

Revisión

Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismo de acción y resistencia

R. Taléns-Visconti^{1,2}, T.M. Garrigues² y E. Cantón¹

¹Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia;

²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot (Valencia)

RESUMEN *Streptococcus pneumoniae* se considera el principal agente causal de la neumonía adquirida en la comunidad, además de estar implicado con frecuencia en exacerbaciones de bronquitis crónica, otitis media aguda, sinusitis, meningitis y otras infecciones. Durante los últimos años, en búