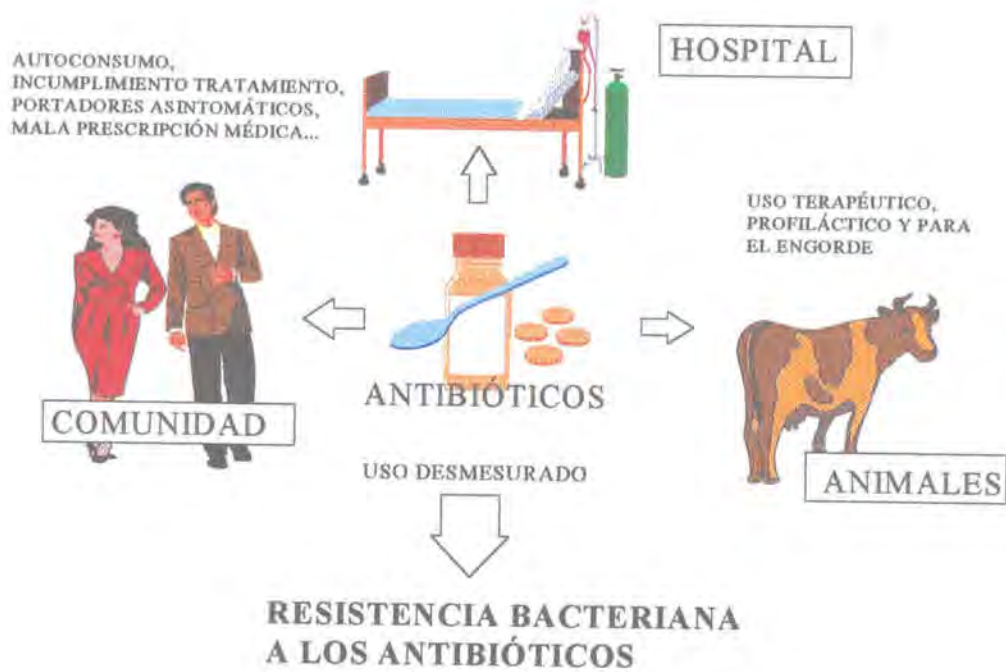


Fig. 1.16 Factores que determinan la aparición de microorganismos resistentes.

Ciertas características microbianas pueden afectar la frecuencia de resistencia aumentando la capacidad del microorganismo a aparecer, persistir o ser transmitido. Tales características incluyen la facilidad de intercambio de material genético, posesión de una resistencia intrínseca, supervivencia variando las condiciones ambientales, ocupación de ciertos nichos ecológicos y su capacidad de colonizar e infectar a un individuo (Cohen, 1992).

La causa última de la resistencia adquirida es la modificación en la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por fenómenos de transferencia genética.

Los intercambios genéticos pueden tener lugar de "madre a hijo" (transferencia vertical) o entre bacterias filogenéticamente distintas o de la misma especie, que coexisten dentro del mismo nicho ecológico (transferencia horizontal). Son varios los mecanismos naturales que permiten la transferencia de genes entre bacterias (Miller, 1998):

a) La transformación, corresponde a la adquisición directa por parte de las bacterias de fragmentos de DNA presentes en su entorno. El DNA libre puede estabilizarse asociándose a componentes del suelo y ese DNA puede incorporarse a células competentes. La transformación natural parece ocurrir sólo entre células del mismo género; no abundan las especies bacterianas capaces de devenir competentes para la transformación (p.e *Haemophilus*, *Neisseria* en Gram negativos y *Bacillus* o *Streptococcus* en bacterias Gram positivas). Algunos mecanismos pueden limitar el intercambio cromosómico de DNA entre grupos relacionados: presencia de enzimas de restricción, sistemas de reparación que reconocen y evitan los heterodúplex de DNA que contienen errores, etc. El DNA es atrapado e introducido por un complejo proteico capaz de unirse al DNA presente en la superficie de la bacteria. Durante el proceso de captación, ciertas enzimas degradan una de las dos cadenas de la molécula de DNA, mientras que la otra puede integrarse en el cromosoma de la bacteria.

b) La transducción. En la transducción los bacteriófagos (virus que infectan a bacterias) capturan material genético de una célula bacteriana y lo introducen en otra. El ciclo lítico de los bacteriófagos comienza cuando éstos se unen a las bacterias y les inyectan su DNA. Este DNA sirve de molde para fabricar más copias del bacteriófago, y acaba lisando la bacteria infectada y liberándose al exterior donde podrán infectar a otras bacterias. A veces sin embargo, la infección de una bacteria por un bacteriófago no conduce a la lisis bacteriana, sino que el ácido nucleico

del virus se incorpora al cromosoma bacteriano de tal forma que sólo se expresan algunos genes víricos. A este ciclo se le denomina lisogénico. Tanto en el ciclo lítico como en el lisogénico algunas partículas víricas hijas pueden incorporar genes bacterianos, que en un ciclo posterior pueden ser introducidos en otro microorganismo.

c) La conjugación, en las bacterias Gram negativas el material genético se transfiere del donador al receptor a través de un apéndice denominado pili, de tal manera que no pasa por el medio de suspensión y depende del contacto directo entre dos células; ocurre aun en presencia de DNAasa en el medio. En los Gram positivos la conjugación no está mediada por pilis, sino que antes de la conjugación, la aspirante a recibir nuevos genes secreta substancias que estimulan la síntesis de factores aglutinantes por parte de las donadoras; estas proteínas poseen la capacidad de agregar unas bacterias a otras. Una vez que las bacterias se asocian se forman los poros necesarios para la transferencia del DNA.

Las mutaciones cromosómicas se producen por mutación de genes del DNA del cromosoma bacteriano. Es un fenómeno poco frecuente, que se transmite por herencia y ocurre de forma espontánea y es persistente. Puede aparecer en una generación (resistencia en un solo paso) cuando una bacteria que inicialmente era sensible a un antibiótico pasa a ser resistente en la generación siguiente, o bien en varias generaciones (resistencia "escalonada") cuando la disminución de la sensibilidad se va produciendo a medida que van apareciendo nuevas generaciones, hasta que llega un momento en que la bacteria es resistente. (García y García, 1997).

En el ambiente existe un "pool" de genes de resistencia a antibióticos (o genes relacionados funcionalmente) los cuales pueden ser adquiridos por microbios antibiótico-sensibles cuando éstos estén sometidos a presión por

el uso de los mismos. El agente antibacteriano no provoca la aparición de resistencia en la bacteria, sino que selecciona las cepas en principio resistentes. La característica biológica de la resistencia o está ausente en la población o está presente en baja frecuencia hasta que el ambiente cambia y entonces resultan súbitamente adaptativos, momento en el que su frecuencia aumenta gradualmente bajo el influjo de la selección natural, convirtiéndose en el tipo genético dominante (Davies, 1995).

Pese a la infinita variabilidad tanto de géneros/especies como de agentes antibacterianos comercializados, es remarcable señalar que la resistencia a dichos compuestos se alcanza por un número relativamente bajo de mecanismos, los cuales pueden englobarse en tres grupos (Hayes y Wolf, 1990; Spratt, 1994; Nikaido, 1994):

- (1) Modificación o destrucción de la sustancia enzimáticamente
- (2) Alteración de la diana
- (3) Prevención del acceso del antibiótico a su diana: Modificación de la permeabilidad y/o reflujo

Debemos hacer hincapié en que los mecanismos anteriormente citados no son excluyentes, sino que pueden estar presentes varios a la vez y actuar de forma sinérgica, para alcanzar niveles significativos de resistencia clínica (Figura 1.17).

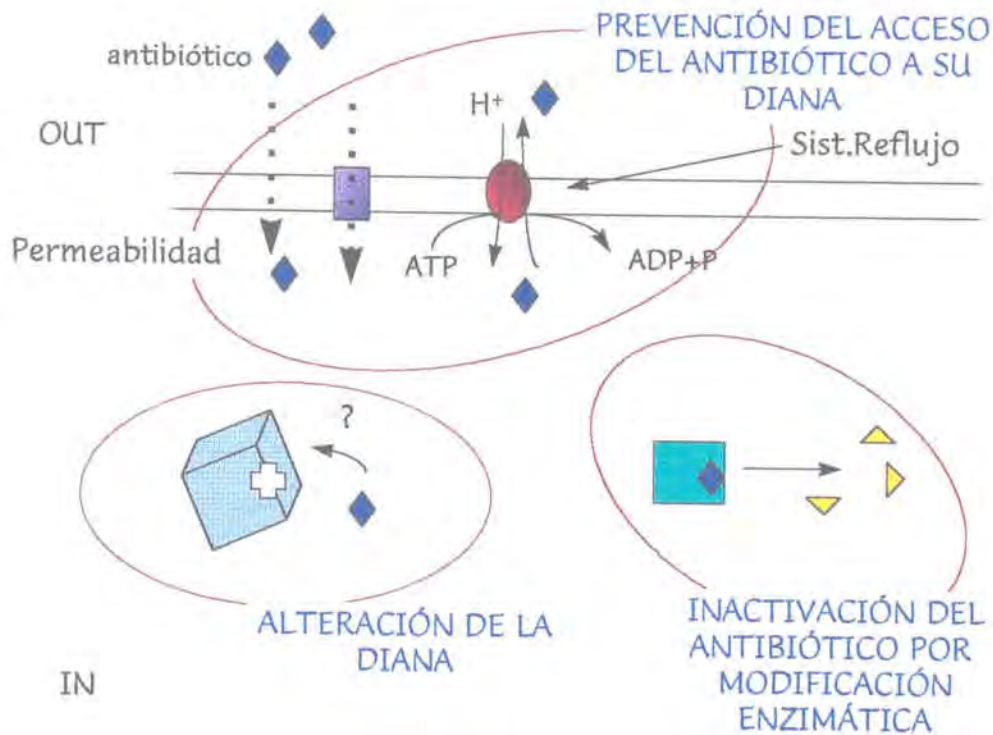


Fig. 1.17 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

### 1.5.1 TIPOS DE RESISTENCIA EN LAS QUINOLONAS

La resistencia a las quinolonas está mediada cromosómicamente y se adquiere por mutaciones en varios genes que gobiernan la DNA-girasa, la topoisomerasa IV, la permeabilidad y/o el reflujo activo del antibiótico. La frecuencia de aislamiento de mutantes es baja, entre  $10^6$  a  $10^{11}$ , dependiendo de la especie bacteriana, del compuesto y de su concentración (Wolfson y Hooper, 1989a; Goldstein y Acar, 1995).

En la tabla 1.2, se esquematiza las resistencias que pueden tener lugar en las quinolonas, que en apartados posteriores serán tratadas con mayor detalle.

Tabla 1.2. Mecanismos de resistencia en las quinolonas (Hooper y Wolfson, 1989b).

| Tipo                        | Genes  | Características   |
|-----------------------------|--|---|
| Alteración de la DNA-girasa | <i>gyrA</i> →  | Resistencia solo a quinolonas   |
|                             | <i>gyrB</i> : nal C, nal D →                             | Resistencia al Na y otras quinolonas (nal D), hipersusceptibilidad a nuevas quinolonas (nal C)  |
| Alteración Topoisomerasa IV | <i>parC</i> o <i>parE</i> →                              | Resistencia a las quinolonas  |
| Disminución permeabilidad   | <i>nfxB</i> , <i>cfxB</i> , <i>nor B</i> , <i>norC</i> → | Resistencia a quinolonas y agentes no relacionados estructuralmente, disminución de la acumulación por disminución de una OMP ( <i>nfxB</i> , <i>cfxB</i> ), alteración del lipopolisacárido ( <i>nor C</i> ) |
|                             | <i>marA</i> →  | Resistencia a quinolonas y agentes no relacionados estructuralmente   |

### 1.5.1.1. ALTERACIÓN DE LA DIANA

Las quinolonas actúan inhibiendo la enzima DNA-girasa, implicada en la replicación del DNA. Se ha propuesto un modelo cooperativo de unión de la quinolona al DNA para la inhibición de la DNA-girasa con la formación de un complejo ternario (DNA-quinolona-DNAgirasa). La afinidad y especificidad de la unión viene determinada por la conformación de la hebra de DNA inducida por el enzima (Shen y cols., 1989).

Las moléculas de quinolona se unen a los hidrógenos de las bases desapareadas inducido por la propia DNA-girasa durante la apertura y superenrollamiento del DNA. La subunidad A de la DNA-girasa forma enlaces covalentes entre Tyr-122 (centro activo) y el extremo 5' de la cadena de DNA.

Después de la unión de la quinolona al DNA, nuevas moléculas se unen no sólo a través de nuevos puentes de hidrógeno sino por interacciones con moléculas de antibiótico vecinas. La unión inicial de la droga puede crear un cambio conformacional en el DNA, permitiendo la unión de moléculas de quinolona hasta la saturación.

Cualquier mutación que afecte la configuración de la DNA-girasa que pueda bloquear o disminuir la unión de la quinolona a la hebra de DNA es capaz de conferir resistencia al agente antibacteriano.

La resistencia a las quinolonas puede ser causada por mutaciones tanto en los genes que codifican para la subunidad A de la DNA-girasa (*gyrA*) como en los de la subunidad B (*gyrB*). Mientras que sólo dos mutaciones diferentes en *gyrB* ha sido asociada con bajos niveles de resistencia en *E. coli* (Yamagashi y cols.,1981; Yamagashi y cols., 1986), algunas mutaciones puntuales en *gyrA* causan elevada resistencia. Estas mutaciones se sitúan en una región conservada entre los residuos de Ala-67 y Gln-106 de la proteína GyrA de *E. coli*. Esta región se denomina QRDR (*quinolone resistance determining region*) (Yoshida y cols., 1990). Todas estas mutaciones son el resultado de un cambio en algún aminoácido dentro de una pequeña región cerca del extremo N-terminal de la subunidad A próxima a la Tyr-122 (Hooper y Wolfson , 1993a). El lugar de la alteración puede tener especial importancia para inducir resistencia a quinolonas. Las alteraciones de los aminoácidos 83, 87, 81, 84, 67 y 106, conducen a niveles de resistencia en

orden decreciente de concentración mínima inhibitoria (MICs); siendo la sustitución de la Ser-83 de la subunidad A salvaje (*wild type*) por una Leu-83 o Trp-83 el de mayor resistencia, probablemente debido a un cambio conformacional de la subunidad A. Este cambio introduce un grupo hidrofóbico lo que podría interferir la unión de la quinolona. El grupo OH de la serina, podría participar en la formación de un enlace con el hidrógeno o bien con algún ligando metálico esencial para la acción de la quinolona.

La Ser-83 parece jugar un papel importante porque además de estar conservada en la DNA-girasa de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*; su sustitución conduce a mutantes de elevada resistencia a las quinolonas (Oram y Fisher, 1991). El cambio de la Ser-83 por una Ala, también provoca resistencia, este resultado sugiere que la pérdida del grupo hidroxilo *per se*, es responsable del fenotipo resistente.

La sustitución de la Gln-106 por una Arg o una His, induce un nivel de resistencia comparable al cambio de la Ser-83, así pues, el nivel de resistencia depende del aminoácido substituido. Ambas mutaciones en Gln-106 introducen residuos cargados positivamente, de tal manera que la sustitución de un grupo polar por uno con carga positiva desestabiliza la interacción de la quinolona con la DNA-girasa.

La región de la proteína entre los aminoácidos 67-106, puede constituir un sitio de interacción con las quinolonas. Ser-83, Asp-87 y Gln-106 son aminoácidos hidrofílicos, lo que confirma la idea de que están implicados en algún tipo de interacción con las moléculas de quinolona.

En la figura 1.18, se muestra un fragmento de la estructura tridimensional de la GyrA, y los puntos de mutación.



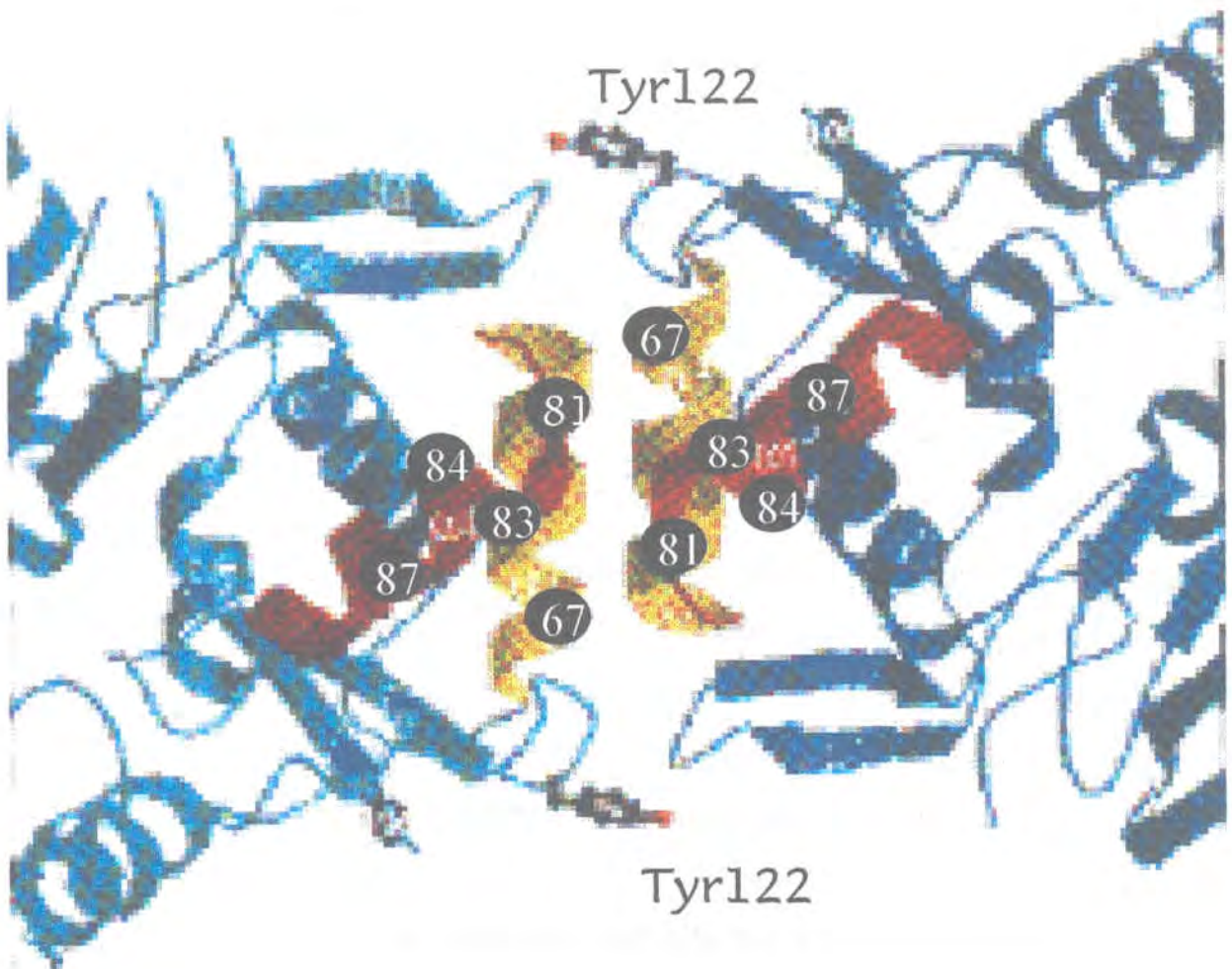


Fig. 1.18. Estructura tridimensional del fragmento QRDR de la GyrA y los lugares de mutación (Joao y cols., 1997).

Las mutaciones en la subunidad B de la DNA girasa también están asociadas con la resistencia a las quinolonas, sin embargo la frecuencia de mutación en *gyrB* en los aislados clínicos es mucho menor en comparación con la frecuencia de aislamientos por mutación en *gyrA*. El por qué las mutaciones de aislados clínicos mayoritariamente son debidas a alteraciones en la *gyrA* podría deberse a que éstas son más resistentes que los mutantes

en *gyrB* y por lo tanto, presentarían una ventaja selectiva (Nakamura y cols., 1989).

Recientemente, se ha visto que las quinolonas podrían tener otra diana, la topoisomerasa IV, con la estructura  $A_2B_2$ , codificadas por los genes *parC* y *parE*. En *E. coli* no se detectan mutaciones en *parC/parE* sin la presencia concomitante de alguna mutación en *gyrA*, lo que sugiere que la topoisomerasa IV sería una diana secundaria (Vila y cols., 1994; Ouabdesselam y cols., 1996; Vila y cols., 1996; Jalal y Wetland, 1998). Sin embargo, en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* se han encontrado mutaciones en la topoisomerasa IV (*grlA* equivalente a *parC*) que confieren niveles tanto altos como bajos de resistencia a las quinolonas sin la necesidad previa de una mutación en la *gyrA*, lo que sugiere que la topoisomerasa IV podría ser la primera diana de las fluoroquinolonas en estos géneros (Ferrero y cols., 1994 Pan y cols., 1996; Fukuda y cols., 1998).

#### 1.5.1.2 PREVENCIÓN DEL ACCESO DEL ANTIBIÓTICO A SU DIANA

##### 1.5.1.2a. DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD

Para alcanzar su diana intracelular, las quinolonas deben pasar a través de las envueltas celulares, en el caso de los Gram negativos, la membrana externa y la membrana interna o citoplasmática. Las quinolonas difieren en su hidrofobicidad, lo que puede afectar la interacción de la quinolona con ambas membranas (Chapman y Georgopapadaku, 1988). La contribución de la captación de quinolona a través de las proteínas de la membrana externa de *E. coli* se ha demostrado utilizando mutantes deficientes en alguna de las porinas (Hooper y cols., 1989; Piddock y cols., 1991); aquellos mutantes carentes de OmpF son más resistentes a las quinolonas que los mutantes deficientes en OmpC y OmpA, los cuales son susceptibles de modo

similar a aquellas que expresan estas dos porinas (Cohen y cols., 1989; Gutman y cols., 1985).

Hirai y cols 1986b, observaron que la MIC a quinolonas disminuía en mutantes con lipopolisacárido defectuoso (“rough”) comparado con la cepa parental salvaje; el grado de disminución está correlacionado con la hidrofobicidad de la quinolona. El LPS constituye una barrera de permeabilidad para aquellas quinolonas hidrofóbicas, cuyo coeficiente de partición en octanol/agua es superior a 2.0, tales como el ácido nalidíxico o el ácido oxolínico. Sin embargo, la entrada de quinolonas hidrofílicas con coeficiente de partición inferior a 1 (ciprofloxacino, norfloxacino) se ven poco afectadas por la modificación de la estructura del LPS.

Una clase de mutantes de *E. coli* seleccionados por su resistencia a las quinolonas hidrofílicas y distintas a la conferida por las mutaciones en GyrA o GyrB, puede ser debida en parte a una disminución de la permeabilidad a través de la OmpF. Estas mutaciones designadas como *nfxB* (Hooper y cols., 1989), *norB* (Hirai y cols., 1986a), *norC*, *nfxC* y *cfxB* (Hooper y cols., 1992); son genéticamente distintas a mutaciones del gen *ompF* y confieren: (i) resistencia pleiotrópica a las quinolonas y otros antibióticos no relacionados como la tetraciclina y el cloranfenicol; (ii) substancial disminución de la OmpF y (iii) reducida acumulación de quinolona.

Los mutantes de *E. coli marA* seleccionados con tetraciclina y cloranfenicol y los mutantes *soxQ* seleccionados para la resistencia a la naftoquinona menadiona también expresan resistencia a las quinolonas y presentan una reducción de la expresión de la OmpF (Cohen y cols., 1988; Cohen y cols., 1989; Greenberg y Demple., 1989; Greenberg y cols., 1991).

La secuencia de aminoácidos de MarA es homóloga a otras proteínas de *E.coli* que actuarían como reguladores transcripcionales positivos, lo que sugiere que MarA podría actuar directamente aumentando la transcripción de *micF* y reducir la traducción de *ompF* (Anderson y Delihias, 1990; Cohen y cols., 1993). La expresión de *micF* reduce la traducción de *ompF* probablemente por desestabilización de la unión del mRNA de *ompF* con el ribosoma.

#### 1.5.1.2b. SISTEMAS DE REFLUJO EN BACTERIAS

Las bacterias Gram negativas generalmente son más resistentes a un elevado número de compuestos lipofílicos y anfifílicos que las bacterias Gram positivas; tales sustancias incluyen colorantes, detergentes, ácidos grasos libres, antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos.

La membrana externa de las bacterias Gram negativas contribuye a esta resistencia intrínseca actuando como una eficiente barrera de permeabilidad, debido a la baja fluidez del lipopolisacárido frente a las moléculas lipófilas y al paso de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño a través de las porinas. Sin embargo, para la existencia de niveles significativos de resistencia clínica se requiere, además de la membrana externa, de otro/s mecanismos que actúen de forma sinérgica. El conocimiento de la contribución de la resistencia debida al reflujo comienza cuando Levy y colaboradores demostraron que la resistencia en *E. coli* a la tetraciclina estaba codificada plasmídicamente y era debida al reflujo de antibiótico energía dependiente (McMurry y cols., 1980; George y Levy, 1983). Desde entonces, el número de especies bacterianas en las que se han identificado sistemas de reflujo ha ido aumentando y, se reconoce que estas proteínas de reflujo activo de amplio rango de especificidad, son frecuentes en bacterias del tipo salvaje, y que contribuyen significativamente a la resistencia

intrínseca de especies como *Pseudomonas aeruginosa* (Nakae, 1997). También se han encontrado bombas de reflujo en organismos generalmente susceptibles a agentes antimicrobianos comunes, como es el caso de *E. coli* (Ma y cols., 1995), *Bacillus subtilis* (Neyfakh y cols., 1991) o *Campylobacter jejuni* (Charvalos y cols., 1995). Estos sistemas bombean antibióticos, colorantes y detergentes hacia fuera de la célula utilizando la fuerza protón-motriz, lo que sugiere que actúa como *antiporte* sustancia/H<sup>+</sup> (Ma y col., 1994; Nikaido, 1994; Paulsen y cols., 1996).

Las MDR (*multidrug resistance pumps*) serían translocasas que tendrían la capacidad de extruir una gran variedad de sustancias, proporcionando una defensa simple contra cualquier tóxico presente en el medio (Lewis, 1994). En la Tabla 1.3 se esquematiza las diferentes familias de MDR.

En las bacterias Gram negativas se requiere un sistema de reflujo que sea capaz de transportar moléculas a través de ambas membranas. Si solamente cruza la membrana citoplasmática acumulándose en el periplasma, podrían de nuevo entrar; siendo un sistema inútil y costoso para la célula, porque en la mayoría de los casos es un sistema dependiente de la fuerza protón-motriz. Así pues, deben estar presentes otras proteínas accesorias (MFP, *membrane fusion proteins*) que unen la membrana interna con la externa, así como una proteína de membrana externa para asegurar el eficiente reflujo de moléculas hacia el medio externo. Sin embargo, en algunos sistemas de reflujo se desconocen todavía la identidad de estas proteínas MFP y la proteína de membrana externa. En los Gram positivos, el reflujo de moléculas puede estar asegurado simplemente con el transporte a través de la membrana citoplasmática (Marshall y Piddock, 1997) (Figura 1.19).

Tabla 1.3. Clasificación de las diferentes familias de MDR (Lewis, 1994)

|                          | MF (major facilitator)   | Smr ( <i>Staphylococcus multidrug resistance</i> )                            | RND (resistance nodulation, division)                                   | MFP (membrane fusion proteins)                                 | ABC (ATP-binding cassette)  |
|--------------------------|--|---|---|--|---|
| Propiedades              | antiporte<br>substancia/H <sup>+</sup> y<br>translocasas<br>específicas  | antiporte<br>substancia/H <sup>+</sup>  | antiporte?<br>substancia/H <sup>+</sup>                                 | proteínas auxiliares<br>que unen<br>translocasas               | MDRs (eucariotas<br>, translocasas<br>específicas<br>(procariotas)<br>12 hélices<br>transmembrana |
| Topología en la membrana | 12-14 hélices<br>transmembrana   | 4 hélices<br>transmembrana  | 12 hélices<br>transmembrana   | 1 hélice<br>transmembrana de<br>localización<br>periplasmática |   |
| Distribución             | Gram positivos y<br>Gram negativos   | Gram positivos y<br>Gram negativos  | Gram negativos.<br>Reflujo de<br>metales en la<br>misma familia         | Gram negativos   | Procariotas y<br>eucariotas   |
| Familias (localización)  | QacA <i>S.aureus</i><br>QacB <i>S.aureus</i><br>EmrB <i>E.coli</i><br>Emr <i>E.coli</i><br>BcrE <i>E.coli</i><br>Bmr <i>B.subtilis</i><br>NorA <i>S.aureus</i> | Smr <i>S.aureus</i><br>EmrE/MvrC <i>E.coli</i><br>QacE diferentes<br>especies | AcrB <i>E.coli</i><br>AcrE <i>E.coli</i><br>MexB<br><i>P.aeruginosa</i> | EmrA<br>AcrA<br>AcrF<br>Mex (mexAB, OprK)                      | P-glicoproteína<br><i>H.sapiens</i><br>PFMDR1<br><i>P.falciparum</i>                              |

## GRAM POSITIVOS

## GRAM NEGATIVOS

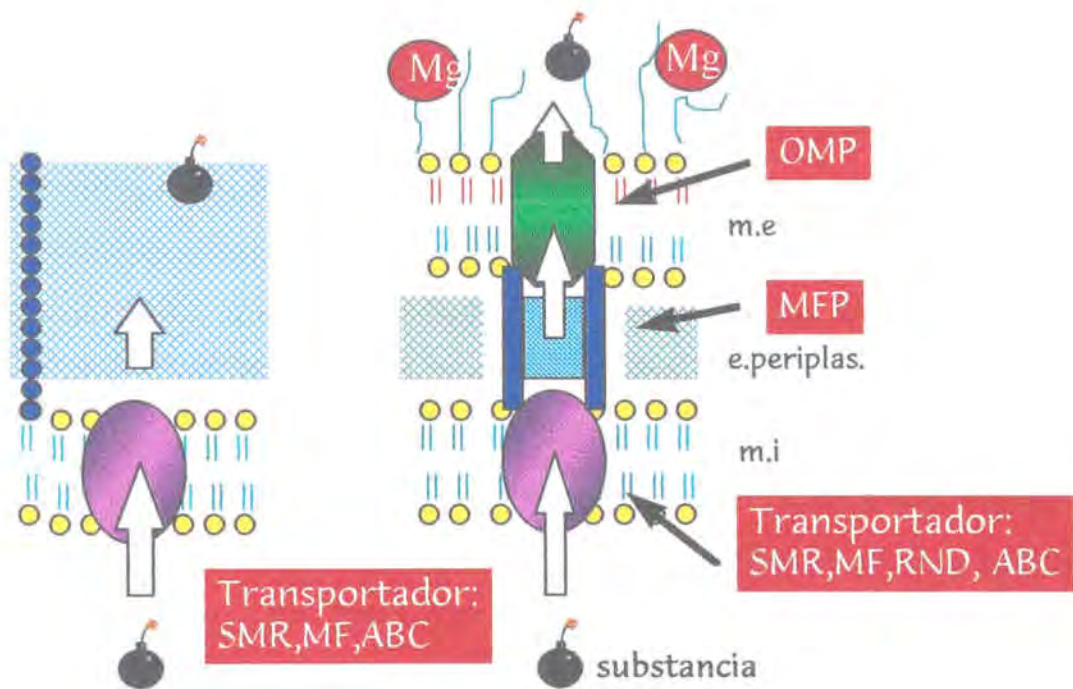


Fig. 1.19 Modelo de los sistemas de reflujo en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las flechas indican el sentido de salida del sustrato de la bomba de reflujo. m.e (membrana externa); m.i (membrana interna).

Los mecanismos de reflujo más estudiados son el sistema *acr* de *E. coli* (Ma y cols., 1995) y el sistema *mex* de *P. aeruginosa* (Köhler y cols., 1997). En *E. coli*, mutaciones en el locus *acr* aumentan la susceptibilidad a un amplio espectro de inhibidores, tales como colorantes básicos, detergentes y antibióticos hidrofóbicos (Ma y col., 1993; Ma y col., 1995); mientras que en *P. aeruginosa* la inactivación de cualquier de los componentes del sistema *mexA-mexB-OprM* deja a este microorganismo extremadamente susceptible a la tetraciclina, al norfloxacin y al cloranfenicol (Li y col., 1995; Poole y col., 1993).

La amplia variedad de sustratos bombeados hace difícil determinar cuales son las características estructurales comunes; generalizando se puede decir que corresponden a compuestos con un dominio lipofílico, mayoritariamente no cargados a pH fisiológico (Lewis y cols., 1997).

El posible mecanismo de acción de estas bombas sería la captura de los sustratos cuando éstos o bien se situarían en la membrana citoplasmática por la cara externa, antes de atravesarla, o bien una vez en el citoplasma se volverían a unir a la membrana citoplasmática. En cualquier caso, es necesario que el dominio hidrofóbico del sustrato se inserte en la membrana (Nikaido, 1996) (Figura 1.20).

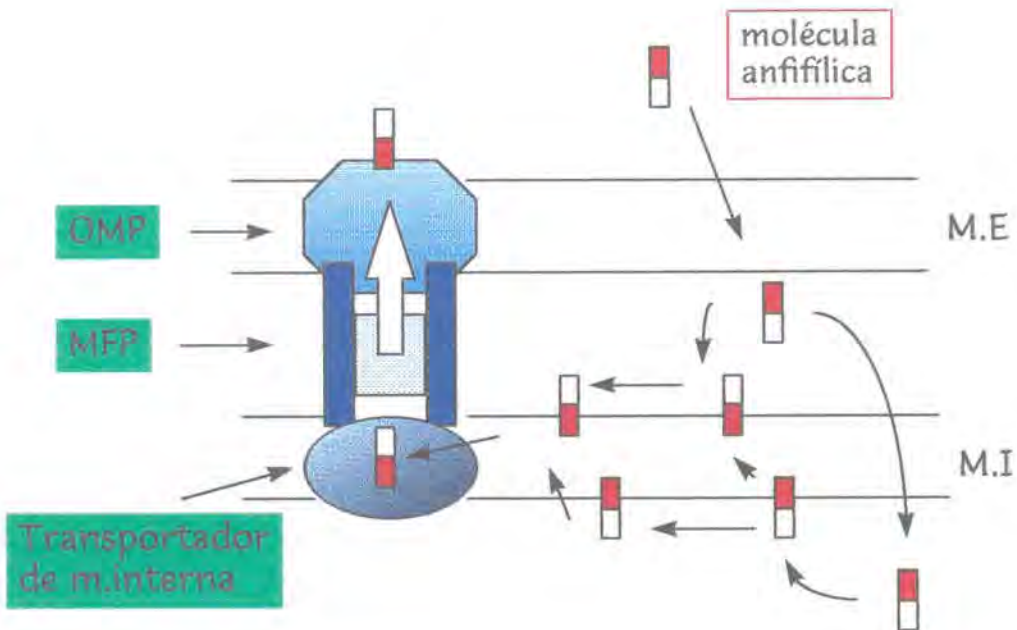


Fig. 1.20 Estructura y mecanismo propuesto de un sistema de reflujos en bacterias Gram-negativas (Nikaido, 1998).



Es poco probable que una baja permeabilidad de la membrana externa produzca por sí sola niveles significativos de resistencia, en muchos casos, el sistema de reflujo activo podría ser el segundo factor que contribuiría a esta resistencia. Sin embargo, esto no significa que la barrera de permeabilidad no sea importante ya que como puede observarse en la Figura 1.21, la concentración intracelular de cualquier agente es el resultado de un equilibrio entre el influjo y el reflujo. La entrada lenta de los agentes antimicrobianos a través de la membrana externa hace del reflujo un mecanismo de resistencia efectivo (Ma y cols, 1994).

De esta manera, y aunque resulta complicado hacer comparaciones entre especies, podríamos generalizar diciendo que microorganismos como *E. coli*, con una elevada permeabilidad de membrana externa y un sistema de reflujo con eficiencia similar al de *P. aeruginosa*, no presente niveles significativos de resistencia debido a la membrana externa si el agente no tiene el tamaño y/o la estructura que dificulte su penetración a través de esta envuelta celular. En general, agentes altamente hidrofóbicos como los detergentes, algunos colorantes y antibióticos hidrofóbicos (el ácido fusílico, la rifampicina y la novobiocina) penetran a través de la membrana externa más lentamente que su tasa de reflujo, y es por esta razón que ambos organismos sean resistentes.

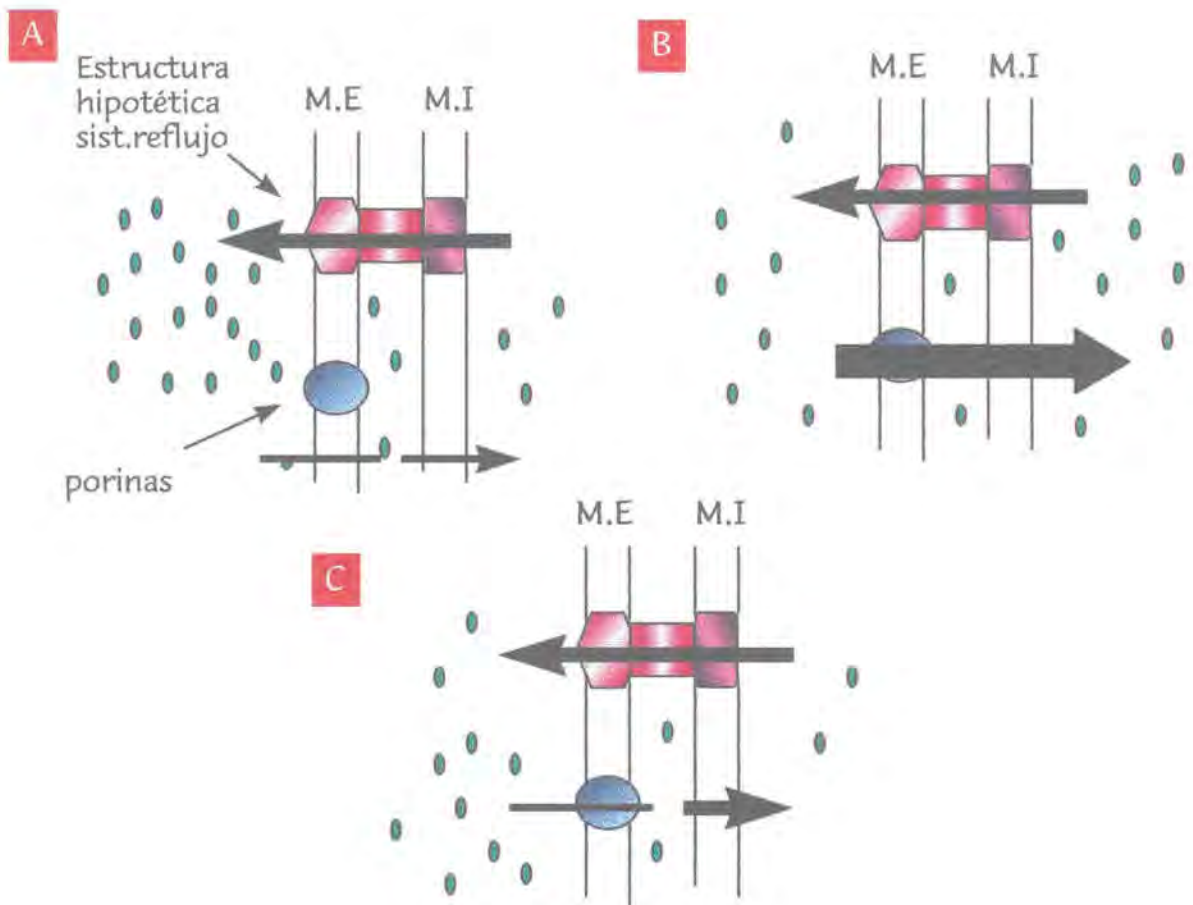


Fig. 1.21 Competición entre los procesos de entrada y reflujo de moléculas (Ma y cols., 1994). El sistema de reflujo en los tres casos expuestos tiene la misma eficiencia (grosor de la flecha). A) Moléculas cuya estructura y/o tamaño dificulte su paso a través de la membrana externa, tales como los antibióticos hidrofóbicos, contribuyen a que el sistema de reflujo sea efectivo. B) Elevada permeabilidad, las sustancias pasan rápidamente a través de las porinas, el sistema de extrusión es “más lento” que la entrada, los compuestos se van acumulando en el interior de la célula. C) Disminución de la permeabilidad por pérdida de una porina hace del sistema de reflujo un mecanismo efectivo.

Basándonos en las características de los sustratos conocidos del *acrAB*, tales como antibióticos y colorantes catiónicos, se podría sugerir que este sistema contribuiría a la resistencia intrínseca de *E. coli*. Sin embargo, la mayoría de estos sustratos no se encuentran en el ambiente natural de esta bacteria y es por esto, por lo que parece probable que el sistema de reflujo *acrAB* haya evolucionado para otras finalidades. Debemos recordar que el ambiente natural de *E. coli* está enriquecido con sales biliares y ácidos grasos, componentes hidrofóbicos que inhiben el crecimiento de muchas bacterias (Thanassi y cols., 1997). El hecho de que mutantes de *acrAB* sean hipersensibles a las sales biliares y decanoato (ácido graso de 10 átomos de carbono) sugiere que una de las funciones biológicas del operón es proteger la bacteria de estos inhibidores hidrofóbicos naturales (el operón es inducido por concentraciones bajas de decanoato). Además, el crecimiento de la bacteria en presencia de esta misma concentración de decanoato aumenta la resistencia a la novobiocina y a la eritromicina (Ma y cols., 1995). Una función similar de exportación de sales biliares y ácidos grasos ha sido atribuida al operón *mtrCDE* de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas del recto de hombres homosexuales (Shafer y cols., 1995). Del sistema *mex*, se conoce poco su función natural.

---

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral forma parte de un conjunto de trabajos desarrollados por el grupo de investigación del Dr. M. Viñas del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Barcelona.

La mayoría de los trabajos publicados hacen referencia a especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, pero en *Serratia marcescens* los mecanismos de resistencia han sido poco estudiados. Sin embargo *S. marcescens* ha producido durante los últimos años un inusual elevado número de episodios infecciosos en los centros hospitalarios españoles, además estudios epidemiológicos han constatado un elevado porcentaje de aislados resistentes a las fluoroquinolonas en *Serratia* y *Enterobacter*, que es superior a cualquier otro género de las enterobacteriáceas.

El objetivo principal de esta tesis ha sido la de aportar más conocimientos en el estudio de los mecanismos de resistencia a las quinolonas en *S. marcescens*.

Los objetivos concretos de la presente tesis doctoral son:

1. La obtención y caracterización de mutantes espontáneos resistentes al ciprofloxacino obtenidos *in vitro*.
2. Investigar la importancia de la membrana externa (papel del lipopolisacárido y porinas) y las características fisicoquímicas de las quinolonas (hidrofobicidad y grado de protonación en función del pH externo) en la acumulación de estos antibióticos por la bacteria *S.marcescens*.
3. Comprobar si existen variaciones en la acumulación del ciprofloxacino,

debido a la competencia por la vía de entrada, incubando este antibiótico simultáneamente con otros agentes antibacterianos que pasan a través de las porinas.

4. La búsqueda y caracterización de bombas de reflujo en *Serratia marcescens*, ya que una baja permeabilidad no podría explicar por sí sola niveles significativos de resistencia clínica, de tal manera que sería/n necesario otro/s mecanismo/s que actuaran de forma sinérgica. Se cree que este segundo factor podría ser el reflujo o extrusión de sustancias.
5. Estudiar el mecanismo de acción antibacteriano del ciprofloxacino y ácido nalidíxico en *S. marcescens*.
6. Estudiar las variaciones de la susceptibilidad y acumulación de quinolonas en presencia de analgésicos (ácido salicílico y paracetamol).
7. El estudio comparativo de la acumulación y susceptibilidad de los derivados del ciprofloxacino en *S. marcescens*.
8. Comparar la acumulación y susceptibilidad del ciprofloxacino en *S. marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
9. Comprobar si existe alguna mutación en la región QRDR (quinolone resistance determining region) comprendida entre los residuos ala-67 y gln-106 de la subunidad A de la DNA girasa, ya que algunas mutaciones puntuales en GyrA de la DNA-girasa causan elevada resistencia.

---

MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. CEPAS BACTERIANAS

#### 3.1.1. CEPAS BACTERIANAS SENSIBLES AL CIPROFLOXACINO

Las cepas utilizadas fueron: *Serratia marcescens* NIMA (Williams y Qadri, 1980), cepa salvaje; NR1, mutante de antígeno O seleccionado por la resistencia al bacteriófago FSB3 (Palomar y cols., 1993); NR1-2, revertiente de NR1 (Palomar y cols., 1993); ATCC43821 aislado clínico de un paciente con UTI (*urinary tract infection*) (Trias y cols, 1987a). Las cepas de *Escherichia coli* K-12 y UH302 (Cole y cols., 1982), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Colección española). Las cepas se mantuvieron en agar inclinado y se resembraron en TSB (caldo de triptona y soja) para los experimentos.

#### 3.1.2. CEPAS RESISTENTES AL CIPROFLOXACINO

Las cepas utilizadas fueron: *S. marcescens* Ncip, NI, NII, NIII, mutantes espontáneos resistentes al ciprofloxacino derivados de la cepa salvaje sensible NIMA. La metodología para su obtención se detalla en el apartado (3.4).

### 3.2. MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.2.1 TSB (CALDO DE TRIPTONA Y SOJA)

El medio utilizado para el desarrollo de los microorganismos en medio líquido es el TSB como medio nutritivo, cuya composición en g/l es la siguiente:

|                         |      |
|-------------------------|------|
| Peptona de caseína..... | 17.0 |
| Peptona de soja.....    | 3.0  |



|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| NaCl.....                             | 5.0 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 2.5 |
| Glucosa.....                          | 2.5 |

El medio se prepara disolviendo 30 g del producto en 1 l de agua destilada. Se esteriliza en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. El pH final es de 7.3.

### 3.2.2 TSA (AGAR DE TRIPTONA Y SOJA)

El medio empleado para el crecimiento en medio sólido y la conservación a corto plazo de las cepas se utilizó el TSA, medio equivalente al TSB pero sin glucosa ni fosfato. Su composición en g/l es la siguiente:

|                         |      |
|-------------------------|------|
| Peptona de caseína..... | 15.0 |
| Peptona de soja.....    | 5.0  |
| NaCl.....               | 5.0  |
| Agar.....               | 15.0 |

El medio se prepara mezclando 40 g de polvo en 1 l de agua destilada, dejando embeber durante 10 minutos y llevando a ebullición hasta disolver totalmente el agar. Una vez disuelto, se esteriliza en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos, se deja enfriar a 50 °C y se distribuye en placas de petri estériles a razón de 20 ml por placa. El control de esterilidad del medio se lleva a cabo a 30 °C durante 24 horas.

### 3.3.3. MEDIO DE CONSERVACIÓN (CONGELACIÓN): CALDO DE TRIPTONA SOJA-GLICEROL (TSB-G)

El medio utilizado para la conservación de las cepas bacterianas estudiadas a largo plazo, constituido por el medio nutritivo líquido (TSB) y glicerol al 20 %.

El medio se prepara pesando 3 g de TSB que se resuspenden en 80 ml de agua destilada, posteriormente, se añaden 20 ml de glicerol, de este modo se consigue un volumen final de 100 ml. Se mezclan bien y se esteriliza al autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para la conservación de los microorganismos a largo plazo, se parte de 5 ml de un cultivo en TSB de una noche. A continuación se centrifuga 1 ml en tubos eppendorf estériles a 7500 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina y el sedimento se resuspende en 1 ml del medio de conservación. Los tubos eppendorfs se guardan a -20 °C hasta su utilización. Si el cultivo inicial proviene de un medio sólido, el crecimiento de una placa se resuspende directamente en un tubo eppendorf que contiene 1 ml del medio de congelación, procediéndose de igual forma.

### 3.3. SUBSTANCIAS EMPLEADAS

#### 3.3.1 ANTIBIÓTICOS

QUINOLONAS: Clorhidrato de ciprofloxacino (soluble en agua); ciprofloxacino (cip), metil-cip, etil-cip, propil-cip, butil-cip (solubles en NaOH 0.5 N); ácido nalidíxico (soluble en NaOH 0.5 N); norfloxacino (soluble en NaOH 0.02 N); ácido pipemídico (soluble en NaOH 0.05 N).

Las concentraciones *stock* preparadas para las quinolonas fue de 1 mg/ml. Se pueden conservar en solución a temperatura ambiente pero resguardadas de la luz porque son fotosensibles.

OTROS ANTIBIÓTICOS: Tetraciclina (se disuelve 50% v/v agua-etanol, resguardada de la luz); Cloranfenicol (soluble en etanol); Novobiocina (soluble en agua); Eritromicina (soluble en etanol); Aminoglicósidos:

Kanamicina, gentamicina y estreptomina (solubles en agua). Los antibióticos se solubilizan en la solución adecuada para cada uno y se filtran (tamaño del poro del filtro es de 0.2  $\mu\text{m}$ ). Una vez preparadas las soluciones concentradas se conservan a -20 °C. En el caso concreto de la tetraciclina se protege de la luz.

### 3.3.2. ANALGÉSICOS

ÁCIDO SALICÍLICO (se prepara como solución alcohólica en etanol absoluto a una concentración de 700 mM. La solución es inestable por lo que su preparación debe realizarse en el momento de su utilización).

PARACETAMOL o 4-ACETAMIDO FENOL (se prepara en una solución alcohólica a una concentración stock de 1 mg/ml).

### 3.3.3. COLORANTES

ACRIFLAVINA (Se prepara en solución acuosa. Es estable a temperatura ambiente y resguardado de la luz).

CRISTAL VIOLETA (se prepara en solución acuosa. Es termoestable pero fotosensible con lo que su conservación debe realizarse en frascos opacos a la luz).

BROMURO DE ETIDIO (se añade 1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua y se agita hasta que está completamente disuelto, la solución se protege de la luz y se conserva a temperatura ambiente).

### 3.3.4 INHIBIDORES METABÓLICOS

CIANURO POTÁSICO (se prepara en solución acuosa y se conserva a temperatura ambiente).

2,4-DINOTROFENOL (se prepara en solución alcohólica en etanol absoluto. Se conserva a -20 °C y protegido de la luz).

CARBONIL CIANIDA M-CLOROFENILHIDRAZONA (CCCP) (se prepara en solución alcohólica en metanol, se conserva a -20 °C, es fotosensible por lo que debe protegerse de la luz).

## 3.4. OBTENCIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS RESISTENTES AL CIPROFLOXACINO

### 3.4.1 EN MEDIO SÓLIDO

1. A partir de un cultivo de la cepa NIMA, incubada en TSB a 30 °C durante 18 h, se siembran 100 µl sobre una placa de TSA que contiene una concentración determinada del antibiótico del cual queremos aislar mutantes resistentes, en nuestro caso fue de 0.6 µg/ml de ciprofloxacino. Asimismo, se calcula el número de bacterias presentes en el cultivo, mediante conteo directo en TSA a 30 °C transcurridas 24 h.
2. A partir de las colonias crecidas, se calcula la frecuencia de mutación, que se define como el número de UFC/ml en las placas con antibiótico respecto al número de UFC/ml control.
3. De una colonia aislada de la placa con antibiótico, se hace una resiembra en TSA y se incuba 24 h a 30 °C. En este caso, este mutante recibió el nombre de NI (mutante resistente al ciprofloxacino de primer paso).

4. A partir de la cepa NI, se prepara un cultivo líquido y se procede de igual forma para la obtención de un mutante resistente de segundo paso. En cada paso de mutación se incrementa la concentración selectiva del compuesto, en nuestro caso: el mutante NII y el mutante NIII fueron seleccionados a una concentración de 3.5 y 15  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

### 3.4.2 EN MEDIO LÍQUIDO

1. Se toman 10  $\mu\text{l}$  de un cultivo de la cepa parental (NIMA) incubada en TSB a 30 °C durante 18 h, se diluyen en 1 ml de TSB que contiene una concentración de ciprofloxacino inhibitoria del crecimiento de la cepa NIMA (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ). La solución se incuba 24 h a 30 °C (primer paso).
2. A partir del cultivo anterior, se toman 10  $\mu\text{l}$  y se vuelve a sembrar un tubo que contiene nuevo TSB con el mismo antibiótico de selección, a doble concentración de antibiótico respecto al primer paso.

En cada paso de selección se procede de igual forma. En el presente trabajo de tesis doctoral se realizaron cuatro pasos de selección sucesivos.

## 3.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 3.5.1 AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (Método modificado de Filip y cols., 1973).

1. A partir de un cultivo bacteriano incubado en TSB durante 18 h a 30 °C, se centrifuga a 7500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Se resuspende el sedimento en 5 ml de tampón fosfato (PBS) pH 7.5 y se vuelve a centrifugar, en las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

3. El sedimento se resuspende en 2 ml de PBS, y la suspensión se somete a sonicación durante tres períodos de un minuto cada uno, con intervalos de 30 segundos y manteniendo la muestra en un baño de hielo.
4. A continuación se centrifuga a temperatura ambiente 7500 rpm para retirar las células enteras.
5. A partir de 1 ml del sobrenadante se centrifuga a 12000 rpm, 30 minutos a 4 °C.
6. El precipitado obtenido se resuspende en 200 µl de PBS pH 7.5 y 900 µl de laurilsarcosinato sódico (SLS) al 0.6 % en agua.
7. Se incuba 30 min a 37 °C. ( A partir de la solubilización se obtienen las proteínas de la membrana citoplasmática).
8. Una vez solubilizadas las proteínas se centrifugan 30 min a 12000 rpm a temperatura ambiente.
9. El sedimento obtenido que contiene la membrana externa se resuspende en 5 µl de PBS pH 7.5.

### 3.5.2. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

1. A partir de 5 µl de la muestra de proteínas de membrana externa aislada previamente se añade 10 µl de tampón de muestra (3.5.2.1a), a continuación se lleva a ebullición durante 10 minutos.
2. Montaje de los geles: La mezcla del gel separador (3.5.2.1b) se deposita dentro del *sandwich* o molde del gel evitando la formación de burbujas. La cantidad de mezcla utilizada es la necesaria para llegar hasta 1,5 cm aproximadamente del inicio del gel. A continuación se cubre la parte superior del gel con isobutanol saturado con agua para evitar el contacto del aire con la parte superior de la mezcla. Se deja polimerizar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Tras este período de tiempo, se retira el isobutanol y se lava varias veces con agua destilada. A continuación se deposita la mezcla del gel iniciador (3.5.2.1c), e

inmediatamente se inserta el peine que permite moldear los pocillos. Se deja polimerizar, se retira el peine y se lavan varias veces los pocillos con agua destilada.

3. Una vez montados los geles, éstos se colocan en la cubeta de electroforesis (Hoefer Se250/260) y se cubren con el tampón de recorrido (3.5.2.1d). El recorrido electroforético se realiza a 70 V para el gel iniciador y de 110 V para el gel separador. Con los geles de urea se continúa el recorrido por un período adicional de 10 minutos después que el marcador (azul de bromofenol) se escape por la parte inferior.
4. Los geles se tiñen con la solución de azul de Coomasie (3.5.2.1e). Después de una hora, el gel se transfiere a una solución de fijación (3.5.2.1f), la cual se mantiene durante aproximadamente una hora, con dos o tres cambios. Finalmente, el gel se rehidrata con la solución de hidratación (3.5.2.1g).

### 3.5.2.1. SOLUCIONES y TAMPONES

#### 3.5.2.1a TAMPÓN DE MUESTRA PARA ELECTROFORESIS (SAMPLE BUFFER)

Composición:

|   |        |
|---|--------|
| Agua destilada .....                          | 4.0 ml |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 .....                   | 1 ml   |
| Glicerol .....                                | 0.8 ml |
| SDS (dodecil sulfato sódico) 10 % (p/v) ..... | 1.6 ml |
| 2-β-mercaptoetanol .....                      | 0.4 ml |
| Azul de bromofenol al 0.05 % (p/v) .....      | 0.2 ml |

Esta solución se conserva a temperatura ambiente. La muestra debe diluirse al menos en una proporción 1:4 con el tampón de muestra y a continuación se calienta durante 5 minutos a 95 °C.

Los componentes de esta solución se preparan de la siguiente manera:

A) Tris 0.5 M pH 6.8.

Se pesan 6 g de Tris base que se disuelven en 60 ml de agua destilada. Se ajusta el pH con HCl 1 N y se lleva hasta un volumen de 100 ml con agua destilada. La solución se conserva a 4 °C.

B) SDS al 10%.

Se disuelven 10 g de SDS en agua, con ayuda de una agitación suave (agitador magnético a baja velocidad). Una vez disuelto se completa el volumen hasta 100 ml con agua destilada en un matraz aforado.

3.5.2.1b COMPOSICIÓN DEL GEL SEPARADOR (12 % ACRILAMIDA)\*

|   |          |
|---|----------|
| Agua destilada .....                        | 1.675 ml |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 .....                 | 1.25 ml  |
| SDS 10 % .....                              | 50.0 µl  |
| Solución de acrilamida .....                | 2.0 ml   |
| Persulfato amónico 10 % .....               | 25.0 µl  |
| TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) ..... | 2.5 µl   |

Se desgasifica las soluciones antes de añadir los dos últimos componentes al vacío durante diez minutos, ya que el O<sub>2</sub> es un potente inhibidor de la polimerización.

En ocasiones, al gel separador, se le puede añadir urea a una concentración final de 4 M. La adición de urea incrementa la resolución de bandas proteicas en el rango de 25 y 45 kDa. En este caso, la composición del gel separador sería:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Urea .....                   | 1.2 g  |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 .....  | 1.2 ml |
| Solución de acrilamida ..... | 2.0 ml |



|                              |              |
|------------------------------|--------------|
| SDS 10 % .....               | 50.0 $\mu$ l |
| Agua destilada .....         | 0.47 ml      |
| Persulfato sódico 10 % ..... | 30.0 $\mu$ l |
| TEMED .....                  | 3 $\mu$ l    |

### 3.5.2.1c COMPOSICIÓN DEL GEL INICIADOR (4 % ACRILAMIDA)\*

|                              |              |
|------------------------------|--------------|
| Agua destilada .....         | 2.0 ml       |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 .....  | 0.83 ml      |
| SDS 10 % .....               | 33.0 $\mu$ l |
| Solución de acrilamida ..... | 0.430 ml     |

Esta solución se desgasificará como en el caso anterior y posteriormente se añadirán:

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| Persulfato amónico 10 % ..... | 20.0 $\mu$ l |
| TEMED .....                   | 4.0 $\mu$ l  |

El persulfato amónico se debe utilizar inmediatamente después de prepararlo o bien se conserva a -20 °C.

#### (\*) SOLUCIÓN DE ACRILAMIDA

La solución de acrilamida está formada por un *stock* al 30 % de acrilamida/bisacrilamida. Esta solución se prepara de la siguiente manera:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Acrilamida .....                 | 29.2 g |
| N'N'-bis-metilenacrilamida ..... | 0.8 g  |
| Agua destilada .....             | 100 ml |

Esta solución se filtra y se guarda a 4 °C en oscuridad. El tiempo máximo de utilización es de treinta días.

### 3.5.2.1d TAMPÓN PARA RECORRIDO ELECTROFORÉTICO (RUNING BUFFER)

Este tampón se prepara a una concentración cinco veces la del uso. El pH resultante es de 8.3.

|                      |      |
|----------------------|------|
| Tris base .....      | 15 g |
| Glicina .....        | 72 g |
| SDS .....            | 5 g  |
| Agua destilada ..... | 1 l  |

La solución concentrada se conserva en la nevera a 4 °C. Si aparece un precipitado de SDS, debe precalentarse a 37 °C antes de usar. Para su utilización se diluye cinco veces la cantidad de tampón necesaria en agua destilada, que es la concentración de uso.

### 3.5.2.1e SOLUCIÓN AZUL DE COOMASIE

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Metanol .....          | 450 ml |
| Ácido acético .....    | 50 ml  |
| Azul de coomasie ..... | 1.0 g  |
| Agua destilada .....   | 450 ml |

3.5.2.1f SOLUCIÓN DE FIJACIÓN, compuesta por metanol, ácido acético y agua destilada en proporción 5:1:5.

3.5.2.1g SOLUCIÓN DE REHIDRATACIÓN, compuesta por agua, ácido acético y metanol en proporción 18:1:1. El gel se mantiene en esta solución hasta su desecación al vacío y calor durante 2 h con un aparato Biorad (modelo 543).

### 3.6. ANÁLISIS DEL LIPOPOLISACÁRIDO

(Método de Hitchcock y Brown, 1983).

1. Se toman 200  $\mu$ l de cultivo bacteriano incubado durante toda la noche en TSB a 37 °C; se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos.
2. Se resuspende el sedimento en 50  $\mu$ l de tampón de muestra (3.5.2.1a) .
3. La muestra se lleva a ebullición durante 10 minutos y se añaden 50  $\mu$ l de la solución de proteinasa K (3.6.1a) y se incuba a 56 °C durante 2 horas. La muestra así preparada puede examinarse en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (1970) modificado por Ames y cols. (1974). La concentración de acrilamida del gel separador (3.6.1b) es del 15 % y del iniciador del 4 % (apartado 3.5.2.1c).
4. El recorrido electroforético se realiza a una intensidad de corriente constante de 10 mA en el gel iniciador y de 15 mA en el separador.
5. Tinción de plata descrito por Tsai y Frasch (1982).
  - 2.1 Después de la electroforesis, el gel se lava con la solución de lavado (3.6.1c) como mínimo durante 2 ó 3 horas en agitación constante.
  - 2.2 El gel se trata con una solución de ácido periódico durante 7 minutos (3.6.1d). La actividad oxidativa del ácido periódico aumenta extraordinariamente la sensibilidad del posterior revelado con plata.
  - 2.3 Se lavan 3 veces con agua destilada durante un período cada uno de 15 minutos.
  - 2.4 El gel se tiñe con la solución de nitrato de plata (3.6.1e) la cual se deja actuar durante 10 minutos.
  - 2.5 Se lavan 3 veces con agua destilada 5 minutos cada uno.
  - 2.6 El revelado de los geles, solución de revelado (3.6.1f) de lipopolisacárido, el cual tiene un fundamento químico análogo al de las técnicas fotográficas, se basa en la reducción del catión

de plata. Esta solución se dejará hasta que aparezcan las bandas.

- 2.7 Para detener el revelado se utiliza la solución de parada (3.6.1g), y para conservar el gel durante algún tiempo sin secarlo, se utiliza la solución de conservación (3.6.1h).

### 3.6.1 SOLUCIONES Y TAMPONES

#### 3.6.1a SOLUCIÓN DE PROTEINASA K

|                                    |                     |
|------------------------------------|---------------------|
| proteinasas K (10.0 mg/ml).....    | 50 mg               |
| Tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.3 ..... | 0.05 ml (stock 1 M) |
| MgCl <sub>2</sub> 5 mM .....       | 0.025 ml (stock 1M) |
| Agua destilada .....               | 4.925 ml            |

#### 3.6.1b GEL SEPARADOR (15 % ACRILAMIDA)

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Agua destilada .....                | 1.2 ml  |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 .....         | 1.2 ml  |
| SDS 10 % .....                      | 50.0 µl |
| Solución de acrilamida .....        | 2.5 ml  |
| Persulfato amónico (APS) 10 % ..... | 25.0 µl |
| TEMED.....                          | 5.0 µl  |

#### 3.6.1c SOLUCIÓN DE LAVADO

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Ácido acético glacial..... | 5 ml  |
| Etanol absoluto.....       | 40 ml |
| agua destilada.....        | 55 ml |

#### 3.6.1d SOLUCIÓN DE ÁCIDO PERIÓDICO

Solución (3.6.1c), añadiendo 0.7 % de ácido periódico.

### 3.6.1e SOLUCIÓN DE TINCIÓN:

#### Solución A

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| AgNO <sub>3</sub> ..... | 0.5 g  |
| Agua destilada .....    | 2.5 ml |

#### Solución B

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| NaOH 1N .....              | 1.4 ml |
| NH <sub>3</sub> 30 % ..... | 10 ml  |
| Agua destilada .....       | 700 ml |

Las dos soluciones se preparan y mezclan inmediatamente antes de ser utilizadas. La mezcla debe realizarse con agitación constante, descartándose si se observa un precipitado de plata de color marrón.

### 3.6.1f SOLUCIÓN DE REVELADO

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Ácido cítrico 10 % ..... | 50.0 µl |
| Formaldehído .....       | 50.0 µl |
| Agua destilada .....     | 100 ml  |

### 3.6.1g SOLUCIÓN DE PARADA

Ácido acético glacial 10 %

### 3.6.1h SOLUCIÓN DE CONSERVACIÓN DEL GEL

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Etanol absoluto ..... | 25 ml |
| Glicerol .....        | 2 ml  |
| Agua destilada .....  | 73 ml |

### 3.7. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

#### 3.7.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC)

1. La determinación de la MIC se realiza por el método de las diluciones en caldo.
2. Se utilizan cultivos obtenidos mediante siembra en medio TSB durante 18 h a 37 °C que se diluyen 1000-veces en caldo fresco.
3. A cada uno de los tubos que contienen diluciones seriadas del antibiótico, se inocula 5 µl de la dilución de cultivo.

La MIC se determina transcurridas 18 h de incubación a 37 °C como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano.

#### 3.7.2 CURVA DE CINÉTICA DE MUERTE

1. La cepa a estudiar se cultiva en un matraz de 25 ml. Una vez alcanzada la fase exponencial (aproximadamente  $D.O_{600} = 0.5$ ), se inicia el experimento (tiempo 0). Se toman 100µl de la dilución adecuada y se inocula por duplicado en placas de TSA que se incuban a 37 °C durante 24 h para conocer la población bacteriana inicial.
2. Inmediatamente después, se añade el antibiótico a una determinada concentración. (Para concentraciones diferentes de antibiótico, se deberá emplear diferentes cultivos, 25 ml cada uno, incubados en las mismas condiciones).
3. Se incuba a 37 °C con agitación, y se extraen muestras transcurridos 30 min, 1 hora, 2 h, 3 h y 6 h.
4. De cada tiempo, se siembra de la dilución adecuada, por duplicado, en placas de TSA y se incuban a 37 °C durante 24h.

5. Recuento del número de microorganismos viables. Los resultados se expresan como UFC/ml.

### 3.7.3 CÁLCULO DEL ÍNDICE BACTERICIDA

(Método descrito por Morrissey, 1997).

1. A partir de los resultados obtenidos de la cinética de muerte, de un antibiótico a concentraciones diferentes y para el mismo tiempo de incubación (normalmente, se suele utilizar las 3 horas de incubación con el antibiótico), se calcula el índice bactericida.

El índice bactericida (BI) es el logaritmo de la reducción de UFC/ml con respecto al logaritmo de la concentración de agente antimicrobiano. La mayor concentración de principio activo utilizada es aquella que se alcanza en suero ( $C_{max}$ ). El índice bactericida es el área bajo la curva comprendida entre el punto de la concentración de antibiótico que cruza el eje de la abscisa (parte del eje de ordenadas positivo) hasta el punto de la concentración  $C_{max}$ .

Tabla. Valores de  $C_{max}$  para el cálculo del BI (Morrissey, 1997).

| Antibiótico      | Dosis oral (mg) | $C_{max}$ (mg/l) |
|------------------|-----------------|------------------|
| Ciprofloxacino   | 500             | 2.60             |
| Norfloxacino     | 400             | 1.60             |
| Ofloxacino       | 400             | 5.85             |
| Trovafloxacino   | 300             | 3.0              |
| Temafloxacino    | 400             | 2.43             |
| Lomafloxacino    | 400             | 4.7              |
| Ácido nalidíxico | 1000            | 20-50            |

### 3.7.4 DETERMINACIÓN DE LA EOP (*Efficiency Of Plating*)

(Método descrito por Aumercier y cols. 1990).

1. A partir de un cultivo en fase exponencial, aproximadamente  $D.O_{600} = 0.5$  de la cepa a ensayar, se diluye y se siembran en placas que contienen una combinación de diferentes concentraciones de quinolona y analgésico.

La placa control es aquella que no tiene ni analgésico ni antibiótico. Para comprobar que la concentración creciente de analgésico no afecta a la viabilidad y cómo afecta la concentración de antibiótico empleada en el ensayo, se siembran 100  $\mu$ l de cultivo en placas que contienen analgésico y agente antimicrobiano, respectivamente.

2. Las placas se incuban a 37 °C por un período de tiempo comprendido entre 24 y 90 h, ya que aquellas placas con elevadas concentraciones de antibiótico y analgésico el crecimiento puede ser más lento.
3. La EOP es el cociente entre las UFC/ml de las placas que contienen antibiótico-analgésico, respecto las UFC/ml de la placa control.

### 3.7.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA BACTERIDA (OBC)

(Método descrito por Piddock y cols., 1994).

1. A partir de un crecimiento bacteriano en fase exponencial ( $D.O_{600} = 0.5$ ), se distribuye el cultivo en tubos, a razón de 5 ml cada uno, que contienen diluciones seriadas del antibiótico a ensayar. El tubo control es aquel que no contiene agente antibacteriano.



2. Los tubos se incuban 1 h a 37 °C , transcurrido este período de tiempo, de cada tubo se siembra 100 µl, por duplicado, en placas de TSA y se incuban a 37 °C durante 24 h.
3. El recuento de microorganismos viables en el tubo control se considera el 100 % de supervivencia. El número de células en el resto de tubos incubados a diferentes concentraciones de antibiótico, se expresa como el porcentaje de supervivencia respecto al control.

La OBC, es la máxima concentración de principio activo en la que se observa el mayor descenso del porcentaje de supervivencia.

### 3.8. MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE QUINOLONAS EN CÉLULAS BACTERIANAS

(Método fluorimétrico modificado descrito por Mortimer y Piddock ,1991).

1. Se cultiva la cepa a ensayar en medio TSB a 37 °C hasta que alcanza una  $DO_{600}$  de 0.5-0.7.
2. Se centrifuga a 7500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. El sedimento se resuspende en PBS pH7.5 (3.8.1a) y se centrifuga en las mismas condiciones; a continuación se resuspende el sedimento concentrándolo 10 veces en PBS pH 7.5.
4. Se preparan alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf manteniéndolos a 37 °C.
5. A cada tubo se le añade la disolución de quinolona para alcanzar una concentración final de 10 µg/ml. Los tiempos de incubación con el antibiótico fueron de 0.5 min, 1.5 min, 3 min, 6 min y 12 minutos.
6. Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, se centrifuga inmediatamente a 13000 rpm a 4 °C durante 1 minuto.
7. El sedimento se lava con 1 ml de PBS pH 7.4 frío (de este modo se consigue un aumento de retención celular de la quinolona) y se

- resuspendene en 1 ml de HCl-glicina 0.1 M pH 3 (3.8.1b); se deja como mínimo durante dos horas de incubación a temperatura ambiente.
8. La suspensión se centrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares.
  9. La concentración de antibiótico en el sobrenadante se determina por fluorimetría (Fluorímetro Hitachi modelo f-2000) a partir de una curva de calibrado previamente establecida para las condiciones de trabajo experimental.

En la tabla 3.2, se indican las longitudes máximas de excitación y emisión ( $\lambda_{ex}$  y  $\lambda_{em}$ ) respectivamente, determinado en HCl-glicina 0.1 M pH 3.0 para las quinolonas empleadas.

Tabla 3.2 Longitudes de excitación y emisión de las quinolonas ensayadas.

|                  | $\lambda_{ex}$ | $\lambda_{em}$ |
|------------------|----------------|----------------|
| Ciprofloxacino   | 279            | 447            |
| Norfloxacino     | 281            | 440            |
| Ácido nalidíxico | 246            | 354            |
| Ácido pipemídico | 354            | 445            |

### 3.8.1. SOLUCIONES Y TAMPONES PARA LOS ENSAYOS DE FLUORIMETRÍA

#### 3.8.1a TAMPÓN PBS (PHOSPHATE BUFFER SALINE)

Utilizado como tampón para el lavado y mantenimiento de células bacterianas. Se prepara como solución *stock* a una concentración diez veces la de utilización. Su composición es:

|  |         |
|--|---------|
| NaCl .....                             | 80.0 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 2.0 g   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 11.44 g |
| KCl .....                              | 2.0 g   |
| Agua destilada .....                   | 1 l     |

### 3.8.1b SOLUCIÓN GLICINA-HCL pH 3

Solución A (glicina 0.2 M)

Solución B (HCl 0.2 M)

En los ensayos fluorimétricos se utiliza la solución HCl-glicina 0.1 M pH 3, para lo cual se toman 50 ml de la solución A, 12 ml de la solución B y agua destilada hasta un volumen total de 100 ml.

### 3.8.2 ACUMULACIÓN DE QUINOLONA SIMULTÁNEAMENTE CON OTROS ANTIBIÓTICOS

El *modus operandi* es idéntico al apartado anterior, pero en este caso se añade simultáneamente a la quinolona otros antibióticos tales como la tetraciclina y la kanamicina, a una concentración final de 20 µg/ml. A continuación se mide por fluorimetría la quinolona acumulada.

### 3.8.3. ACUMULACIÓN DE CIPROFLOXACINO CON CÉLULAS TRATADAS CON DETERGENTE

1. Las condiciones de incubación y preparación de las células para realizar el ensayo son las mismas que en el apartado 3.8, sin embargo antes de incubar las células con el ciprofloxacino, las células se tratan con una

solución de EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 3 mM durante 5 minutos.

2. Inmediatamente después, las células se centrifugan a 7500 rpm a temperatura ambiente y el sedimento se resuspende con el mismo volumen de partida de PBS pH 7.5.
3. El ensayo fluorimétrico posterior de la acumulación del ciprofloxacino se realiza tal como está explicado en el apartado 3.8.

#### 3.8.4 ACUMULACIÓN DE QUINOLONA EN EXPERIMENTOS DE REFLUJO

1. Las condiciones de incubación y preparación de las células para realizar el ensayo son las mismas que en el apartado 3.8 .
2. La suspensión bacteriana se separa en dos tubos: muestra control y muestra para el ensayo de reflujo.

2.1 Tubo "control": Se reparte en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se procesan como en el apartado 3.8. Los tiempos de incubación fueron 0.5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 6 y 12 min.

2.2 Tubo "reflujo": la suspensión se incuba 3 min con la quinolona (concentración final de 10 µg/ml) e inmediatamente se añade el inhibidor metabólico. Los inhibidores metabólicos utilizados fueron: CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona), KCN y 2,4 dinitrofenol a una concentración final de 100 µM, 2 mM y 1 mM, respectivamente.

2.2.1.1 Los tiempos de incubación quinolona-inhibidor metabólico fueron de 2 min, 4 min, 6 min y 9 min. El procesado de las muestra fue el mismo que en el apartado 3.8.

### 3.9. MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TETRACICLINA POR FLUORIMETRÍA

El ensayo de acumulación de tetraciclina se realiza en las mismas condiciones que para las quinolonas, y el mismo *modus operandi* (3.8). Sin embargo, en este caso la concentración final de tetraciclina fue de 20 µg/ml. La longitud máxima de excitación y de emisión de la tetraciclina en HCl-glicina 0.1 M pH 3.0 es de 329 nm y 540 nm, respectivamente.

### 3.10. MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ACRIFLAVINA

El método empleado en la acumulación del colorante acriflavina es el mismo que el descrito en el apartado 3.8. La concentración final utilizada en los ensayos fue de 5 µg/ml. La longitud máxima de excitación y de emisión en HCl-glicina 0.1 M pH 3.0 de la acriflavina es de 413 y 505 nm, respectivamente.

### 3.11. BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 3.11.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSÓMICO

(Método de Hull, modificado por Leranoz y cols., 1991).

1. A partir de un cultivo de 100 ml de TSB incubado a 30 °C durante 24 h en condiciones estáticas, se centrifuga a 7500 rpm, 15 min a temperatura ambiente. El sedimento se resuspende en 50 ml de una solución de NaCl 0.15 M y EDTA 0.01 M a pH 8.0. A esta solución se le añade 1 ml de lisozima al 1 % en Tris-HCl 0.25 M pH 8.0. La mezcla se incuba 10 minutos en hielo.

2. Se añaden 10  $\mu$ l de una solución de proteinasa K de concentración 10 mg/ml, y se agita suavemente la mezcla. Se introduce la solución en un baño a 78-85 °C (esta temperatura está dentro de un margen del 10% inferior a la  $T_m$ , temperatura de fusión que está relacionada linealmente con la composición media de las bases del DNA, de *S. marcescens*) y se lisan las células mediante la adición de 2.63 ml de SDS al 20 % (hasta alcanzar una concentración final de 1 %). Un aumento en la viscosidad en la solución es indicativo de la lisis celular.
3. La suspensión se deja enfriar a temperatura ambiente y a continuación se añaden 13.16 ml de  $\text{NaClO}_4$  5 M, de modo que la concentración final de perclorato sódico fuera de 1 M. Tras agitar, se añaden 32.9 ml (0.5 vol.) de una mezcla de cloroformo-isopentanol en proporción 24:1. La mezcla se agita vigorosamente durante 30 minutos, formándose una emulsión lechosa.
4. La emulsión se centrifuga a 10600 rpm durante 10 minutos a 4°C, para separar la fase orgánica y la acuosa. Se recupera la fase acuosa teniendo cuidado de no recoger material de la interfase (la materia blanca de la interfase, compuesta de restos celulares).
5. Se repite la extracción del cloroformo-isopentanol y la fase acuosa se transfiere a un vaso de precipitado estéril. El DNA cromosómico es precipitado mediante la adición de 2 vol. de etanol frío (-20 °C) al 95 % y recogido con una varilla de vidrio estéril que se agita dentro de la solución simultáneamente a la adición del etanol.
6. El DNA recogido con la varilla se resuspende en 15 ml de tampón 0.1xSSC. Una vez resuspendido, se ajusta la concentración de SSC a 1 mediante la adición de 850  $\mu$ l de 20xSSC.
7. El RNA presente en la suspensión fue eliminado por tratamiento con RNasa a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, incubándose a 37 °C durante 1 h.
8. La mezcla es transferida a tubos de polipropileno, y se añade un volumen de mezcla a partes iguales de fenol tamponado y solución de cloroformo-

- isopentanol. La mezcla se agita y se centrifuga a 5000 rpm, 10 minutos a 4 °C.
9. La fase acuosa es cuidadosamente recogida y se repite el paso anterior.
  10. A la fase acuosa se le añade 0.112 vol. de acetato sódico 3 M y 0.625 vol de isopropanol. El DNA se deja precipitar durante 2 h a -20 °C.
  11. La solución se sedimenta por centrifugación a 8000 rpm, 10 minutos a 4 °C. El sedimento se lava una vez con etanol frío de 70 % (sin resuspender) y se repite la centrifugación.
  12. Se decanta el sobrenadante y se eliminan los restos de etanol al vacío. Una vez seco , el DNA se resuspende en 2 ml de tampón TE.
  13. La concentración final de DNA se determina espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia (A) a 260 nm, y calculando la concentración mediante la fórmula:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = A_{260} / 0.020$$

### 3.11.2. AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA SUBUNIDAD A DE LA DNA-GIRASA POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

1. El DNA cromosómico de las cepas NIMA, NI, NII, NIII y Ncip es utilizado para el PCR. Los cebadores empleados fueron el *gyrA*-up (5' - ACGCGATGAGCGTATTGGGT-3') y el *gyrA*-down (5'-TGGACATGCGCACTTCGGTA-3'). El producto de la reacción es un fragmento de 200 p de bases, que se sitúa en la región QRDR. La mezcla de reacción incluía 1 U del enzima Taq polimerasa, 1 μM de cada cebador o *primer*, 0.5 mM de una mezcla de los dideoxinucleósidos trifosfato, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y de 10 a 100 ng de DNA cromosómico.

La amplificación se lleva a cabo mediante un ciclo de 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1.5 min a 72 °C.

### 3.11.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se utiliza para identificar el fragmento amplificado. En general se utiliza una concentración de agarosa de 1.7 %. Para la preparación de los geles y de las soluciones se siguieron las instrucciones de Sambrock y cols. (1989), añadiendo el bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml. El tampón utilizado fue el 1xTAE y el marcador de pesos moleculares fue el pBR322 DNA/AluI (Pharmacia).

### 3.11.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA: *GENE-CLEAN*

1. La electroforesis se para cuando las bandas aparecen separadas lo suficiente para que se puedan cortar los fragmentos de DNA con independencia.
2. La banda de interés se corta, procurando coger todo el DNA y la menor cantidad de agarosa posible.
3. El fragmento de agarosa que contiene el DNA se coloca en un eppendorf previamente tarado y se pesa de nuevo para saber el peso total, en función del cual, se determinarán los volúmenes de la solución a utilizar en el proceso de extracción del DNA del gel de agarosa.
4. Se añaden 3 volúmenes de la solución NaI 6 M, y se incuba 5 minutos a 55 °C, para fundir la agarosa.
5. Posteriormente, se añaden 5-7 µl de la solución *glassmilk*, sin que se formen grumos, y se incuba 5 minutos en hielo.
6. Se centrifuga, un pulso, y se elimina el sobrenadante.



7. El sedimento se lava con 500  $\mu$ l de *newwash*, se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad. Esta operación se realiza 3 veces. En la última vez, es importante que no quede nada de sobrenadante, como esta solución contiene etanol dejamos el eppendorf abierto a temperatura ambiente para que evapore.
8. El sedimento se resuspende en un volumen adecuado de agua, se incuba 3 minutos a 55 °C, y se centrifuga 1 minuto. Recogemos el sobrenadante y lo guardamos.
9. El sedimento se vuelve a resuspender en agua y se repite el paso anterior. En este caso el sobrenadante se añade al anterior obtenido.

### 3.11.5 PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN: *AmpliTaq DNA-polimerase* (Perkin Elmer)

La mezcla de reacción para PCR:

|   |                          |
|---|--------------------------|
| “Terminator Reaction Mix” .....           | 8.0 $\mu$ l              |
| Producto de PCR (10-30 ng/ $\mu$ l) ..... | 3-6 $\mu$ l              |
| Cebador ( <i>primer</i> ) .....           | 3.2 pmol                 |
| Agua .....                                | X                        |
|   | 20 $\mu$ l volumen final |

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 30 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50 °C y 4 minutos a 60 °C, se repitieron 25 ciclos.

2. Se cogen los 20  $\mu$ l del “amplificado” y se ponen en un eppendorf que contiene 2  $\mu$ l de acetato sódico 3 M y 50  $\mu$ l de etanol absoluto (-20 °C), y se centrifugan 15-30 minutos a máxima velocidad.

3. El sobrenadante se elimina cuidadosamente y se añaden 250 µl de etanol de 70 % (-20 °C), en este caso no es necesario centrifugar, el etanol se elimina cuidadosamente y se seca el sedimento.
4. Las muestras son secuenciadas por el servicio científico-técnico (SCT) de la Universidad de Barcelona (Utilización del *AbiPrism<sup>®</sup> System*. Perkin Elmer).

### 3.11.6. SOLUCIONES Y TAMPONES UTILIZADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 3.11.6a 50xTAE (Tris acetato)

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Tris base .....          | 242 g   |
| Ác.acético glacial ..... | 57.1 ml |
| EDTA 0.5 M pH 8.....     | 100 ml  |
| Agua destilada .....     | 1000 ml |

#### 3.11.6b Tampón 20xSSC

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| NaCl .....              | 175.3 g |
| Citrato trisódico ..... | 88.2 g  |
| agua .....              | 100 ml  |

#### 3.11.6c Tampón TE

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8 .....   | 10 mM |
| EDTA 0.5 M pH 8 ..... | 1 mM  |

#### 3.11.6d. Glassmilk

Se pesan 10 g de sílica en 100 ml de PBS, la solución se deja depositar durante 2 h, transcurridas las cuales se centrifuga a 2000 rpm durante 2 minutos

y el sedimento se resuspende con una solución NaI 3 M a una concentración de 100 mg/ml.

### 3.11.6e. Wash-Buffer

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| NaCl .....            | 50 mM      |
| Tris-HCl pH 7.5 ..... | 10 mM      |
| EDTA .....            | 2.5 mM     |
| Etanol .....          | 50 % (v/v) |

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS SOBRE *Serratia marcescens* NIMA: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL ÁCIDO NALIDÍXICO Y EL CLORHIDRATO DE CIPROFLOXACINO

La actividad antibacteriana de las quinolonas depende de la penetración a través de las envueltas bacterianas (Hirai y cols.,1986; Bedard y cols., 1987; Chapman y Georgopapadaku, 1988 ; Dechéne y cols., 1990) y de la inhibición de la actividad de la DNA-girasa y la topoisomerasa IV (Vila y cols, 1996; Vila y cols, 1997; Kampranis y Maxwell, 1998).

Las DNA topoisomerasas son esenciales para la regulación de los niveles de enrollamiento del DNA y para la separación de las cadenas de DNA del cromosoma de la bacteria. En *Escherichia coli* se han identificado cuatro DNA topoisomerasas; la topoisomerasa I, topoisomerasa II o DNA girasa, topoisomerasa III y la topoisomerasa IV (Drlica, 1984; Drlica y Zhao, 1997). La topoisomerasa I y la girasa son responsables de la regulación del enrollamiento del DNA; mientras que la girasa y la topoisomerasa IV son necesarias para la separación de las cadenas del cromosoma (Luttinger, 1995).

El objetivo de este apartado fue evaluar la actividad antibacteriana en *S. marcescens* NIMA del HCl-ciprofloxacino y del ácido nalidíxico.

##### Determinación de la actividad bactericida de las quinolonas

En la tabla 4.1.1, se muestran los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC), la concentración óptima bactericida (OBC) y el cálculo del índice bactericida (BI).

El establecimiento de categorías de los microorganismos “sensibles” o “resistentes” a los antibióticos se basa sobre todo en la comparación de las MIC’s. Esto cobra significado con aquellos valores obtenidos con el mismo

antibiótico y para el mismo tipo de bacteria; el cálculo de la MIC nos indica cuál es la concentración mínima de antibiótico a la cual se impide el desarrollo de la bacteria, pero no refleja la actividad bactericida del antibiótico. *Pseudomonas aeruginosa* suele presentar valores de MIC elevados para el ciprofloxacino respecto a otros Gram negativos, si tomásemos éstos para la predicción de la actividad bactericida, lo esperable sería observar una frecuencia baja de muerte bacteriana, lo cual en realidad no ocurre (Morrisey, 1997).

Tabla.4.1.1. Determinación de la actividad bactericida del HCl-ciprofloxacino, norfloxacino y ácido nalidíxico en *S. marcescens* NIMA.

|                    | MIC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | OBC<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | BI    |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| HCl-ciprofloxacino | 0.06                        | 0.25                        | 0.710 |
| norfloxacino       | 0.06                        | 0.25                        | 0.455 |
| ácido nalidíxico   | 5                           | 30                          | 0.198 |

La OBC se ha utilizado para comparar la actividad bactericida de las quinolonas (Smith, 1984b; Piddock y cols., 1994) y corresponde a la concentración de antibiótico a la que se observa el mayor descenso de la supervivencia. En nuestro caso se observó que el valor de OBC para el ácido nalidíxico era mucho más elevado que para las quinolonas más modernas, como el ciprofloxacino. El ciprofloxacino es mucho más potente que el ácido nalidíxico, lo que es debido a la adquisición de nuevas características en la estructura de la molécula “cabeza” de serie de la quinolona, como la presencia de un anillo piperacínico en la posición C-7 y un flúor en la posición C-6 (Bryskier y Chantot, 1995) (Figura 4.1.1).

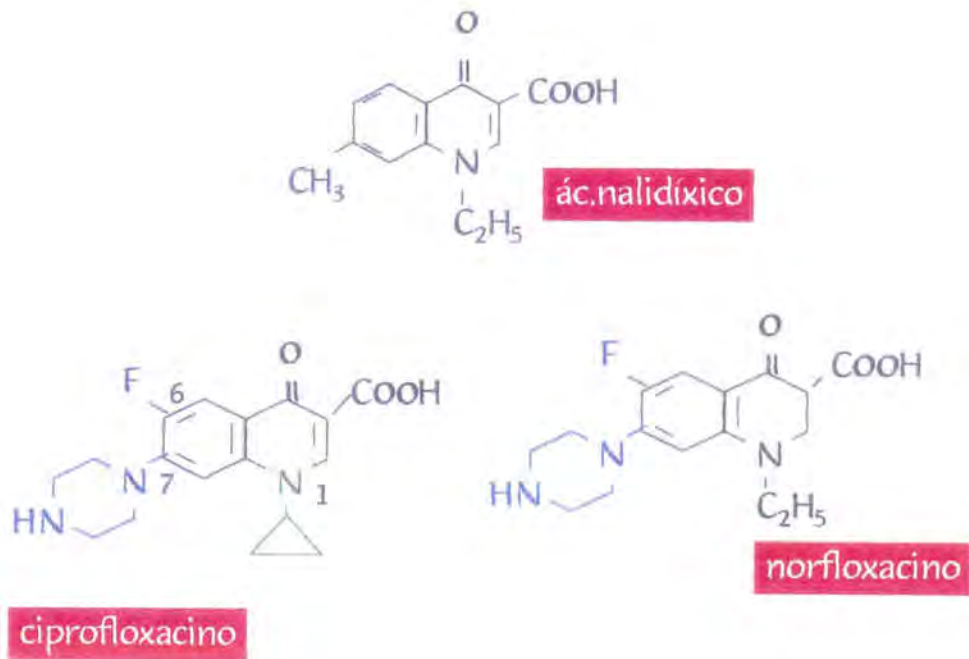


fig. 4.1.1 Estructuras químicas del ácido nalidíxico, ciprofloxacino y norfloxacino.

Para *E. coli* y otras bacterias Gram negativas, la concentración de quinolona que inhibe el superenrollamiento de DNA plasmídico o la síntesis de DNA al 50 % (IC<sub>50</sub>) se correlaciona con el valor de la MIC determinado (Moniot-Ville y cols., 1991; Piddock, 1993); sin embargo, por ejemplo, la OBC del ciprofloxacino es 4 veces mayor que su MIC, este resultado podría sugerir que la inhibición del DNA por sí sólo no sería responsable del efecto bactericida de las quinolonas y, no se descartan los efectos secundarios producidos por la activación de la respuesta SOS (Piddock y cols., 1990).

El HCl-ciprofloxacino y norfloxacino mostraron valores de MIC y OBC iguales. Las quinolonas desarrolladas más recientemente, presentan valores muy similares de OBC (George y Morrissey, 1997), lo que dificulta la comparación de actividad entre ellas, de ahí la utilización de otro método para la determinación de la actividad bactericida: el cálculo del índice

bactericida (BI) (Morrisey, 1997). Este valor también permite comparar la actividad bactericida de un compuesto con otro ya que se trabaja con un rango de concentraciones del antibiótico tal que el máximo utilizado se corresponde con el valor máximo que se alcanza en sangre.

El valor del BI del ciprofloxacino es significativamente más elevado que el obtenido para los otros dos antibióticos. Lo más destacable en este caso es el hecho de que la única variación en la estructura de la molécula del ciprofloxacino respecto a la del norfloxacino es la presencia de un grupo ciclopropilo en la posición N-1 del esqueleto base de la quinolona. Precisamente se ha sugerido que la potencia antibacteriana está enormemente influida por el sustituyente en N-1 (Mitscher y cols, 1993).

#### Cinéticas de muerte en *S. marcescens* NIMA

La actividad bactericida de las quinolonas tiene lugar en breve después del contacto con el agente antibacteriano (Asuquo y Piddock, 1993); Sin embargo como puede observarse en las figuras 4.1.2 y 4.1.3, la actividad bactericida varía en función del principio activo utilizado. En el caso concreto del ácido nalidíxico (fig.4.1.2) la actividad bactericida aumenta a medida que aumentamos la concentración de antibiótico hasta que alcanza un valor, por encima del cual, no se incrementa o se incrementa ligeramente, como en el caso del ciprofloxacino. Este valor coincide con la OBC. Este efecto paradójico letal se ha descrito anteriormente (Diver, 1989; Piddock y cols., 1990; Smith 1984a) y parece estar asociado a la inhibición de la síntesis de RNA y proteínas (Piddock y cols., 1990).



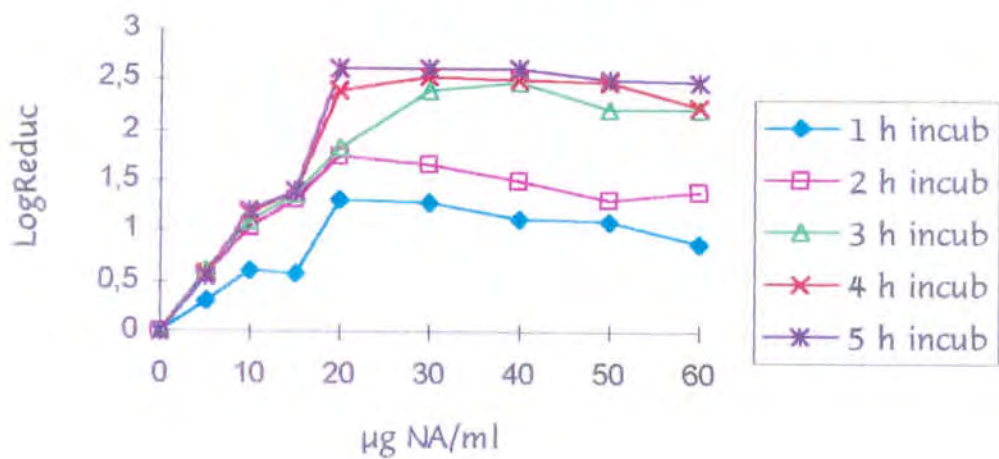


Fig. 4.1.2 Curvas de muerte celular en *S. marcescens* a diferentes concentraciones de ácido nalidíxico.

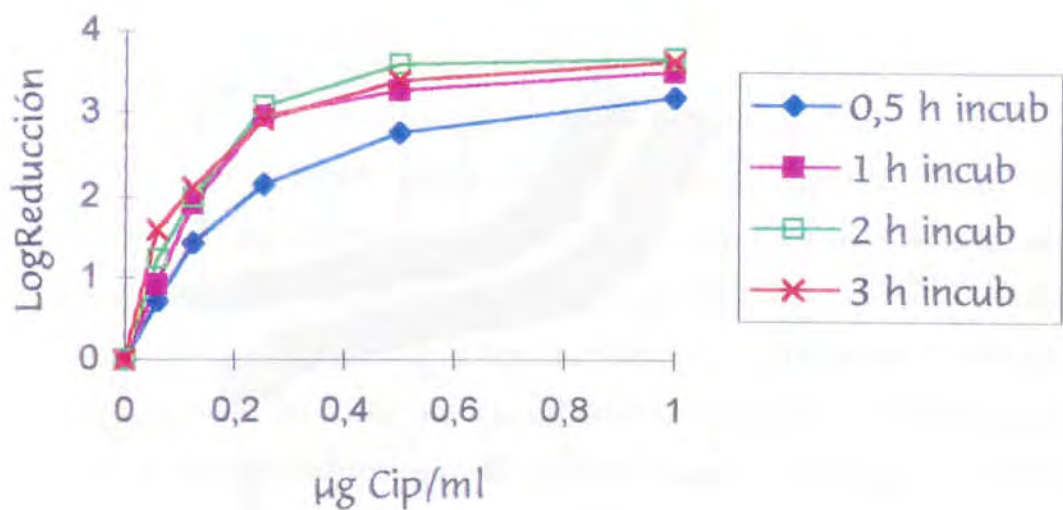


Fig. 4.1.3 Curvas de cinética de muerte en *S. marcescens* incubada a diferentes concentraciones de HCl-ciprofloxacino (representado en la figura como Cip).

El HCl-ciprofloxacino provoca la muerte de las células más rápidamente que el ácido nalidíxico, como puede observarse en las figuras anteriores. Los tiempos de incubación con estos antibióticos en los que existen valores de muerte celular elevados son de 1 y 3 horas para el ciprofloxacino y el ácido nalidíxico, respectivamente.

#### a) Cinéticas de muerte quinolona-cloranfenicol

En las figuras 4.1.4 y 4.1.5, se muestran las cinéticas de muerte del HCl-ciprofloxacino y del ácido nalidíxico, respectivamente. Las concentraciones utilizadas para los ensayos fueron para las quinolonas las obtenidas en la OBC, mientras que para el cloranfenicol fue de  $7 \mu\text{g/ml}$  (que correspondía a la MIC para la cepa NIMA).

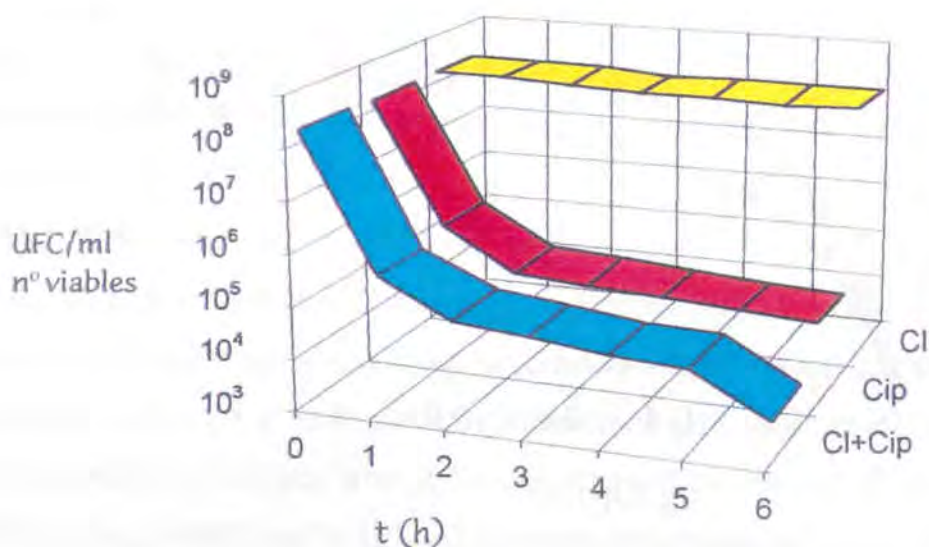


Fig. 4.1.4 Cinética de muerte en *S. marcescens* NIMA al clorhidrato de ciprofloxacino (representado en la figura como Cip), cloranfenicol (Cl) y la combinación HCl-ciprofloxacino-cloranfenicol (Cl+Cip).

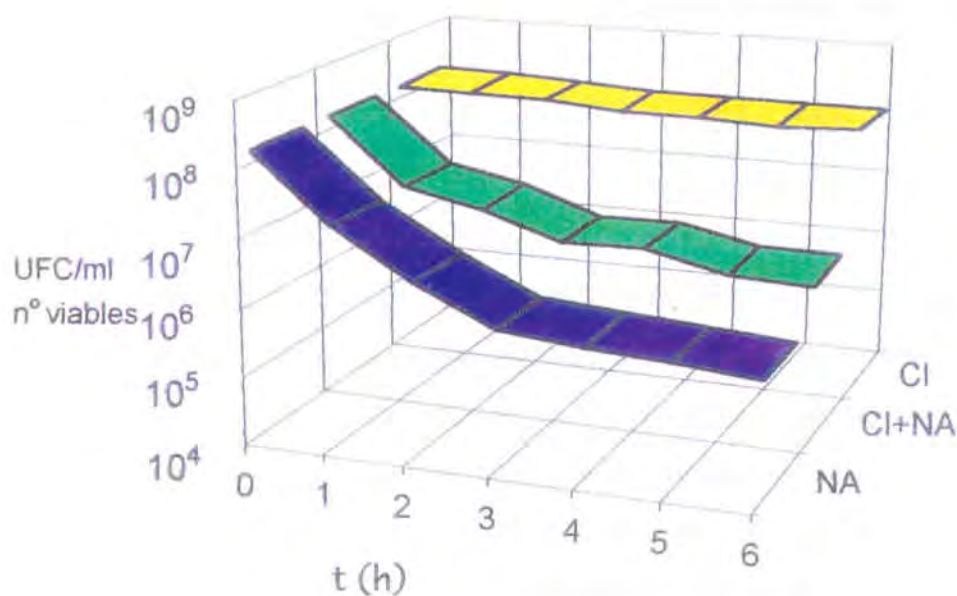


Fig. 4.1.5 Cinética de muerte en *S. marcescens* NIMA: incubadas sólo con el ácido nalidíxico (NA), cloranfenicol (CI) y la combinación de ambos antibióticos (CI+NA).

Se han descrito dos mecanismos de acción independientes, denominados A y B, responsables de la actividad bactericida de las quinolonas (Lewin y Smith, 1988 ; Piddock y cols., 1990). El mecanismo A fue el primero en ser identificado en las quinolonas. Es común a todas ellas y es el único mecanismo que exhibe el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico. Para la actividad bactericida de estos antibióticos se requiere la síntesis de proteínas y de RNA, así como que las células sean capaces de dividirse; por lo tanto, no es sorprendente que el cloranfenicol, disminuya la actividad bactericida del ácido nalidíxico, como puede observarse en la Fig. 4.1.5.

El estudio del efecto del cloranfenicol sobre la actividad del ciprofloxacino conduce a la identificación de un segundo mecanismo; el mecanismo B, en el cual concentraciones bacteriostáticas de cloranfenicol o rifampicina, pueden reducir ligeramente pero no abolir la actividad bactericida de la fluoroquinolona ciprofloxacino (fig 4.1.4); por lo tanto

presenta un mecanismo adicional que es independiente de la síntesis de proteínas, RNA y división celular.

Chen y cols., (1996) propusieron un modelo de muerte celular mediada por las quinolonas. La acción bactericida del ácido nalidíxico tendría lugar principalmente a través de una vía que es inhibida por el cloranfenicol. El cloranfenicol prevendría la muerte celular pero no la inhibición de la síntesis de DNA. Estos autores formularon la hipótesis que un “factor reparador” estaría implicado en esta vía y sería independiente de la respuesta SOS, ya que el efecto letal del ácido nalidíxico no es afectado por una mutación en *lexA* que evita la respuesta SOS. Sin embargo el cloranfenicol no bloquea la muerte celular en presencia de ciprofloxacino. Estos autores proponen que las subunidades de la girasa se disocian liberándose el DNA “roto”. El mecanismo de reparación o prevención de daño debido a esta disociación parece implicar la respuesta SOS, porque mutantes en *lexA* son hipersusceptibles al ciprofloxacino (fig. 4.1.6).

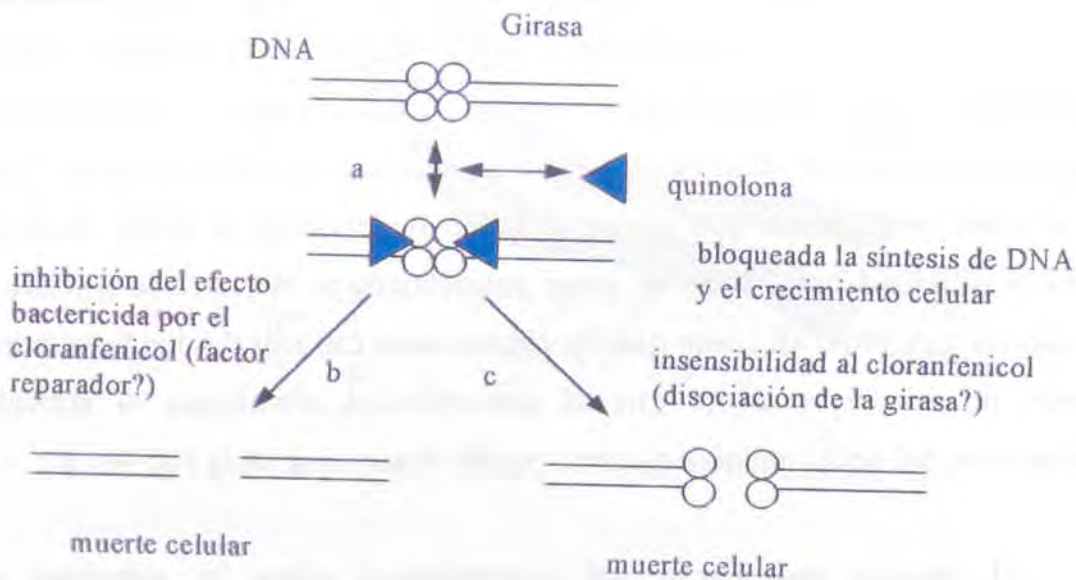


Fig. 4.1.6 Representación esquemática de la muerte celular mediada por la incubación con quinolona. a) Las quinolonas se unen al complejo DNA-DNAgirasa y bloquean la reacción

enzimática intermedia referida a la escisión covalente entre las hebras de DNA y la tirosina 122 de la girasa, lo que provoca la inhibición de la síntesis de DNA. Las cadenas de DNA rotas pueden liberarse por dos vías diferentes, las cuales conducen a la muerte celular; b) esta vía es inhibida por el cloranfenicol. Se cree que existe un "factor reparador" que retira el complejo quinolona-girasa del DNA. Este factor no se ha identificado. c) Se ha propuesto que esta vía implicaría la disociación de las subunidades de la girasa (Chen y cols., 1996).

#### b) Actividad bactericida quinolona-Kanamicina o quinolona-tetraciclina

En estudios anteriores se han comprobado los efectos sinérgicos *in vitro* de la combinación de antibióticos cefémicos (cefepoxima y cefcamato) y las quinolonas (ciprofloxacino y ofloxacino) en *S. marcescens* (Otsuki y Nishino, 1996). En la presente tesis doctoral se han estudiado otras combinaciones de sustancias antibacterianas para comprobar la posible existencia de efectos sinérgicos en la actividad bactericida del ciprofloxacino y del ácido nalidíxico.

En las figuras 4.1.7 y 4.1.8 se muestran las cinéticas de muerte del ciprofloxacino y el ácido nalidíxico, respectivamente. Las concentraciones utilizadas para los ensayos fueron para las quinolonas las obtenidas en la OBC, mientras que para la kanamicina y tetraciclina fueron de 7 y 14 µg/ml respectivamente.

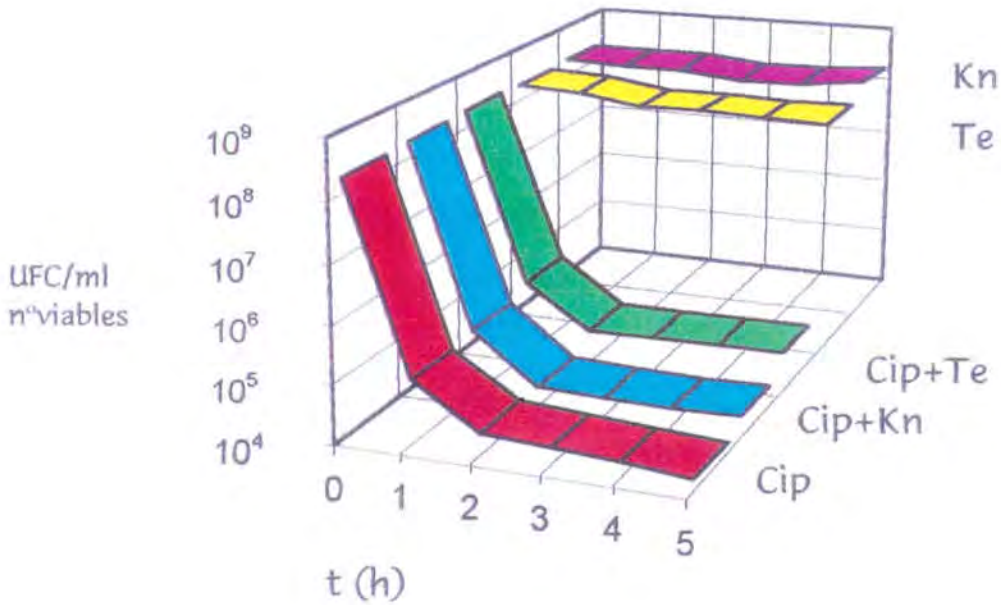


Fig. 4.1.7 Cinética de muerte de NIMA: HCl-Ciprofloxacino-tetraciclina (Cip+Te) o HCl-ciprofloxacino-kanamicina (Cip+Kn). La concentración de HCl-ciprofloxacino utilizada fue de  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ; mientras que la de tetraciclina (Te) fue de  $14 \mu\text{g/ml}$  y la de kanamicina (Kn)  $7 \mu\text{g/ml}$ .

La combinación de ciprofloxacino con estos antibióticos no parece modificar significativamente la actividad bactericida. La combinación ácido nalidíxico con la tetraciclina disminuye la actividad bactericida del primero, debido posiblemente a la inhibición de la síntesis de proteínas, sin embargo con la kanamicina existe un aumento de la actividad bactericida (fig. 4.1.8). Los aminoglicósidos, especialmente la gentamicina (Martin y Beveridge, 1986), muestran la capacidad permeabilizadora de estos antibióticos desorganizando la membrana, lo que podría permitir una mayor entrada de ácido nalidíxico.

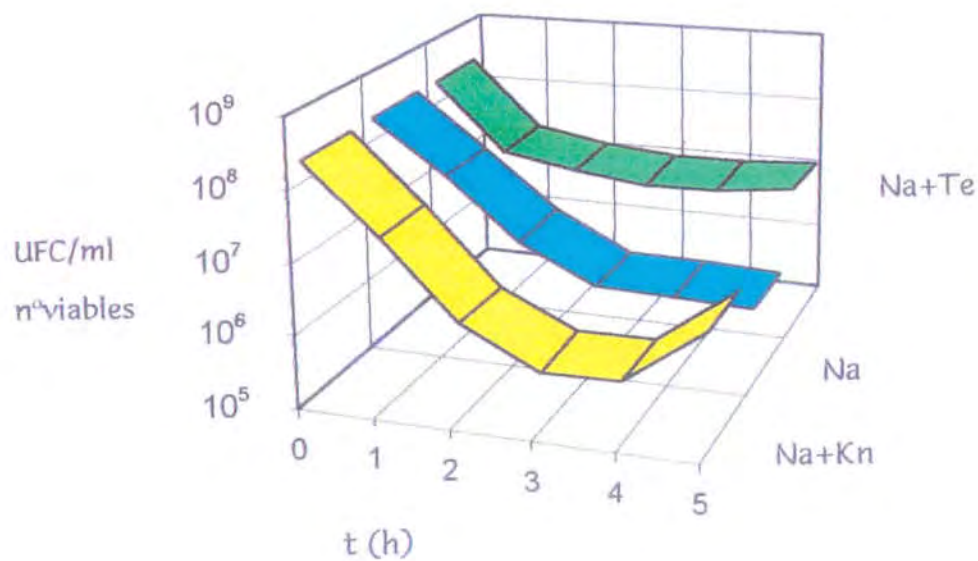


Fig. 4.1.8 Cinética de muerte en NIMA: ácido nalidíxico-tetraciclina (Na+Te) y ácido nalidíxico-kanamicina (Na+Kn). La concentración de ácido nalidíxico utilizada fue de 30  $\mu\text{g/ml}$ ; mientras que la de tetraciclina (Te) fue de 14  $\mu\text{g/ml}$  y la de kanamicina (Kn) 7  $\mu\text{g/ml}$ .

## 4.2 PAPEL DE LA MEMBRANA EXTERNA EN LA ACUMULACIÓN DE QUINOLONAS EN *Serratia marcescens*.

Una función fundamental de las membranas biológicas es la de servir como barrera de permeabilidad selectiva. La membrana externa sirve como una barrera efectiva que protege a las bacterias Gram-negativas de una variedad de compuestos, tales como algunos antibióticos, desinfectantes y detergentes. Tanto la membrana externa como la membrana interna contienen proteínas de transporte que median el paso de un limitado número de solutos. Para alcanzar su diana intracelular (DNA-girasa y topoisomerasa IV) las quinolonas deben pasar a través de ambas membranas.

Se ha determinado la acumulación de las quinolonas (clorhidrato-ciprofloxacino y ácido nalidíxico) por un método fluorimétrico, utilizándose para el estudio la cepa salvaje NIMA de la especie *Serratia marcescens*, los mutantes derivados, NR1 (antígeno O<sup>-</sup>) y NR1-2 (cepa revertiente de NR1), Ncip (mutante espontáneo de elevada resistencia al ciprofloxacino) y la cepa clínica ATCC43821, para describir la importancia tanto de la membrana externa como de las características fisicoquímicas de las quinolonas utilizadas en la captación y/o acumulación del antibiótico por la bacteria y su contribución a la resistencia. También se pretende estudiar si existen variaciones en la acumulación de ciprofloxacino debido a la competencia por la vía de entrada, incubando este compuesto simultáneamente con otros antibióticos que pasan a través de las porinas.

### Susceptibilidad a las quinolonas

En la tabla 4.2.1, se especifican los valores obtenidos de concentración mínima inhibitoria (MIC) de las quinolonas ensayadas.



Tabla 4.2.1. MIC's a las quinolonas ( $\mu\text{g/ml}$ )

|                    | NIMA | NR1   | NR1-2 | Ncip | ATCC43821 |
|--------------------|------|-------|-------|------|-----------|
| HCl-Ciprofloxacino | 0.06 | 0.125 | 0.125 | 30   | 0.25      |
| Norfloxacino       | 0.06 | 0.125 | 0.125 | 35   | 0.25      |
| Ác. Pipemídico     | 5    | 5     | 5     | 60   | 10        |
| Ác. Nalidíxico     | 5    | 2.5   | 3     | 60   | 10        |

El perfil de susceptibilidad a estos agentes antibacterianos muestra que todas las cepas son sensibles excepto la Ncip.

No obstante, se pueden observar tres hechos importantes: (i) La actividad antimicrobiana de las quinolonas en general depende no sólo del esqueleto base compuesto por el sistema bicíclico-heteroaromático, sino de la naturaleza de los sustituyentes periféricos (Chu y Fernandes., 1989; Mitscher y cols., 1993; Bryskier y Chantot, 1995); siendo el HCl-ciprofloxacino y el norfloxacino más potentes que el ácido nalidíxico o el ácido pipemídico (como se ha podido observar en el apartado 4.1). (ii) Las quinolonas difieren en su hidrofobicidad, lo que podría afectar su interacción con las envueltas celulares y por lo tanto su entrada y acumulación. La cepa carente de antígeno O (NR1) es más susceptible al ácido nalidíxico, molécula hidrofóbica, la cual presenta intacta la estructura del LPS (iii). La cepa clínica ATCC43821, es intrínsecamente más resistente que la cepa ambiental salvaje.

### Perfil de membrana externa y LPS

Las figuras 4.2.1 y 4.2.2 muestran los geles SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa (OMP) y lipopolisacárido (LPS) respectivamente. El examen de OMP y LPS se llevó a cabo con células incubadas en TSB a 37 °C.

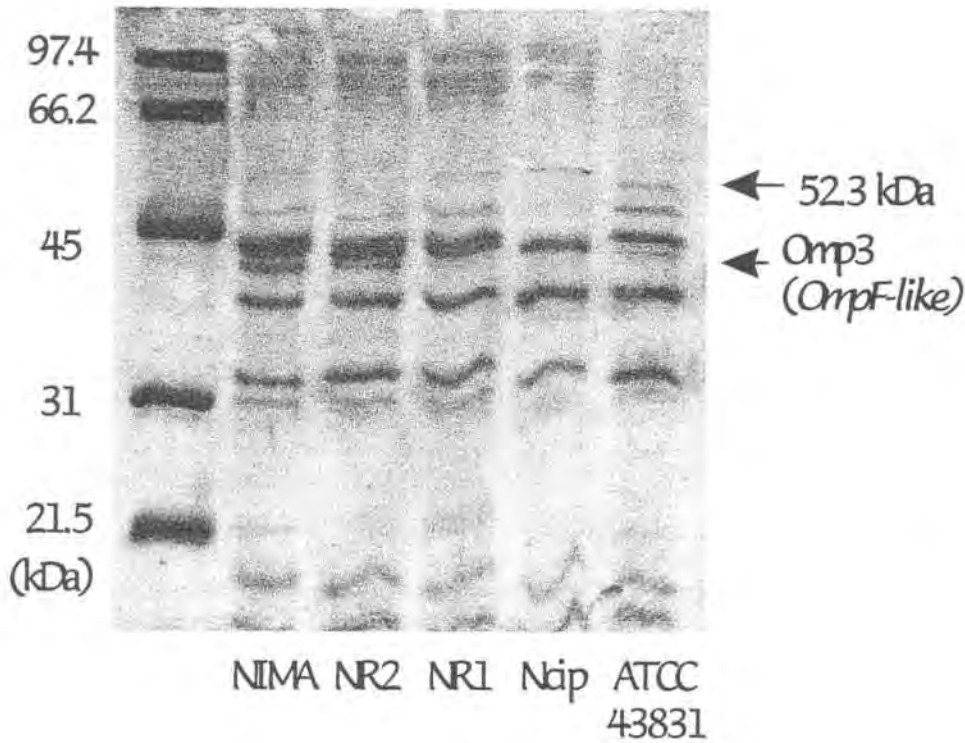


Fig. 4.2.1 Perfil de proteínas de membrana externa de *Serratia marcescens*. Gel SDS-PAGE, acrilamida 12 % y urea 4 M.

A diferencia de *Escherichia coli*, las porinas de *S. marcescens* no han podido ser caracterizadas con claridad. En geles de electroforesis SDS-PAGE, se han observado de 1 a 3 porinas con pesos aparentes cercanos a los 40 KDa (Malouin y cols, 1990; Puig y cols, 1993; Hutsul y Worobe, 1997).

En el perfil de OMPs del mutante Ncip se puede observar una disminución de la expresión de la proteína que bandea en la zona de la *OmpF-like* (Hutsul y Worobe, 1997) respecto a la parental que en nuestro laboratorio se denominó Omp3 (Puig y cols., 1993) y una proteína de membrana externa cuyo peso molecular aparente es de 52.3 kDa, que podría corresponder a una proteína perteneciente a un sistema de reflujo (Masuda y cols., 1995; Charvalos y cols., 1995).

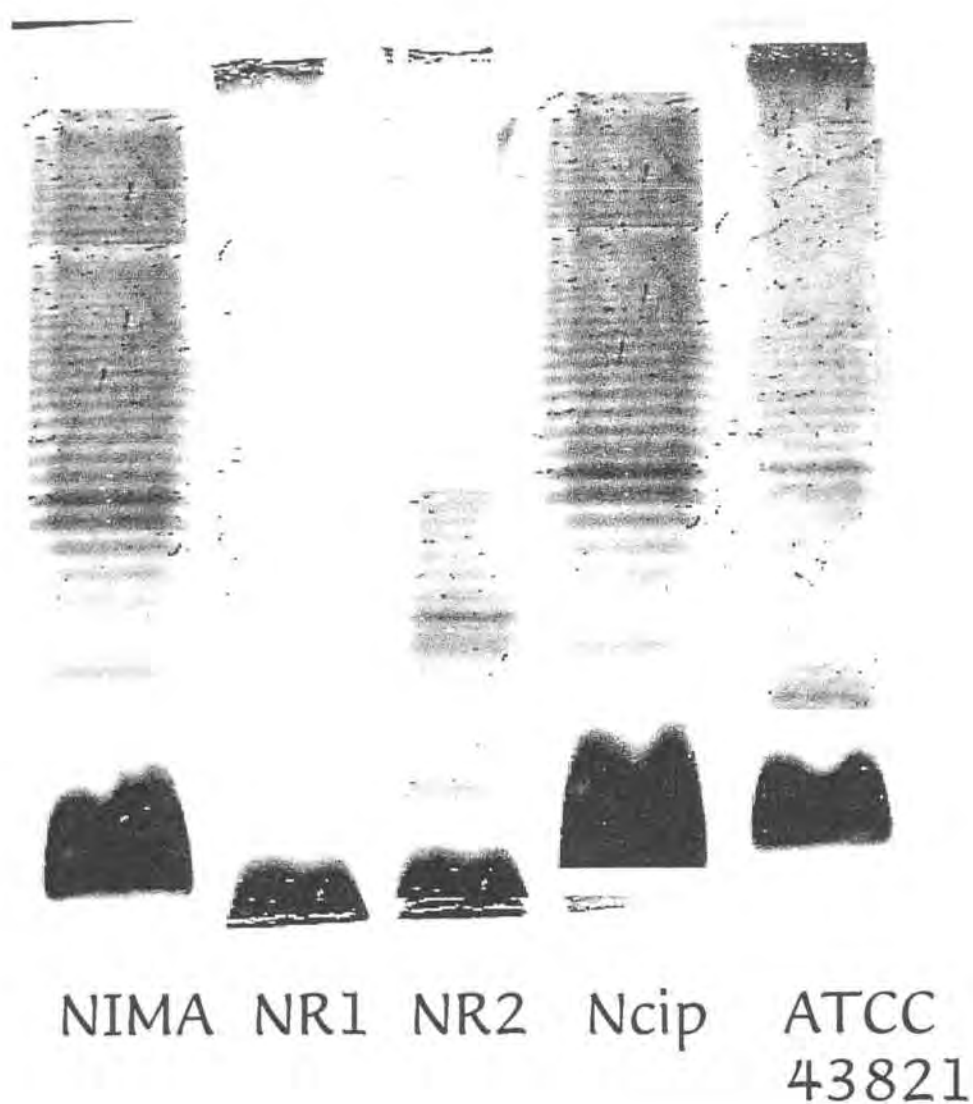


Fig. 4.2.2 Perfil de lipopolisacárido de *S. marcescens* en un gel SDS-PAGE de acrilamida 15 %.

El LPS de las cepas ensayadas muestra las tres regiones típicas del lipopolisacárido: lípido A, el antígeno O y el core, excepto para la cepa NR1, que carece de las bandas correspondientes al antígeno O en geles teñidos por el método de la tinción de plata.

## Transporte de ciprofloxacino

Como puede observarse en la Figura 4.2.3, la acumulación de HCl-ciprofloxacino es proporcional a la concentración de quinolona externa entre 5-50  $\mu\text{g/ml}$ , lo que confirma trabajos anteriores en los cuales se sugiere que la entrada no está mediada por un transportador proteico saturable (Bedard y cols., 1987; Hooper y cols., 1989; Diver y cols., 1990; McCarffrey y cols., 1992).

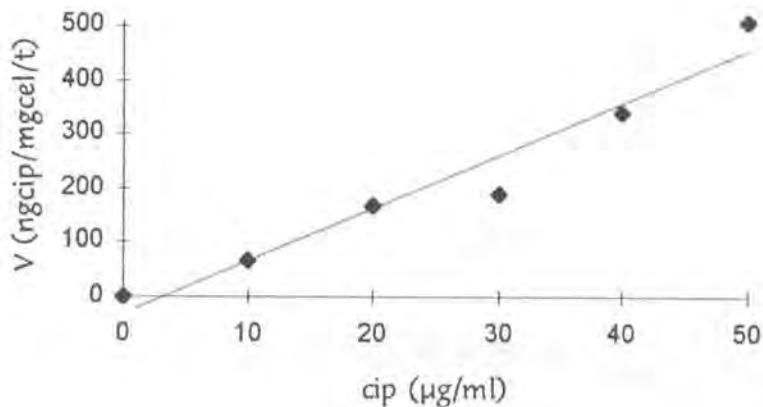


Fig. 4.2.3 Difusión facilitada de ciprofloxacino (tiempo de incubación 4 min).

## Efecto del pH externo en la acumulación de HCl-ciprofloxacino

Las fluoroquinolonas presentan dos lugares de protonación, que dan como resultado cuatro microespecies:  $\text{H}_2\text{Q}^+$ ,  $\text{Q}^-$ , forma zwitteriónica  $\text{HQ}^+$ , y la no cargada  $\text{HQ}^0$ . El predominio de una u otra especie depende del pH exterior, lo que determinará tanto la difusión como la distribución de estos compuestos a través de la membrana (Nikaido y Thanassi, 1993). Sólo las especies que no muestran carga neta ( $\text{HQ}^+$  y  $\text{HQ}^0$ ) parecen tener un papel

significativo en la penetración a través de la membrana citoplasmática. La forma zwitteriónica es la mayoritaria a pH neutros (Pidcock, 1991; Furet y cols, 1992; Hancock y Bellido, 1992; Nikaido y Thanassi, 1993).

Como puede observarse en la Figura 4.2.4, la entrada de ciprofloxacino es muy rápida alcanzándose un equilibrio estacionario a los pocos minutos de incubación con el antibiótico. En este estado se establece un equilibrio de la forma no cargada de la quinolona entre ambos lados de la membrana (Nikaido y Thanassi, 1993).

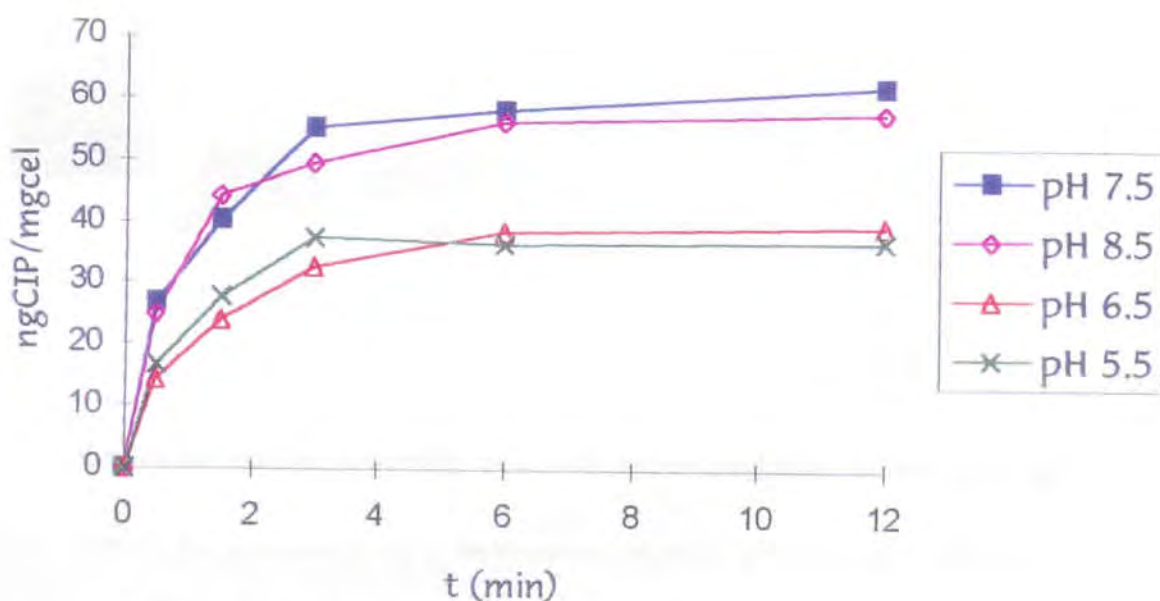


Fig. 4.2.4 Acumulación de HClciprofloxacino (concentración externa de 10  $\mu\text{g/ml}$ ) a diferentes pH en *Serratia marcescens* NIMA.

El máximo de acumulación se alcanzó a pH 7.5 y 8.5, mientras que a pH ácidos se observó una marcada disminución de la acumulación. A pH neutro y básico el grupo carboxílico está desprotonado, lo que facilitaría la quelación de iones  $Mg^{2+}$  que neutralizan las cargas negativas de las moléculas de lipopolisacárido (Chapman y Geogopapadakou, 1988). Estos complejos quinolona-Mg con carga positiva neta pasarían preferentemente a través de la vía proteica definida por las porinas (Nikaido y Thanassi, 1993). La acumulación en el periplasma además se vería favorecida por el potencial Donnan que es negativo en el interior. Por otro lado la acumulación citoplasmática dependería de la existente en el periplasma. (Nikaido y Thanassi, 1993). A pH ácido se observa una disminución de la acumulación que puede ser reflejo de una disminución de la formación del complejo fluoroquinolona-Mg (Takack-Novak y cols., 1990; Nikaido y Thanassi, 1993). Así pues, la acumulación de fluoroquinolona está influida por el grado de protonación/desprotonación de la molécula y su distribución depende tanto del potencial Donnan como del gradiente de pH.

En la figura 4.2.5, se representa el “equilibrio esperado” de norfloxacinó a través de la membrana citoplasmática a valores de pH externo de 5.2 y 6.5 (Nikaido y Thanassi, 1993).

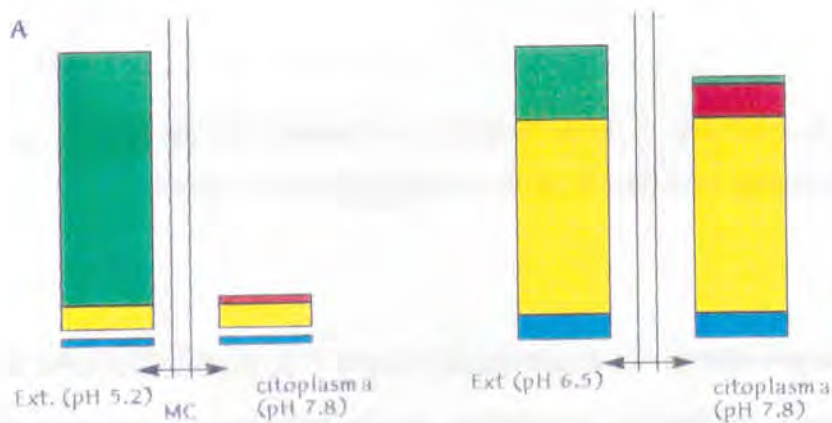


Fig. 4.2.5 Equilibrio “esperable” del norfloxacinó a través de la membrana citoplasmática

(MC) a valores de pH externo de 5.2 y 6.5. Los colores verde, amarillo, rojo y azul, representan la forma catiónica, zwitteriónica, aniónica y la microespecie sin carga, respectivamente (Nikaido y Thanassi, 1993).

En el caso del ácido nalidíxico, quinolona hidrofóbica con un LogP de 2; sólo tiene 2 especies químicas:  $HQ^{\circ}$  y  $Q$ . A  $pH \geq 7$ , la forma predominante es la cargada negativamente. Como puede observarse en la figura 4.2.6, la acumulación de este antibiótico también se modifica en función del pH del medio.

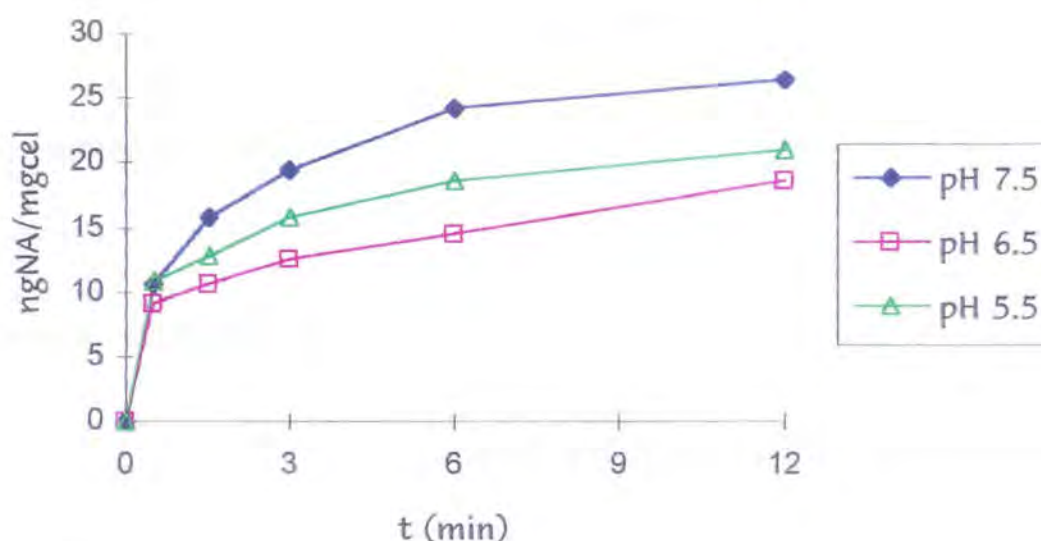


Fig. 4.2.6 Acumulación de ácido nalidíxico en función del pH externo en *S. marcescens* NIMA. La concentración final de ácido nalidíxico fue de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

El aumento en la acumulación a pH 7.5, podría deberse a la quelación de los iones magnesio existentes en la membrana externa por el grupo carboxílico desprotonado del ácido nalidíxico.

## Papel de la membrana externa en la acumulación de quinolonas en *S. marcescens*

La acumulación de todas las quinolonas ensayadas, a pH 7.5, se estabilizó a los pocos minutos de incubación con el antibiótico. En las figuras 4.2.7 y 4.2.8 se muestran los resultados de acumulación del ciprofloxacino y del ácido nalidíxico, respectivamente.

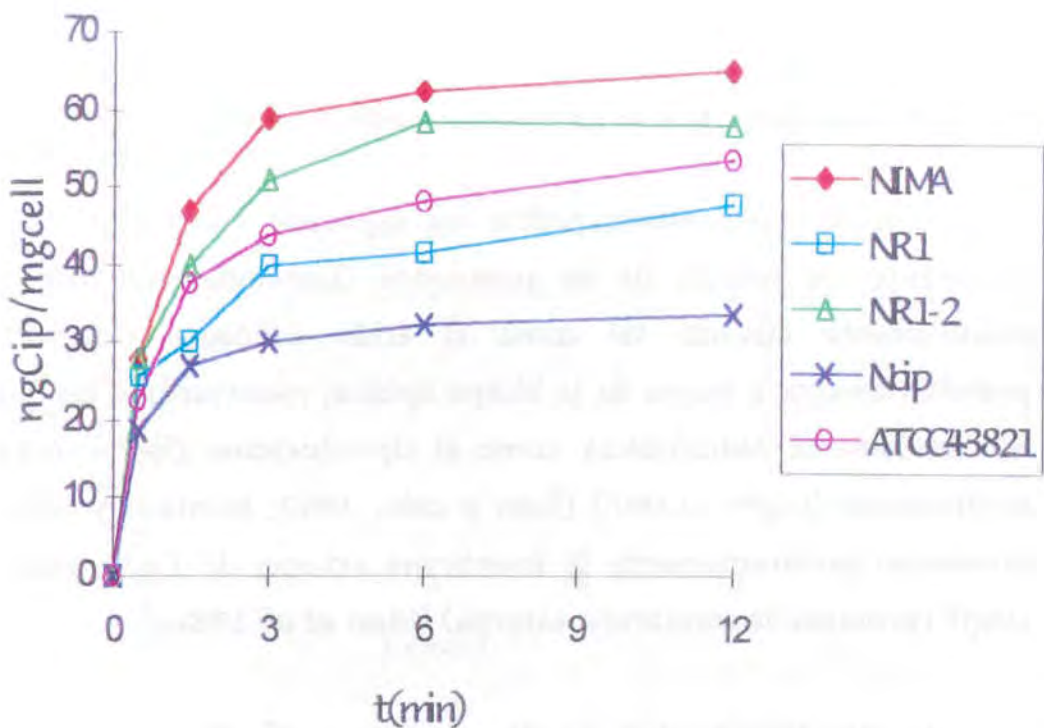


Fig. 4.2.7 Acumulación del clorhidrato de ciprofloxacino (concentración externa de 10  $\mu\text{g/ml}$ ) a pH 7.5.



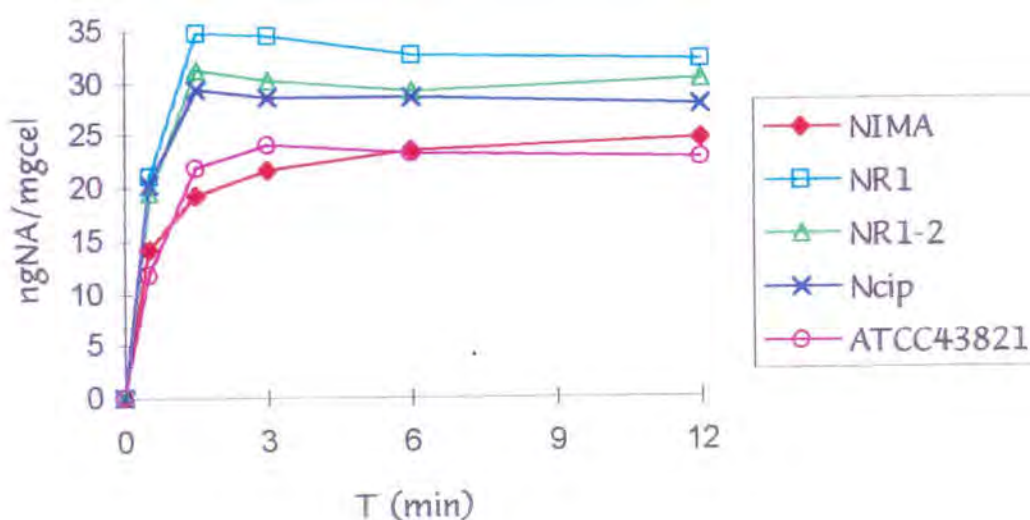


Fig. 4.2.8. Acumulación de ácido Nalidíxico (concentración externa 10  $\mu\text{g/ml}$ ) a pH 7.5.

Este comportamiento podría ser explicado ateniéndonos a las vías preferentes de entrada de las quinolonas. Quinolonas con hidrofobicidad relativamente elevada, tal como el ácido nalidíxico ( $\log P=2$ ), pasan preferentemente a través de la bicapa lipídica; mientras que las quinolonas moderadamente hidrofóbicas, como el ciprofloxacino ( $\log P= -0.974$ ) y el norfloxacino ( $\log P= -1.007$ ) (Ross y cols., 1992; Montero y cols., 1997), atraviesan preferentemente la membrana externa de *Escherichia coli* vía OmpF (proteína de membrana externa) (Hirai *et al.* 1986a).

La cepa Ncip mostró una disminución significativa en la acumulación del HCl-ciprofloxacino; lo que sugiere que este antibiótico utiliza la porina "OmpF-like" (Omp3) para pasar a través de la membrana externa. El bajo peso molecular de estas quinolonas y su existencia como especie zwitteriónica a pH neutro son compatibles con esta posibilidad. Se ha descrito que una alteración en el mecanismo de transporte de la quinolona puede conducir a una disminución de la acumulación intracelular. La pérdida de una proteína

de membrana externa específica es la responsable de una disminución en la entrada o acumulación del principio activo (Cohen y cols., 1989; Hooper y cols., 1989; Piddock y cols., 1991).

El papel de la proteína Omp3 de *S. marcescens* en la captación de la fluoroquinolona (HClciprofloxacino) podría ser corroborada utilizando la cepa UH302 de *E.coli* (mutante deficiente en porinas: OmpF, OmpC y OmpA) y la cepa derivada UH302p73c (portadora de un cósmido que contiene la secuencia de la Omp3 de *S. marcescens*). En la figura 4.2.9 se muestra la acumulación del ciprofloxacino en estas cepas respecto a la cepa salvaje NIMA. (Ruiz y cols., 1999, manuscrito en reparación).

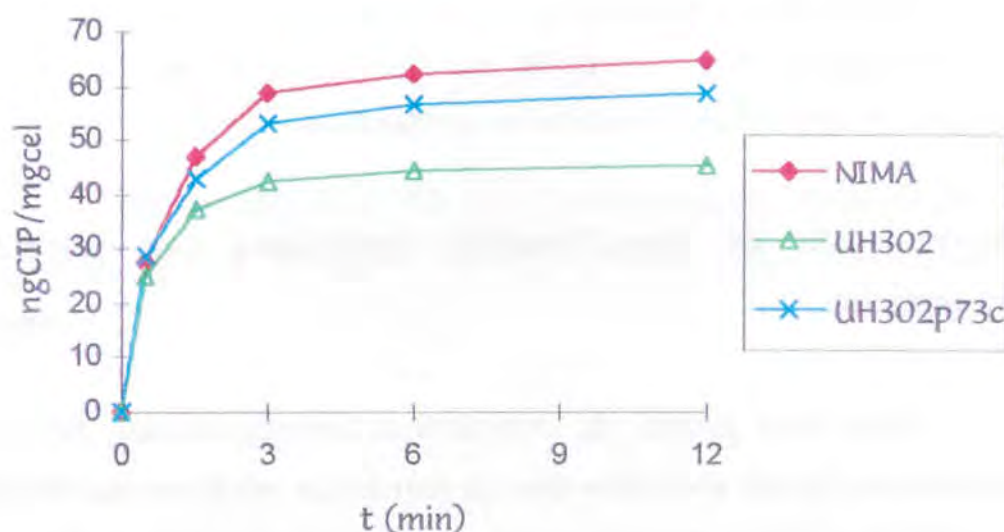


Fig. 4.2.9 Acumulación del clorhidrato de ciprofloxacino (concentración externa 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a pH 7.5.

La cepa NR1, mutante AgO<sup>-</sup> acumula menos fluoroquinolona que la parental. En principio, estas sustancias pasarían preferentemente a través de la membrana externa vía porina, por lo tanto su captación no debería afectarse por modificaciones en la estructura del LPS; Sin embargo, si se hace hincapié en que el LPS juega un papel muy importante en la inserción y trimerización de las porinas (Diedrich y Col, 1990; Sen y Nikaido, 1991), la incorrecta unión o porinas “no funcionales” podría ser responsable de esta acumulación disminuida; esta hipótesis puede reforzarse por la observación de un ligero incremento en la acumulación del mutante NR1-2, revertiente de NR1 (Ag O<sup>+</sup>).

Por otra parte, existe una correlación entre la hidrofobicidad de las quinolonas y su relativa eficacia contra mutantes LPS-deficientes. Las alteraciones en la estructura del LPS afecta significativamente la permeabilidad de la membrana para las quinolonas hidrofóbicas como el ácido nalidíxico, pero no para las quinolonas cuyo coeficiente de partición en octanol/agua es menor a 1.0 (fig. 4.2.7) (Hirai *et al.* 1986b). En el presente estudio se han obtenido resultados similares con el mutante NR1 Ag O<sup>-</sup>.

### Acumulación de ciprofloxacino simultánea con tetraciclina y kanamicina.

Estos tres grupos de antibióticos: aminoglicósidos, tetraciclinas y quinolonas, tienen en común que sus dianas son intracitoplasmáticas, lo cual significa que deben atravesar ambas membranas para alcanzarlas.

Los aminoglicósidos ejercen su acción a nivel de síntesis de proteínas; para llegar a los ribosomas, entran en el citoplasma por un proceso multifactorial dependiente de energía; la fase inicial implica una interacción electrostática independiente de energía con las moléculas de LPS, seguida por dos fases EDPI (*energy dependent phase I*) y EDPII (*energy dependent phase II*) que son dependientes de la energización de la membrana. Nakae y

Nakae (1982), han evidenciado que los aminoglicósidos penetran por la membrana externa de los Gram negativos, tal como *Escherichia coli*, a través de los poros protéicos hidrofílicos (porinas). La transmisión a través de la membrana citoplasmática es claramente dependiente del componente eléctrico ( $\Delta\psi$ ) de la fuerza protón-motriz (Fraimow y cols., 1991). Los aminoglicósidos son transportados activamente a través de la membrana mediante un mecanismo *uniporte*. Tanto la función de las proteínas de transporte como la de los canales protéicos, pueden ser dependientes de la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana. La observación de la captación en vesículas "voltage gated" sugiere que el transportador tiene propiedades de canal (Leviton y cols., 1995).

Las tetraciclinas actúan sobre la síntesis de proteínas. El paso por la membrana externa de *E. coli* implica la difusión pasiva a través de una proteína de membrana externa, preferentemente por la OmpF (Chopra y cols., 1992). La acumulación de tetraciclina es un proceso electroneutro y  $\Delta\text{pH}$ -dependiente (Yamaguchi y cols., 1991; Thanassi y cols., 1995).

En las figuras 4.2.10 y 4.2.11, se muestran la acumulación de ciprofloxacino solo e incubado simultáneamente con tetraciclina y kanamicina.

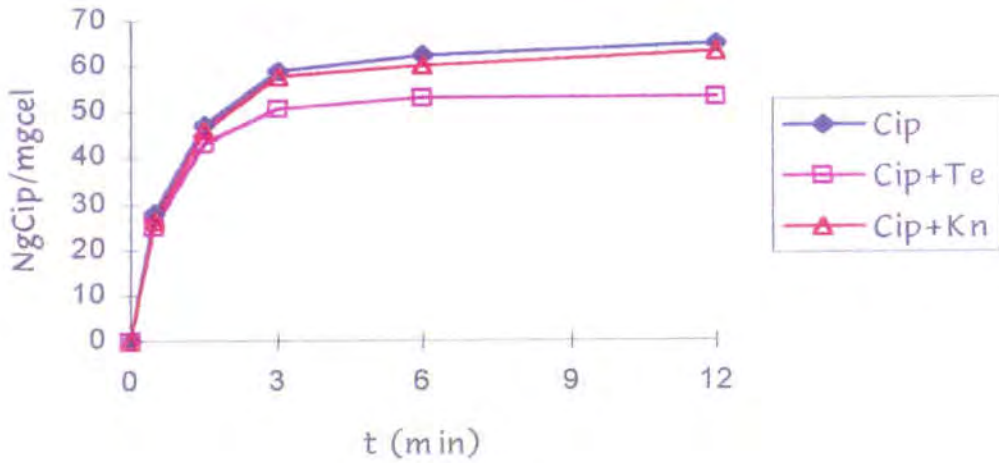


Fig. 4.2.10 Acumulación de ciprofloxacino (cip), concentración externa 10  $\mu\text{g/ml}$ ; ciprofloxacino-tetraciclina (Cip+Te), concentración externa de tetraciclina 20  $\mu\text{g/ml}$  y ciprofloxacino-kanamicina (cip+Kn), concentración de kanamicina externa 20  $\mu\text{g/ml}$ .

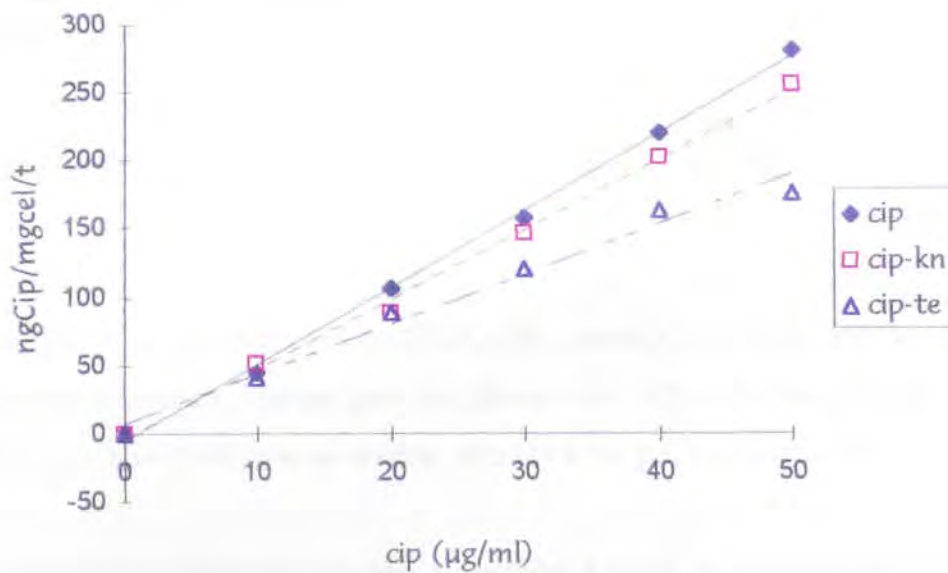


Fig. 4.2.11 Difusión de ciprofloxacino (concentraciones externas crecientes) comparada con la incubación simultánea de ciprofloxacino-tetraciclina (la concentración de tetraciclina fue

la misma en todo el ensayo, 20 µg/ml) y la difusión de ciprofloxacino-kanamicina (en el caso de la kanamicina la concentración también fue de 20 µg/ml) .

En la figura 4.2.10 se observa que la saturación o equilibrio estacionario se alcanza a los pocos minutos de incubación con el ciprofloxacino, pero la acumulación es menor en el caso de la incubación simultánea con la tetraciclina. El resultado se repite en el caso del ensayo de difusión (fig.4.2.11), en el que la velocidad de entrada del ciprofloxacino parece estar disminuida en presencia de la tetraciclina. Las tetraciclinas y las fluoroquinolonas son moléculas que muestran diferentes especies químicas en función del pH, son capaces de formar complejos con los iones  $Mg^{2+}$  existentes en la membrana externa y pasan a través de las porinas (Nikaido y Thanassi, 1993); es posible que exista algún tipo de competencia por el sitio de interacción inicial en la membrana externa. Respecto a la kanamicina no se observa ninguna diferencia en la acumulación respecto al control (sólo ciprofloxacino) a pesar de estar descrito que los aminoglicósidos pueden desorganizar la pared celular, lo que podría contribuir a una mayor entrada de ciprofloxacino (Martin y Beveridge, 1986).

#### **Efecto del ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA) en la acumulación de HCl-ciprofloxacino.**

En la figura 4.2.12 se puede observar la acumulación del HCl-ciprofloxacino tras preincubación de 5 minutos con EDTA 3 mM. Se ha propuesto que el EDTA aumenta la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas quelando los iones  $Mg^{2+}$  que estabilizan las cargas negativas del lipopolisacárido y liberando moléculas de LPS, de tal manera que se produce una reestructuración de los lípidos de la membrana externa con la exposición de zonas de fosfolípidos (Nikaido y Vaara, 1985).

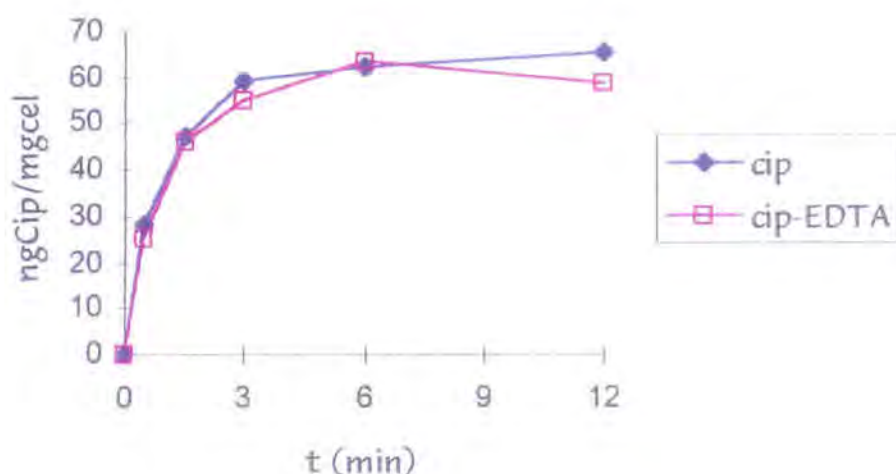


Fig. 4.2.12 Acumulación de HCl-ciprofloxacino sin y con incubación previa de EDTA 3 mM.

La preincubación con EDTA no parece modificar la acumulación de HCl-ciprofloxacino, lo que contradice el aumento de permeabilidad esperado; sin embargo, este resultado está de acuerdo con estudios previos (Marshall y Piddock, 1994). Como en el caso de la incubación simultánea de tetraciclina y HCl-cip, el EDTA podría perturbar de alguna manera la interacción inicial de la quinolona con la superficie de la bacteria.

Aunque el paso de las fluoroquinolonas, como el HCl-ciprofloxacino a través de la membrana externa de *S. marcescens* tiene lugar preferentemente por porina, también parece estar implicada la difusión pasiva a través de zonas lipídicas (Vázquez y cols., 1998; Montero y cols., 1998). En cualquier caso, sea cual sea la vía predominante, las propiedades fisicoquímicas de las quinolonas tales como la lipofilia, ionización o microespecie predominante juegan un papel crucial en la permeabilidad de estos antibióticos. Se ha propuesto que el primer paso del mecanismo de entrada en la célula dependería de una interacción electrostática entre la quinolona y la membrana (Furet y cols, 1992).

### 4.3 EXTRUSIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y COLORANTES EN *Serratia marcescens*: BOMBAS DE REFLUJO

Una baja permeabilidad posiblemente no podría explicar por sí sola niveles significativos de resistencia clínica, de tal manera que sería necesario otro/s mecanismo/s que actuarían de forma sinérgica, este segundo factor podría ser el reflujo de sustancias tóxicas. El número de especies bacterianas en las que se han identificado sistemas de reflujo ha ido aumentando desde los primeros datos referentes a la resistencia debida al reflujo (George y Levy, 1983; George, 1996; Saier y cols., 1998). Se acepta que estas proteínas de reflujo activo de amplio rango de especificidad son frecuentes en bacterias del tipo salvaje (Nikaido, 1994, Ma y cols., 1995, Nikaido, 1998).

En este apartado se examina la acumulación de diferentes antibióticos y del colorante acriflavina en presencia de inhibidores metabólicos en la cepa Ncip, quinolona-resistente, comparándola con *Serratia marcescens* NIMA quinolona-sensible, para demostrar la existencia de bombas de reflujo en *S. marcescens* y su papel en la resistencia a los agentes antibacterianos.

En el perfil de OMPs de la figura 4.2.1 del apartado 4.2, se puede observar que el mutante Ncip carece de una proteína que bandeja en la zona de la *OmpF-like* u *Omp3* (Puig y cols., 1993; Hutsul y Worobe, 1997) y una proteína de membrana externa cuyo peso molecular aparente es de 52.3 kDa, que podría corresponder a una proteína perteneciente a un sistema de reflujo, (Guymon y cols., 1978; Masuda y cols., 1995; Charvalos y cols., 1995; Hagman y cols., 1995) si la comparamos con la cepa parental.

En la tabla 4.3.1, se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias a diferentes compuestos, los cuales se han descrito como posibles substatos de la bomba de reflujo AcrAB o MexAB-OprM descrita en



*E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (Nikaido, 1996; George, 1996).

Tabla 4.3.1. MIC's ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la cepa salvaje y la cepa mutante espontáneo resistente al ciprofloxacino.

| Antibióticos      | NIMA | Ncip |
|-------------------|------|------|
| Ciprofloxacino    | 0.06 | 30   |
| Ácido nalidíxico  | 5    | 60   |
| Novobiocina       | 25   | >500 |
| Eritomicina       | 60   | 80   |
| Tetraciclina      | 14   | 30   |
| Estreptomocina    | 15   | 15   |
| Kanamicina        | 8    | 15   |
| Gentamicina       | 5    | 5    |
| Cloranfenicol     | 7    | 50   |
| Bromuro de etidio | 0.5  | 2    |
| Acridina          | 30   | >150 |
| Cristal violeta   | 5    | 6    |

El mutante espontáneo ciprofloxacino-resistente Ncip, muestra resistencia cruzada a otros compuestos excepto para los aminoglicósidos.

### Acumulación de ciprofloxacino en presencia de cianuro potásico (KCN)

Los inhibidores metabólicos actúan a diferentes niveles desacoplando o impidiendo indirectamente la fosforilación oxidativa. Entre éstos destacaremos: el ionóforo valinomicina, que actúa como un "vehículo" a favor de gradiente, abriendo canales para los iones  $\text{K}^+$ , con lo que disipa la

diferencia de potencial eléctrico; la nigericina, afecta específicamente sobre el  $\Delta pH$  ya que intercambia iones  $H^+$  por iones  $Na^+$ ; el cianuro ( $CN^-$ ) que bloquea la cesión de electrones del complejo de la citocromo oxidasa al  $O_2$ . Los protonóforos 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) y el carbonil-cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) que permeabilizan la membrana a los  $H^+$ . En todos los casos el efecto que ese obtiene es la desenergización de la membrana.

En la figura 4.3.1, se muestra la acumulación del ciprofloxacino en presencia del inhibidor metabólico KCN, en *S. marcescens* NIMA y el mutante Ncip.

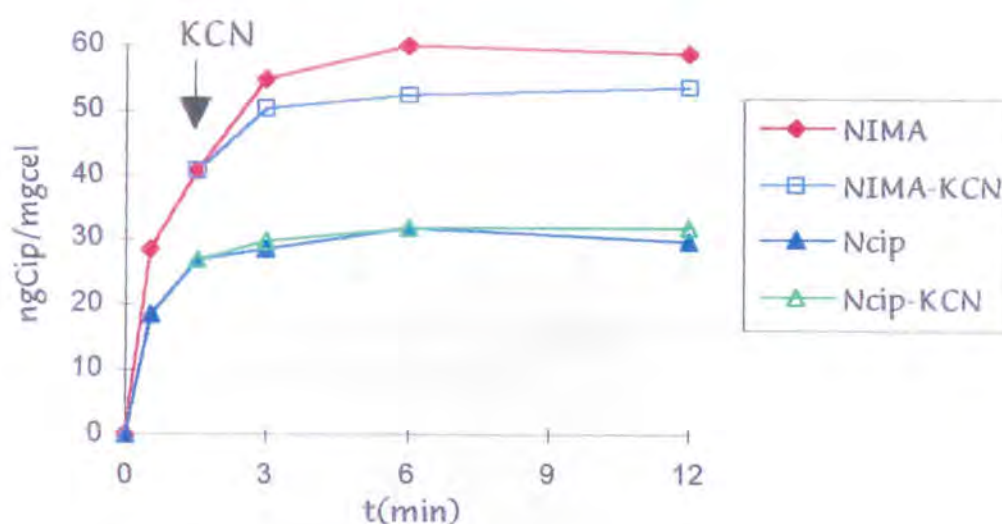


Fig. 4.3.1 Acumulación de ciprofloxacino (concentración externa  $10\mu g/ml$ ). Concentración final de inhibidor metabólico KCN 2 mM.

El KCN no afecta significativamente a la acumulación del ciprofloxacino. Las bombas de reflujó, son sistemas que bombean antibióticos, colorantes y detergentes hacia el exterior de la célula acoplado la transducción de energía (libre), lo que sugiere que actúa como *antiporte* sustancia/ $H^+$  (Ma y cols., 1994; Nikaido, 1994; Paulsen y cols., 1996). El mantenimiento del gradiente de protones podría explicar la no

modificación de la acumulación de ciprofloxacina por el KCN.

### Acumulación de quinolonas en presencia de protonóforos

En la figura 4.3.2, se muestra la acumulación del ciprofloxacino en presencia del 2,4-DNP en las cepas NIMA y Ncip.

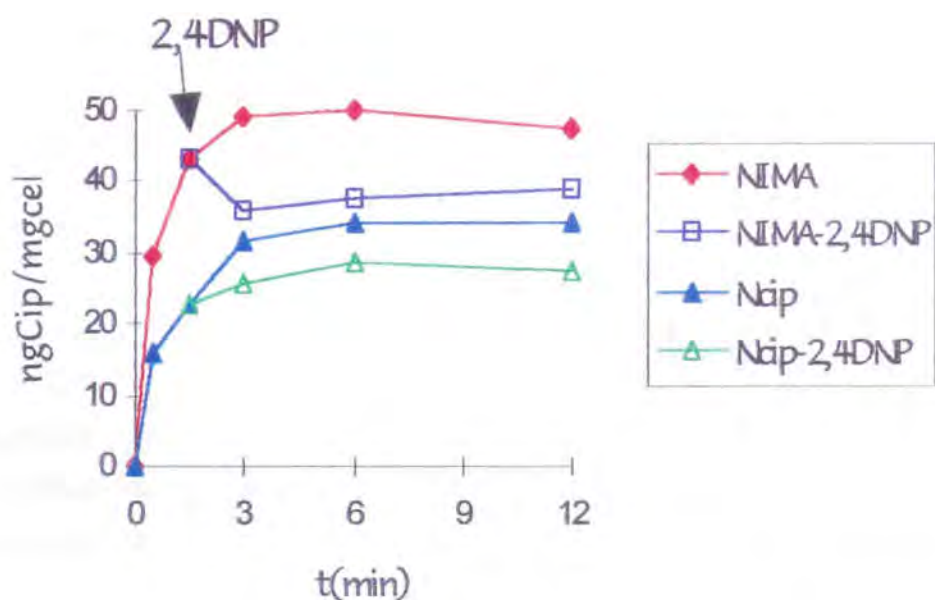


Fig. 4.3.2 Acumulación de ciprofloxacino (concentración externa 10  $\mu\text{g/ml}$ ). La concentración final de inhibidor metabólico 2,4DNP fue de 1mM.

La acumulación de ciprofloxacino en presencia del 2,4-DNP no sólo no aumenta sino que disminuye. Sin embargo, este resultado puede ser debido a la elevada concentración de inhibidor metabólico, que podría favorecer la formación de complejos o alterar la acumulación del antibiótico (Nikaido y Thanassi, 1993).

En la figura 4.3.3 y 4.3.4, se muestra la acumulación del ciprofloxacino y ácido nalidíxico respectivamente, en presencia del protonóforo CCCP.

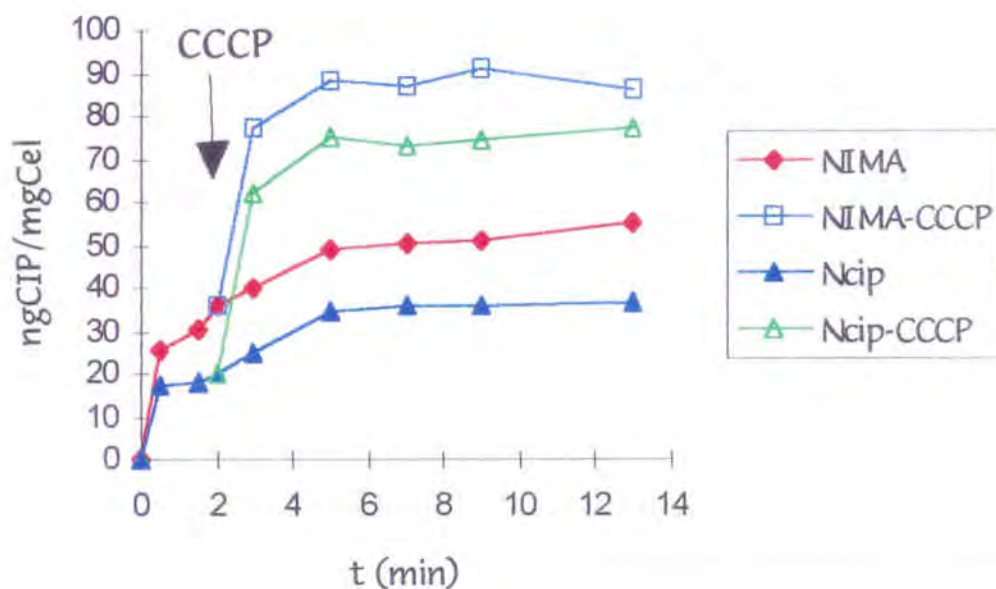


Fig. 4.3.3 Acumulación de ciprofloxacino (concentración externa  $10\mu\text{g/ml}$ ). Inhibidor metabólico CCCP (concentración final  $100\mu\text{M}$ ).

Cuando las células son desenergizadas con el protonóforo CCCP, se observa un incremento en la acumulación del ciprofloxacino que podría ser debida a la inhibición de un sistema de reflujo dependiente de la fuerza protón-motriz. La utilización del inhibidor metabólico CCCP, sería por lo tanto más adecuada para el estudio de la inhibición de los sistemas de bombas de reflujo porque al utilizarse a concentraciones bajas su presencia no afectaría de forma directa al antibiótico (Nikaido y Thanassi, 1993).

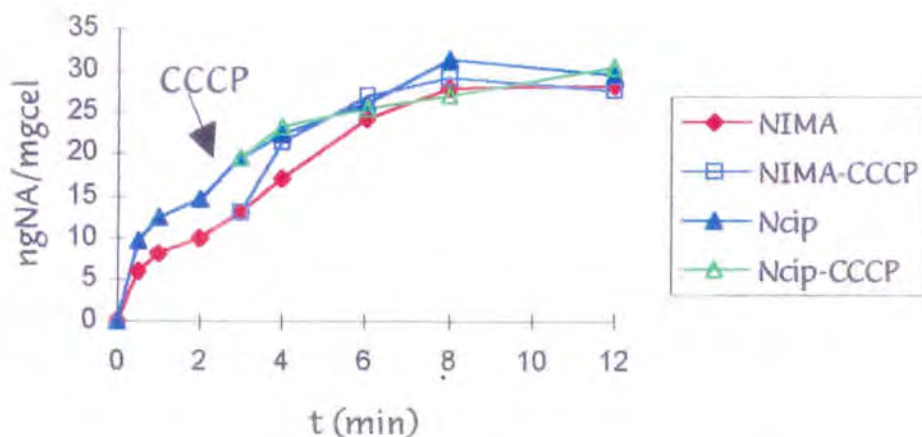


Fig. 4.3.4 Acumulación de ácido nalidíxico (concentración final externa 10  $\mu\text{g/ml}$ ). El inhibidor metabólico, 100  $\mu\text{M}$  CCCP.

En los ensayos fluorimétricos de reflujo se observa que tras la inhibición con el CCCP las concentraciones intracelulares alcanzan valores similares entre la cepa parental y la mutante.

En el caso del ácido nalidíxico, la presencia del inhibidor metabólico no parece afectar significativamente la acumulación respecto a las células no desenergizadas. Por tanto, en principio, el ácido nalidíxico no constituiría un sustrato para la bomba de reflujo de *S. marcescens*.

### Acumulación de tetraciclina

Las tetraciclinas entran en la bacteria a través de la membrana externa de *E. coli* preferentemente a través de la porina OmpF (Chopra y

cols.,1992). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por fluorimetría. Como puede observarse en la figura 4.3.5, la pérdida de una porina de membrana externa en el mutante Ncip, se traduce en una disminución de la acumulación de tetraciclina respecto a la cepa salvaje. En esta figura también se puede observar el efecto del CCCP en la acumulación de tetraciclina.

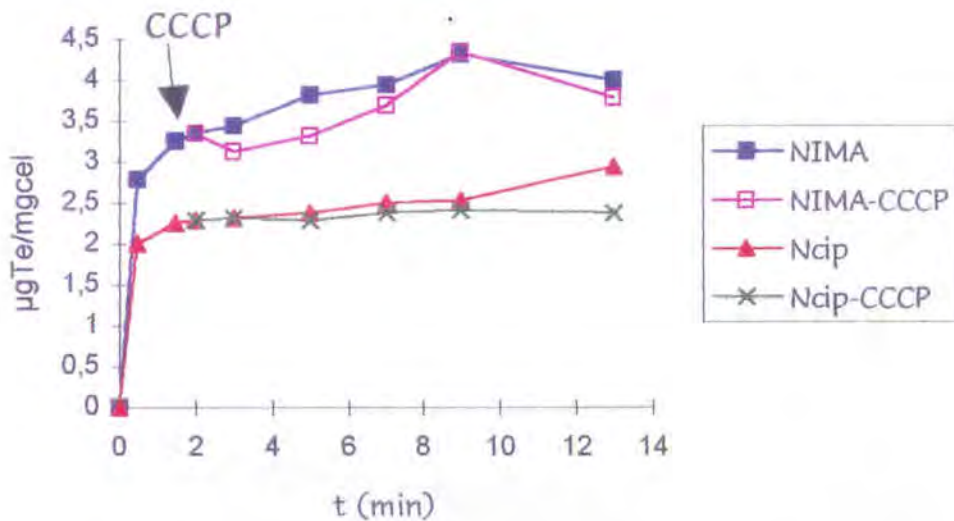


Fig. 4.3.5 Acumulación de Tetraciclina (concentración externa 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El inhibidor metabólico se añadió transcurridos 3 minutos de incubación con el antibiótico.

La incubación en presencia de CCCP no está seguida de un aumento de la acumulación de tetraciclina. La adición del inhibidor CCCP, inhibe el reflujo pero también la entrada debido a la disipación del  $\Delta\text{pH}$  a través de la membrana interna (Yamaguchi y cols., 1991; Chopra y cols.,1992), de manera que, el resultado final neto es la invarianza de la acumulación. Estos resultados coinciden con estudios realizados en *E. coli* (Thanassi y cols., 1995).

## Acumulación de acriflavina

Los colorantes antibacterianos incluyen el grupo del trifenilmetano (cristal violeta) y las acridinas que son activas frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las acridinas pueden unirse a diferentes estructuras de la célula bacteriana, la más importante de las cuales es el DNA, donde las moléculas de acridina se intercalan entre las hebras de la doble hélice. En *S. marcescens* la acumulación de acriflavina después de la inhibición de las células con CCCP, conduce a un aumento de acriflavina acumulada intracelularmente (Fig. 4.3.6).

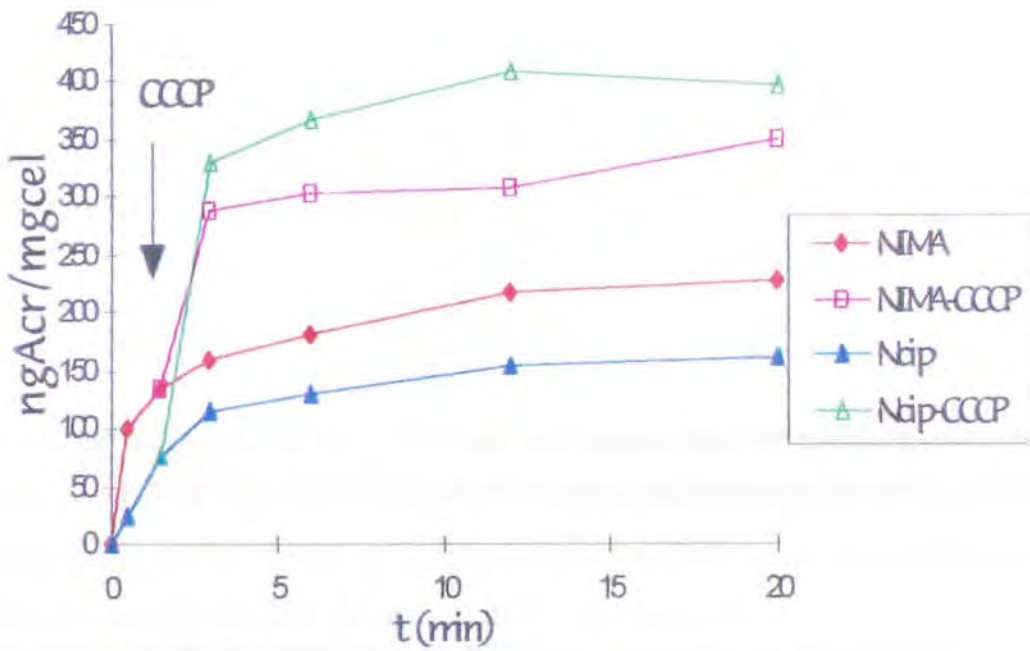


Fig. 4.3.6 Acumulación de acriflavina (concentración externa 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Inhibidor metabólico CCCP (concentración final 100  $\mu\text{M}$ ), el cual se añadió transcurridos 3 minutos de incubación con la acriflavina.

Como se ha podido observar en las figuras anteriores, parece que tanto la cepa salvaje NIMA como el mutante ciprofloxacino-resistente Ncip, podrían contener un sistema de reflujo dependiente de la fuerza protón-motriz, *antiporte* substancia/H<sup>+</sup> .

La concentración intracelular de las quinolonas u otro agente antibacteriano sería el resultado de un equilibrio entre el influjo y el reflujo. Una tasa de penetración lenta de los agentes antibacterianos a través de la membrana externa haría del reflujo un mecanismo de extrusión de substancias efectivo (Ma y cols,1994).

La cepa mutante Ncip, muestra resistencia cruzada a otros compuestos no relacionados ni estructuralmente ni funcionalmente con las quinolonas, lo que podría ser debido a la disminución de la permeabilidad y a un sistema de reflujo que actuaría conjuntamente. Sin embargo la susceptibilidad a los aminoglicósidos en el mutante Ncip no varía respecto a NIMA. Estudios con estos antibióticos no han evidenciado su extrusión de la célula por un sistema de reflujo (Ma y cols., 1993; Ma y cols., 1994; Ma y cols., 1995).

El aumento de la expresión de estas bombas, bien por mutaciones en los genes reguladores o bien por una respuesta fisiológica, aumenta la MIC de un compuesto a niveles que puede ser de relevancia clínica; por ejemplo, la sobreproducción del sistema MexAB-OprM en *Pseudomonas aeruginosa*, aumenta de 8 a 32 veces más la MIC al ciprofloxacino respecto la cepa salvaje (Nikaido, 1998).

La presencia de bombas de reflujo puede conducir al desarrollo de cepas de resistencia moderada a antibióticos diferentes al que se ha utilizado para la selección, poniendo en peligro la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa por substancias alternativas.



#### 4.4 CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Serratia marcescens* RESISTENTES AL CIPROFLOXACINO, SELECCIONADOS *IN VITRO*

Las quinolonas son antibióticos de amplio uso terapéutico, disponibles para el tratamiento de pacientes aquejados con diferentes tipos de infecciones, tales como las del tracto urinario, respiratorio, gastrointestinal, enfermedades de transmisión sexual y osteomielitis crónica; sin embargo, la aparición de resistencias puede constituir un serio problema clínico. La resistencia a las fluoroquinolonas está mediada cromosómicamente y se adquiere por mutaciones en varios genes que gobiernan la DNA-girasa, la permeabilidad bacteriana y/o el reflujo activo del antibiótico (Nikaido, 1994; Piddock, 1995; Zeller y cols., 1997; Drlica y Zhao, 1997).

Los principales factores que contribuyen a la elevada variabilidad en la resistencia dependen de la política de administración de antibióticos, características del paciente, origen de las cepas y localización geográfica (Johnson, 1997).

Durante los últimos años se han observado resistencias a las fluoroquinolonas en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilin-resistentes; en aislados nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. También es preocupante la aparición de resistencias en bacterias responsables de infecciones adquiridas en la comunidad, tales como las provocadas por *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Neisseria gonorrhoeae* (Ball, 1990; Watanabe y cols., 1990; Howard y cols., 1990; Endtz y cols., 1991; Aubert y cols., 1992; Tapsall y cols., 1996; Vila y cols., 1997).

El objetivo de este apartado fue la caracterización de los mutantes espontáneos resistentes al clorhidrato de ciprofloxacino (HCl-ciprofloxacino)

obtenidos *in vitro*, para ello se utilizó como cepa salvaje *Serratia marcescens* NIMA, y dos metodologías, en medio sólido y medio líquido.

**Selección *in vitro* de mutantes resistentes a las fluoroquinolonas, tales como el ciprofloxacino en *S. marcescens*.**

La cepa parental de *S. marcescens* NIMA fue utilizada para la obtención de mutantes espontáneos resistentes al clorhidrato de ciprofloxacino. La frecuencia de mutación, la concentración del agente seleccionador para los mutantes obtenidos en el primer, segundo y tercer paso (NI, NII y NIII, respectivamente) se muestran en la tabla 4.4.1.

Tabla 4.4.1. Pasos de selección de mutantes resistentes a quinolona

| Paso            | UFC/ml<br>iniciales | Agente<br>seleccionador<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | UFC/ml | Frecuencia<br>aislamiento<br>mutantes | Clon |
|-----------------|---------------------|---|--------|---------------------------------------|------|
| 1 <sup>er</sup> | $2.1 \times 10^9$   | HCl-Cip (0.6)                                   | 20     | $8 \times 10^{-9}$                    | NI   |
| 2 <sup>o</sup>  | $1.8 \times 10^9$   | HCl-Cip(3.5)                                    | 117    | $6 \times 10^{-8}$                    | NII  |
| 3 <sup>er</sup> | $1.9 \times 10^9$   | HCl-Cip (15)                                    | 240    | $1,2 \times 10^{-7}$                  | NIII |

La frecuencia de aislamiento de mutantes a las fluoroquinolonas es baja, entre  $10^{-6}$  a  $10^{-11}$ , dependiendo de la especie bacteriana, del compuesto y concentración de antibiótico (Cullman y cols., 1985; Limb y cols., 1987; Wolfson y Hooper, 1989b; Watanabe y cols., 1990; Heising y Tschorny, 1994; Goldstein y Acar, 1995). En nuestro caso, la frecuencia de aislamiento de mutantes de NIMA obtenido en el primer paso de selección (en medio sólido), utilizando 10 veces la MIC al ciprofloxacino, fue de  $8 \times 10^{-9}$ ; mientras que para la misma concentración de antibiótico no se obtuvo

ningún mutante en *E. coli*, lo que corrobora las observaciones de Watavale y cols., (1990), en las que algunas cepas de *Enterobacter cloacae* y *S. marcescens* adquieren resistencias a las fluoroquinolonas con mayor frecuencia que *E. coli*.

La cepa Ncip, mutante de elevada resistencia al ciprofloxacino, se obtuvo mediante la exposición creciente al clorhidrato de ciprofloxacino en medio líquido.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC's) de los mutantes obtenidos se muestran en la tabla 4.4.2.

Tabla 4.4.2. MIC's ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la cepa salvaje y los mutantes seleccionados

|         | NIMA | NI | NII | NIII | Ncip |
|---------|------|----|-----|------|------|
| HCl-Cip | 0.06 | 3  | 5   | 40   | 30   |
| Cl      | 7    | 40 | 40  | 40   | 50   |
| Te      | 14   | 40 | 40  | 40   | 30   |
| Kn      | 8    | 10 | 10  | 10   | 15   |
| E       | 60   | 70 | 80  | 80   | 80   |
| Cv      | 5    | 5  | 10  | 10   | 6    |
| Acr     | 35   | 80 | 100 | >150 | >150 |

Abreviaturas: HCl-Cip (clorhidrato de ciprofloxacino); Na (ácido nalidíxico); Cl (cloranfenicol); Te (tetraciclina); Kn (kanamicina); E (eritromicina); Cv (cristal violeta); Acr (acriflavina)

Según el perfil fenotípico de susceptibilidad a los diferentes antibióticos y colorantes ensayados, los mutantes NIII y Ncip serían semejantes. A pesar de que el agente selectivo es el HCl-ciprofloxacino, se puede observar que ya el mutante de primer paso (NI), muestra resistencia cruzada a los diferentes compuestos ensayados. El mutante NII no presenta un aumento drástico en la resistencia respecto al mutante NI. Evidentemente, el mayor cambio se observa con el HCl-ciprofloxacino (mutantes NIII y Ncip), ya que se ha utilizado este antibiótico para la obtención de los mutantes resistentes.

### Características de crecimiento bacteriano de los mutantes obtenidos (tiempo de duplicación)

Las alteraciones cromosómicas que conducen a la resistencia a las quinolonas pueden modificar las funciones celulares. Se ha observado que algunas cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*, con alguna mutación de resistencia tienden a crecer más lentamente en medios convencionales de laboratorio que sus cepas parentales (Hashmi y Smith, 1991; Hooper y Wolfson, 1993).

Para observar si la acumulación de mutaciones afectaba al crecimiento bacteriano se calculó el tiempo de duplicación a partir de las curvas de crecimiento (fig. 4.4.1). Los tiempos de duplicación de las diferentes cepas ensayadas fueron: 34.6; 36.4; 63; 70.7 y 74.0 min para NIMA, NI, NII, NIII y Ncip, respectivamente. El mutante NI mostró un tiempo de duplicación similar a la salvaje; mientras que los clones NIII y Ncip fueron superiores al de NIMA, pero semejantes entre ellos.

Se ha observado que mutaciones en *gyrA* no sólo afectarían al mecanismo de acción de las quinolonas, inhibición del enzima diana, sino también a la función enzimática de la girasa. La girasa es fundamental para

mantener el grado de superenrollamiento del DNA dentro de la célula. Cambios en el grado de superenrollamiento originan efectos pleiotrópicos en la expresión de genes no relacionados (Drlica, 1992).

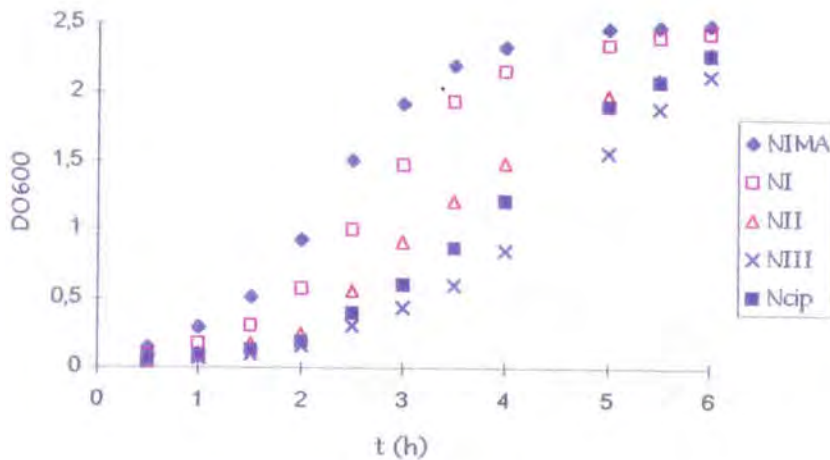


Fig. 4.4.1 Curvas de crecimiento, realizadas en TSB a 37 °C con agitación.

### Perfil de proteínas de membrana externa y lipopolisacárido

Las proteínas de membrana externa de la cepa salvaje y de los mutantes fueron aisladas y separadas electroforéticamente, utilizando un gel de acrilamida al 12 % con urea 4 M. Los resultados se muestran en la Figura 4.4.2. Como puede apreciarse en el gel, los mutantes difieren de la cepa parental en la ausencia de la proteína que bandeja en la zona de la "OmpF-like" (Omp3) de *S. marcescens* y una proteína de peso molecular aparente de 52.3 kDa.

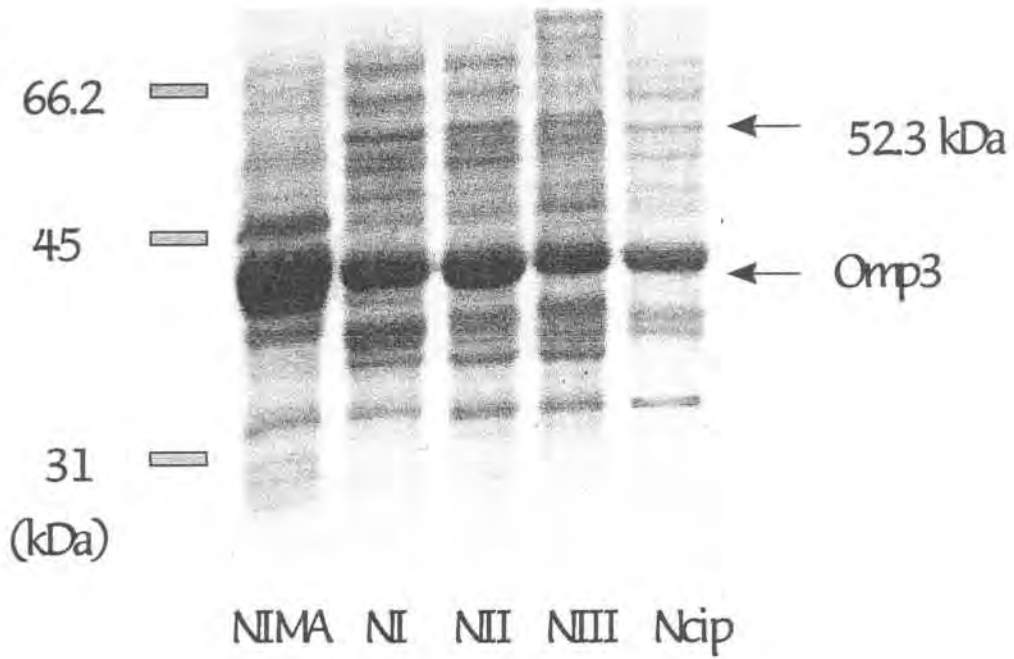


Fig. 4.4.2 Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de la cepa parental NIMA y los mutantes seleccionados *in vitro*. Las fechas indican la posición que ocuparía la proteína Omp3 y la proteína de 52.3 kDa de *S. marcescens*.

En la figura 4.4.3, se muestra el perfil de lipopolisacárido de la cepa salvaje y de los mutantes espontáneos. En todos los casos, se mantiene la estructura característica: lípido A, core y antígeno O; y no difieren entre ellos visualmente.

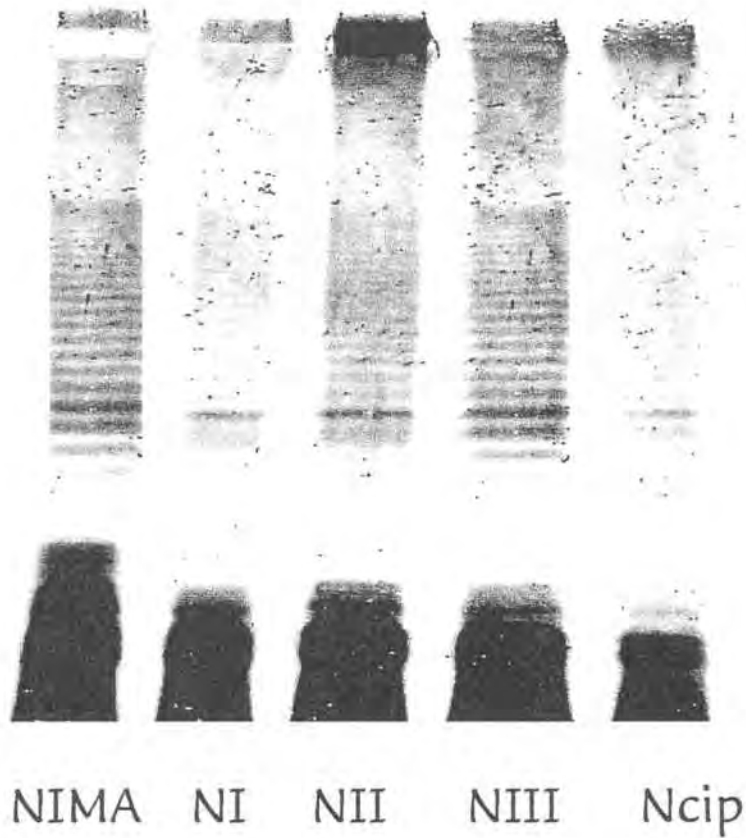


Fig. 4.4.3 Perfil de lipopolisacárido de *S. marcescens* NIMA y los mutantes derivados en un gel SDS-PAGE de acrilamida 15%, utilizándose la tinción de plata para la visualización de las bandas.

### Acumulación de quinolona

Los resultados de la acumulación de HCl-ciprofloxacino y ácido nalidíxico se muestran en las figuras 4.4.4 y 4.4.5.

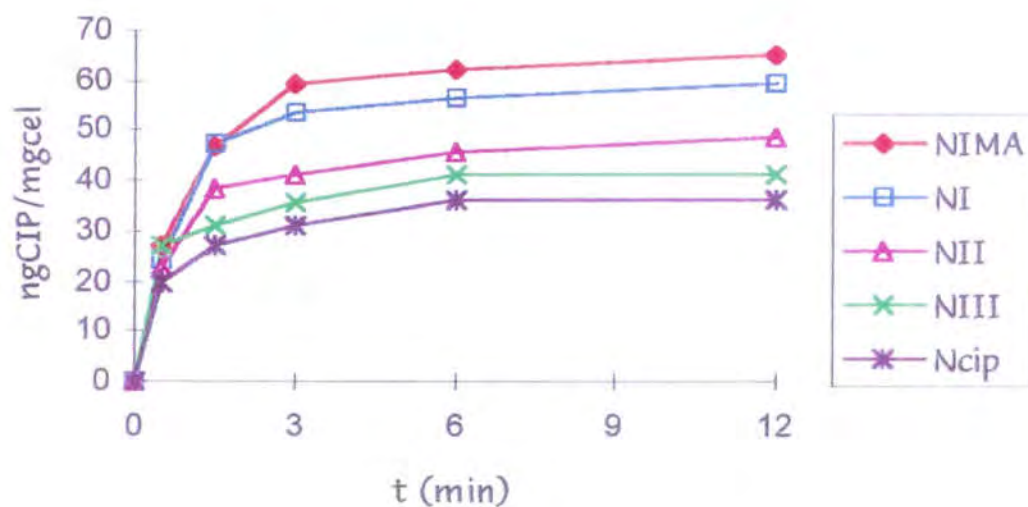


Fig. 4.4.4 Acumulación de HCl-cip. Concentración final 10  $\mu\text{g/ml}$ .

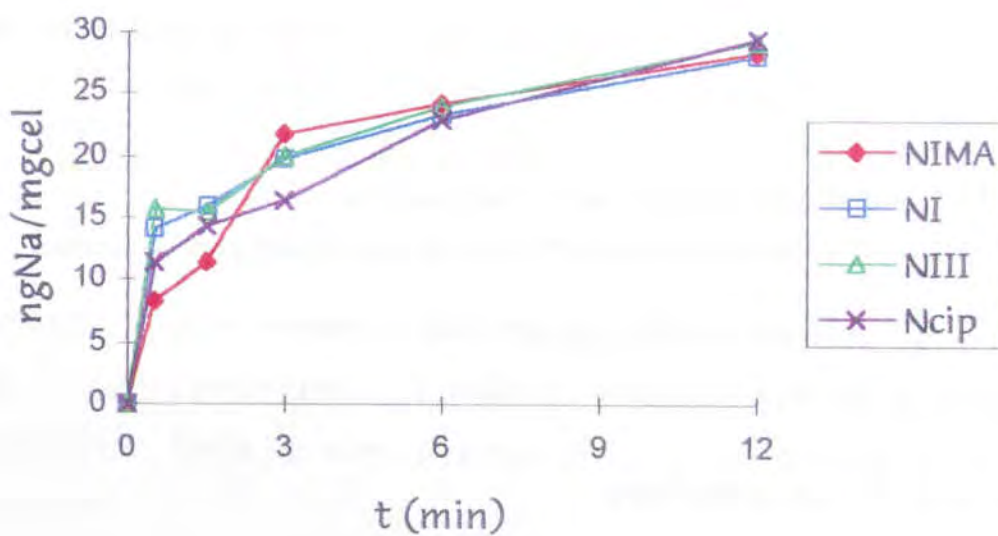


Fig. 4.4.5 Acumulación de ácido nalidíxico. Concentración final 10  $\mu\text{g/ml}$ .



Ambas quinolonas alcanzaron una concentración estacionaria a los pocos minutos de incubación con el antibiótico. Respecto al ácido nalidíxico no se observan diferencias significativas en la acumulación; mientras que para el ciprofloxacino si se aprecian algunas diferencias en la acumulación. Se ha descrito que la utilización del ciprofloxacino como agente seleccionador en el primer paso, parece favorecer la obtención de mutantes de permeabilidad con una disminución de porina (OmpF en *E. coli*), mientras que el ácido nalidíxico favorecería mutaciones en *gyrA* (Heising y Tschorny, 1994). La mayor acumulación de ciprofloxacino se obtuvo en la cepa NIMA, el mutante NI acumuló ligeramente menos; sin embargo la acumulación de este agente antibacteriano está claramente disminuida en los mutantes de elevada resistencia NIII y Ncip.

La desenergización de las células en presencia del protonóforo CCCP aumenta la acumulación de ciprofloxacino en NI, NIII y Ncip a niveles comparables a los de NIMA (fig. 4.4.6).

Todo esto, pone de manifiesto que la acumulación de ciprofloxacino es el resultado del equilibrio entre la entrada y la salida del antibiótico y que la disminución de la permeabilidad hace del mecanismo de reflujo un sistema efectivo de eliminación de sustancias tóxicas presentes en el citoplasma.

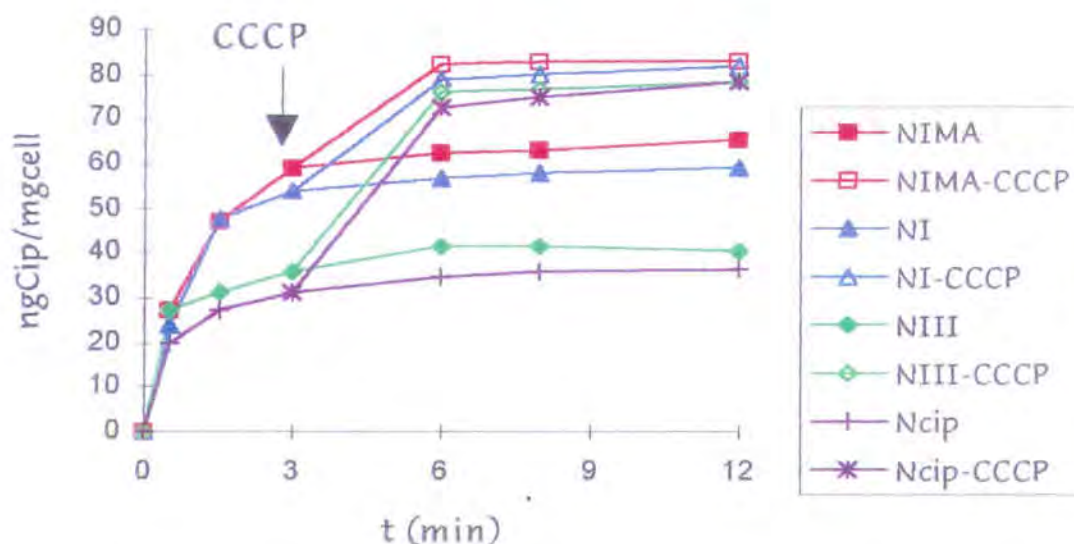
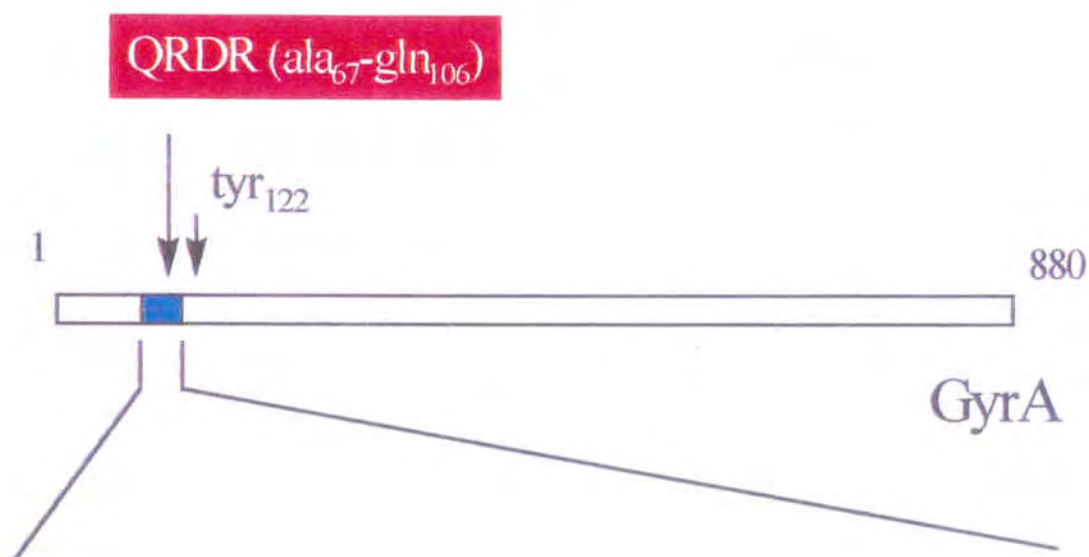


Fig. 4.4.6 Acumulación de HCl-ciprofloxacino (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de concentración externa) de NIMA, NI, NII y Ncip, sin y con el protonóforo CCCP (100  $\mu\text{M}$ ).

### Identificación de mutaciones en la subunidad A de la DNA-girasa de los mutantes espontáneos obtenidos

Se identificaron las posibles alteraciones existentes en los mutantes seleccionados *in vitro* respecto a la cepa salvaje de un fragmento comprendido entre los aminoácidos 67 y 106 de la subunidad A de la DNA girasa, que corresponde a la región designada QRDR (*quinolone resistance determining region*) (Yoshida y cols., 1990; Heising y cols., 1993; Ouabdesselam y cols., 1995).

En la figura 4.4.7, se presentan las secuencias de la región QRDR de los fragmentos de PCR amplificados del gen *gyrA* de las cepas estudiadas.



ala<sub>67</sub> arg val val gly asp val ile gly lys tyr his pro his gly  
 GCC-CGT-GTC-GTC-GGG-GAC-GTG-ATC-GGT-AAA-TAT-CAC-CCG-CAC-GGT-

asp ser<sub>83</sub> ala val tyr asp thr ile val arg met ala gln pro phe  
 GAC-AGC-GCG-GTT-TAC-GAC-ACT-ATC-GTG-CGT-ATG-GCT-CAG-CCG-TTT-

arg  
 AGA

asn  
 AAC

ser leu arg tyr met leu val asp gly gln<sub>106</sub>  
 TCA-CTG-CGC-TAC-ATG-CTG-GTG-GAC-GGT-CAG

(*S.marcescens* NIMA)

(NI)

(NII)

(NIII)

(Ncip)

Fig. 4.4.7 Secuencia de la región conservada (QRDR) de la subunidad A de la DNA girasa implicada en la resistencia a las quinolonas en las cepas NIMA, NI, NII, NIII y Ncip.

En la tabla 4.4.3, se resumen los cambios observados en la región QRDR de la subunidad A de la DNA girasa de NIMA, NI, NII, NIII y Ncip; así como sus MIC's al clorhidrato de ciprofloxacino.

Tabla 4.4.3. Estudio del fragmento QRDR de la GyrA y MIC's de las cepas estudiadas.

| <i>S. marcescens</i> | MIC (cip en µg/ml) | aa substituido en QRDR                |
|----------------------|--------------------|---------------------------------------|
| NIMA                 | 0.06               | ninguno (*)                           |
| NI                   | 3                  | ninguno (*)                           |
| NII                  | 5                  | ninguno (*)                           |
| NIII                 | 40                 | Ser <sub>83</sub> a Arg <sub>83</sub> |
| Ncip                 | 30                 | Asp <sub>82</sub> a Asn <sub>82</sub> |

(\*) La secuencia de la región QRDR de la GyrA de la cepa NIMA de *S. marcescens*, NI y NII coincidió con la descrita por Hoon y cols., (1998).

Estudios realizados *in vitro* con *E. coli* muestran como una única mutación en *gyrA* provoca una disminución de la susceptibilidad a las fluoroquinolonas (Willmott y Maxwell, 1993), sin embargo, en cepas de elevada resistencia está asociada a dos substituciones en la secuencia de aminoácidos en la proteína GyrA (Heising y cols., 1993; Conrad y cols., 1996). Aunque otros factores adicionales como mutaciones en la subunidad ParC de la topoisomerasa IV y la disminución de la acumulación intracelular juegan también un papel complementario en la resistencia (Vila y cols., 1996). En otras especies como *S. marcescens*, sin embargo, la resistencia elevada a las quinolonas puede estar asociada a un único cambio en la secuencia QRDR de la subunidad A de la DNA girasa (Oppegaard y Sorum, 1996; Jalal y Wretlind, 1998; Weigel y cols., 1998). También en *S.*

*marcescens* la resistencia elevada a las fluoroquinolonas puede conseguirse por mutación puntual en otra posición a parte de la Ser 83 (Weigel y cols., 1998), resultado que coincide con el obtenido en este estudio.

El tiempo de duplicación en el mutante NI y la cepa parental es similar. El perfil de proteínas de membrana externa de la cepa NI presenta una disminución en una proteína de membrana externa y una sobreexpresión de una proteína de peso molecular aparente de 52.3 kDa respecto a la cepa parental. Las MIC a las quinolonas y otros agentes antimicrobianos no relacionados son superiores en NI si los comparamos con NIMA. Se ha observado una reducción en la acumulación de ciprofloxacino, y existencia de un mecanismo de reflujos en el mutante de primer paso, que sin embargo no presenta alteración de la GyrA. Dadas las características fenotípicas estudiadas, el mutante NI podría pertenecer a los mutantes descritos *cfxB*, *nfxB*, *norB*, *norC* o *nfxC* (Hirai y cols., 1986; Hooper y cols., 1989; Hooper y cols., 1992), los cuales comparten las siguientes características: (i) presentan resistencia pleiotrópica a las quinolonas y otros compuestos no relacionados estructuralmente como la tetraciclina y el cloranfenicol; (ii) se da una disminución aparente de una proteína de membrana externa; y (iii) se da una acumulación disminuida de quinolona (Hooper y Wolfson, 1993). Otro tipo de mutantes que también conducen a una reducción de una porina y resistencia a otros antibióticos son los mutantes *marA*. (Cohen y cols., 1988; Cohen y cols., 1989; Hächler y cols., 1991; Cohen y cols., 1993; Miller y cols., 1994).

El mutante Ncip fue casi idéntico al NIII en las características examinadas en este trabajo (OMP, acumulación de ciprofloxacino, susceptibilidad a los diferentes agentes antibacterianos, tiempo de duplicación y alteración de la DNAGirasa). Sin embargo, la técnica de selección utilizada no nos permite determinar el orden de las mutaciones

individuales que hayan tenido lugar.

Los datos del presente estudio demuestran que la concentración final de ciprofloxacino intracelular refleja el equilibrio entre la entrada y el reflujo. Una disminución de la permeabilidad del agente antibacteriano podría hacer del sistema de reflujo un mecanismo efectivo de resistencia, como puede observarse en la serie de mutantes obtenidos. Sin embargo, los mutantes NIII y Ncip, deben su elevada MIC al ciprofloxacino por la acción conjunta de la permeabilidad-reflujo y la alteración de la DNA girasa, la cual es fundamental para la adquisición de elevados niveles de resistencia.

Los mutantes seleccionados *in vitro* con una sola mutación cromosómica, raramente son 10 veces más resistentes que la cepa parental y sus MIC's, suelen estar normalmente dentro del rango de susceptibilidad. Para obtener una resistencia de relevancia clínica, la mayoría de los microorganismos deben estar sometidos a sucesivas exposiciones al antibiótico por lo que parece darse una adquisición de mutaciones múltiples (Heising y Tschorny, 1994).

Debido a las propiedades farmacocinéticas de estos antibióticos, la concentración que se alcanza en el lugar de infección suele exceder a las MIC's de los microorganismos infectantes. Sin embargo un uso desmesurado en la agricultura/ganadería (medidas de profilaxis y engorde) y de la comunidad (autoconsumo y cese del tratamiento antes de la total erradicación de la infección), puede conducir a concentraciones de antibiótico en el individuo tratado que son seleccionadoras de microorganismos resistentes y no "eliminadoras", con el consiguiente aumento de la incidencia de la resistencia a las fluoroquinolonas en algunas áreas geográficas (Aguilar y cols, 1992).

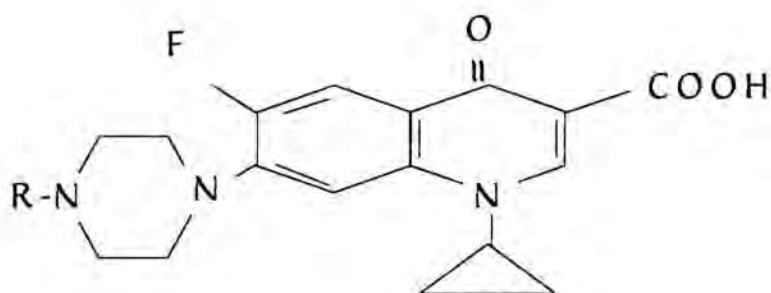
## 4.5 ACUMULACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD DE LOS DERIVADOS ALQUÍLICOS DEL CIPROFLOXACINO EN *Serratia marcescens*.

Las quinolonas están englobadas en una familia de antimicrobianos que son motivo de amplio estudio: relaciones entre la estructura y la actividad (Domagala y cols., 1989; Shen y cols., 1989; Bryskier y Chantot., 1995), síntesis de nuevos compuestos (Fukuda y cols., 1998), así como la reducción de los efectos indeseables y la resistencia que producen (Yoshida y cols., 1990; Zhao y cols., 1997; Pan y Fisher, 1997; Pan y Fisher, 1998).

Las quinolonas para interaccionar con la DNA-girasa deben atravesar las envueltas celulares. Al aumentar la longitud de la cadena alquílica ligada a la posición N4 del grupo piperacínilo del ciprofloxacino se incrementa la lipofilia del compuesto (Montero y cols., 1997) y sería de esperar que se facilitara la interacción con las membranas biológicas. El objetivo de esta parte del estudio será comprobar cómo pequeños cambios en la estructura de la molécula causa variaciones en la actividad antibacteriana y en la acumulación o permeabilidad del compuesto.

En la tabla 4.5.1 se especifica la estructura química de la molécula de ciprofloxacino, el nombre, peso molecular y logP de los derivados del ciprofloxacino (Saiz, 1996; Montero y cols., 1997).

Tabla 4.5.1. Características fisicoquímicas de los derivados del ciprofloxacino y estructura química del compuesto colega de serie (Saiz, 1996; Montero y cols., 1997).



| Cadena alquílica R                              | Nombre                 | Peso molecular | logP   |
|---|------------------------|----------------|--------|
| H   | ciprofloxacino         | 331.3          | -1.130 |
| CH <sub>3</sub>                                 | N-metilciprofloxacino  | 345.3          | 0.197  |
| CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | N-etilciprofloxacino   | 359.3          | 0.396  |
| (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | N-propilciprofloxacino | 373.3          | 0.797  |
| (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | N-butilciprofloxacino  | 387.3          | 0.921  |

### Susceptibilidad de los derivados alquílicos del ciprofloxacino

En la tabla 4.5.2, se muestra la concentración mínima inhibitoria (MIC) en  $\mu\text{g/ml}$  de los diferentes compuestos sobre *S. marcescens* NIMA, Ncip, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.



Tabla 4.5.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) en  $\mu\text{g/ml}$  de los derivados del ciprofloxacino.

|           | NIMA  | Ncip | <i>E.coli</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>S.aureus</i> |
|-----------|-------|------|---------------|---------------------|-----------------|
| cip       | 0.125 | 30   | 0.03          | 0.5                 | 0.25            |
| Metilcip  | 0.125 | 30   | 0.03          | 1                   | 0.25            |
| Etilcip   | 0.25  | 30   | 0.06          | 2                   | 0.25            |
| Propilcip | 0.25  | 50   | 0.125         | 4                   | 0.5             |
| Butilcip  | 0.5   | 60   | 0.25          | 7                   | 1               |
| HClcip    | 0.06  | 30   | 0.03          | 0.25                | 0.25            |

En todos los casos ensayados el derivado más potente es aquel que corresponde al clorhidrato de ciprofloxacino. El aumento de la longitud de la cadena alquílica origina compuestos menos activos frente los microorganismos ensayados. El menos activo fue el butil-ciprofloxacino.

Los valores de MIC se correlacionan con los obtenidos para el índice bactericida (BI) (fig. 4.5.1), en los que se observa una disminución de la actividad bactericida del antibiótico a medida que la cadena alquílica del N4 del piperacínilo se alarga. Esta observación ha sido constatada en otro estudio anterior (Chu y Fernandez, 1989). Sin embargo, los derivados alquílicos, tales como el etil y el propil-ciprofloxacino son aproximadamente de 2 a 4 veces más activos contra *Mycobacterium tuberculosis* que el ciprofloxacino, molécula parental de la serie. Se desconoce por qué estos compuestos aumentan la actividad contra las micobacterias. La mayor lipofiliidad de la molécula podría jugar un papel importante (Haemers y cols., 1990).

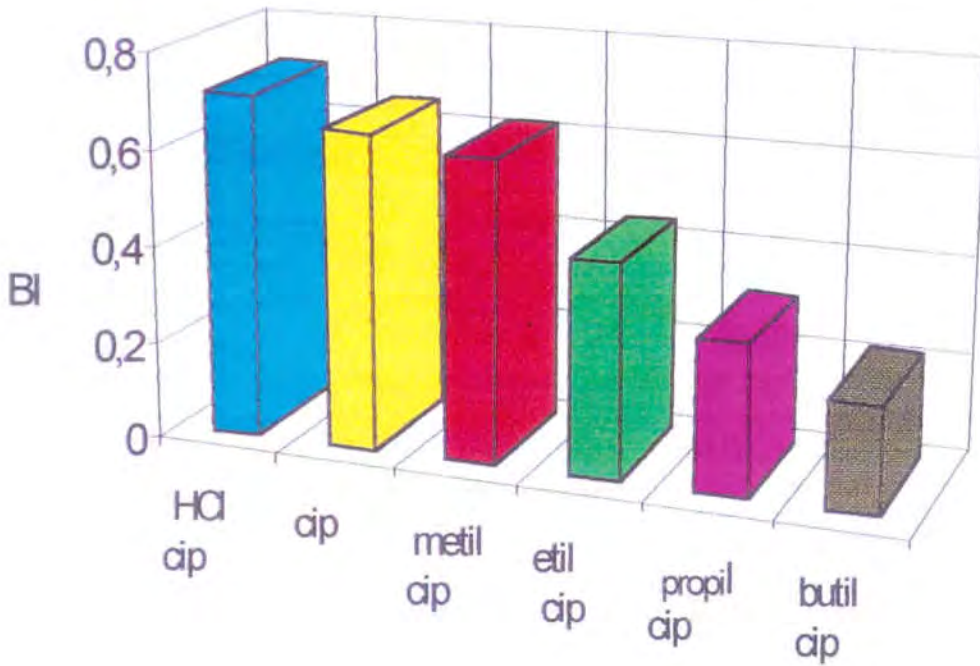


Fig. 4.5.1 Índice Bactericida de los derivados del ciprofloxacino en NIMA.

### Acumulación de los derivados del ciprofloxacino

La acumulación de los derivados alquílicos del ciprofloxacino alcanzan su valor de acumulación máxima a los pocos minutos de incubación. No existen diferencias remarcables en la captación de la quinolona respecto al aumento de la cadena alquílica. No obstante, el derivado butilciprofloxacino presenta una mayor acumulación (fig. 4.5.2).

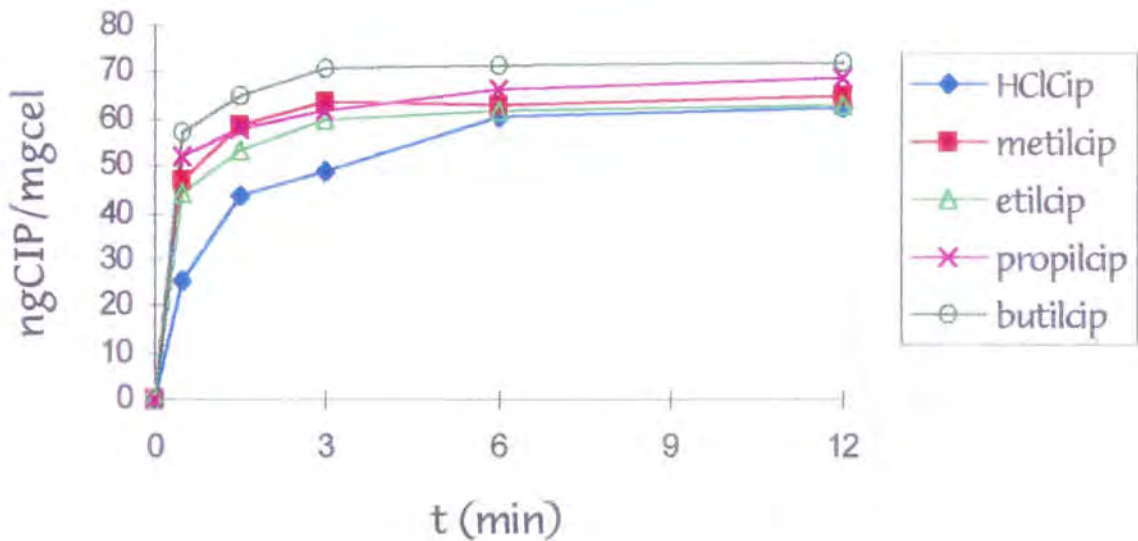


Fig. 4.5.2 Acumulación de los derivados alquílicos del ciprofloxacino en *Serratia marcescens* NIMA.

El butil ciprofloxacino es más hidrofóbico que el clorhidrato, de tal manera que en los mutantes de LPS, la acumulación de esta molécula debería incrementarse como en el caso del ácido nalidíxico (apartado resultados discusión 4.2). En la figura 4.5.3, se muestra la acumulación de butilciprofloxacino y HClciprofloxacino en la cepa parental NIMA y en la cepa NR1, mutante de antígeno O.

Aunque en ambas cepas se observa como la acumulación del butilciprofloxacino aumenta respecto a la quinolona más hidrofílica, los

incrementos observados prácticamente son similares en las dos cepas ensayadas, de tal manera que la alteración de la estructura del LPS no afectaría significativamente la entrada del compuesto.

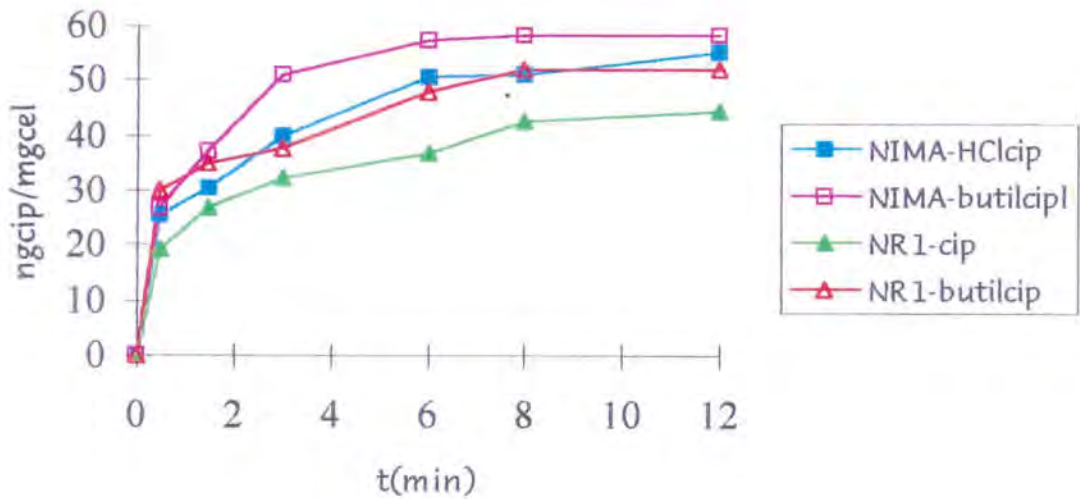


Fig. 4.5.3 Acumulación de HClcip y butilcip en *S. marcescens* NIMA y NR1 (mutante de antígeno O).

Una de las vías de paso a través de la membrana externa se realiza mediante porinas. En la figura 4.5.4, se observa la acumulación del butilciprofloxacino y HCl-ciprofloxacino en la cepa parental NIMA y en Ncip, mutante carente de una de las proteínas de membrana externa; para comprobar cómo afecta en la acumulación la pérdida de la porina en ambos compuestos.

En la cepa Ncip se observa una diferencia clara en la acumulación de ambos antibióticos. En el caso del butilciprofloxacino se alcanzan valores similares a los obtenidos en la cepa NIMA, mientras que para el HClciprofloxacino son inferiores. El HClciprofloxacino, molécula hidrofílica, podría utilizar preferentemente la vía

hidrofílica (porina) para pasar a través de la membrana externa, mientras que el butilciprofloxacino podría utilizar vía hidrofóbica, no alterándose su acumulación con la ausencia de una proteína de membrana externa.

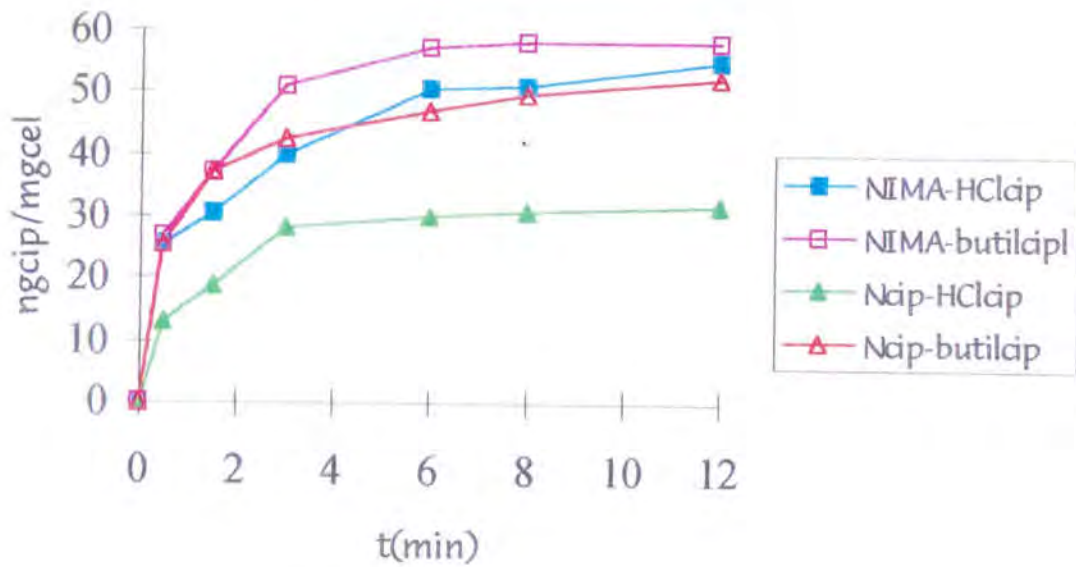


Fig. 4.5.4 Acumulación de HClcip y butilcip en *S. marcescens* NIMA y Ncip (mutante espontáneo resistente al ciprofloxacino).

La acumulación de quinolona es el resultado del equilibrio entre la entrada y salida del antibiótico, de tal manera que el ligero aumento de acumulación observado en el butilciprofloxacino podría deberse o bien a un aumento de la entrada o a un menor reflujo del mismo. Para comprobar esta hipótesis se realizó un ensayo de reflujo. En las figuras 4.5.5 y 4.5.6, se muestran la acumulación de cip-HCl y cip-butil con y sin inhibidor metabólico (CCCP) en las cepas NIMA y Ncip, respectivamente.

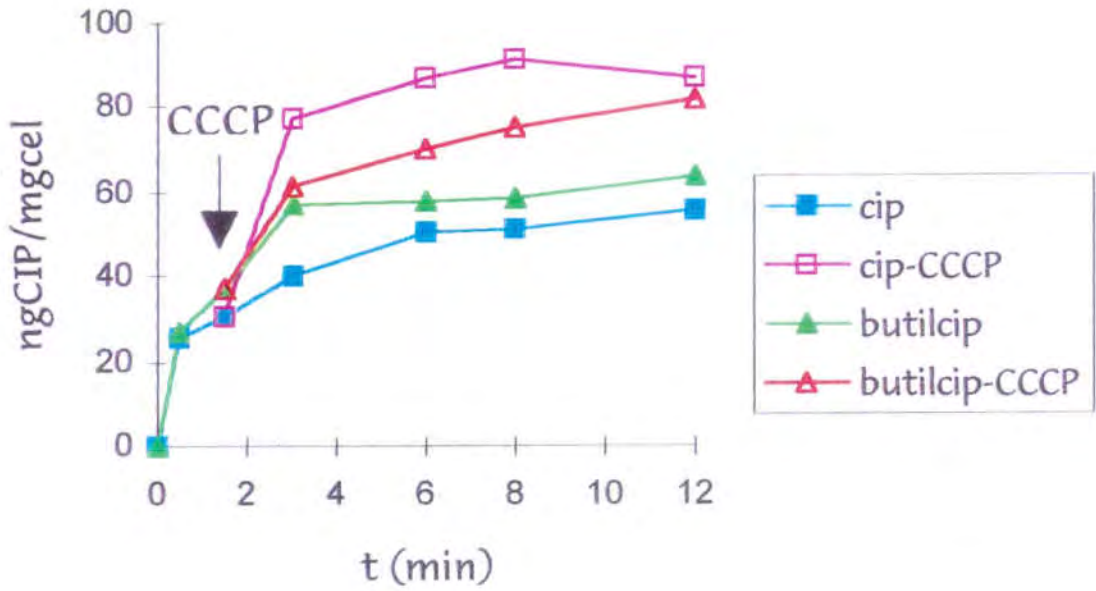


Fig. 4.5.5 Acumulación y reflujo de HClcip y butilcip en *S. marcescens* NIMA.

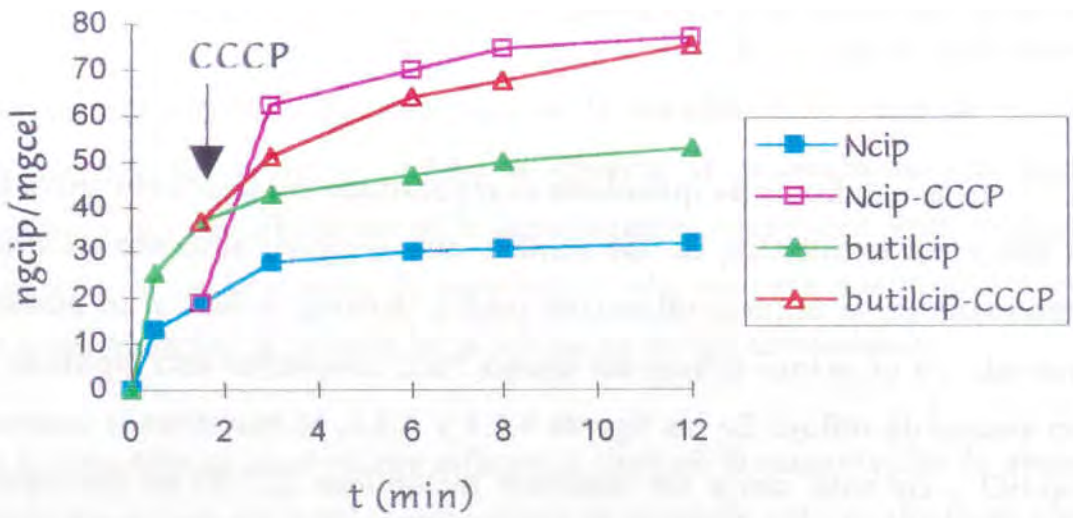


Fig. 4.5.6 Acumulación y reflujo de HClcip y butilcip en *Ncip*.

La inhibición metabólica de la cepa bacteriana NIMA por el protonóforo CCCP conduce a un aumento en la acumulación tanto de la cip-HCl como del butilciprofloxacino, las cuales alcanzan valores similares. Para la cepa Ncip, se obtuvieron resultados similares a los observados en la cepa NIMA. Así pues, el aumento de acumulación del butilciprofloxacino podría ser consecuencia de una disminución del reflujó de la molécula más que de un aumento en la entrada. En otras palabras, el HClciprofloxacino sería mejor substrato para la bomba de reflujó que el butilciprofloxacino, lo que sugiere una limitación de su actividad dependiente del tamaño y/o la lipofilia de la molécula.

#### 4.6 EFECTO DE LOS ANALGÉSICOS EN LA ACUMULACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD DE LAS QUINOLONAS EN *Serratia marcescens*

Los agentes antimicrobianos y los analgésicos se administran con frecuencia simultáneamente; los primeros tienen como misión erradicar el foco de la infección; mientras que los analgésicos son medicamentos que suprimen el dolor, teniendo algunos una acción general sobre el sistema nervioso central que hace que, a la vez que calma el dolor, actúan como antitérmicos y además suelen tener un efecto antiinflamatorio. Los analgésicos más utilizados son el ácido acetil salicílico (SAA) y el paracetamol (PRC). La forma SAA (aspirina) se degrada rápidamente a ácido salicílico (SA) en el cuerpo humano. Trabajos anteriores han demostrado que los salicilatos y otros ácidos débiles, como el benzoato y el acetato, aumentan la resistencia de *Escherichia coli* a un amplio grupo de antimicrobianos que tienen diferentes estructuras, dianas y modo de acción, los cuales incluyen la ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico y cefalosporinas (Foulds y Cols., 1989; Rosner, 1985).

Se ha estudiado cómo afecta la combinación simultánea de los analgésicos (a concentraciones terapéuticas de 1 mM SA y 5 µg/ml PRC) en la susceptibilidad y permeabilidad a las quinolonas en *S. marcescens*.

##### Perfil de proteínas de membrana externa y de lipopolisacárido

En la figura 4.6.1, se muestra un gel de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes. Las células fueron cultivadas en TSB y TSB suplementado con analgésico.



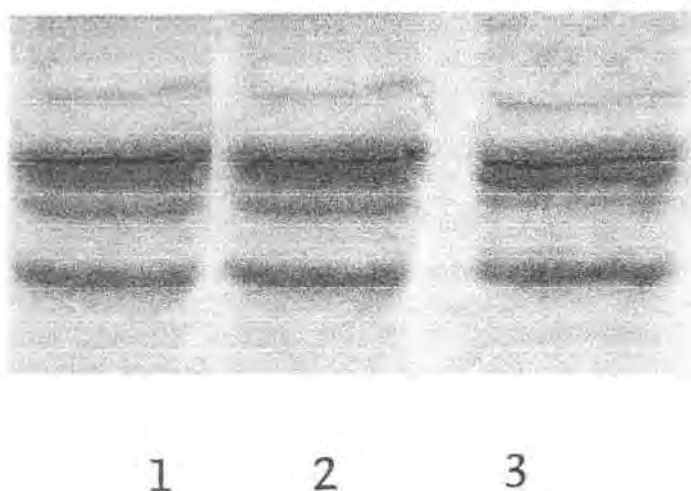


Fig. 4.6.1 Perfil de proteínas de membrana externa en *S. marcescens*. El carril número 1, corresponde a la incubación de las células sin analgésico; el 2 y el 3 en presencia de SA 1 mM y PRC 5 µg/ml, respectivamente.

No se observaron diferencias respecto al control cuando las células se incubaron a concentraciones terapéuticas de ácido salicílico y paracetamol, siendo éstas de 1 mM y 5 µg/ml, respectivamente. Sin embargo, estudios anteriores muestran variación en el perfil de proteínas de membrana externa a concentraciones elevadas de ácido salicílico en el medio; concretamente, se observa la disminución de la OmpF en *E. coli*, y otras porinas en otros géneros tales como *Serratia*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Sawai y cols, 1987; Rosner y cols., 1991; Burns y Clark, 1992; Puig y cols., 1995).

En la figura 4.6.2, se puede observar el perfil electroforético del lipopolisacárido de *S. marcescens* NIMA incubada en TSB y TSB suplementado con analgésicos.

El LPS juega un papel importante en la permeabilidad a los antibióticos hidrofóbicos, bien por la interacción electrostática entre las moléculas de LPS, que son neutralizadas por cationes divalentes o por la presencia de 6-7 cadenas de ácidos grasos saturados por molécula de LPS que determina su baja fluidez. Como se muestra en la figura 4.6.2, la estructura del LPS no parece estar alterada visualmente, de tal manera que la permeabilidad del ácido nalidíxico en presencia de los analgésicos estudiados no debería alterarse.

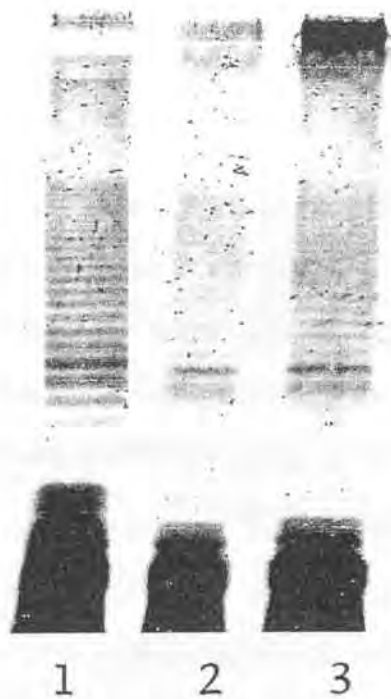


Fig. 4.6.2 Perfil de LPS en *S. marcescens*. El carril número 1, corresponde a la incubación de las células sin analgésico; el 2 y el 3 en presencia de SA 1 mM y PRC 5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente

### Susceptibilidad de *S. marcescens* a las quinolonas en presencia de ácido salicílico y paracetamol

En la tabla 4.6.1, se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias sin analgésico (control) y en presencia de SA 1mM y de PRC 5 µg/ml.

Tabla 4.6.1. MIC's a las quinolonas en *S. marcescens* (µg/ml)

|                  | Control | SA 1 mM | PRC 5 µg/ml |
|------------------|---------|---------|-------------|
| Ciprofloxacino   | 0.06    | 0.06    | 0.06        |
| ácido nalidíxico | 5       | 5       | 5           |

En presencia de concentraciones terapéuticas de los analgésicos ensayados no observamos variación en la MIC respecto al control; sin embargo si utilizamos el cálculo del índice bactericida para determinar la actividad bactericida del ciprofloxacino y del ácido nalidíxico en presencia de concentraciones terapéuticas de ácido salicílico y paracetamol, sí que existen algunas modificaciones (figura 4.6.3).

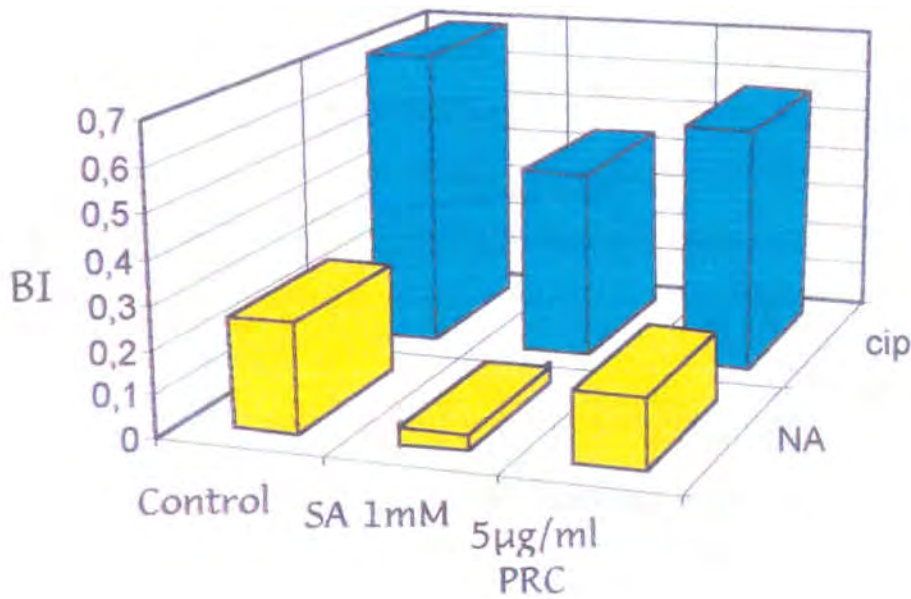


Fig. 4.6.3 Índice bactericida en *S. marcescens* del ciprofloxacino y ácido nalidíxico sin y con analgésico, cuya concentración terapéutica de SA y PRC fue 1 mM y 5 µg/ml respectivamente.

Como puede observarse en la figura anterior, la diferencia más significativa de disminución de la actividad bactericida tanto del ciprofloxacino como del ácido nalidíxico ocurre en presencia de ácido salicílico. Para corroborar este resultado se realizó un estudio de la eficiencia del crecimiento en placa (EOP, *Efficiency Of Plating*), que es el cociente entre las UFC/ml de las placas que contienen antibiótico-analgésico respecto las UFC/ml de la placa control (figuras 4.6.4 y 4.6.5).

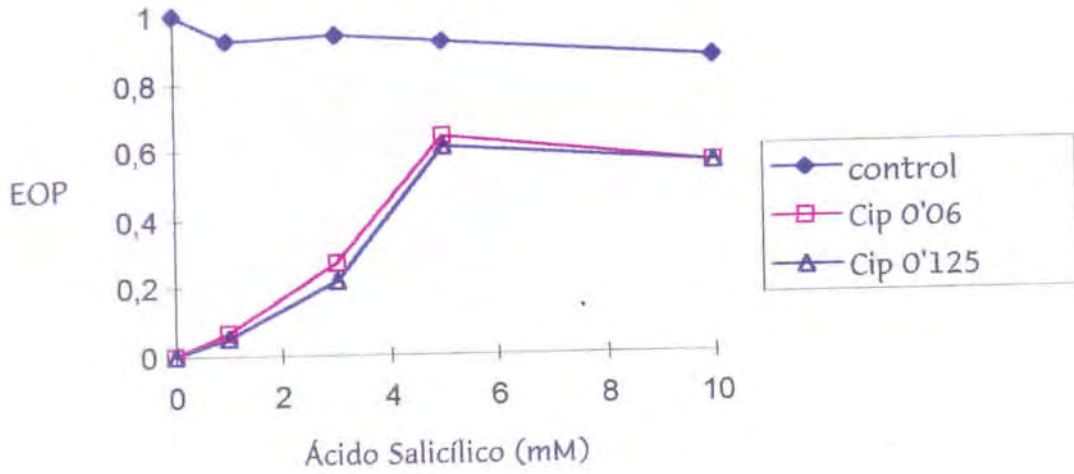


Fig. 4.6.4 EOP del ciprofloxacino y el ácido salicílico en *S. marcescens* NIMA. Las concentraciones utilizadas de ciprofloxacino fueron 0.06  $\mu\text{g/ml}$  y 0.125  $\mu\text{g/ml}$ .

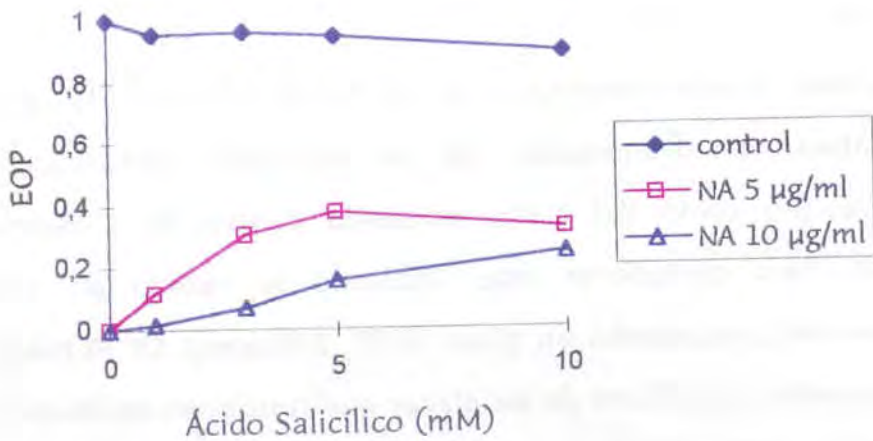


Fig. 4.6.5 EOP del ácido nalidíxico (NA) con el ácido salicílico.

Con el aumento de la concentración de ácido salicílico se observa un incremento de la resistencia del ciprofloxacino y ácido nalidíxico, cuyas concentraciones utilizadas son inhibitorias del crecimiento. A partir de 5 mM de SA se alcanza un estadio en el cual aún aumentando su concentración no se observa un incremento en la EOP, lo que podría correlacionarse con el hecho de que es a partir de dicha concentración cuando en los geles de poliacrilamida desnaturalizantes se puede observar la desaparición de una proteína de membrana externa (Rosner y cols., 1991).

### Acumulación de ciprofloxacino y ácido nalidíxico en presencia de los analgésicos ácido salicílico y paracetamol.

La permeabilidad de estos antibióticos se midió por un método fluorimétrico. En las figuras 4.6.6 y 4.6.7, se puede observar la acumulación del ciprofloxacino en presencia de SA y PRC, respectivamente.

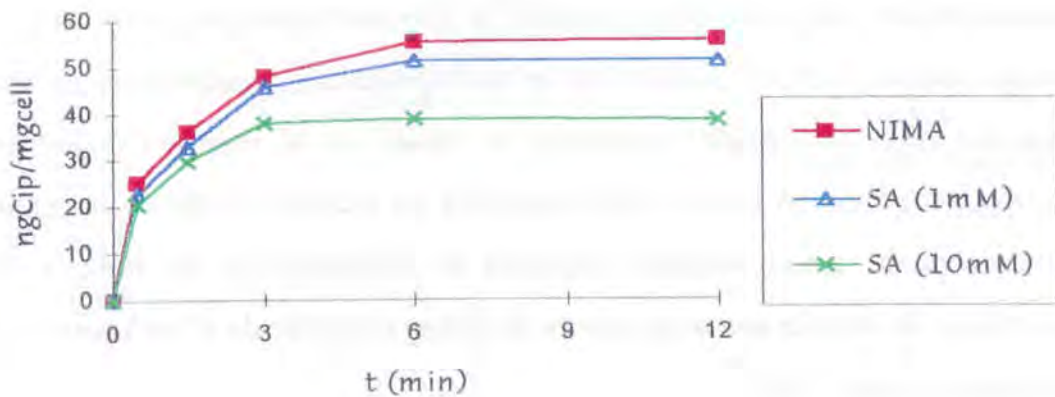


Fig. 4.6.6 Acumulación de ciprofloxacino (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de concentración externa) y ácido salicílico, cuyas concentraciones fueron: la terapéutica (1mM) y de 10 mM.

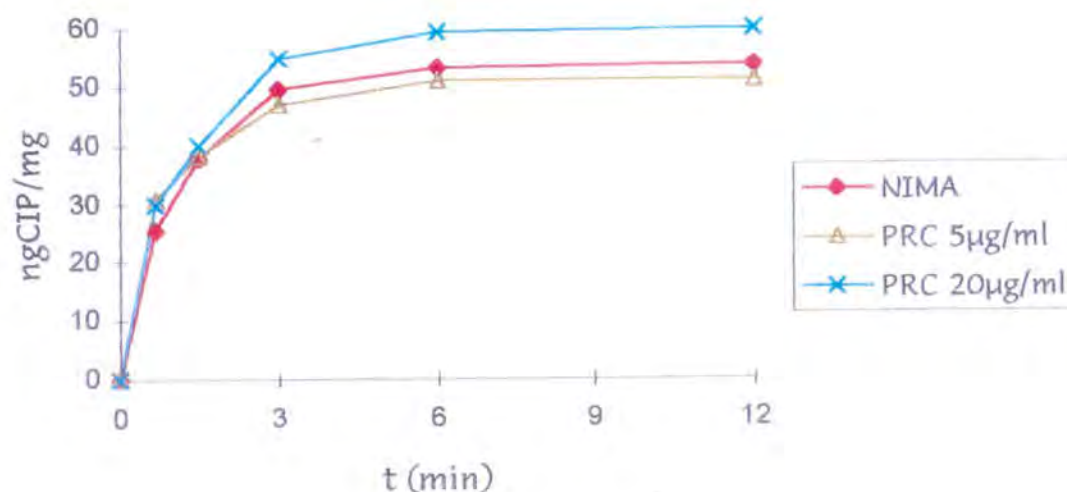


Fig. 4.6.7 Acumulación de ciprofloxacino (10 µg/ml) con paracetamol, a concentración terapéutica (5 µg/ml) y en exceso (20 µg/ml).

La diferencia más importante se obtuvo en la combinación ciprofloxacino-ácido salicílico, observándose una disminución en la acumulación del antibiótico cuando la concentración de ácido salicílico es muy elevada. El ciprofloxacino es un antibiótico moderadamente hidrofóbico que se cree pasa preferentemente a través de la membrana externa vía porina, como se ha citado anteriormente. La multiplicación de las células en presencia de ácido salicílico provoca la supresión de la síntesis de una proteína de membrana externa, en el caso particular de *E. coli* sería la OmpF (Rosner y cols., 1991).

Respecto al ácido nalidíxico, las figuras 4.6.8 y 4.6.9 muestran el efecto de la incubación con el ácido salicílico y el paracetamol respectivamente, en la permeabilidad o acumulación de este antibiótico.

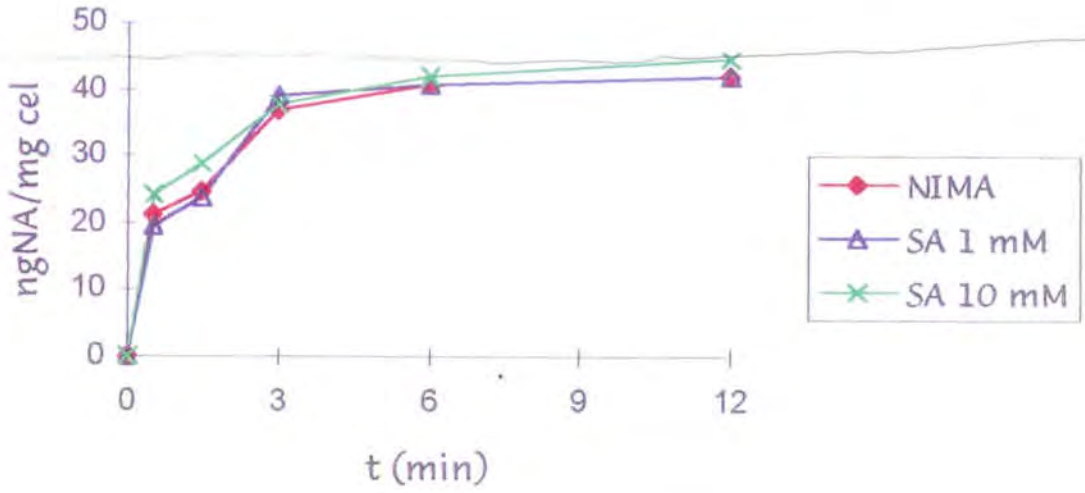


Fig. 4.6.8 Acumulación de ácido nalidíxico (10 µg/ml de concentración externa), incubadas en TSB y en TSB con ácido salicílico, las concentraciones utilizadas de SA fueron de 1 mM y 10 mM.

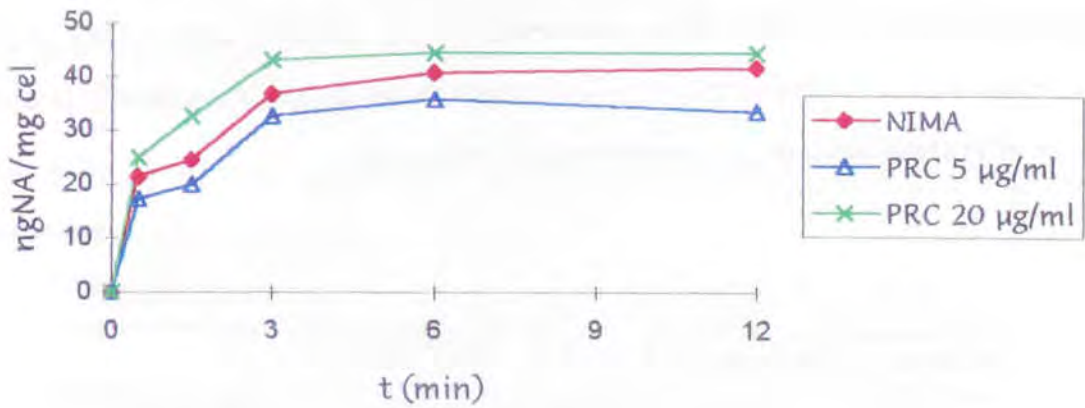


Fig. 4.6.9 Acumulación de ácido nalidíxico (10 µg/ml de concentración externa). Las células de *S. marcescens* NIMA fueron incubadas en TSB, TSB con PRC. Las concentraciones empleadas fueron 5 y 20 µg/ml, la terapéutica y en exceso respectivamente



La acumulación del ácido nalidíxico no se ve afectada por la incubación con ácido salicílico ni con paracetamol. El ácido nalidíxico es una quinolona hidrofóbica cuya vía de entrada por la membrana externa se realiza preferentemente a través del LPS (Hirai y cols, 1986b). A pesar de no observarse diferencias respecto a la permeabilidad, si existen pequeñas variaciones en la actividad bactericida de este antibiótico, sobre todo con la presencia del ácido salicílico como se ha podido comprobar anteriormente.

Los resultados sugieren que la administración conjunta de quinolona y paracetamol no modifican la actividad bactericida de estos antibióticos ni alteran la membrana externa, factor que condicionaría la permeabilidad.

Sin embargo el empleo conjunto de quinolona y salicílico sí parece variar la actividad del ciprofloxacino principalmente. El efecto de potenciación de la resistencia y disminución de la permeabilidad, como consecuencia de la disminución de la síntesis de una proteína de membrana externa, es dependiente de la concentración de ácido salicílico empleada, siendo más acusados estos efectos a medida que sobrepasa la concentración terapéutica de 1 mM. Si la concentración de salicílico aumentara y/o la de antibiótico disminuyera en un determinado tejido podrían existir problemas en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

#### 4.7 ACUMULACIÓN DE CIPROFLOXACINO EN *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* Y *Staphylococcus aureus*

*Serratia marcescens* es un patógeno que ocupa el cuarto lugar en orden de importancia entre los patógenos nosocomiales *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Boquete y cols., 1996).

En este estudio se compara la susceptibilidad del HClciprofloxacino en los diferentes géneros bacterianos, todos ellos susceptibles a este antibiótico y su relación con la acumulación por un método fluorimétrico. Los microorganismos escogidos son patógenos nosocomiales humanos, los cuales han adquirido importancia significativa en los últimos años debido a la aparición de resistencia a las quinolonas (García-Rodríguez, 1995; Cunha y cols., 1997; Khachtourians, 1999).

##### Concentración mínima inhibitoria

En la tabla 4.7.1 se muestran las MIC en  $\mu\text{g/ml}$  de HClciprofloxacino para cada microorganismo ensayado.

Tabla 4.7.1. MIC's en  $\mu\text{g/ml}$  del ciprofloxacino en las diferentes especies estudiadas.

|                | <i>S. marcescens</i> | <i>E. coli</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
|----------------|----------------------|----------------|---------------------|------------------|
| Ciprofloxacino | 0.06                 | 0.03           | 0.25                | 0.25             |

## Acumulación de HClciprofloxacino

Las quinolonas tienen que superar la barrera de permeabilidad para alcanzar su diana intracelular, en los Gram negativos deben pasar a través de ambas membranas, mientras que en los Gram positivos sólo deben atravesar la membrana citoplasmática.

En *S. marcescens*, las quinolonas difunden a través de la membrana externa por las porinas y la bicapa lipídica (apartado 4.2); en *P. aeruginosa* parece que está implicada la proteína de membrana externa D2 y probablemente pasarían a través de los fosfolípidos de forma similar a como ocurre en las enterobacteriáceas (Daikos y cols., 1988; Michéa-Hamzhepour y cols., 1991). Los Gram positivos, no tienen ni membrana externa ni lipopolisacárido (LPS), pero los ácidos lipoteicoicos podrían interactuar con las quinolonas de manera similar al LPS (Piddock, 1993).

En la figura 4.7.1, se muestra la acumulación de HClciprofloxacino en *S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

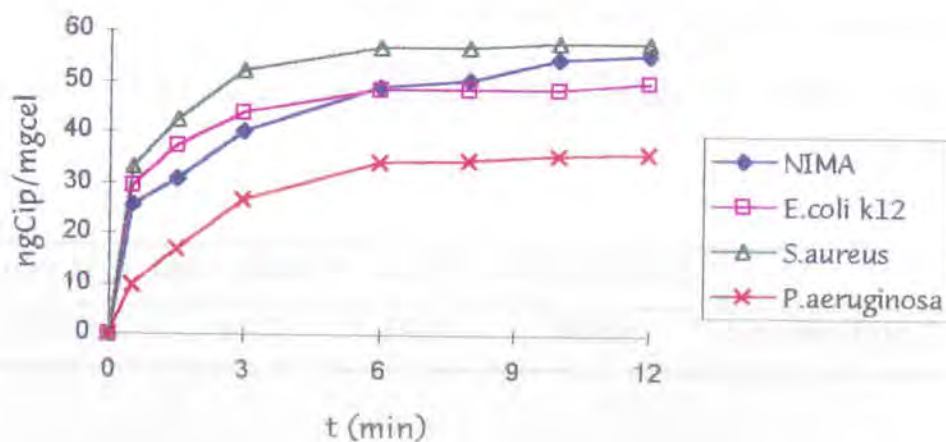


Fig. 4.7.1 Acumulación de HClciprofloxacino (10  $\mu\text{g/ml}$ ).

La acumulación de HClciprofloxacino en todos los géneros ensayados es un proceso rápido, alcanzando el equilibrio estacionario a los pocos minutos de incubación con el antibiótico; sin embargo la acumulación en *P. aeruginosa* es significativamente menor que en los otros microorganismos, lo que corrobora estudios anteriores que muestran que *Pseudomonas* presenta una baja permeabilidad respecto a otras bacterias Gram negativas como *E. coli* (Nikaido y Vaara, 1985).

La concentración de HClciprofloxacino intracelular final reflejaría el equilibrio entre la entrada y el reflujo (Piddock, 1995). Con tal de comprobar si existen diferencias en la acumulación debido al reflujo, las células se incubaron con el inhibidor CCCP. En las figuras 4.7.2, 4.7.3 y 4.7.4 se puede observar la acumulación de *S. marcescens* NIMA comparándola con los otros tres géneros.

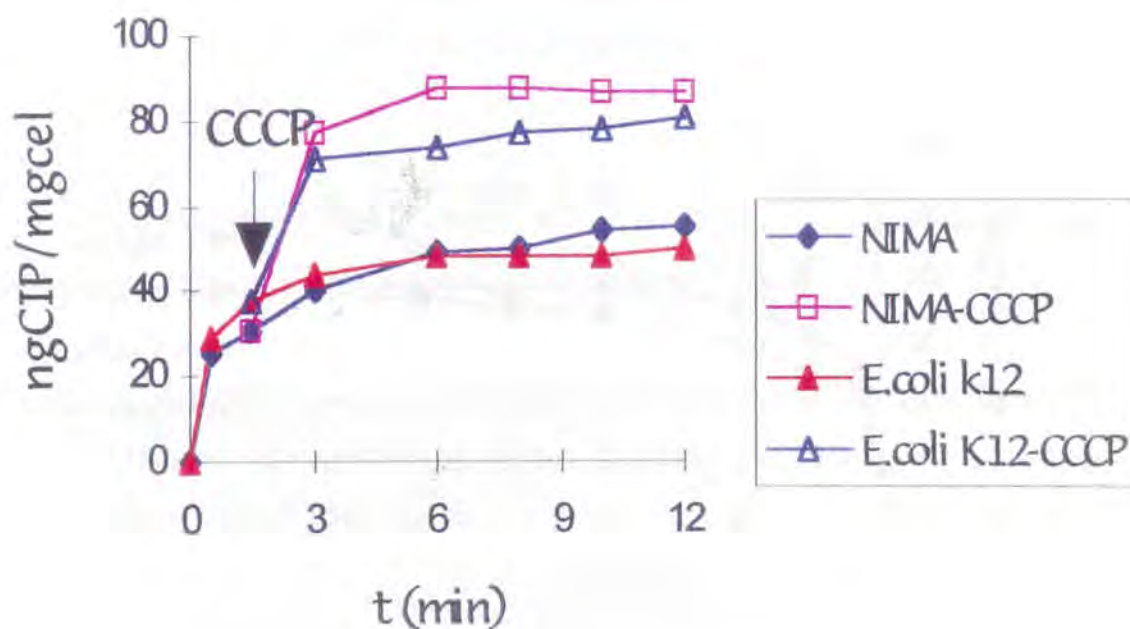


Fig 4.7.2 Reflujo de HClciprofloxacino (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en *S. marcescens* NIMA y *E. coli*. CCCP (100  $\mu\text{M}$ ).

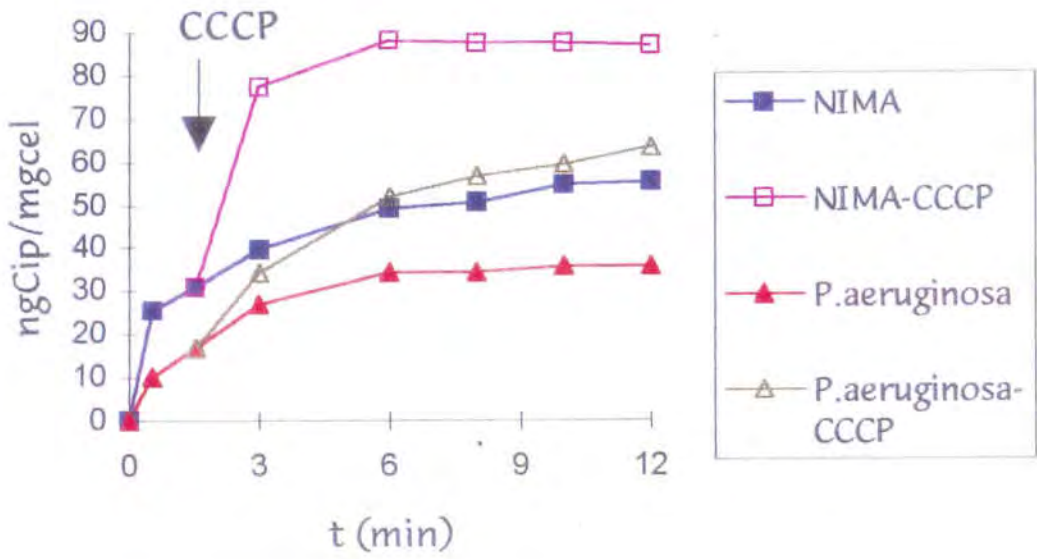


Fig. 4.7.3. Reflujo de HCl ciprofloxacin (10  $\mu\text{g/ml}$ ). En *S. marcescens* NIMA y *P. aeruginosa*. CCCP (100  $\mu\text{M}$ ).

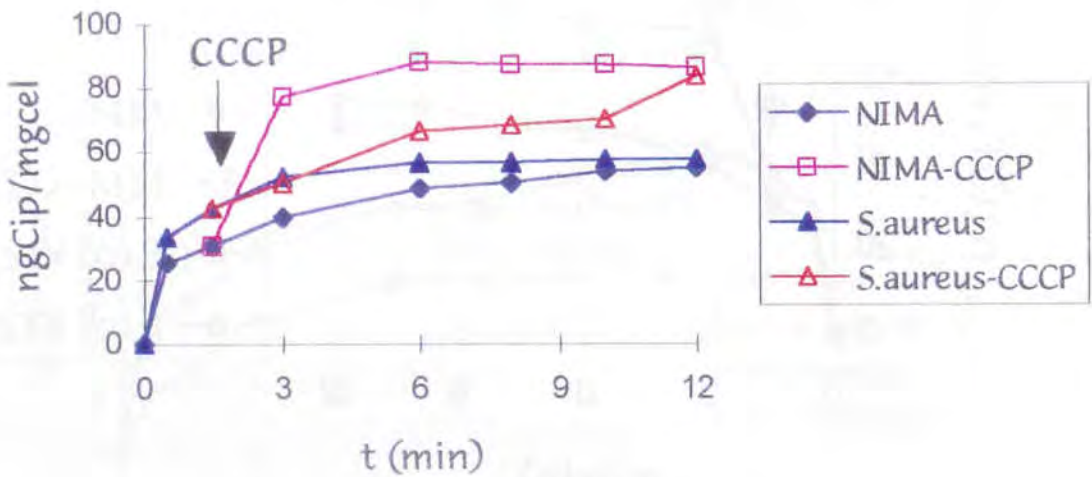


Fig. 4.7.4 Reflujo de HCl ciprofloxacin en *S. marcescens* NIMA y *S. aureus*. CCCP (100  $\mu\text{M}$ ).

La acumulación de HClciprofloxacino en *Serratia* y *Escherichia* no varía significativamente lo que no explicaría la diferencia observada en la MIC, esto demuestra por otra parte que el género *Serratia* es intrínsecamente más resistente que *E. coli* a pesar de tener una permeabilidad similar de membrana externa.

En el caso de *Pseudomonas* (fig.4.7.3) una baja permeabilidad o entrada lenta del agente antibacteriano a través de la membrana externa podría contribuir a hacer del mecanismo de reflujo un sistema efectivo de resistencia, lo que permitiría explicar la diferencia de MIC observada en este microorganismo. Podríamos generalizar diciendo que *S. marcescens* o *E. coli*, con una elevada permeabilidad de membrana externa y un sistema de reflujo con eficiencia similar al de *P. aeruginosa*, (con el inhibidor metabólico acumulan aproximadamente 1.7 y 2 veces más ciprofloxacino en *S. marcescens* y *P. aeruginosa*, respectivamente), no presentan niveles significativos de resistencia debida a la membrana externa si el compuesto no tiene el tamaño y/o la estructura que dificulte su penetración a través de la membrana externa.

Como muestran las figuras 4.7.1 y 4.7.4, la acumulación de HClciprofloxacino en *S. marcescens* y *S. aureus* es similar.

Podríamos decir que las membranas externas tanto de *E. coli* como la de *S. marcescens* representan modestas barreras de permeabilidad en la captación de HClciprofloxacino.

## Cálculo del índice bactericida

En la figura 4.7.5 se muestra la curva de cinética de muerte a la ciprofloxacino en *S. marcescens* NIMA, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* a concentraciones terapéuticas, es decir la  $C_{\max}$  de 3  $\mu\text{g/ml}$ .

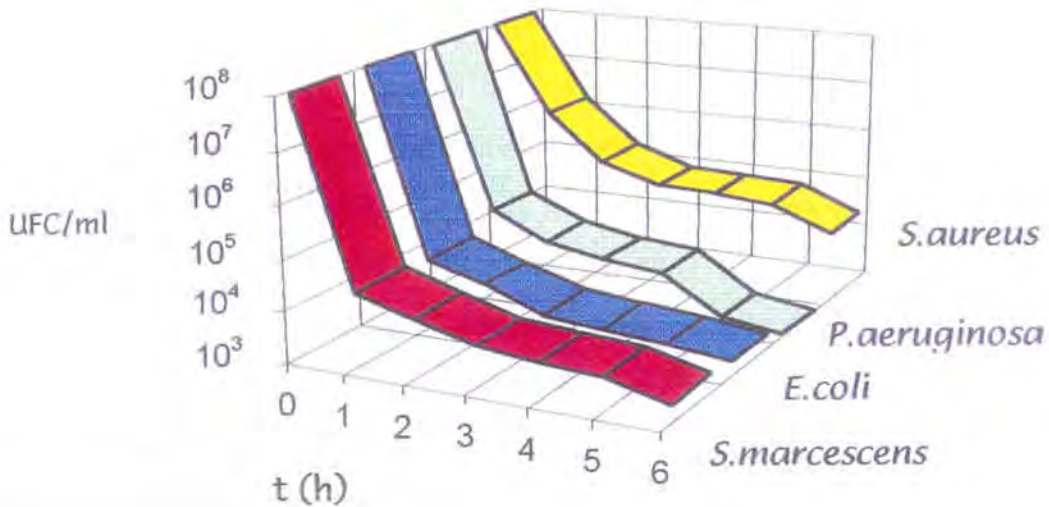


Fig. 4.7. 5 Cinética de muerte del HClciprofloxacino a concentración terapéutica (3  $\mu\text{g/ml}$ ) en *S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

A esta concentración de ciprofloxacino, el antibiótico se muestra efectivo para todos los microorganismos ensayados, sin embargo la "muerte" de *S. aureus* es progresiva a lo largo del tiempo, sin cambios bruscos en el número de células viables. A diferencia de los otros casos, la disminución del número de UFC/ml es rapidísima, en una hora de incubación con el antibiótico se pasa de aproximadamente  $10^8$  a  $10^4$  UFC/ml. Se ha descrito que el espectro y actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas tales como el ciprofloxacino, es muy efectiva frente bacterias Gram negativas, pero que su actividad contra los Gram positivos es limitada (Pidcock, 1993;

Piddock, 1994) esta podría ser la razón de que *S. aureus* tenga una MIC relativamente elevada.

En la figura 4.7.6 se muestra la gráfica de los índices bactericidas obtenidos en *S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

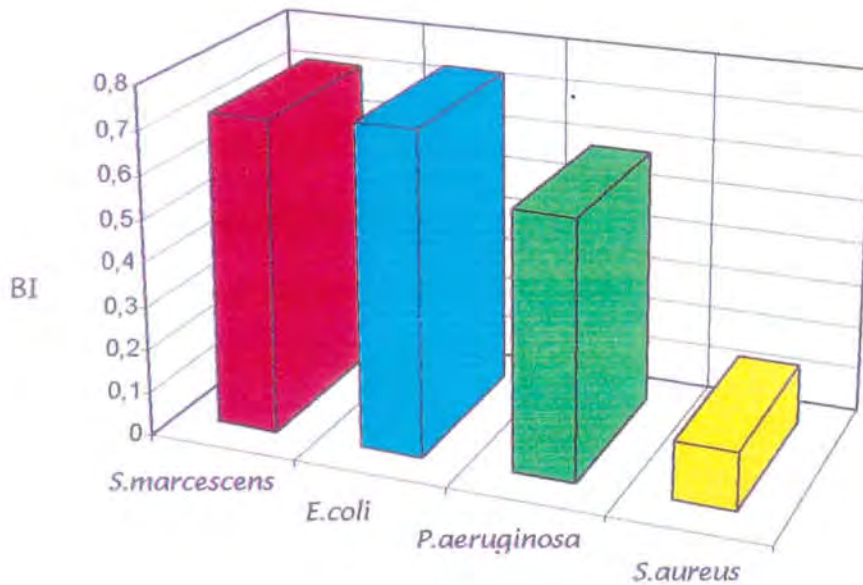


Fig. 4.7.6 Índice Bactericida del HClciprofloxacino en diferentes géneros bacterianos.

Cuanto mayor sea el índice bactericida más potencia antibacteriana tiene el principio activo ensayado respecto a la cepa bacteriana utilizada. Para el HClciprofloxacino la mayor actividad se muestra frente *E. coli*, seguida de *S. marcescens*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*; reiterando de nuevo la limitada capacidad bactericida del ciprofloxacino en las bacterias Gram positivas.



Si sólo tuviéramos en cuenta las MIC obtenidas, *Pseudomonas* sería 4 veces menos susceptible que *S. marcescens* lo que podría parecer *a priori* que tampoco el ciprofloxacino es muy efectivo para este género. Sin embargo cuando observamos la figura 4.7.6, se podría decir que el ciprofloxacino presenta una buena actividad bactericida frente a *Pseudomonas* a pesar de tener una MIC relativamente alta.

---

**CONCLUSIONES**

1. La acumulación de ciprofloxacino en *Serratia marcescens* es proporcional a la concentración de quinolona externa, lo que sugiere que la entrada no está mediada por un transportador proteico saturable.
2. La entrada de ácido nalidíxico y ciprofloxacino en *S. marcescens* es rápida alcanzándose un equilibrio estacionario a los pocos minutos de incubación con el antibiótico.
3. El nivel de acumulación máximo de ciprofloxacino se alcanzó a valores de pH neutros y básicos, mientras que a pH ácidos se observó una menor acumulación. Esto está de acuerdo con el hecho que la especie desprotonada de la fluoroquinolona parece ser la responsable de la quelación de los iones  $Mg^{2+}$  de la membrana externa, facilitando su paso a través de la membrana externa.
4. La hidrofobicidad de las quinolonas determina la vía de paso preferente a través de la membrana externa: a) El ácido nalidíxico, molécula hidrofóbica, pasa mayoritariamente a través del lipopolisacárido. El mutante de AgO (NR1) acumula más y es más susceptible a este antibiótico que la cepa parental, de tal manera que la membrana externa podría actuar como barrera de permeabilidad para los antibióticos hidrofóbicos. b) El ciprofloxacino, molécula moderadamente hidrofóbica, atraviesa la membrana externa preferentemente a través de los poros proteicos hidrofílicos (porinas). El mutante Ncip, carente de la proteína Omp3, mostró una disminución significativa de la acumulación de esta fluoroquinolona.
5. La acumulación de ciprofloxacino es menor si se incuba simultáneamente con tetraciclina; es posible que sea debido a algún tipo de competencia por el lugar de interacción inicial con la membrana externa.

6. Se ha demostrado la existencia de proteínas de reflujo activo dependiente de la fuerza protón-motriz en la cepa salvaje NIMA.
7. La concentración intracelular de ciprofloxacino y otros agentes antibacterianos es el resultado del equilibrio entre el influjo y el reflujo, de tal manera que una tasa de penetración lenta de los compuestos a través de la membrana externa, como en los mutantes NI,NII, haría del reflujo o extrusión un mecanismo de resistencia efectivo.
8. No existen diferencias remarcables en la captación de los derivados alquílicos del ciprofloxacino en *S. marcescens* NIMA, no obstante el butilciprofloxacino es el que más se acumula, lo que parece ser consecuencia de una disminución del reflujo más que de una mayor entrada. El butilciprofloxacino sería peor substrato para la bomba de reflujo.
9. *Pseudomonas aeruginosa* es más resistente y su membrana externa es menos permeable al ciprofloxacino que *Escherichia coli* y *S. marcescens* NIMA. Las membranas externas de *E. coli* y *S. marcescens* representan modestas barreras de permeabilidad en la captación de ciprofloxacino y tienen un sistema de reflujo con eficiencia similar al de *P.aeruginosa*; así pues es de esperar que *E. coli* y *S. marcescens*, no presenten niveles significativos de resistencia mediada por la membrana externa si el principio activo no tiene el tamaño y/o estructura que dificulte su penetración a través de la membrana externa.
10. La acción conjunta permeabilidad-reflujo determinan niveles de resistencia moderada al ciprofloxacino, mientras que para la adquisición de elevados niveles de resistencia a esta fluoroquinolona en *S. marcescens* es imprescindible la alteración de la DNA girasa.

11. En *S. marcescens* la resistencia elevada a estos agentes antibacterianos puede estar asociada a un único cambio en la secuencia QRDR; Mientras que cepas de *Escherichia coli* de elevada resistencia a las fluoroquinolonas están asociadas a dos substituciones en la secuencia de aminoácidos de la región QRGR de la GyrA.
12. La actividad antimicrobiana de las quinolonas depende no sólo del esqueleto base de la molécula sino de la naturaleza de sus substituyentes periféricos, de tal manera que el ciprofloxacino y el norfloxacino exhiben mayor actividad bactericida que el ácido nalidíxico.
13. La combinación del ciprofloxacino con la tetraciclina y la kanamicina no parece modificar significativamente la actividad antibacteriana; sin embargo, el ácido nalidíxico y la tetraciclina se comportan como antagonistas.
14. La actividad bactericida de los derivados del ciprofloxacino a medida que la cadena alquílica se alarga es menor, siendo el butilciprofloxacino el menos activo.
15. La combinación de ciprofloxacino y ácido salicílico induce modificaciones en la susceptibilidad y la acumulación de la fluoroquinolona en *S. marcescens* NIMA; sin embargo no hubo variaciones con el paracetamol ni tampoco con el ácido nalidíxico y ambos analgésicos.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, J.M., J. Chacon, R. Canton, y F. Baquero. 1992. The emergence of highly fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in community acquired urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29: 349-350.

Acar, J.F., y F.W. Goldstein. 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 24 (suppl. 1): S67-S73.

Akimenko, V.K., y S.M. Trutko. 1991. Physiological role of the oversynthesis of intermediates and the biosynthesis of metabolites for microorganism-producers. *Prikl. Biokhim Mikrobiol.* 27: 17-35.

Altemeier, W.A., W.R. Culbertson, W.R. Fullen, y J.J. McDonough. 1969. *Serratia marcescens* septicemia. A new threat in surgery. *Arch. Surgery.* 99: 232-238.

Allen, F.G. 1967. Conditions of the colour change of prodigiosin. *Nature.* 216: 929-931.

Ames, G.F., E.N. Spudich, y H. Nikaido. 1974. Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J. Bacteriol.* 117: 406-416.

Anderson, J., y N. Delihias. 1990. *micF* RNA binds to the 5' end of *ompF* mRNA and to a protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 29: 9249-9256

Asuquo, A.E., y L.J.V. Piddock. 1993. Accumulation and killing kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 865-880.

Aubert, G., B. Pozzetto, y G. Dorche. 1992. Emergence of quinolone-imipenem cross-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* after fluoroquinolone therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 29: 307-312.

Aumercier, M., D.M. Murray, y J.L. Rosner. 1990. Potentiation of susceptibility to aminoglycosides by salicylate in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 786-791.

Ball, P. 1990. Emergent resistance to ciprofloxacin amongst *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: clinical significance and therapeutic approaches. *J. Antimicrob. Chemother.* 26 (suppl. F): 165-179.

Baron, E.J., R.S. Chang, D.H. Howard, J.N. Miller y J.A. Turner. 1993. Antimicrobial agents. En *Medical microbiology, a short course*. Ed. Wiley-Liss. New York. p73-79.

Barry, M.A., D.E. Graven, T.A. Goularte, y D.A. Lichtenberg. 1984. *Serratia marcescens* contamination of antiseptic soap containing triclosan: implications for nosocomial infection. *Infect. Control.* 5: 427-430.

Batty, K.T., T.M.E. Davis, y K.E. Ilett. 1995. The effect of ciprofloxacin on theophylline pharmacokinetics in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 39: 305-311.

Bedard, J., S. Wong., y L.E. Bryan. 1987. Accumulation of enoxacin by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1348-1354.



Bergey, D.H., F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. Hammer, y F.M. Huntoon. 1923. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 1ª Edición. Williams and Wilkins, Baltimore. USA.

Bizio, B. 1823. Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. Biblioteca italiana o sia Giornale di Letteratura Scienze e Arti. 30.

Boquete, T., A. Videl, C. Martín-Bourgon, L. Azañedo, y J.A. Sáez-Nieto. 1996. Epidemiological markers of *Serratia marcescens* isolates causing nosocomial infections in Spain. *Microbiología SEM*. 12: 607-612.

Borner, K., H. Lode, G. Höffken, C. Prinsing, P.D. Glatzel, y R. Wiley. 1986. Liquid chromatographic determination of ciprofloxacin and some metabolites in human body fluids. *J. Clin. Biochem.* 24: 325-331.

Breed, R.S. y M.E. Breed. 1924. The type species of the genus *Serratia*, commonly known as *Bacillus prodigiosus*. *J. Bacteriol.* 9: 545-557.

Breines, D.M., S. Ouabdesselam, E.Y. Ng, J. Tankovic, S. Shah, C.J. Soussy, y D.C. Hooper. 1997. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 175-179.

Brisson-Noel, A., P. Trien-Cuot, y P. Courvalin. 1988. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 22(suppl.B): 13-23.

Brubaker, R.R. 1985. Mechanisms of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 21-50.

Bryskier, A., y J.F. Chantot. 1995. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs.* 49(suppl.2): 16-28.

Burns, J.L., y D.K. Clark. 1992. Salicylate inducible antibiotic resistance in *Pseudomonas cepacia* associated with absence of pore forming outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2280-2285.

Cabrera, H.A. 1969. An outbreak of *Serratia marcescens* and its control. *Arch. International Med.* 123: 650-655.

Cajal, Y., J. Rogers, D. Bergo, y M.K. Jain. 1996. Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. *Biochemistry.* 35: 299-308.

Cohen, M.L. 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science.* 257: 1050-1055.

Cohen, S.P., L.M. McMurry, y S.B. Levy. 1988. *marA* locus causes decreased expresion of OmpF porin i multiple-antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 5416-5422.

Cohen, S.P., L.M. McMurry, D.C. Hooper, J.S. Wolfson, y S.B. Levy. 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug

accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1318-1325.

Cohen, S.P., H. Hächler, y S.B. Levy. 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 1484-1492.

Cole, S.T., I. Sonntag, y U. Henning. 1982. Cloning and expresion in *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 149: 145-150.

Conrad, S., M. Oethinger, K. Kaifel, G.K lotz, R. Marre, y W.V. Keru. 1996. *gyrA* mutations in high level fluoroquinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 443-455.

Cook, W.A, W.H. Deitz, y W.A Goss. 1966. Mechanims of action of nalidixic acid on *Escherichia coli* IV. Effects on stability of cellular constituents. *J. Bacteriol.* 91: 774-779.

Crump, B., R. Wise, y J. Dent. 1983. Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 784-786.

Cullman, W., M. Steiglitz, B. Baars y W. Opferkuch. 1985. Comparative evolution of recently developed quinolone compounds with a note on the frequencie of resistant mutants. *Chemother. (basel)*. 31: 19-28.

Cunha, B.A., S.M. Hussain, Y. Ueno, E.A. Walters, y P. Domenico. 1997. Antibacterial activity to trovafloxacin against nosocomial gram positive and gram negative isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 (suppl.B): 29-34.

Chadwick, D.C, y J. Goode. 1997. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. Ciba Foundation Symposium 207. New York. John Wiley and Sons.

Chapman, J.S y N.H. Georgopapadakou. 1988. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 438-442.

Chapman, J.S., y N.H. Georgopapadakou. 1989. Fluorometric assay for fleroxacin uptake by bacterial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 27-29.

Charvalos, E., Y. Tselentis, M.M. Hamzehpour, T. Köhler, y J.C. Pechère. 1995. Evidence for an efflux pump in multidrug resistant *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2019-2022.

Chen, C.R., M. Malik, M. Snyder, y K. Drlica. 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone induced DNA cleavage. *J. Med. Biol.* 258: 627-637.

Chopra, I., P.M. Hawkey, y M. Hinton. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* 29: 245-277.

Chu, D.T.W., y P.B. Fernandes. 1989. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 131-135.

Dalkes, G.L.; V.T. Eblans, y G.G. Jackson. 1988. Alteration in outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* associated with selective resistance to quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 785-787.

Dalhoff, A. 1994. Quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Development during therapy and clinical significance. *Infection.* 22(Suppl 2): 111-121.

Dámaso, D., M. Moreno-López, y R.M. Daza. 1984. Polimixinas. En *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos de uso clínico*. Ed. Grutesa. Madrid, España. p365-375.

Davies, J.E. 1995. Esplendor y decadencia de los antibióticos. *Mundo Científico.* 143: 128-135.

Davies, J. 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia SEM.* 12: 9-16.

Davis, B.D. 1987. Mechanism of bacterial action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* 51: 341-350.

Davis, R., A. Markham, y J.A. Balfour. 1996. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs.* 6: 1019-1074.

Dechéne, M., H.Leying, y W. Cullmann. 1990. Role of the outer membrane for quinolone resistance in enterobacteria. *Chemother.* 36: 13-23.

Deitz, W.H., T.M. Cook, y W.A. Goos. 1966. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli* III. Conditions required for lethality. *J. Bacteriol.* 91: 768-773.

de Kruif, P. 1995. Cazadores de microbios. Salvat Editores. Barcelona. p325-347.

del Villar, A. 1993. Antisépticos urinarios, sulfonamidas, cotrimozaxol y metronidazol. En *Tratamiento antimicrobiano*. Drobnic ed. Grupo Bristol. Ediciones Doyma, Barcelona. p191-200.

Diedrich, D.L., M.A. Stein, y C.A. Schnaitman. 1990. Associations of *Escherichia coli* K-12 OmpF trimers with rough and smooth lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 172: 5307-5311.

Diver, J. 1989. Quinolone uptake by bacteria and bacterial killing. *Rev. Infect. Dis.* 11 (suppl.5): 941-959.

Diver, J.M., L.J.V. Piddock, y R. Wise. 1990. The accumulation of five quinolone antibacterial agents by *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemothr.* 25: 319-333.

Domagala, J.M., L.D. Hanna, L.C. Heifetz, M.P. Hutt, T.F. Mich, P.S. Sanchez, y M. Salomon. 1989. New structure activity relationship of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* 29: 394-404.

Doyle, R.J., y N.C. Lee. 1986. Microbes, warfare, religion and human institutions. *Can. J. Microbiol.* 32: 193-200.

Drlica, K. 1984. Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol. Rev.* 48: 273-289.

Drlica, K. 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 6: 425-433.

Drlica, K., y X. Zhao. 1997. DNA-gyrase topoisomerase IV, and the 4-quinolone. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 377-392.

Easmon, C.S.F., y J.P. Cranc. 1985. Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 67-73.

Endtz, H.P., G.J. Ruijs, B. van Klingeren, W.H. Jansen, T. van der Reyden, y R.P. Mouton. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolone in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 199-208.

Falkow, S. 1991. Bacterial entry into eukariotic cells. *Cell.* 65: 1099-1102.

Farmer, J.J., B.R. Davis, F.W. Hickman, F.H. Hickman, D.P. Bodey, M. Negut, y R.A. Bobo. 1976. Detection of *Serratia marcescens* outbreaks in hospital. *Lancet ii*, 455-459.

Ferrero, L., B. Cameron, M.D. Lagneux, J. Crouzet, A. Famechon, y F. Blanche. 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* topoisomerase IV: a primary target for quinolones. *Mol. Microbiol.* 13: 641-653.

Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff, y C.F. Earhart. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium laurylsarcosinate. *J. Bacteriol.* 115: 717-722.

Flor, S., D.R.P. Guay, J.A. Opsahk, K. Tack, y G.R. Matzke. 1990. Effects of magnesium-aluminium hydroxyde and calcium carbonate antiacids on bioavailability of ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2436-2438.

Foulds, J., D.M. Murray, T. Chai, y L. Rosner. 1989. Decreased permeation of cephalosporins through the outer membrane of *Escherichia coli* grown in salicylates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 412-417.

Fraimow, H.S., J.B. Greenman, I.M. Leviton, T.J. Dougherty, y M.H. Miller. 1991. Tobramycin uptake in *Escherichia coli* is driven by either electrical potential or ATP. *J. Bacteriol.* 173: 2800-2808.

Frost, R.W., K.C. Lassetter, A.J. Noe, E.C. Shamblen, y J.T. Lettieri. 1992. Effects of aluminium hydroxide and calcium carbonate antiacids on the bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 830-832.



Fukuda, H. S. Hori, y K. Hiramatsu. 1998. Antibacterial activity of gatifloxacin (AM-1155, CG5501, BMS-206584) a new developed fluoroquinolone, against sequentially acquired quinolone resistant mutants and the *norA* transformant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1917-1922

Furet, Y.X., J. Deshusses, y J.C. Pechère. 1992. Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmatic membrane in quinolone susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2506-2511.

García, J.A., y E. García. 1997. Resistencias bacterianas y antibioticoterapia. En *Eficacia in vivo, eficacia in vitro*. Ed. Doyma. Barcelona. p39-50.

García de Lomas, J., D. Navarro, y C. Gimeno. 1993. Mecanismo de acción de los antibióticos. En *Tratamiento antimicrobiano*. Drobnic, L. Editor. Grupo Bristol. Ediciones Doyma. Barcelona.

García-Rodríguez, J.A., M.J. Fresnadillo, M.I. García-García, E. García-Sánchez, J.E. García-Sánchez, I. Trujillano, y the spanish study group on quinolone resistance. 1995. Multicenter spanish study of ciprofloxacin susceptibility in Gram negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 456-459.

Gellert, M., K. Mizunichi, M.H. O'Dea, T. Itoh, y J. Tomizawa. 1977. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA-gyrase activity. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4772-4776.

George, A. M, y S.M. Levy. 1983. Amplificable resistance to tetracycline, chloramphicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.* 155: 531-540.

George, A.M. 1996. Multidrug resistance in enteric and other Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 139: 1-10.

George, J., y I. Morrissey. 1997. The bactericidal activity of lomefloxacin, D-ofloxacin, ciprofloxacin, sparfloxacin and cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 719-723.

Georgopapadakou, H.N. 1993. Penicillin binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(10): 2045-2053.

Gobernado, M., y M. Santos. 1993. Quinolonas. En *Tratamiento antimicrobiano*. Drobnic, L. Editor. Grupo Bristol. Ediciones Doyma. Barcelona.

Goldstein, F.W., y J.F.Acar. 1995. Epidemiology of quinolone resistance: Europe and North and South America. *Drugs.* 49 (Suppl 2): 36-42.

Gomez, J.L.. Páginas de la historia de la farmacia. 1995. Ediciones Latros. p161.

Gootz, T.D., y B.A. Martin. 1991. Characterization of high level quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 840-845.

Goss, W.A, W.H. Deitz, y T.M. Cook. 1965. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli* II. *J. Bacteriol.* 89: 1068-1074.

Goss, W.A, W.H. Deitz, y T.M. Cook. 1964. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 88: 1112-1118.

Greeberg, J.T., y B. Demple. 1989. A global response induced in *Escherichia coli* by redox cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J. Bacteriol.* 171: 3933-3939.

Greenberg, J.T, J.H. Chou, P.A. Mochach, y B. Demple. 1991. Activation of oxidative stress genes by mutations of the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 4433-4439.

Grimont, F., y P.A.D. Grimont. 1992. The genus *Serratia*. En *The Prokaryotes*, 2ª Edición, Vol II, pág. 2822-2448. A Ballows, H.G. Trüpper, M. Dworkin, W.H. Tno, y K.H. Schleifer, editores. Springer-Verlag, New York.

Grimont, P.A.D., F. Grimont, y H.L.C. Dulong de Rosnay. 1977. Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.* 98: 39-66.

Grimont, P.A.D. y F. Grimont. 1978. The genus *Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 221-248.

Grüneberg, R.N. 1994. Changes in urinary pathogens and their antibiotic sensitivities, 1971-1992. *J. Antimicrob. Chemother.* 33 (SupplA): 1-8.

Gutman, L., R. Williamson, N. Moreau, M.D. Kitzis, E. Collatz, J.F. Acar, y F.W. Goldstein. 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimetoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enteribacter*, and *Serratia*. *J. Infect. Dis.* 151: 501-507.

Guymon, F.L., D.L. Walstad, y P.F. Saparling. 1978. Cell developpe alterations in antibiotic sensitive and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 136 : 391-401.

Hächler, H., P.S. Cohen, y S.B. Levy. 1991. *marA*, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 5532-5538.

Haemers, A., D. C.Leusen, W. Bolaert, M. Zhang, S.R. Pattyn. 1990. Influence of N-substitution on antimycobacterial activity of ciprofoxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 496-497.

Hagman, K.E., W. Pan, B.G. Apratt, J.T. Balthazar, R.C. Judd, y W.M. Shafer. 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology.* 141 : 611-622.

Hancock, R.E.W. 1981. Aminoglycoside uptake and mode of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 8: 249-276.

Hancock, R.E.W, y F. Bellido. 1992. Antibiotic uptake: unusual results for unusual molecules. *J. Antimicrob. Chemother.* 29: 235-243.

Harvey, D., D. Baltimore, A. Berk, S. Lizipursky, P. Matsudaira y J. Darnell. 1995. Regulation of transcription initiation. En *Molecular cell biology*. 3 ed. Scientific American Books. New York, USA. p405-480.

Hashmi, Z.S., y J.M.B. Smith. 1991. Outer membranes changes in quinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 465-469.

Hayem, G., y C. Carbon. 1995. A reappraisal of quinolone tolerability. The experience of their musculoskeletal effects. *Drug Saf.* 13: 338-343

Hayes, J.D, y C.R. Wolf. 1990. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* 272: 281-295.

Hazishume, H., M. Sanada, S. Nakagawa, y N. Tanaka. 1993. Alteration in expresion of *Serratia marcescens* porins associated wirh decreased outer membrane permeability. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 21-28.

Hefferan, F.C. 1924. The "miraculous" microorganism. *Transactions of the Royal Society Canada.* 18: 1-17.

Hefferan, M. 1904. A comparative and experimental study of bacilli producing red pigement. *Zentralblatt für Bakteriol. Parasitenkunde, und Intfektionskheiten.* Abt.311-317; 397-404; 456-475; 520-540.

Heisig, P., H. Schedletzky, y H. Falkenstein-Paul. 1993. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 696-701.

Heising, P., y R. Tschorny. 1994. Characterization of fluoroquinolone resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1284-1291.

Hejazi, A., y F.R. Falkiner. 1997. *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol.* 46: 903-912.

Hines D.A., P.N. Saurugger, G.M. Ihler, y M.J. Benedik. 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170: 4141-4146

Hirai, K., H. Aoyama, S. Suzue, T. Irikura, S. Iyobe, y S. Mitsuhashi. 1986a. Isolation and characterization of nor-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 248-253.

Hirai, K., H. Aoyama, T. Irikura, S. Iyobe, y S. Mitsuhashi. 1986b. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 : 535-538.

Hirota, Y., H. Suzuki, Y. Nishamura, y S. Yasuda. 1977. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E.coli* lacking a murein lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 1417-1420

Hitchcock, P.J., y T. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154: 269-277.

Hoon, J., E.H. Cho, K.S. Kin, H.Y. Kin, y Y.M. Kin. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from *Serratia marcescens* and characterization of mutations in *gyrA* of quinolones resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 : 190-193.

Hooper, D.C, y J.S. Wolfson. 1985. The fluoroquinolones; pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 716-721.

Hooper, D.C, y J.S. Wolfson. 1989. Mode of action of the quinolone antimicrobial agents; review of a recent information. *Rev. Infect. Dis.* 11(suppl5): S902-S911.

Hooper, D.C., J.S. Wolfson, S.K. Souza, E.Y. Ng, L.G. Mchugh, y M.N. Swartz. 1989. Mechanism of quinolone resistance in *Escherichia coli*: characterization of *nfxB* and *cfxB*, two mutant resistance loci decreasing norfloxacin accumulation. *Antimicrob. Agents Chemothr.* 33: 283-290.

Hooper, D.C., J.S. Wolfson, M.A. Bozza, y E.Y. Ng. 1992. Genetics and regulation of outer membrane protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1151-1154.

Hooper, D.C., y J.S.Wolfson. 1993a. Mechanism of bacterial resistance to quinolones. En *Quinolone antimicrobial agents*. 2<sup>nd</sup> Ed. Edited by Hooper, D.C., y J.S. Wolfson. American Society for Microbiology. Washington, DC.

Hooper, D.C, y J.S . Wolfson. 1993b. Mechanisms of quinolone action and bacterial killing. En *Quinolone antimicrobial agents*. 2<sup>nd</sup> ed. Edited by Hooper and Wolfson. American Society Microbiology, Washington, DC.

Hooper, D.C. 1995. Quinolone mode of action. *Drug*. 49 (suppl2): 10-15.

Hoshino, K., A. Kitamura, I. Morrissey, K. Sato, J. Kato y H. Ikeda. 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2623-2627.

Howard, A., J.T.D. Joseph, L.L.O. Bloodworth, J.A Frost, H. Chart, y B. Rowe. 1990. The emergence of ciprofloxacin resistance in *Salmonella typhimurium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 296-298.

Hutsul, J.A., y E. Worobe. 1994. Molecular characterization of 40 kDa OmpC-like porin from *Serratia marcescens*. *Microbiol.* 140: 379-387.

Hutsul, J.A., y E. Worobe. 1997. Molecular characterization of *Serratia marcescens* OmpF porin, and analysis of *S.marcescens* OmpF and OmpC osmoregulation. *Microbiol.* 143 : 2797-2806.

Inoue, S., T. Ohue, J. Yamagishi, J. Nakamura, y M. Shimizu. 1978. Mode of incomplete cross-resistance among piromidic acid and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 240-245.

Inouye, M., J. Show, y C. Shen. 1972. The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247: 8154-8159.



Ito, A., K. Hirai, y M. Inoue. 1980. In vitro antimicrobial activity of AM 715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 103-108.

Jalal, S., y B. Wretlind. 1998. Mechanism of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 4: 257-262.

Joao, H. M. Cabral, A.P. Jackson, C.V. Smith, N. Shikotra, A. Maxwell, y R.C. Liddington. 1997. Crystal structure of the breakage reunion domain of DNA gyrase. *Nature.* 388: 903-906.

Johnson, A.P. 1997. Veterinary use of antimicrobial agents and problems of resistance in human bacterial infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 285-296.

Kamoto, R., T. Yamamoto, K. Matsumoto, y H. Maeda. 1985. A serratial protease causes vascular permeability reaction by activation Hageman factor-dependent pathway in guinea pigs. *Infect. Immun.* 48: 747-753.

Kampranis, S., y A. Maxwell. 1998. Conformational changes in DNA gyrase revealed by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 273: 22606-22614.

Khachatourians, G.G. 1999. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic resistant bacteria. The National Food Safety Database (<http://www.foodsafety.org/fs/fs211.htm>).

Kirst, H.A., y G.D. Sides. 1989. New directions for macrolide antibiotics: structural modifications and in vitro activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1413-1418.

Köhler, T., M. Michea-Hamzehpour, P. Plesiat, A.L. Kahr, y J.C. Pechère. 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2540-2543.

Koski, P., y M. Vaara. 1981. Polyamides as constituents of the outer membrane of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173: 3695-3699.

Kresken, M., D. Hafner, y H.Mittermayer. 1994. Prevalence of fluoroquinolone resistance in Europe. *Infection.* 22 (Suppl 2): 90-98.

Kubin, R. 1993. Safety and efficacy of ciprofloxacin in paedriatic patients-review. *Infection.* 21: 413-421.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 224:680-685.

Leranoz, S., M.C. Fusté, R.A. Hull, R.P. Williams, y M. Viñas. 1991. Cloning and expresion in *Escherichia coli* of a gene encoding proline oxidase of *Serratia marcescens*. *Microbios.* 67: 87-94.

Leranoz, S., P. Orús, M. Berlanga, F. Dalet, y M. Viñas. 1996. New fimbrial adhesins of *Serratia marcescens* isolated from urinary tract infections: description and properties. *J. Urology.* 157:694-698.

Leshner, G.Y., E.J. Froelich, M.D. Gruett, J.H. Bailey, y R.P. Brundage. 1962. 1,8-naphthyridine agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1063-1065.

Leviton, I.M., H.S. Fraimow, N. Carrasco, T.J. Dougherty, y M.H. Miller. 1995. Tobramycin uptake in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 467-475.

Lewin, C.S., y J.T. Smith. 1988. Bactericidal mechanism of ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 22 (supplC): 1-8.

Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on the theme. *TIBS Ed.* 4: 119-123.

Lewis, K., D.C. Hooper, y M. Quellette. 1997. Multidrug resistance pumps provide broad defense. MDR pumps expel a broad array of otherwise toxic molecules, including many antibiotics, from microorganisms. *ASM news.* 63: 605-610.

Li, R.C., D.E. Nix, y J.J. Schentage. 1994. Interaction between ciprofloxacin and metal cation: its influence on physicochemical characteristic and antibacterial activity. *Pharm. Res.* 11: 917-20.

Li, X.Z., H. Nikaido, y K. Poole. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas earuginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1948-1953.

Limb, D.I., D.J.W. Dabbs, y R.C. Spencer. 1987. In vitro selection of bacteria resistant to the 4-quinolone agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 19: 65-71.

Lorén, J.G., y J. Guinea. 1978. Efecto de la concentración de glucosa en la biosíntesis de prodigiosina por *Serratia marcescens*. *Revista Española de Fisiología*. 34: 247-252.

Luttinger, A. 1995. The twister "life" of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *J. Mol. Biol.* 15: 601-606.

Lyerly, D., y A. Kreger. 1983. Importance of serratia protease in the pathogenesis of experimental of *Serratia marcescens* pneumonia. *Infect. Immun.* 40: 113-119.

Ma, D., D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nikaido, y H.E. Hearst. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 : 6299-6313.

Ma, D., D.N. Cook, J.E. Hearst, y H. Nikaido. 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram negative bacteria. *Trens in Microbiology*. 489. 2: 489-493

Ma, D., D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nikaido, y J.E. Hearst. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16: 45-55

Macfarlane, G. Fleming. 1988. Biblioteca Salvat de grandes biografías. Barcelona.

Maesen, F.P.V., J.P. Teengs, C. Baur, y B.I. Davies. 1984. Quinolones and raised plasma concentration of theophylline. *Lancet*. ii 530.

Mahr, G., F. Sörgel, y G.R. Granneman. 1992. Effects of temafloxacin and ciprofloxacin on the pharmacokinetics of caffeine. *Clin. Pharmacok.* 22 (Suppl 1): 90-97.

Maki, D.C., C.G. Hennekens, C.W. Phillips, W.V. Shaw, y J.V. Bennet. 1973. Nosocomial urinary tract infection with *Serratia marcescens*: an epidemiological study. *J. Infect. Dis.* 128: 579-587.

Malouin, F., G.D. Campbell, M. Halpenny, G.W. Becker, y R.P. Parr. 1990. Outer membrane and porin characteristics of *Serratia marcescens* *in vitro* and in rat intraperitoneal diffusion chambers. *Infect. Immun.* 58 : 1247-1253.

Manning, P.A., y M. Achtman. 1979. Cell to cell interaction in conjugating *Escherichia coli*: the involvement of the cell envelope. En *Bacterial outer membranes*. Ed. M. Inouye. John Wiley and Sons. Inc. New York. p.407-447.

Margullis, L., y D. Sagan. 1995. *¿Qué es la vida?*. Metatemas. Libros para pensar la ciencia. Fundació la Caixa. Tusquets editores. Barcelona.

Marrie, T.J., J.W. Costerton. 1981. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1093-1102.

Marshall, A.J.H., y L.J.V. Piddock. 1994. Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 34: 465-483.

Marshall, N.J., y L.J.V. Piddock. 1997. Antibacterial efflux system. *Microbiología SEM.* 13: 285-300

Martin, N.L., y T.J. Beveridge. 1986. Gentamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 1079-1087.

Martinez, J.L., E. Cercenado, E. Baquero, J.C. Pérez-Díaz, y A. Delgado-Iribarren. 1987. Incidence of aerobactin production in Gram negative hospital isolates. *FEMS Microbiol. Letters.* 43: 351-353.

Masecar, B.L., R.A. Celesk, y N.J. Robillard. 1990. Analysis of acquired ciprofloxacin resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 281-286.

Masecar, B.L., y J. Robillard. 1991. Spontaneous quinolone resistance in *Serratia marcescens* due to a mutation in *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 898-902.

Masuda, N., E. Sakagawa, y S. Ohya. 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 645-649.

Matsumoto, K., T. Yamamoto, R. Kamata, y H. Maeda. 1984. Pathogenesis of Serratia infection: activation of the Hageman factor-prekallikain cascade by Serratia protease. *J. Biochem.* 96: 739-749

Matsuyama, T., M. Fujita, y I. Yano. 1985. Wetting agent producing by *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol.Lett.* 28: 125-129.

Matsuyama, T., T. Murakami, T. Fujita, M. Fujita, y I. Yano. 1986. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 865-875.

McCaffrey, C., A. Bertasso, J. Pace, y N.H. Georgopapadakou. 1992. Quinolone accumulation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1601-1605.

McMurry, L., R.E. Petrucci, y S.B. Levy. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3974-3977.

Michéa-Hamzehpour, Y.X. Furet, y J.C. Pechère. 1991. Role of protein D2 and lipopolysaccharide in Diffusion of quinolones though the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemothr.* 35: 2091-2097.

Miller, F.P., L.F. Gambino, M.C. Sulavik, y S.J. Gracheck. 1994. Genetic relationship between *soxRS* and the *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1773-1779.

Miller, R.V. 1998. Intercambio de genes bacterianos en la naturaleza. *Invest. y ciencia.* Marzo. p 13-18.

Mirelis, B., E. Miro, F. Navarro, C.A. Ogalla, J. Bonal, y G. Prats. 1993. Increased resistance to quinolone in Catalonia, Spain. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 137-139.

Mitscher, L.A., P. Devasthale, y R. Zavod. 1993. Structure-activity relationships. En *Quinolone antimicrobial agents*. 2<sup>nd</sup> Ed. Edited by Hooper, D.C., y J.S. Wolfson. American Society for Microbiology. p. 3-52.

Mizuno, T., M.Y. Chou, y M. Inouye. 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (*micRNA*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 1966-1970.

Mochales, S. 1994. Forty years of screening programmes for antibiotics. *Microbiologia SEM*. 10: 331-343.

Molla, A., T. Akaike, y H. Maeda. 1989. Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase. *Infect. Immun*. 57: 1868-1871.

Moniot-Ville, N., J. Guibert, N. Moreau, J.F. Acar, E. Collatz, y L. Gutmann. 1991. Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother*. 35: 519-523.

Monreal, J., y E.T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol*. 15: 689-696.

Montero, M.T., J. Freixas, y J. Hernández-Borrell. 1997. Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones. 149: 161-170.



Montero, M.T., J. Hernandez-Borrel, y M.W. Keough. 1998. Fluoroquinolone biomembrane interactions: Monolayer and calorimetric studies. *Langmuir*. 14: 2451-2454.

Morrissey, I., K. Hoshino, K. Sato, A. Yoshida, I. Hayakawa, M.G. Bures, y L.L. Shen. 1996. Mechanism differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1775-1784.

Morrissey, I. 1997. Bactericidal index: a new way to assess quinolone bactericidal activity *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 713-717.

Mortimer, P.G.S., y L.V.J. Piddock. 1991. A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by Enterobacteriae, *Pseudomonas* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 639-653.

Munford, C.A., y M.J. Osborn. 1983. An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1159-1163.

Nagarajau, R. 1991. Antimicrobial activities and mode of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 605-609.

Nakae, R., y T. Nakae. 1982. Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 554-559.

Nakae, T. 1997. Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Microbiología SEM*. 13: 273-284.

Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima, y H. Yoshida. 1989. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 254-255.

Nakanishi, N.S., H. Yoshida, H. Wakebe, M. Inoue, y S. Mitsuhashi. 1991. Mechanism of clinical resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1053-1059.

Nakashima, A.k., A.K. Highsmith, y W.J. Martone. 1987. Survival of *Serratia marcescens* in benzalkonium chloride and in multiple dose medication vials: relationship to epidemic septic arthritis. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1019-1021.

Neil, F., E. Fairweather, y I.B. Holland. 1980. Inhibition of deoxyribonucleic acid gyrase: Effects on nucleic acid synthesis and cell division in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 142: 153-161.

Neu, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257: 1064-1072.

Neyfakh, A.A., V.E. Bidnenko, y L.B. Chen. 1991. Efflux mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4781-4785.

Nikaido, H., y M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.

Nikaido, H., y D.G. Thanassi. 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 37: 1393-1399.

Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability and active efflux. *Science.* 264: 382-388.

Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853-5859.

Nikaido, H. 1998. Antibiotic resistance caused by gram negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* 27 (Suppl1): 32-41.

Okuda, J.S., M. Okamoto, M. Takahata, y T. Nishino. 1991. Inhibitory effects of ciprofloxacin and sparfloxacin on DNA gyrase purified from fluoroquinolone resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2288-2293.

Oppegaard, H. y H. Sorum. 1996. Contribution in quinolone resistant isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2460-2464.

Oram, M., y L.M. Fisher. 1991. 4-quinolone resistance mutations in the DNA-gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 387-389.

Otsuki, M., y T. Nishino. 1996. The synergic effects of quinolones and oral cephem antibiotics on *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 771-776.

Ouabdesselam, S., D.C. Hooper, J. Tankovic, y C.J. Soussy. 1995. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1667-1670.

Palomar, J., R. Montilla, M.C. Fuste, y M. Viñas. 1993. The role of O-antigen in susceptibility of *Serratia marcescens* to non-immune serum. *Microbios.* 76: 189-196.

Palomar, J. 1994. El lipopolisacarido de *Serratia marcescens* como factor de virulencia. Tesis. Universidad de Barcelona.

Palomar, J. S. Leranoz, y M. Viñas. 1995. *Serratia marcescens* adherence: the effect of O-antigen presence. *Microbios.* 81: 107-113.

Palva, E.T. 1979. Protein interactions in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 136: 286-294.

Pan, X., J. Amber, S. Mehtar, y L.M. Fisher. 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2321-2326.

Pan, X., y L.M. Fisher. 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 471-474.

Pan, X., y L.M. Fisher. 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2810-2816.

Paulsen, I.T., M.H. Brown, y R.A. Skurray. 1996. Proton dependent multidrug efflux system. *Microbiol. Rev.* 60: 575-608.

Piddock, L.V.J., R.N. Walters, y J.M. Diver. 1990. Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2331-2336.

Piddock, L.J.V. 1991. Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 399-403.

Piddock, L.V.J., M.C. Hall, y R.N. Walters. 1991. Phenotypic characterization of quinolone-resistant mutants of *Enterobacteriaceae* selected from wild type, *gyrA* type and multiply-resistant (*marA* type strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 185-198.

Piddock, L.V.J. 1993. Newer fluoroquinolones and gram positive bacteria. *ASM New.* 12: 603-608.

Piddock, L.V.J. 1994. New quinolones and gram positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 163-169.

Piddock, L.J.V., A.J. Marshall, y Y.F. Jin. 1994. Activity of Bay y3118 against quinolone susceptible and resistant gram negative and gram positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 422-427.

Piddock, L.J.V. 1995. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state of the art 1992-1994. *Drugs.* 49 (suppl.2): 29-35.

Piddock, L.J.V. 1995. Quinolone resistance and *Campylobacter* ssp. *J. Antimicrob. Chemother.* 36: 891-898.

Poole, K., K. Krebs, C. McNally, y S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175: 7363-7372.

Pradhan, K.M., N.K. Arora, y A. Jena. 1995. Safety of ciprofloxacin therapy in children: magnetic resonance images, body fluid levels of fluoride and linear growth. *Acta Paediatr.* 84: 555-560.

Price, J.R. 1949. Some reactions of 1-methyl-4-quinolone 3-carboxylic acid, a degradation product of the alkaloids. *Aus. J. Sci.* 217: 272-281.

Puig, M., C. Fusté, y M. Viñas. 1993. Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 39: 108-111.

Puig, M., J. Palomar, J.G. Loren, y M. Viñas. 1995. Modification by analgesics of the susceptibility to antibiotics in *Serratia marcescens*. *Microbiologica*. 18: 385-390.

Ratcliffe, N.T., y J.T. Smith. 1983. Effects of magnesium on the activity of 4-quinolone antibacterial agents. *J. Pharm. Pharmacol.* 35: 61-62.

Reissbrodt, R., y W. Rabsch. 1988. Further differentiation of Enterobacteriaceae by means of siderophore pattern analysis. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene A*. 268: 306-317.

Rjazantseva, I.N., I.N. Andreeva, y H. Ogorodnikova. 1994. Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*. *Microbios*. 79: 155-161.

Rosner, J.L. 1985. Non heritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellents in *Escherichia coli* K12. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 8771-8774.

Rosner, J.L., T.J. Chai, y J. Foulds. 1991. Regulation of OmpF expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 5631-5638.

Ross, D.L., S.K. Elkinton, y C.M. Riley. 1992. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. 1-octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. *Intern. J. Pharm.* 88: 379-389.

Ruiz J., S. Casellas, M.T. Jimenez de Anta, y J. Vila. 1997. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the

*gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemothr.* 39: 839-840.

Rusell, A.D., y I. Chopra. 1996a. Antibiotics that inhibit peptidoglycan synthesis. En *Understanding antibacterial action and resistance*. 2ª Ed. Ellis Horwood. Hertfordshire, Great Britain. p57-78.

Rusell, A.D., y I. Chopra. 1996b. Inhibitors of protein synthesis. En *Understanding antibacterial action and resistance*. 2ª Ed. Ellis Horwood. Hertfordshire, Great Britain. p37-54.

Rusell, A.D., y I. Chopra. 1996c. Inhibitors of nucleic acid synthesis. En *Understanding antibacterial action and resistance*. 2ª Ed. Ellis Horwood. Hertfordshire, Great Britain. p28-32.

Saier, M.H., T.I. Paulsen, K.M. Sliwinski, S.S. Pao, R.A. Skurray, y H. Nikaido. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug specific efflux pumps in bacteria. *FASEB.* 12: 265-274.

Saiz, D. 1996. Relación entre las propiedades fisico-químicas de las fluoroquinolonas y su encapsulación en liposomas. Tesina. Universidad de Barcelona.

Sambrock J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2ª Ed. Cold Spring Harbor. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.



Sansano, S.R., A.M. Amreynard, y R.K. Cunningham. 1985. Inhibition of serum bactericidal reaction by lipopolysaccharide. *Infec. Immun.* 48: 759-762.

Sautter, R.L., K.H. Mattan, y R.C. Legaspi. 1984. *Serratia marcescens* meningitis associated with contaminated benzalkonium chloride antiseptic solution. *Infect. Control.* 5: 223-225.

Sawai, T., S. Hirano, y A. Yamaguchi. 1987. Repression of porin synthesis by salicylate in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 40: 233-237.

Schnaimant, C.A. 1973. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. Effect of preparation conditions on the migration of protein in polyacrilamide gels. *Arch. Biochem. Biophys.* 157: 541-552.

Segev, S., M. rehavi, y E. Rubinstein. 1988. Quinolones, theophylline and diclofenac interactions with the gamma-aminobutyric acid receptor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1624-1626.

Sen, K., y H. Nikaido. 1991. Lipopolyaccharide structure required for in vitro trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J. Bacteriol.* 173: 926-928.

Shafer, W.M., J.T. Balthazar, K.E. Hagman, y S.A Morse. 1995. Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the Mtr R protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to fecal lipids. *Microbiol.* 141: 907-911.

Shen, L.L., L.A. Mitscher, P.N. Sharma, T.J. O'Donnell, D.W.T. Chu, C.S. Cooper, T. Rosen, y A.G. Pernet. 1989. Mechanism of inhibition of DNA-gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry*. 28: 3886-3894.

Shimizu, M., Y. Takase, y S. Nakamura. 1975. Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 132-138.

Simberkoff, M.S. 1980. Experimental *Serratia marcescens* infections and defense mechanisms. A genus *Serratia*. Von Graevenitz, A., y S.J. Rubin edidores. Boca Raton: CRC press.

Smith, H. 1968. Biochemical challenge of microbial pathogenicity. *Bacteriol. Rev.* 32: 164-184.

Smith, J.T. 1984a. Mutational resistance to 4-quinolone antibacterial agents. *Eur. J. Clin. Microb.* 3: 347-350.

Smith, J.T. 1984b. Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *Pharm. J.* 233: 299-305.

Spratt, B.G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*. 264: 388-392.

Stamm, W.E., C.A. Kolf, E.M. Dones, R. Havariz, R.L. Anderson, J.J. Farmer, y H.R. de Quiñones. 1976. A nurse outbreak caused by *Serratia marcescens* scalp-vein needles as a portal of entry. *J. Pediatr.* 87: 96-99.

Stanier, R.Y. 1980. The journal, not the arrival, matters. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 1-48.

Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis y P.R. Painter. 1989. *Microbiología*. 2ª edición. Ed. Reverté. Barcelona.

Stille, W., S. Harder, S. Mieke, C. Beer, P.M. Shan, K. Frech, y A.H. Staib. 1987. Decrease of caffeine eliminations in man during coadministration of 4-quinolone. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 729-734.

Storm, D.R., K.S. Rosenthal, y P.E. Swanson. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 723-763.

Sugawara, E., y H. Nikaido. 1992. Pore forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 2507-2511.

Sugino, A., C.L. Peebles, K.N. Kruezer, y N.R. Cozzarelli. 1977. Mechanism of action nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4767-4771.

Sugino, A., N. Higgins, P.O. Brown, C.L. Peebles, y N.R. Cozzarelli. 1978. Energy coupling in DNA-gyrase and the mechanisms of action of novobiocin. *Proc. Natl. Sci. Usa.* 75: 483-4842.

Sugino, A., y K.F. Bott. 1991. *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriol.* 141: 1331-1339.

Takacs-Novak, K., B. Noszal, I.H. ermecz, G. Kereszturi, B. Podanyi, y G. Szasz. 1990. Protonation equilibria of quinolone antibacterials. *J. Pharm. Sci.* 79: 1023-1028.

Tapsall, J.W., E.A. Phillips, T.R. Shultz, y C. Tacker. 1996. Quinolone resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sydney, Australia, 1991 to 1995. *Sex. Trasm. Dis.* 23: 425-5.

Thanassi, D.G., G.S.B. Suh, y H. Nikaido. 1995. Role of outer membrane barrier in efflux mediated tetracycline resistance of *EScherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 998-1007.

Thanassi, D.G., L.W. Cheng, y H. Nikaido. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 2512-2518.

Thomson, A.H., G.D. Thomson, M.Hepburn, y B. Whiting. 1987. A clinically significant interaction between ciprofloxacin and theophyline. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 33: 435-436.

Tipper, D.J. 1979. Mode of action of  $\beta$ -lactams antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 1: 39-53.

Tomás., J.M., V.J. Benedí, B. Ciurana, y J. Jofre. 1986. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infec. Immun.* 54: 85-89.

Traub, W.H. 1972. Continued surveillance of *Serratia marcescens* infections by bacteriocin typing: investigation of two outbreaks of cross infection in an intensive care unit. *Appl. Microbiol.* 23: 982-985.

Trias, J., M. Viñas, J. Guinea, y J.G. Lorén. 1987a. Isolation from urine of two *Serratia marcescens* strains excreting a diffusible yellow pigment. *J. Gen. Microbiol.* 133: 773-777.

Trias, J., M. Viñas, J. Guinea, y J.G. Lorén. 1987b. A method for the enrichment of auxotrophic mutants of *Serratia marcescens* with the antibiotic azthreonam. *Letters Appl. Microbiol.* 4: 81-84.

Trias, J., M. Viñas, J. Guinea, y J.G. Lorén. 1988. Induction of yellow pigmentation in *Serratia marcescens*. *Appl. Environmental Microbiol.* 54: 3138-3141.

Trias, J., M. Viñas, J. Guinea, y J.G. Lorén. 1989. Brown pigmentation in *Serratia marcescens* cultures associated with tyrosine metabolism. *Can. J. Microbiol.* 35: 1037-1042.

Tsai, C.M., y C.E. Frasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 119: 115-119.

Ueki, T., T. Mitsui, y H. Nikaido. 1970. X-ray diffraction studies of outer membrane of *Salmonella typhimuium*. *J. Biochem.* 85: 173-182.

Vaara, M., y T. Vaara. 1983. Polycations as outer membrane disorganizing agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 114-122.

Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56: 395-411.

Van Der ley, P., A. Bekkers, J. Van Meersbergen, y J. Tommassen. 1987. A comparative study on the *phoE* genes on three enterobacterial species. Implications for structure function relationships in a pore forming protein of the outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 164: 469-475.

Vázquez, J.L., M.T. Montero, J. Trias, y J. Hernández-Borrel. 1998. 6-fluoroquinolone liposome interactions: fluorescence quenching study using iodine. *Intern. J. Pharm.* 171: 75-86.

Vicent, S., B. Glauner, y L. Gutmann. 1991. Lytic effect of two fluoroquinolones, ofloxacin and pefloxacin, on *Escherichia coli* W7 and its consequences on peptidoglycan composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1381-1385.

Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goñi, E. Giralt, y T.M. Jimenez de Anta. 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MIC's. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2477-2479.

Vila, J., J. Ruiz, P. Goñi, y M.T. Jimenez de Anta. 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 491-493.

Vila, J., J. Ruiz, P. Goñi, y T. Jimenez de Anta. 1997. Quinolone resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 757-762.

Vila, J., C. Olmos, M. Ballesteros, J.A. Vázquez, M.S. Jimenez, F. Marco, y L. Aguilar. 1997. Development of in vivo resistance after quinolone treatment of gonococcal urethritis. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 841.

Viñas, M., J.G. Lorén, y J. Guinea. 1983. Particulate bound pigment of *Serratia marcescens* and association with the cellular envelopes. *Microbios.* 24: 19-26.

Viñas, M., A. El-Ebiary, J. Guinea, y J.G. Lorén. 1987. Effect of gramicidin and valinomycin on prodigiosin production by non proliferating *Serratia marcescens*. *J. Antibiotics.* 40: 113-115.

Viñas, M., S. Leranoz, M. Puig, y J. Palomar. 1996. Els factors de virulència en *Serratia marcescens*. En la Recerca a la Facultat de Farmàcia de Barcelona. PPU-Universitat de Barcelona. Barcelona.

Virca, G.D., D. Lyerly, A. Kreger, y J. Travis. 1982. Inactivation of human plasma  $\alpha$ -proteinase inhibitor by a metalloproteinase from *Serratia marcescens*. *Bioch. Biophys. Acta.* 704: 267-271

Walker, G.C. 1984. Mutagenesis and inducible responses to DNA damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 60-93.

Watanabe, M., Y. Kotera, K. Yosue, M. Inoue, y S. Mitsuhashi. 1990. In vitro emergence of quinolone resistant mutant of *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 173-175.

Weidekam, E., R. Portmann, K. Suter, C. Partos, D.Dell, y P.W. Lücker. 1987. Single and multiple dose pharmacokinetics of fleroxacin, a trifluorinated quinolone in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1909-1914.

Weigel, L.M., C.D. Steward, y F.C. Tenover. 1998. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2661-2667.

Williams, R.P., y S.M.H. Qadri. 1980. The pigment of *Serratia*. En *The genus Serratia*, 31-75. A. von Graevenitz, S. Rubin, Eds. CRS Press. Boca Raton, Florida, USA.

Willmott, C., y A. Maxwell. 1993. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents chemother.* 37: 126-127.

Wise, R., M. Lockley, J. Dent, y M. Webberly. 1984. Pharmacokinetics of intravenously administered ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 202-210.

Wolfson, J.S., y D.C. Hooper. 1989a. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 378-424.

Wolfson, J.S., y D.C. Hooper. 1989b. Bacterial resistance to quinolones: mechanisms and clinical importance. *Rev. Infect. Dis.* 11(suppl 5): S960-S968.



Yamagishi, J., H. Yoshida, M. Yamagoshi, y S. Nakamura. 1986. Nalidixic acid resistant mutation of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 367-373.

Yamagishi, J., T. Kojima, Y. Oyamada, K. Fujimoto, H. Hattori, S. Nakamura, y M. Ionue. 1996. Alterations in DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1157-1163.

Yamagishi, J., Y. Furutami, S. Inoue, T. Ohue, S. Nakamura, y M. Shimizu. 1981. New nalidixic acid resistance mutation related to deoxyribonucleic acid gyrase activity. *J. Bacteriol.* 148: 450-458.

Yamaguchi, A., H. Ohmori, M. Kanero-Ohdera, T. Nomura, y T. Sawai. 1991.  $\Delta$ pH-dependent accumulation of tetracycline in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 53-56.

Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, y S. Nakamura. 1990. Quinolone resistance determining region in the DNA-gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1271-1272.

Zeller, V., C. Janoir, M.D Kitzis, L. Gutmann, N.J. Moreau. 1997. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1973-1978.

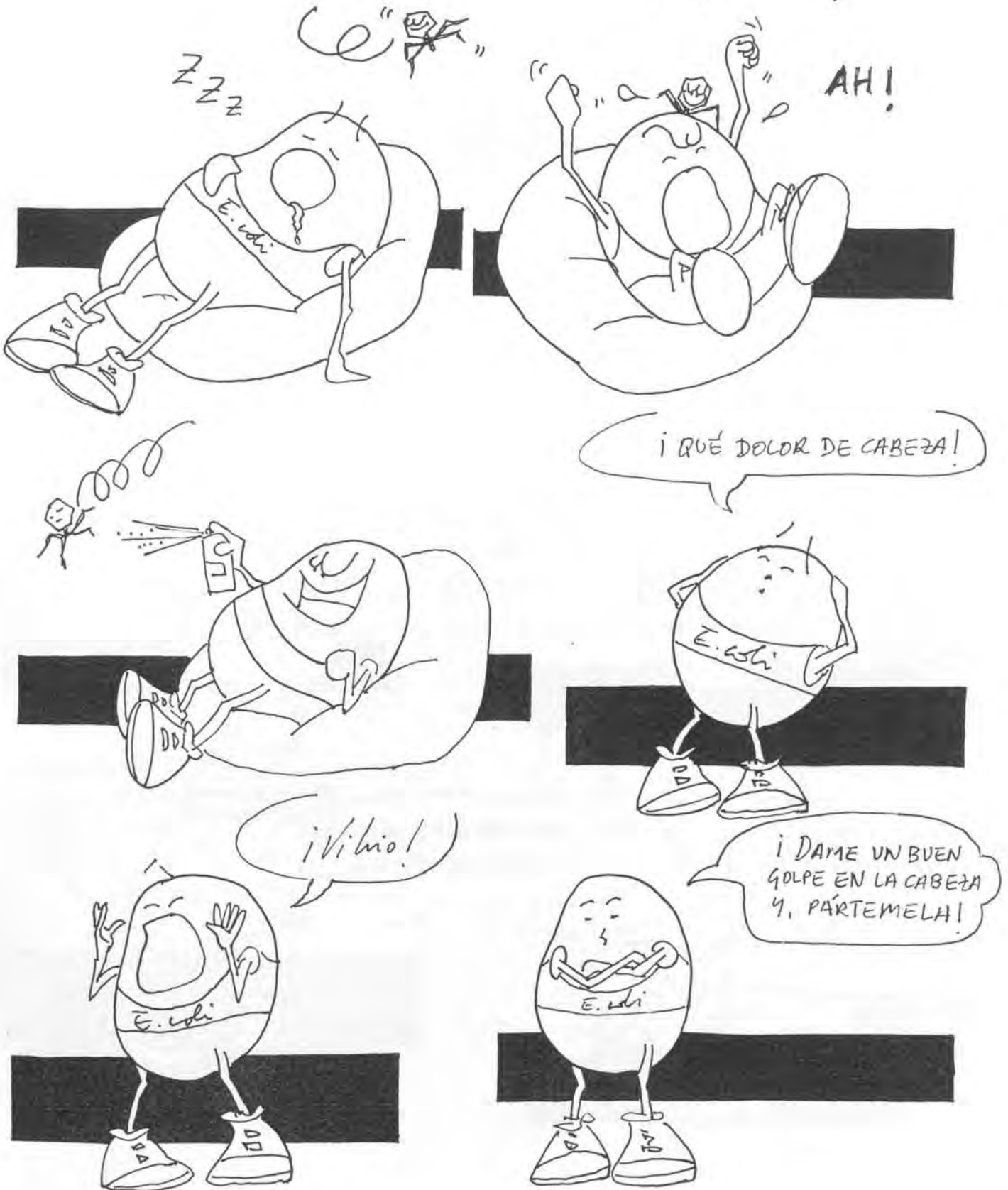
Zhao, X., C. Xu, J. Domagala, y K. Drlica. 1997. DNA topoisomerase targets of fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13991-13996.

---

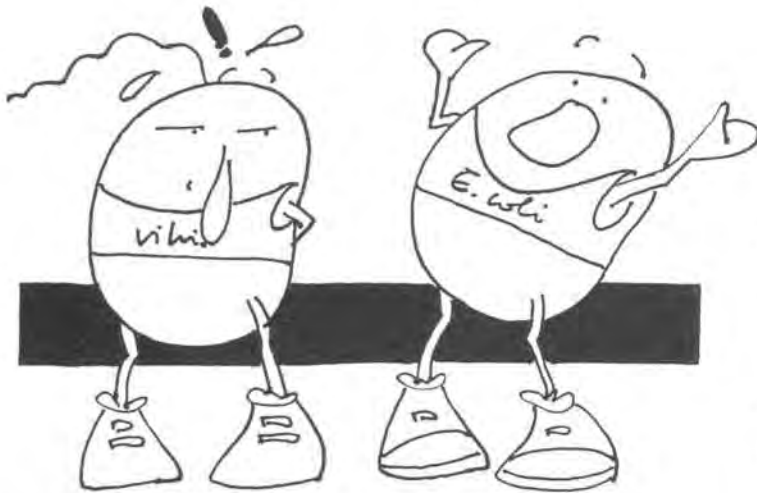
ANEXO

# EL GÉNERO *Serratia*: Diálogos de los dioses

*M. Palanca*



¡ME MUERO DE DOLOR DE PARTO!  
¡ME ESTÁ TRASTORNANDO EL  
CROMOSOMA!



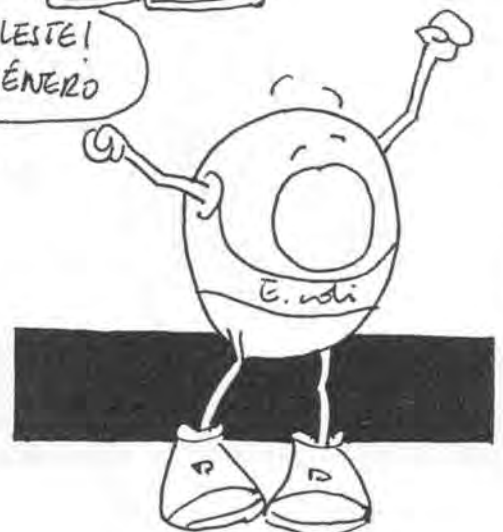
¿QUÉ ES ESTO?, ¡GRANDE  
ERA EL MAL QUE TENÍAS EN  
LA CABEZA!



... Y, LA LLAMAREMOS  
*Senatia*!!



¡QUE NADIE ME MOLESTE!  
... GESTARÉ OTRO GÉNERO

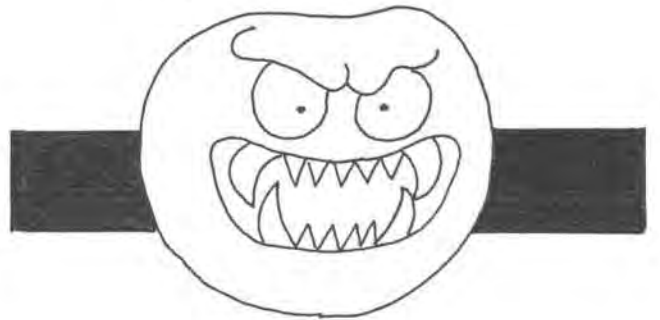
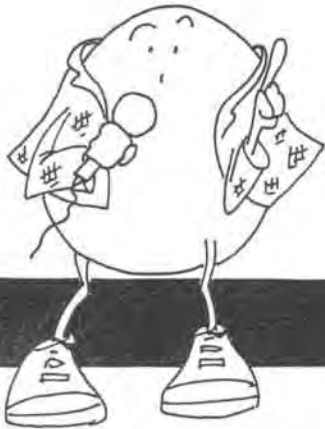


# Patógenos bacterianos

*n. palompa*

¡ NOS HEMOS REUNIDO PROCARIOTAS  
TODOS, PARA ESTUDIAR CÓMO  
VAN NUESTRAS ACCIONES EN  
"LA EMPRESA: "INFECCIÓN Y  
ENFERMEDAD BACTERIANA S.A!"

SOY UN *Streptococcus*  $\beta$ -HEMOLÍTICO.  
SOY EL RESPONSABLE DE LA  
ESCARLATINA. AUNQUE EN LA  
ACTUALIDAD ME DEDICO A LAS  
PNEUMONÍAS, OTITIS Y MENIN-  
GITIS



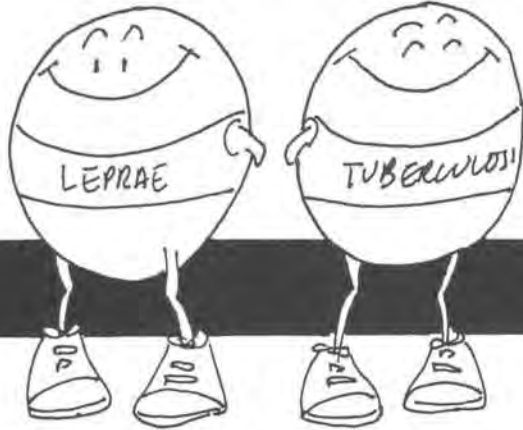
CORRÍA EL AÑO 1347... FUI RESPONSABLE DE LA "MUERTE NEGRA";  
AUNQUE NO ERA LA PRIMERA VEZ QUE ATORMENTABA A LA  
POBLACIÓN DE EUROPA... ¡ SOY *Yersinia pestis*! ¡ VIVA LA PESTE!



¿ POR QUÉ ME LLAMAN  
"LA PESTE"? , ¡ QUE CONSTE  
QUE YO NO EMITO MALOS  
OLORES!



¡HOLA!, ¡SOMOS Mycobacterium!



SOY UN "MICROORGANISMO FRÍO"... SÓLO PUEDO CAUSAR DAÑO EN LAS PARTES SUPERFICIALES DEL CUERPO (DEDOS, NARIZ, TESTÍCULOS...) ¡CÓMO ECHO DE MENOS LAS LEPROSERÍAS DE SIGLOS ANTERIORES



¡LA ORIGINALIDAD DEL HOMBRE, A VECES ME SORPRENDE! COMO MI NOMBRE INDICA, SOY RESPONSABLE DE LA LEPRA



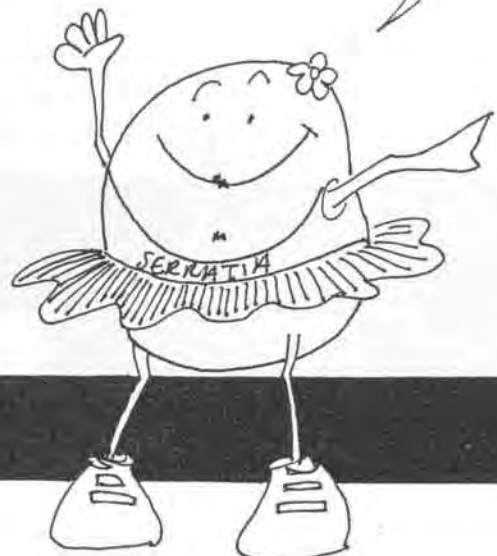
YO, SOY RESPONSABLE DE LA TUBERCULOSIS. ADEMÁS DE TENER IMPORTANCIA A NIVEL DE SALUD PÚBLICA; SOY EL "MICROORGANISMO DE LA LITERATURA"...



MOLIÈRE Y BALZAC LA PADECIERON... ¡QUÉ ME DEUS DEL ROMANTICISMO LITERARIO!



¡HOLA!, SOY SERRATIA



EH TÚ!! , ¿ SE PUEDE SABER QUÉ HACES AQUÍ ?



SOY Bordetella pertussis AGENTE CAUSAL DE LA TOS-FERINA

y yo Corynebacterium diphtheriae . VIVA LA DIFTERIA!

¡ ESTOY ESPERANDO TU RESPUESTA!



BUENO, SÓLO SOY UN PATÓGENO NOSOCOMIAL ...

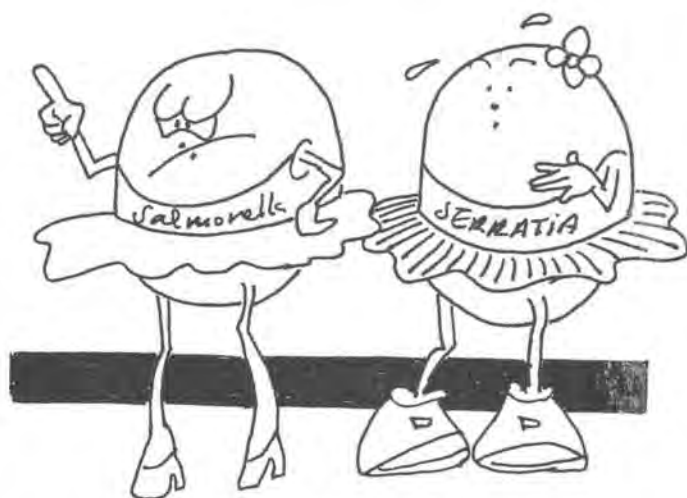
... y mi INFLUENCIA " EN HECHOS MILAGROSOS " A LO LARGO DE LA HISTORIA . ¡ HOSTIA ... SAGRADA!



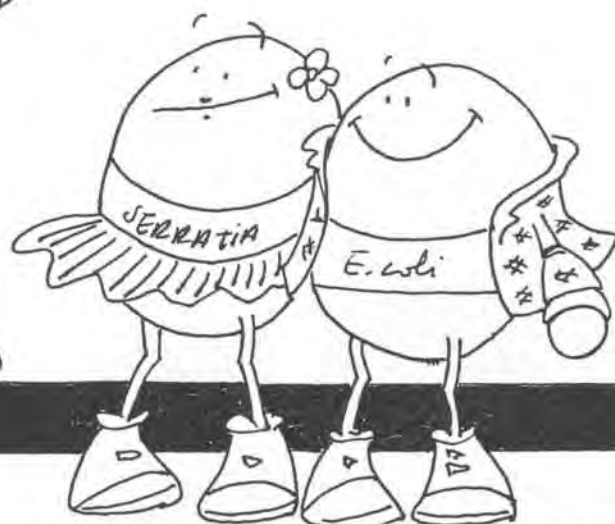
¡ A VER QUÉ ESTÁ PASANDO  
AQUÍ!



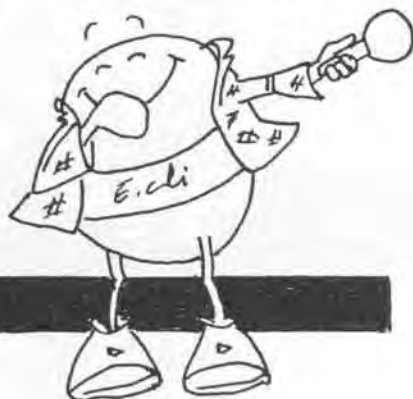
¡ CUIDADIN CON INSULTAR A  
UN MIEMBRO DE MI FAMILIA!



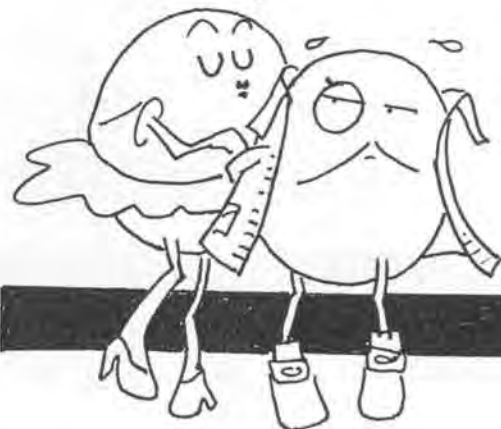
SOY Salmonella, ACTUALMENTE 9020 DE MÁS ÍNDICE DE  
IMPACTO EN PRENSA QUE NINGUNA DE VOSOTRAS, SOBRETUDO EN  
VERANO



EJEM... NO ES POR... PERO EN FIN,  
YO SOY EL AGENTE CAUSAL DE NUMEROSAS  
INFECCIONES URINARIAS...



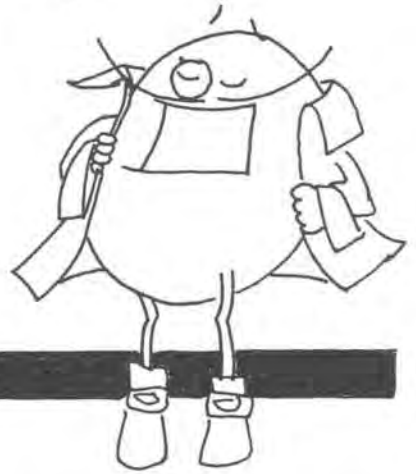
¡ HOLA CARIÑITO MÍO!





MUY BIEN Haemophilus, EXPLICANDOS,  
DELEITANDOS CON LO QUE HACES...  
JE, JE, JE

SI INSISTES... MI NOMBRE  
ES Haemophilus influenzae,  
SOY "AMANTE DE LA SANGRE"



¡DÓNDE ESTÁ ESA  
"BACTERIO-ZORRONA"!

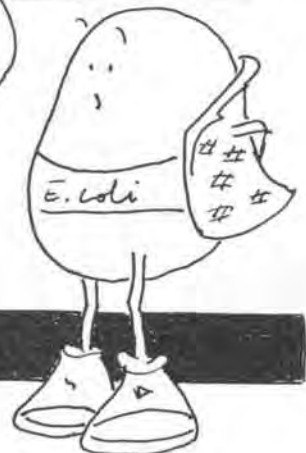
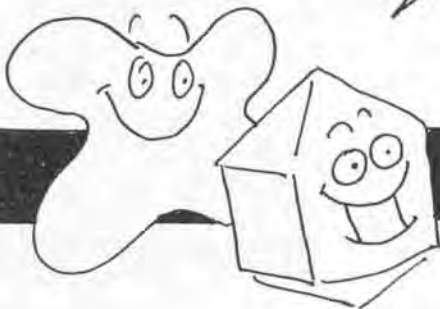
Uy!

ESTA MAYONESA  
SIEMPRE ME DEJA EN  
RIDÍCULO



ESPERADNOS, SOMOS LOS VIRUS  
DE LAS PAPERAS Y DEL  
SARAMPIÓN

¡ME TEMO CHICOS QUE OS  
HABEIS EQUIVOCADO!, ¡SÓLO  
PATÓGENOS  
BACTERIANOS!



GRACIAS Haemophilus  
POR TUS EXPLICACIONES. AHORA  
PASAREMOS A LAS "BACTERIAS  
DEL PECADO"

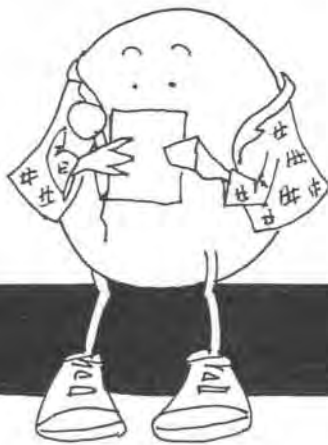


¡HOLA! soy Neisseria gonorrhoeae  
AGENTE CAUSAL de la GONORREA

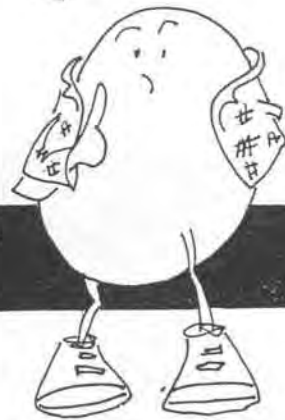


Yo, Treponema  
pallidum.  
"LA SÍFILIS"

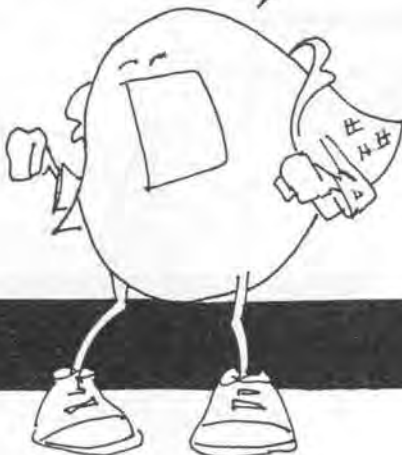
BUENO, ME COMUNICAN QUE  
Rickettsia, AGENTE CAUSAL DEL  
TIFUS, NO PUEDE ASISTIR DADAS  
SUS "OBLIGACIONES COMO PATÓGENO"



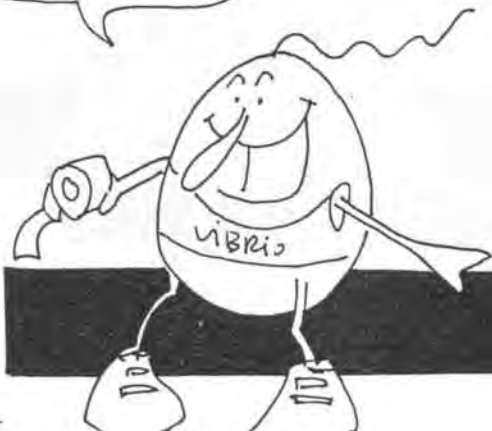
... Y PARA FINALIZAR NUESTRO  
REPASO, LLAMAREMOS "AL  
CÓLERA". NO SIN ANTES  
ADVERTIR QUE NO "SEMOS"  
TODOS LOS QUE HEMOS  
NOMBRADO, LOS ÚNICOS  
AGENTES CAUSANTES DE  
ENFERMEDAD



¡Vibrio cholerae!



SIENTO EL RETRASO, ESTABA  
OCUPADO... POR CIERTO, CREO  
QUE ESTE ES EL ÚLTIMO ROLLO  
DE PAPEL



# ¡ALERTA ROJA!

*M. Galang*

¿OS HABEIS ENTERADO?  
¡SOMOS NOTICIA!



¡TODOS LOS MEDIOS DE  
COMUNICACIÓN HUMANOS NOS ALUDEN!



SE HA DECLARADO LA ALARMA  
POR UN BROTE DE "SERRATIDIS" EN  
LA 5ª PLANTA DE  
BELLVITGE

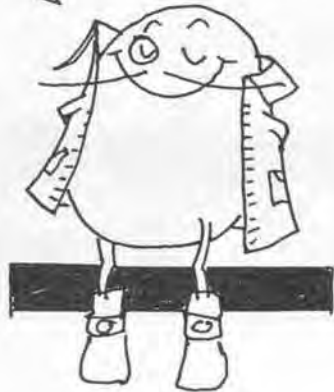


BAH!, ¡VOSOTROS NO  
TENEIS NI IDEA DE LO QUE ES  
UN PATÓGENO!



UN PATÓGENO ES  
UN ORGANISMO CAPAZ  
DE CAUSAR ENFERME-  
DAD... Y YO LA HE  
CAUSADO!!!

YO SOY UN PROFESIONAL



NO COMO OTROS... ¡PATÓGENOS DE  
PACOTILLA!, ¡¡OPORTUNISTAS!!



¡ENVIDIOSO!



SABED QUE LA ENFERMEDAD REPRESENTA LA "RESPUESTA" CLÍNICA APARENTE O EL DAÑO DEL HUESPED COMO RESULTADO DE UNA INFECCIÓN

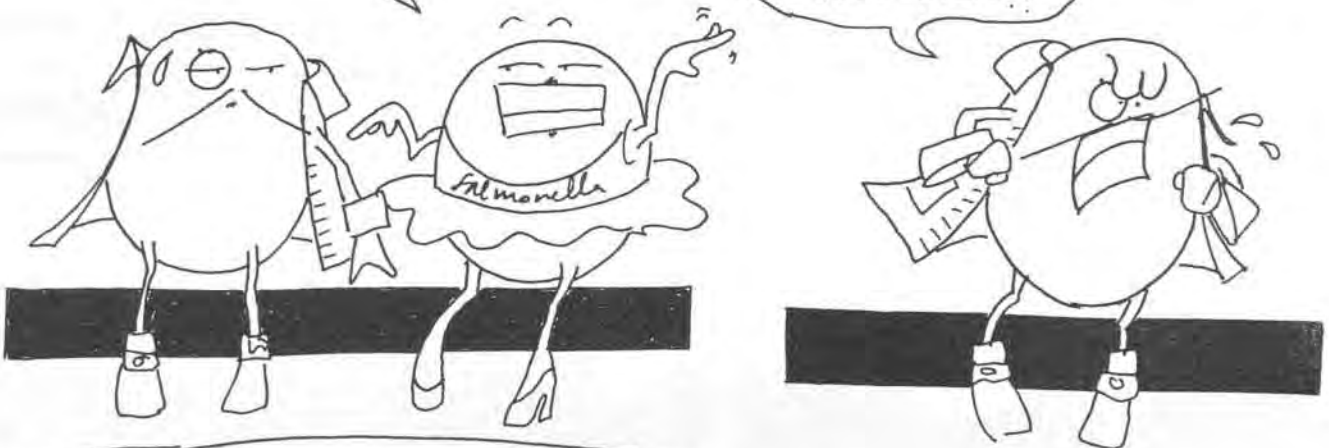
LA INYECCIÓN ES LA INTRODUCCIÓN AL INTERIOR DE UN ORGANISMO DE ...

¡¡ ESO MISMO INYECCIÓN!!

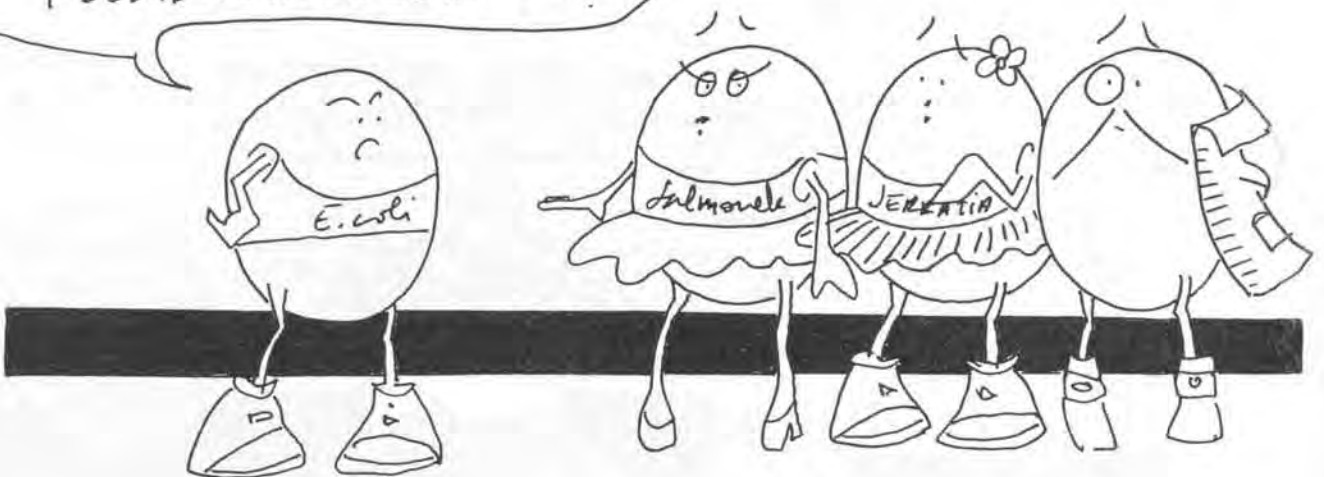


... UNA SOLUCIÓN MEDIANTE UN INSTRUMENTO ADECUADO

POR LAS BOMBAS DE REFLUJO AcrAB-Like, DE QUÉ ESTÁS HABLANDO BACTERIA LOCA!! ¡HE DICHO INFECCIÓN!!



¡ DEJAD DE HACER EL HUMANO!



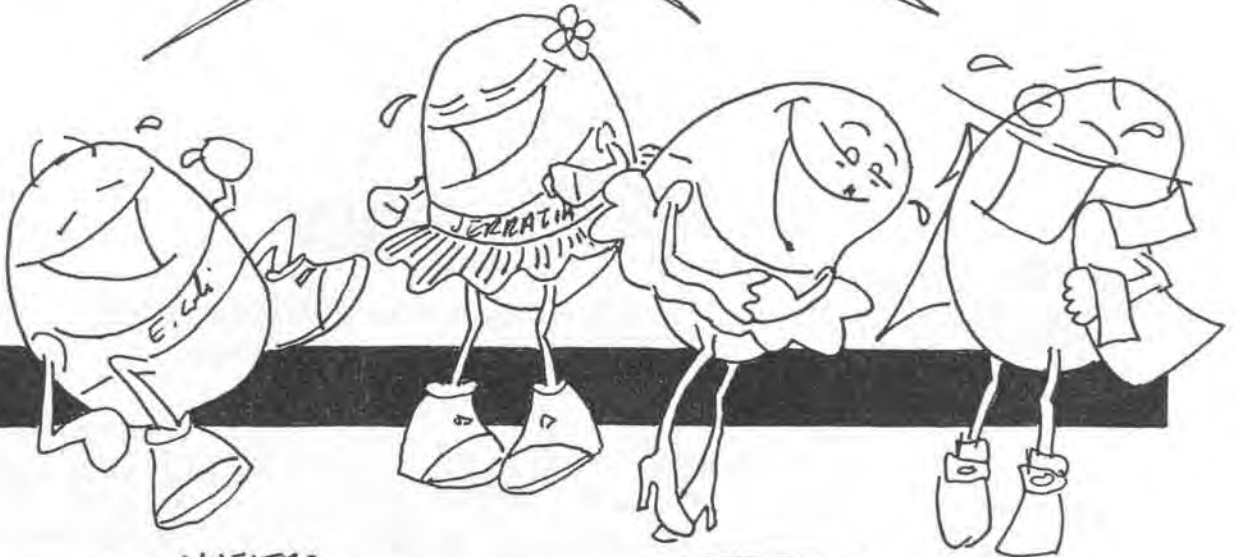
SIN EMBARGO, ES UNA LUCHA  
DESIGUAL. ELLOS DISPONEN DE TODO  
UN ARSENAL TERAPEÚTICO



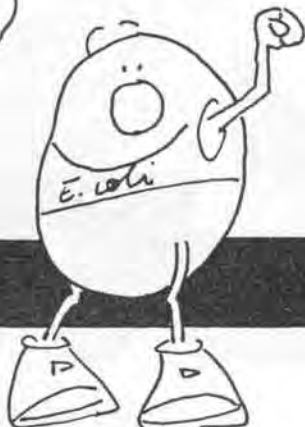
ES UNA LUCHA SIN TREGUA.  
PERO NOSOTROS APRENDEMOS  
RÁPIDAMENTE A HALERLES  
FRENTE



JA, JA, JA



¡LUCHAMOS POR NUESTRO  
DERECHO A UNA INFECCIÓN  
LIBRE!



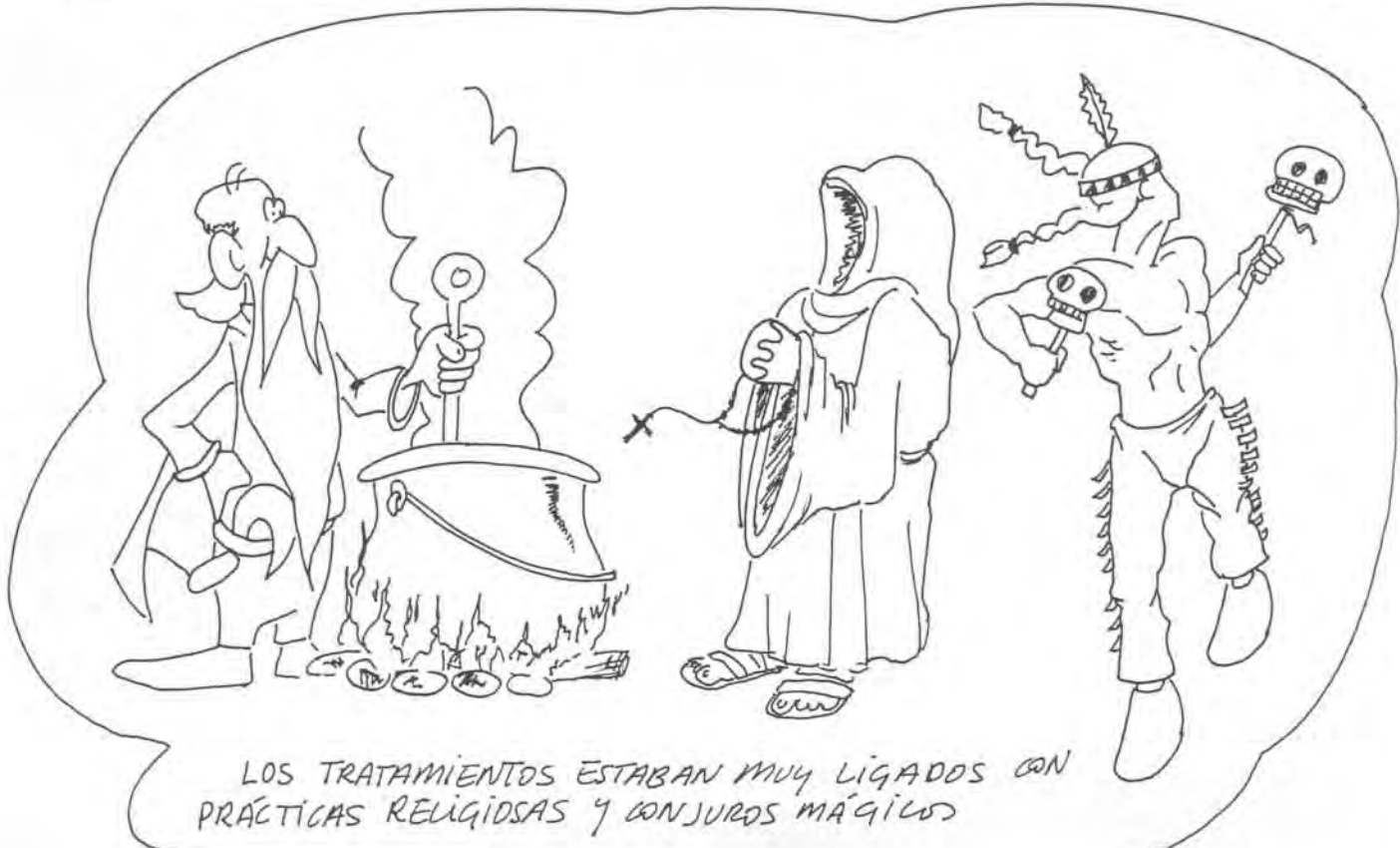
EN DEFINITIVA, ¡QUE  
ORGULLOSA ESTOY DE SER  
PROCARIOTA!



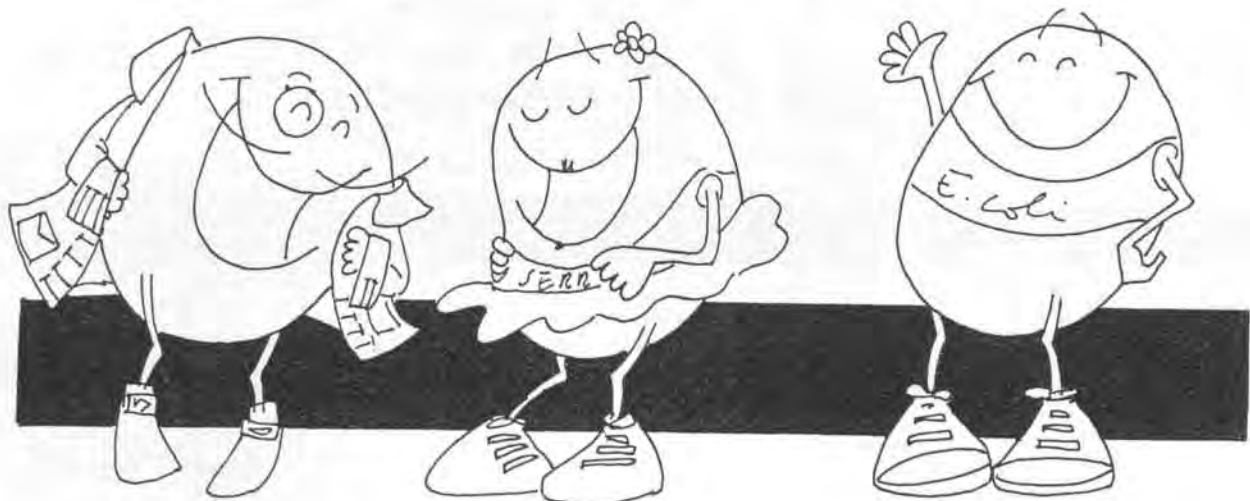
# Antibióticos

*M. Sabang*

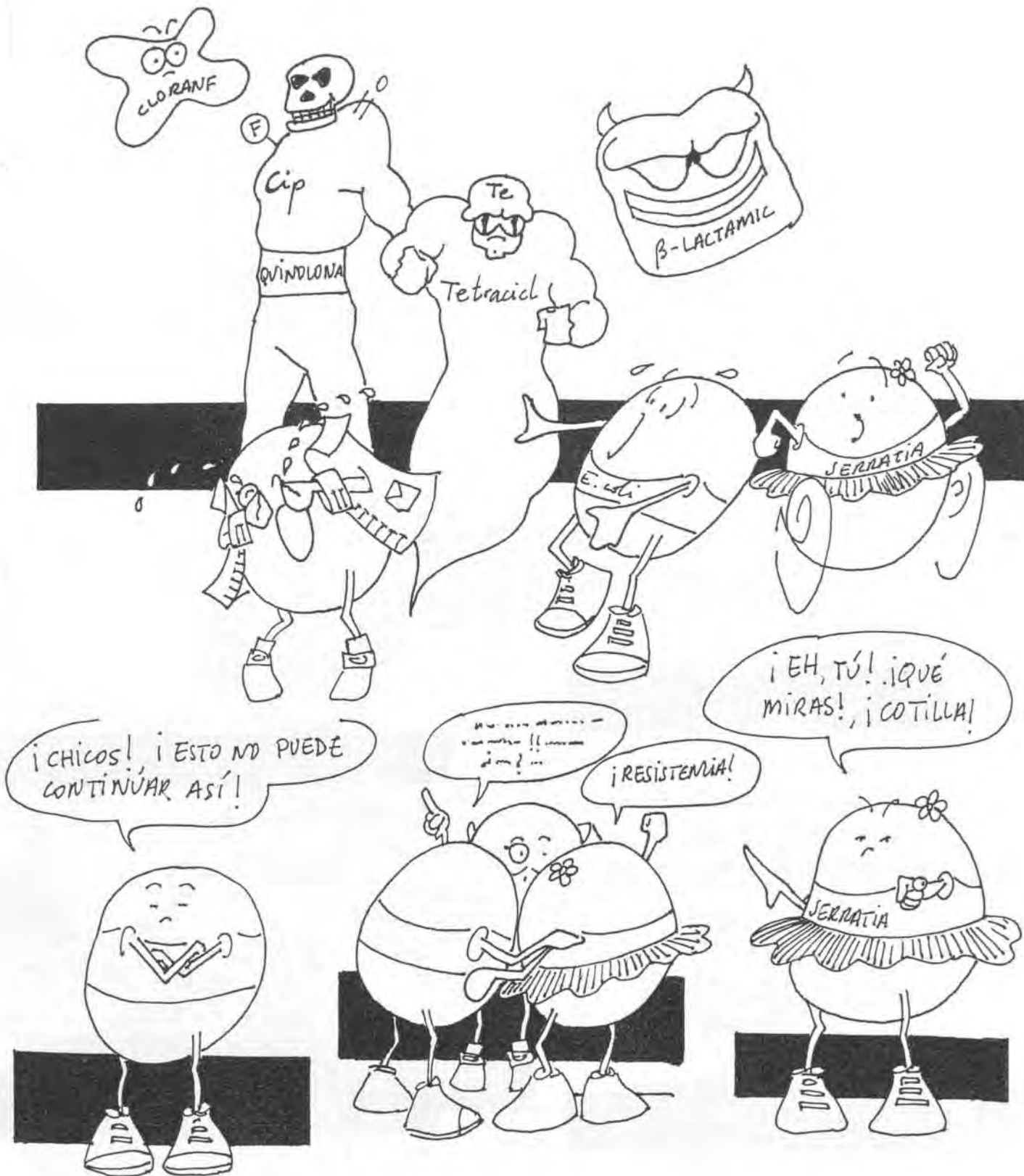
ERA PRE-ANTIBIÓTICA. HUBO UN TIEMPO EN QUE LA ENFERMEDAD ERA ENTENDIDA COMO CONSECUENCIA DE LA INTERVENCIÓN DE FUERZAS DEL ESPÍRITU, QUE MÁS TARDE SERÍA CONVERTIDA EN TÉRMINOS DE CASTIGO DIVINO O DE INTERVENCIÓN DIABÓLICA.



JA, JA, JA



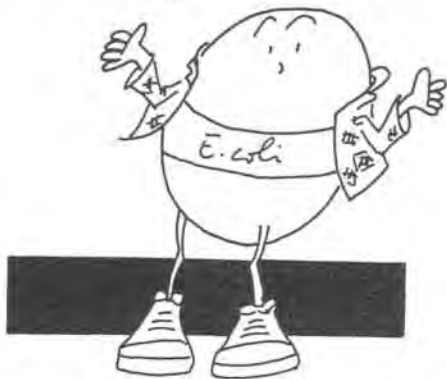
EL GRAN AVANCE DE LA QUIMIOTERAPIA PROCEDE DEL DESCUBRIMIENTO FORTUITO DE MICROORGANISMOS QUE SINTETIZAN Y EXCRETAN COMPUESTOS QUE SON SELECTIVAMENTE TÓXICOS PARA OTROS. LOS ANTIBIÓTICOS HAN CONSTITUIDO UNA MANERA MUY EFICIENTE DE ABORDAR EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS



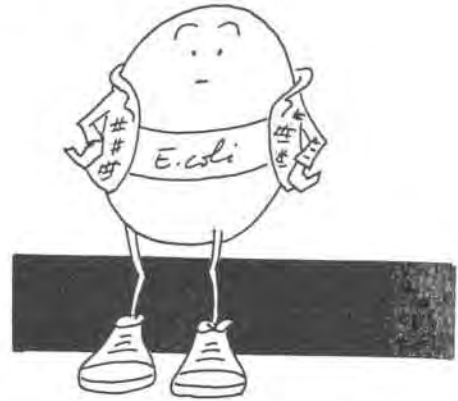
Lo que necesitas  
es  
**AMOR**

*M. Berlanga*

¿QUÉ ES LA SEXUALIDAD?



¡DESDE UN PUNTO DE VISTA BIOLÓGICO!



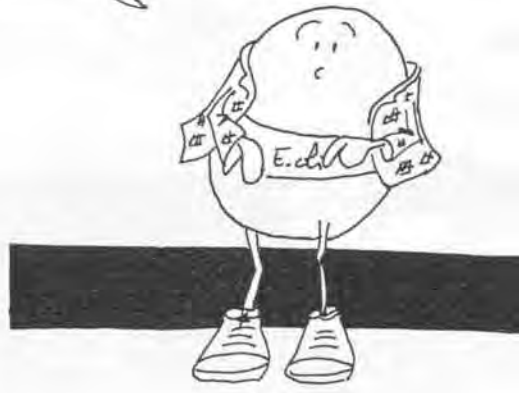
ES LA UNIÓN DE MATERIAL GENÉTICO PROCEDENTE DE MÁS DE UN ORIGEN DISTINTO



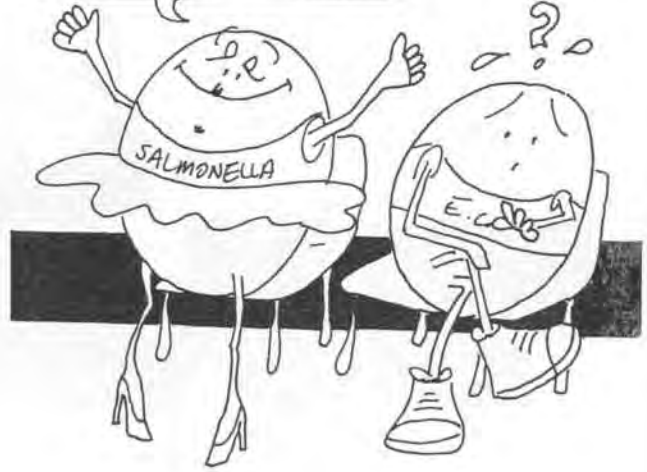
EL ACTO DE PASAR ÁCIDO NUCLEICO A UNA CÉLULA DESDE UN VIRUS, UNA BACTERIA O CUALQUIER OTRO ORIGEN ES: ¡SEXUALIDAD!



LA FUSIÓN DE DOS CÉLULAS GERMINALES HUMANAS ES...



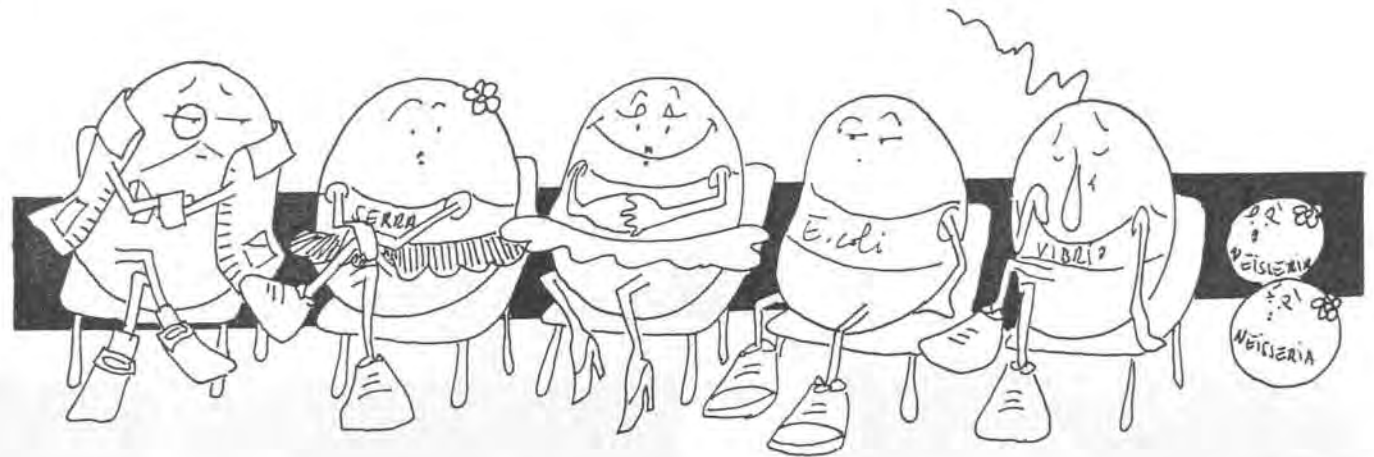
¡SEXUALIDAD!





¡LA INFECCIÓN DEL SER HUMANO POR EL VIRUS DE LA GRIPE CONSTITUYE UN ACTO SEXUAL MEDIANTE EL CUAL SE INSERTA EN SUS CÉLULAS MATERIAL GENÉTICO!

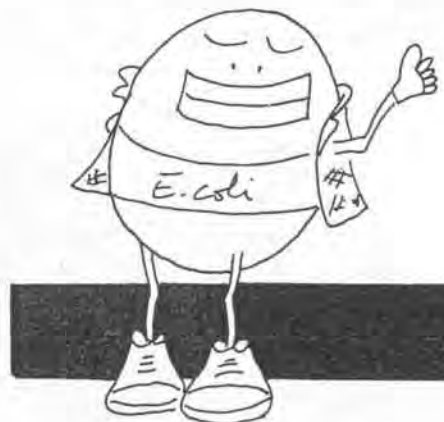
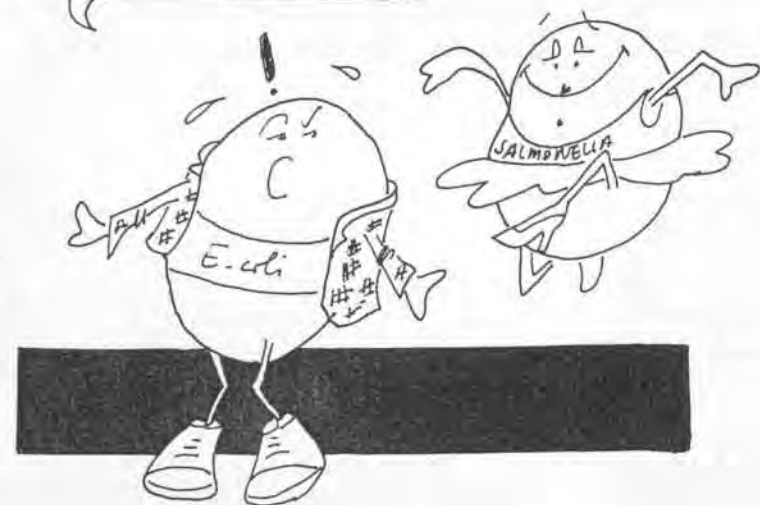
¡SEXUALIDAD!



SEXUALIDAD O INTERCAMBIO GENÉTICO BACTERIANO...

¡CONJUGACIÓN!

ADEMÁS DE LA CONJUGACIÓN, TAMBIÉN DISPONEMOS DE LA TRANSFORMACIÓN Y TRANSDUCCIÓN

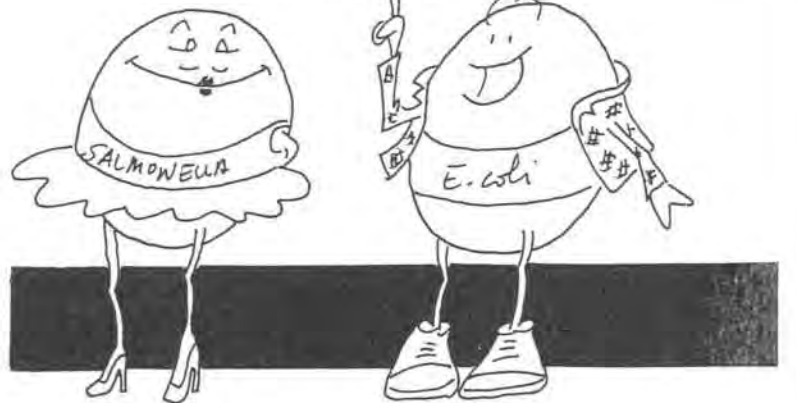


¿ALGUIEN QUIERE HACER  
ALGÚN COMENTARIO?



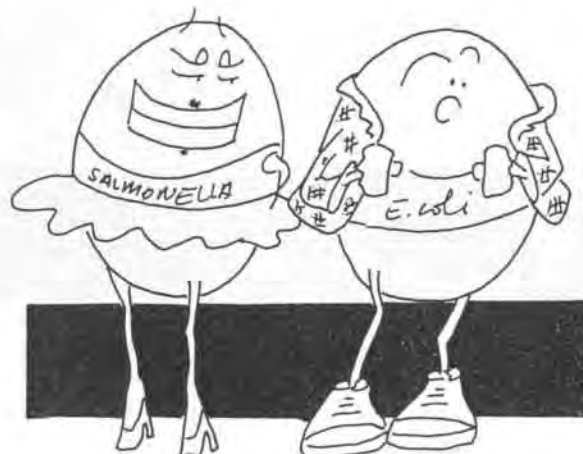
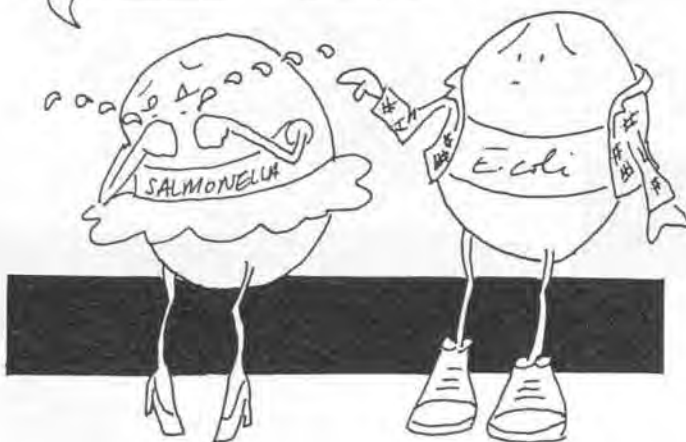
¿NO ES VERDAD QUE LAS CEPAS  
BACTERIANAS ESTÁN CONSTANTEMENTE  
INTERCAMBIANDO FRAGMENTOS DE MATERIAL  
GENÉTICO ENTRE ELLAS DE FORMA  
NATURAL?

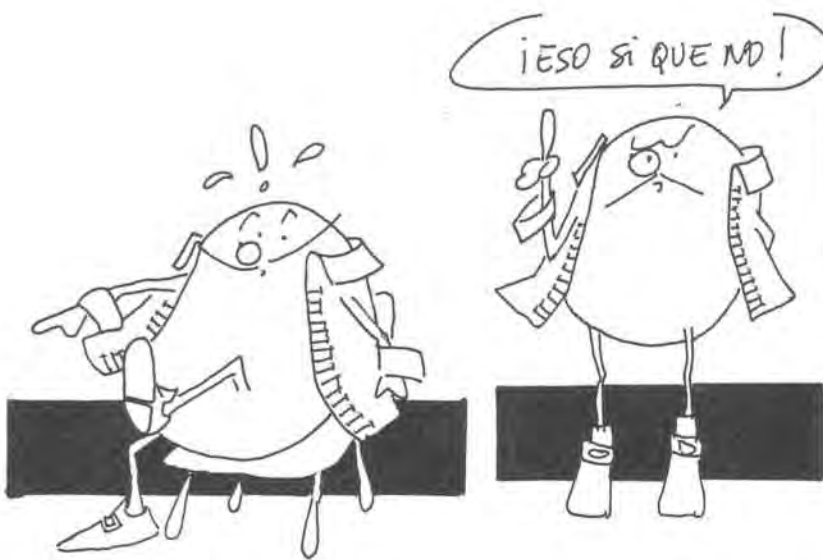
¡EXACTO!, Y ESTO HA SIDO  
CRUCIAL PARA RESPONDER  
CON RAPIDEZ A LOS CAMBIOS  
AMBIENTALES Y SITUACIONES  
CRÍTICAS



PUES... BASÁNDOME EN ESTA  
CARACTERÍSTICA NUESTRA... ¡HE  
INSISTIDO REITERADAMENTE EN LA  
CONJUGACIÓN CON Haemophilus!...  
¡NEGÁNDOSE SIEMPRE!...

¿DÓNDE ESTÁ ESE CANALLA?





¡SEPA USTED! QUE LA SEXUALIDAD, EN REALIDAD, NO ES NECESARIA PARA LA MAYORÍA DE MIEMBROS DE 4 DE LOS 5 REINOS EN QUE SE DIVIDEN LOS SERES VIVOS



NO PUEDE PERDONAR QUE HAYA COMPARTIDO MIS RESISTENCIAS CON *E. coli* EN LAS PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA

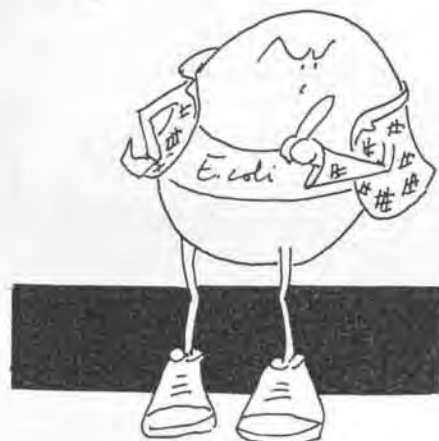


YO, QUE SIEMPRE ESTOY A PUNTO PARA CONTRIBUIR CON GENES ÚTILES...



LOS SISTEMAS BACTERIANOS HAN ESTADO INTERCAMBIÁNDOSE INFORMACIÓN COMO UNA RED DE ORDENADORES CON UNA MEMORIA ACUMULADA DURANTE MILES DE MILLONES DE AÑOS DE FUNCIONAMIENTO CONTINUO. TRANSMITIMOS INFORMACIÓN GENÉTICA EN SENTIDO VERTICAL (DESCENDENCIA) Y HORIZONTAL (A OTRAS BACTERIAS).

¡VAMOS "HIJA-MÍA"! ¡LA PROMISCUIDAD BACTERIANA NO ES PECADO!

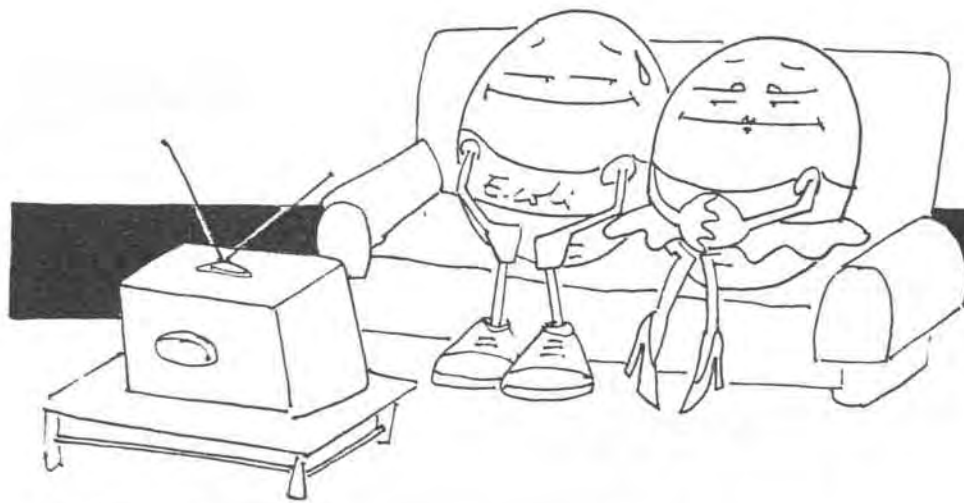


# CONJUGACIÓN

"SEXUALIDAD BACTERIANA"...  
INTERCAMBIO DE GENES DEPENDIENTE  
DE CONTACTO DIRECTO... UMMM MUY  
INTERESANTE...



QUE TE PARECE SI CONJUGAMOS  
UN RATITO Y TE PASO UNA  
RESISTENCIA



AAAH!!, SIQUE,  
CUIDADO...

NO TE PARES!!  
CORRE, CORRE...  
AHORA, ASÍ, ASÍ...

GOOOO!!

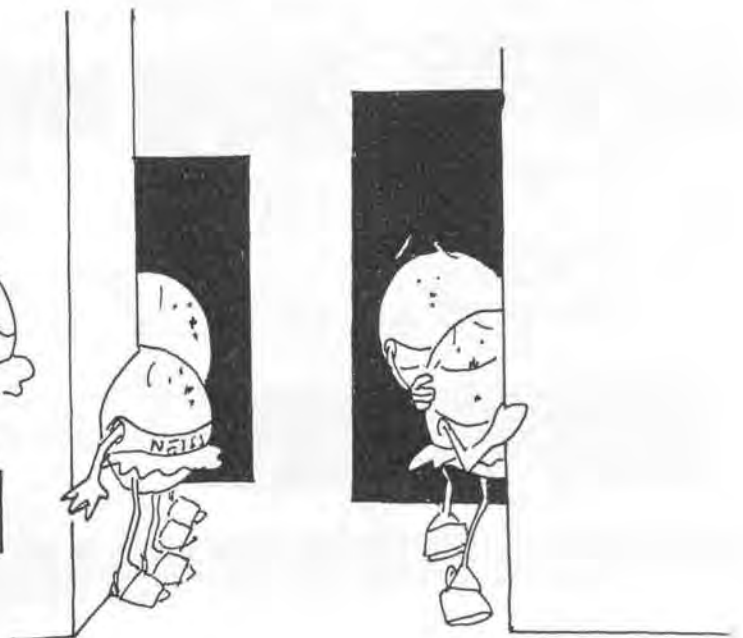
GRRR!!



*m. berlanga*

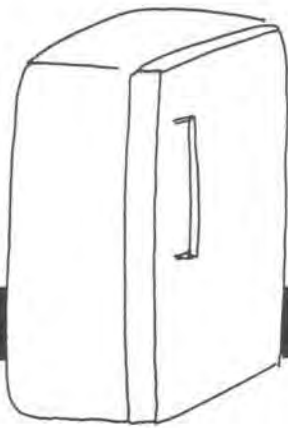
# "TRANSFORMACIÓN!"

*m. Belanga*



¡LO HEMOS CONSEGUIDO!

ME GUSTARÍA ALGO NUEVO



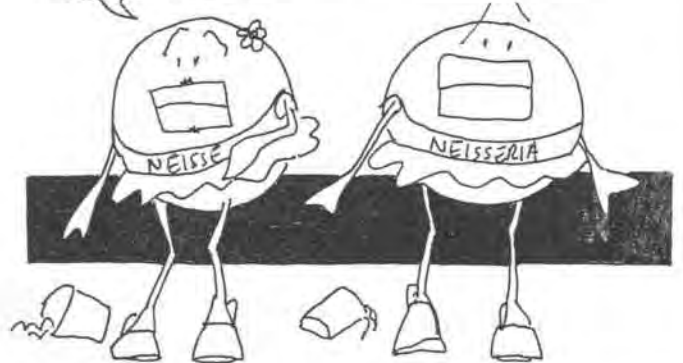
"TIENE BUENA PINTA"



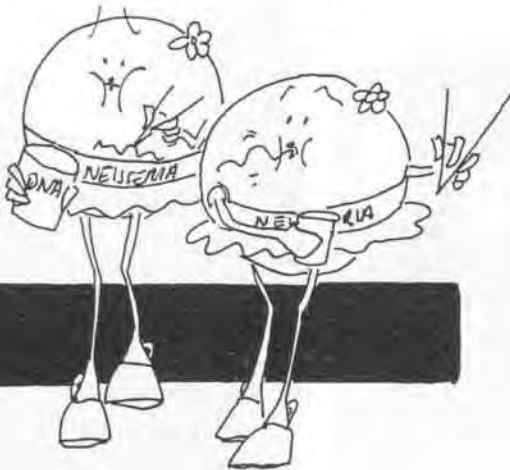
NO SÉ QUE ME OCURRE...

¿QUÉ ME ESTÁ PASANDO!

¡BVENÍSIMOS! ¡"FIDEOS" DE DNA!



¡NO QUIERO MORIR SIN HABER CUMPLIDO MI DESTINO... UNA MENINGITIS!



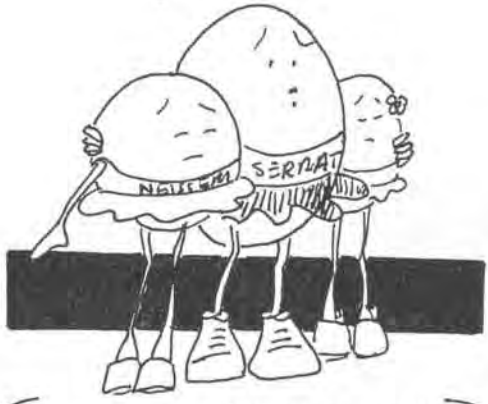
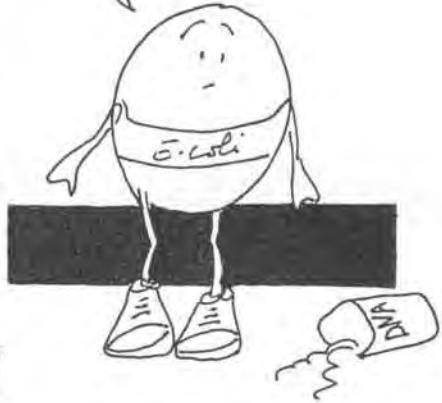
¡QUÉ PASA! ¡A QUÉ SE DEBE ESA PÉRDIDA DE AGUA!



¡AH! YA VEO!

LO ÚNICO QUE PODEMOS HACER ES ESPERAR Y VER QUE PASA

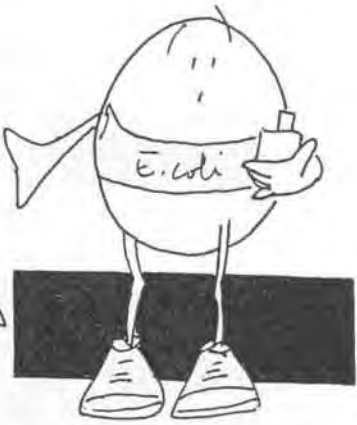
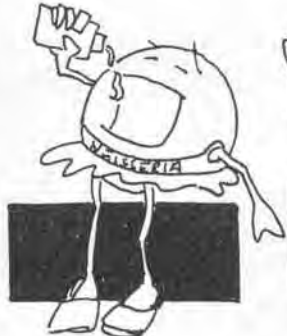
¡ÁNIMO! ¡HABÉIS SIDO MUY VALIENTES!



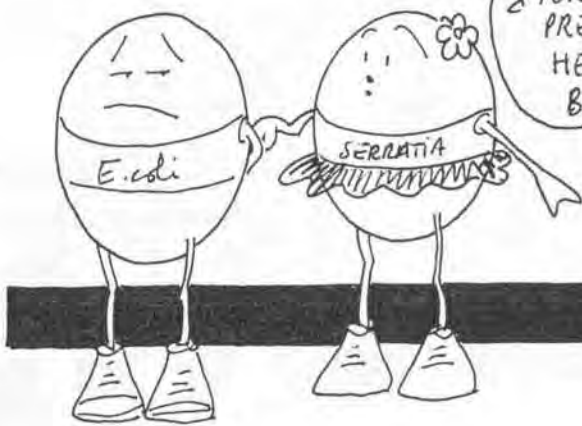
¡TOMAD ESTO!, OS SENTARÁ BIEN

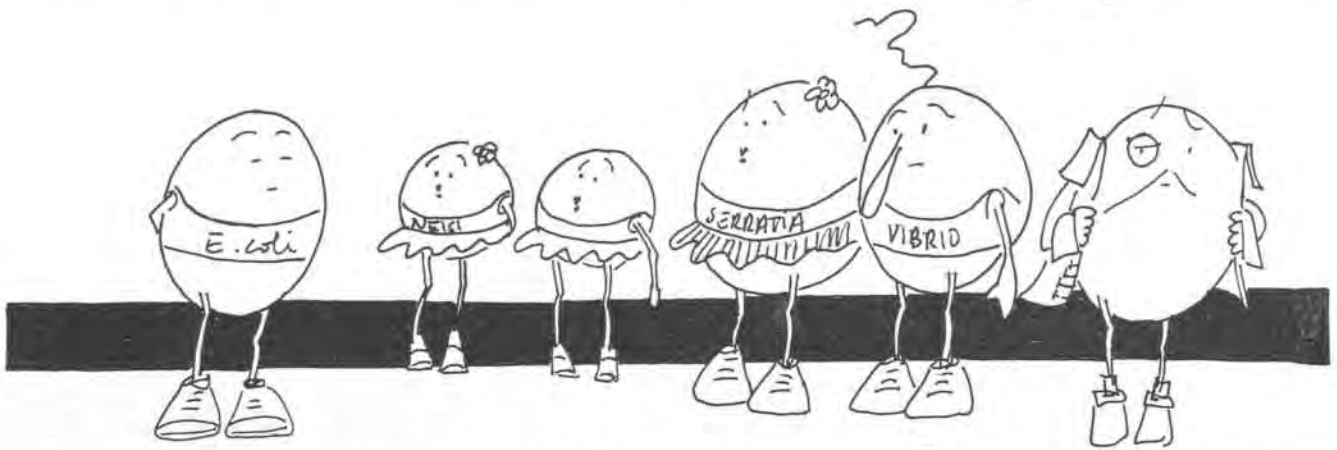
ES AGUA ISOTÓNICA, CON SALES, PARA RESTABLECER LA PÉRDIDA DE AGUA E IONES

¡CIÉLOS!



¿POR QUÉ ESTÁS TAN PREOCUPADO?, HAS HECHO TODO LO BACTERIAMENTE POSIBLE



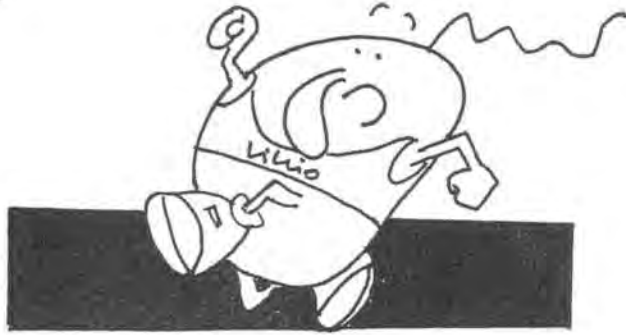




# ERA POST-ANTIBIÓTICA

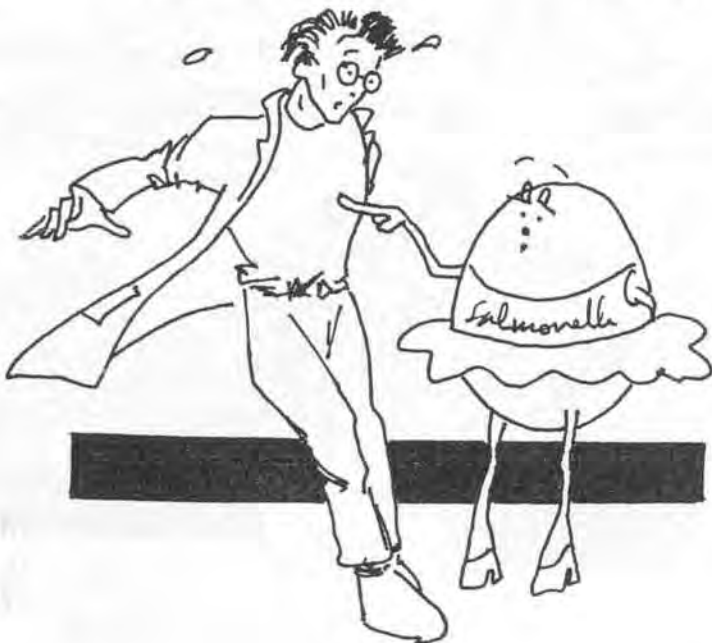
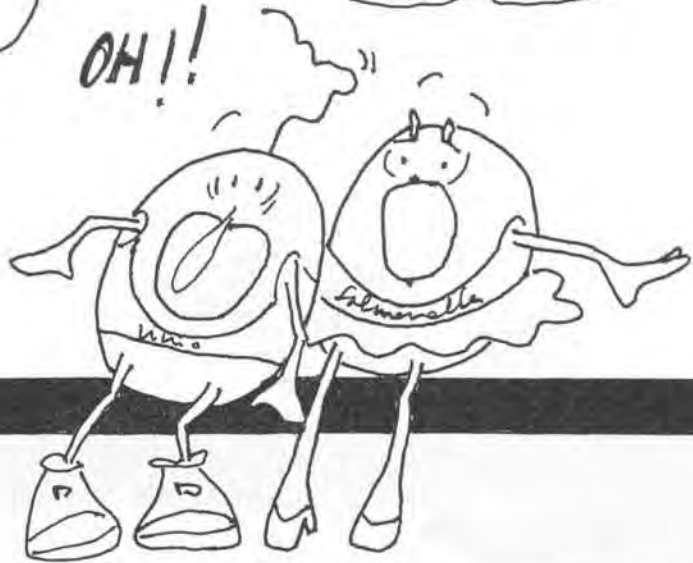
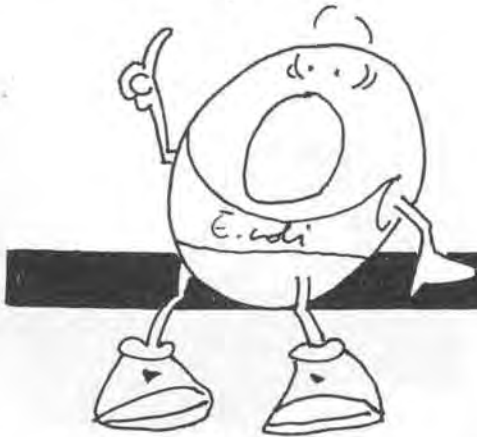
HEMOS CAPTURADO UN MICROORGANISMO EXTRAÑO. SON BACILARES CON 4 PROYECCIONES FILIFORMES A MODO DE FLAGELOS

Y SÓLO UTILITAN DOS PARA LA LOCOMOCIÓN

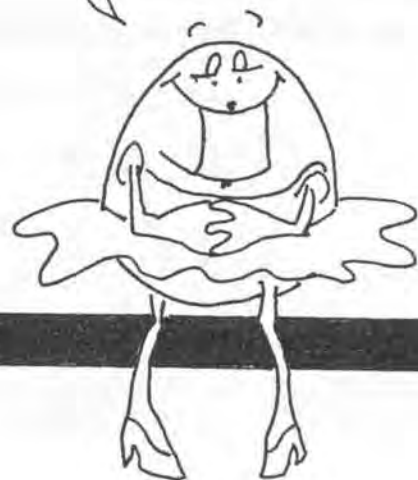


¡ES UN "BATA-BLANCA"!

OH!!

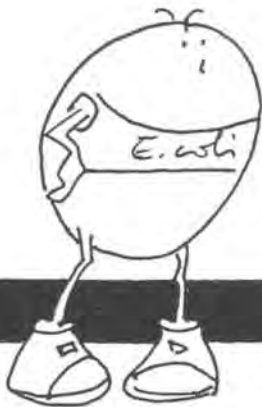


¡ES UN HOMBRE!



¿POR QUÉ NOS ATACAS  
MICROBIÓLOGO?

¿ATACAR?



CON ANTIBIÓTICOS!!

HAN CONSTITUIDO UNA MANERA  
EFICIENTE DE CONTROL DE LAS  
ENFERMEDADES INFECCIOSAS



¡SON "BALAS MÁGICAS" /  
QUE PRESENTAN TOXICIDAD  
SELECTIVA FRENTE A LOS  
MICROORGANISMOS, SIENDO  
INOCUOS PARA LAS CÉLULAS  
DEL HUESPED

SIN EMBARGO, EL DESARROLLO Y  
DISEMINACIÓN DE CEPAS MULTIRRESISTEN-  
TES CONSTITUYE UN SERIO PROBLEMA  
DE SALUD PÚBLICA



AJÁ! ¡ES UN ESPÍA! HA VENIDO  
PARA LLEVARSE TODOS NUESTROS SECRETOS  
DE LA RESISTENCIA!

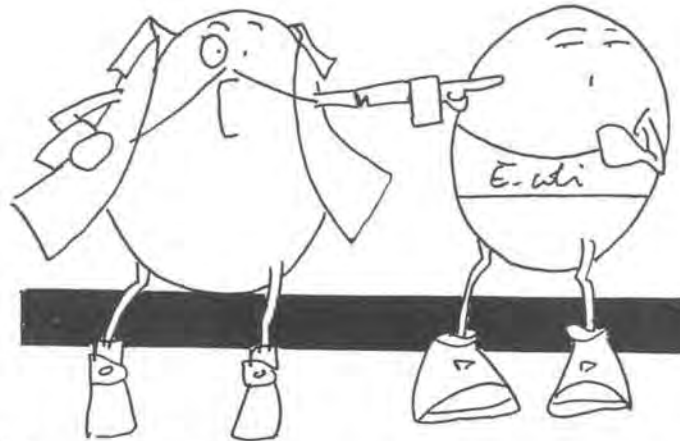
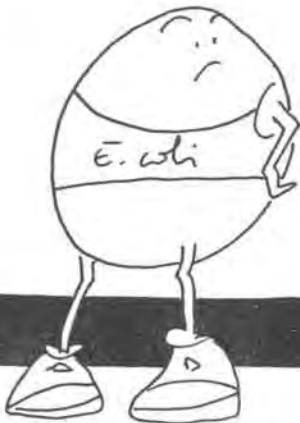


¡EXACTO! LOS MECANISMOS  
DE RESISTENCIA



LO ADMITE! ¡TIENE  
FIMBRIAS EL BATA BLANCA!

¡ENLERRADLO EN LA PLACA!



¡EH? ¿QUÉ PRETENDEIS?  
¡NO HE HECHO NADA!

¡NADA?... NDS HAS ENVIADO  
AL AUTOCLAVE... ¡UN BALTE-  
RICIDIO"! , PERO NO SIN ANTES  
TORTURARNDOS CON LAS QUIND-  
LOWAS, COLORANTES...



¡SI SÓLO SOIS BACTERIAS!

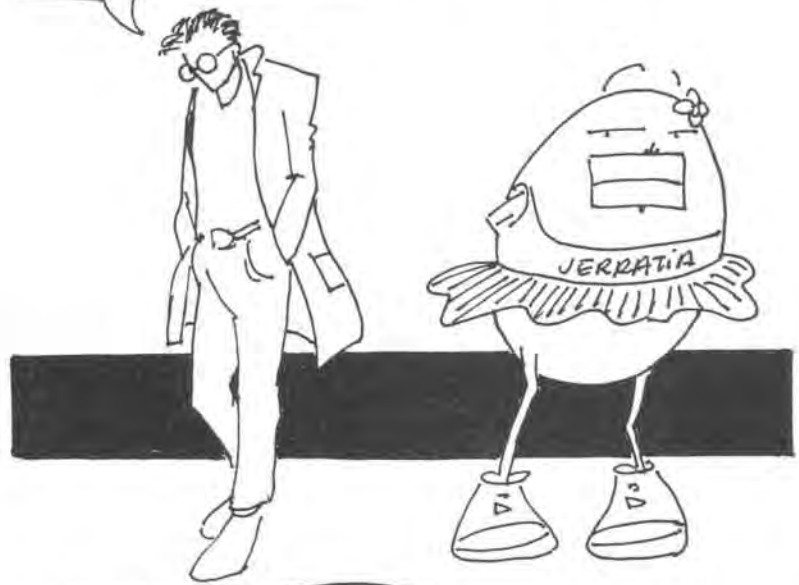
¡CÉLULAS UNICELULARES  
PROCARIOTAS! , PERO TAMBIÉN  
TENEMOS ALMA : "ALMA  
BACTERIANA"



OS LO JURO YO NO  
ELIJÍ EL TEMA, FUE MI  
JEFE!!... ESO ÉL, ÉL...

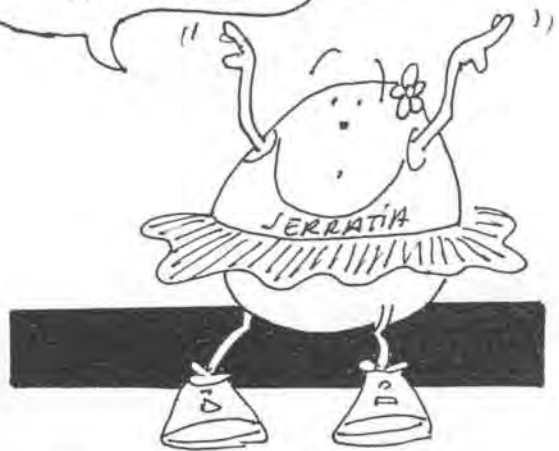
DEMASIADO TARDE. JE, JE, JE

QUÉ QUIERES DECIR?



AHORA SÓLO ERES UN PUNTO  
BLANCO EN UNA PLACA DE TSA  
CON UN CULTIVO DE Serratia  
ROJA. SIMPLEMENTE, UNA  
CONTAMINACIÓN

¿QUÉ HACEIS CON LAS  
PLACAS CONTAMINADAS?



SOY UN HOMBRE!

¿TU CREES?

NOOOO !!



# ACUMULACION DE CIPROFLOXACINO EN *Serratia marcescens*

DURANTE MUCHAS DIVISIONES, LA EXPERIENCIA NOS HA DEMOSTRADO CÓMO HACER FRENTE AL "DEMONIO" QUINOLONA!!



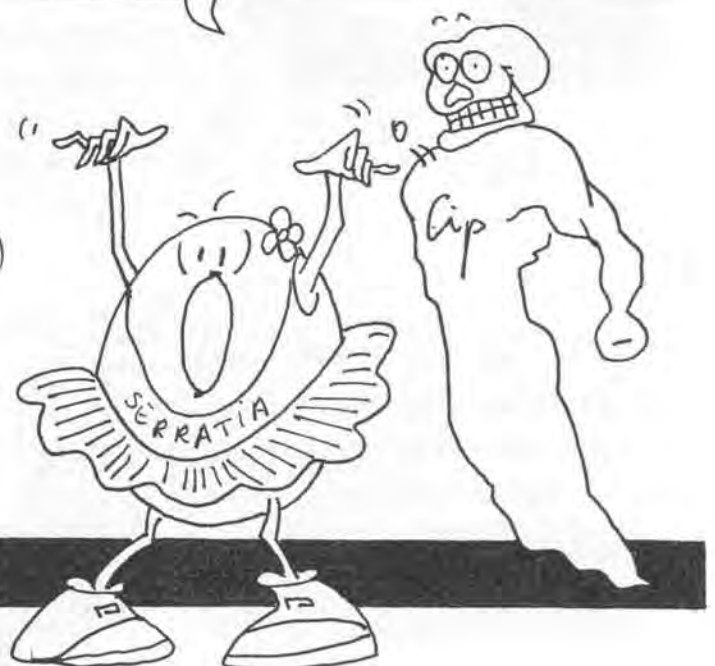
UNO: ALTERAR NUESTRA DIANA (DNA-GIRASA); DOS: DISMINUIR LA PERMEABILIDAD 7/0 EL REFLUJO DEL COMPUESTO



AL PRINCIPIO VIVÍAMOS ATEMORIZADAS Y... AHORA TAMBIÉN !!



¡ SE INTRODUCÍA SIGILOSAMENTE A TRAVÉS DE NUESTROS POROS !!

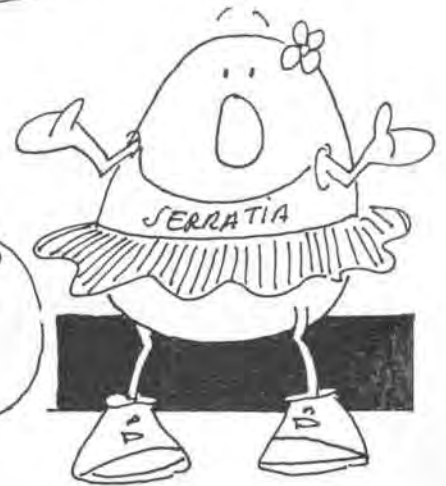


EL CIPROFLOXACINO PUEDE ESTAR PROTONADO/DESPROTONADO EN FUNCIÓN DEL pH EXTERNO, LO QUE DETERMINARÁ TANTO LA DIFUSIÓN COMO SU DISTRIBUCIÓN A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS.

LAS QUINOLONAS PUEDEN QUELAR IONES  $Mg^{2+}$ , EL COMPLEJO QUINOLONA- $Mg$  CON CARGA POSITIVA NETA, PASARÍA A TRAVÉS DE LA MEMBRANA EXTERNA PREFERENTEMENTE "VÍA" PORINA.



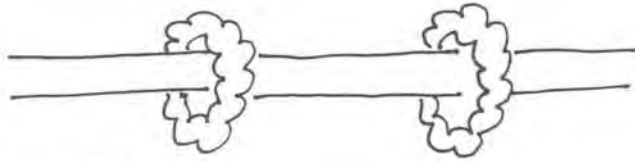
LA ACUMULACIÓN DE CIPROFLOXACINO ES MUY RÁPIDA, ALCANZANDO EL EQUILIBRIO ESTACIONARIO A LOS POCOS MINUTOS DE INCUBACIÓN



Y UNA VEZ DENTRO, ¡ALTERABA NUESTROS "HUMORES METABÓLICOS"! ¡NO INHIBÍA!, ¡ESTÁBAMOS POSEIDAS! ... EN NUESTRA DESESPERACIÓN ACTIVÁBAMOS LA RESPUESTA SOCORRO!, SOS!!



CON TODA UNA SERIE  
DE EFECTOS PLEIOTRÓPICOS



Y AL FINAL...



VIVA la Nup !!



YO NO LES TEMO, SOY  
RESISTENTE AL CIPROFLOXACINO  
JA, JA, JA



# Diario de un procarionta

M. Pulgarín

PROCARIOTAS ÁVIDOS DE CONDOMINIO POR ESOS ANIMALES DENOMINADOS "HUMANOS"; DECIDEN ENVIAR A *Escherichia coli* EN MISIÓN DE RECONDOMINIO



7:00. CUMPLIENDO ÓRDENES ME PREPARO PARA TOMAR CONTACTO CON LAS FORMAS DE VIDA DE LA ZONA. ADOPTO UN CUERPO ANÁLOGO



OBJETIVO: NO LLAMAR LA ATENCIÓN DE LA FAUNA AUTOCTONA





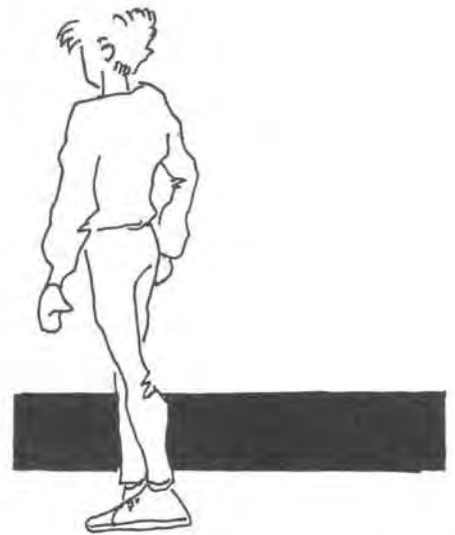
7:20 . SIN CONTACTO  
CON NINGÚN "ENTE"



8:00 . SIN CONTACTO



8:45 . SIN CONTACTO



9:45 . SIN CONTACTO



10:00 . SIN CONTACTO



10:01 . FORCEGEO EN  
LA PUERTA DEL  
DEPARTAMENTO



10:02 . PRIMER CONTACTO CON "UN  
HABITANTE DE LA ZONA"



TAMAÑO DEL ENTE INDIVIDUALIZADO  
165 cm; PERÍMETRO CRANEAL 65; N°  
DE OJOS DOS; LONGITUD DEL RABO  
0.0 cm (CARECE DE ÉL)

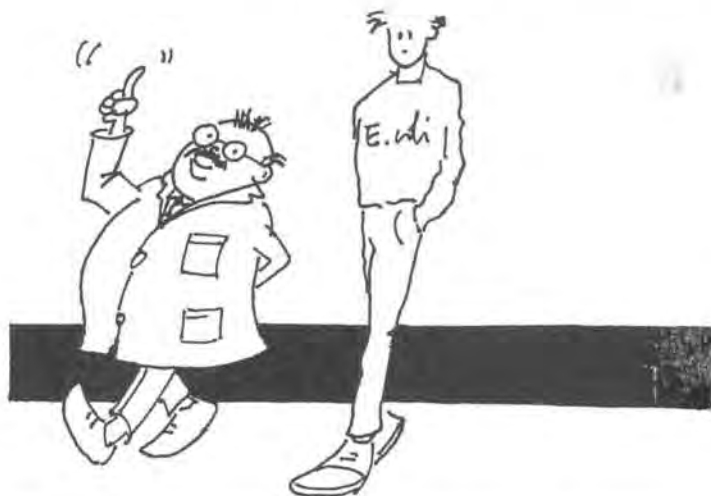
¡AUNQUE MUCHOS PRESUMEN  
DE ÉL!



FUNCIÓN BIOLÓGICA, PROFESOR DE MICROBIOLOGÍA (DEDICACIÓN COMPLETA).



10:03. EL PROFESOR INICIA LA CONVERSACIÓN. ACEPTO PARTICIPAR EN EL DIÁLOGO, OBJETIVO: NO LLAMAR LA ATENCIÓN DE LA FAUNA AUTÓCTONA.



12:30h. EL PROFESOR CONTINUA BLA, BLA, BLA...

13:00. BLA, BLA, BLA... LOS OJOS ME HAN SAÍDO DISPARADOS DE LAS ÓRBITAS

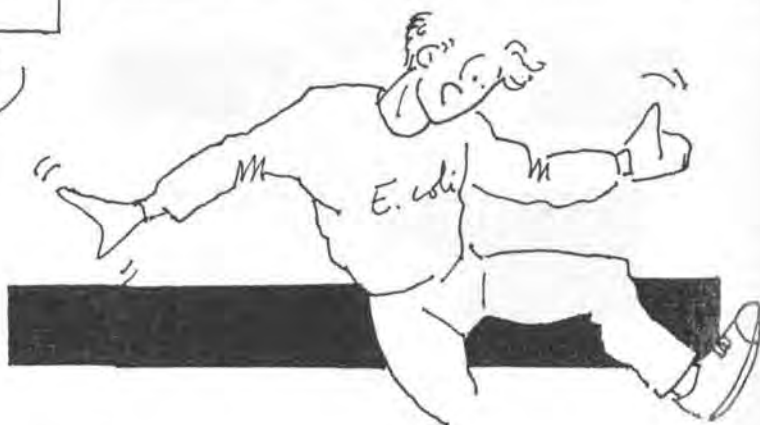
A ESTE PASO ACABARÉ POR LLAMAR LA ATENCIÓN



13:01. BLA, BLA, BLA DE PROFESOR, PARECE BUENA PERSONA A PESAR DE LAS "PERREJÍAS" QUE NOS HACEN. DECIDO LARGARME.

13:03. SALGO A LA CALLE, ME CAÍGO EN UNA ZANJA ABIERTA POR OBRAS EN LA FACULTAD

CREO QUE NO SE DARÁ CUENTA



13:04. ME CAIGO EN UNA ZANJA ABIERTA POR LA COMPAÑÍA DE AGUAS de BARCELONA



13:05. ME CAIGO EN UNA ZANJA ABIERTA POR LA COMPAÑÍA CATALANA de GAS



13:06. ME CAIGO EN UNA ZANJA ABIERTA POR LA COMPAÑÍA TELEFÓNICA

¡POR LAS FÍMBRIAS DE Serratia!



13:07. DECIDO CAMINAR MIRANDO DÓNDE PISO



13:08. DECIDO CRUZAR LA CALLE. SOY ARROLLADO POR UN AUTOBÚS. LA CABEZA HA SALIDO RODANDO, DEBO RECUPERARLA. OPERACIÓN DIFÍCIL-TOSA, POR LA AFLUENCIA DE VEHÍCULOS

13:10. ARROLLADO POR UN TAXI

13:11. ARROLLADO POR UNA FURGONETA DE TRANSPORTE

13:12. ARROLLADO POR UN CARRITO DE BEBÉ

¡IMÁGENES NO OFRECIDAS. OBJETIVO: NO HERIR LA SENSIBILIDAD DE LA FAUNA AUTÓCTONA!

13:13. DESCANSO EN UN BANCO

¡ESTO ES LA JUNQUA!



14:32. PIDO TODO. LLEVO UNA ETERNIDAD SIN COMER



16:15. ME DAN UN PAPELITO CON MUCHOS NÚMEROS. DEDUZCO QUE ES LA CUENTA.

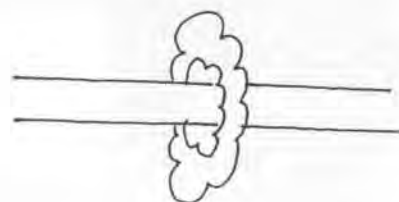
¡NO TENGO NI UN DURO!



16:16. EL GRADO DE "MANSEDUMBRE" DECRECE, SIENDO SUBSTITUIDA POR UNA GRAN AGRESIVIDAD. ¿POR QUÉ?



16:17. SALGO PITANDO DEL LUGAR A PESAR QUE ESTE COMPORTAMIENTO PODRÍA LLAMAR LA ATENCIÓN



16:17. IGUAL QUE LO ANTERIOR



16:30. SIGO CORRIENDO



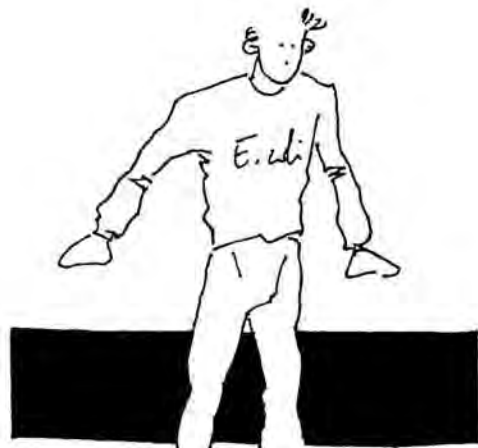
16:35. SIGO CORRIENDO PERSEGUIDO POR UN DOGO QUE LADRA DE UN MODO GROSERO Y AL HACERLO MUESTRA UNOS COLMILLOS QUE PARECEN PLÁTANOS

16:50. POR FIN A SALVO EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



16:55. RECUPERADO DEL ESTADO HIPERACTIVO. "NI CRISTO POR EL DEPARTAMENTO"

17:00. DECIDO DAR POR CONCLUIDA LA OPERACIÓN Y REGRESO A MI ESTADO PROCARIOTA NORMAL





M. Baelanga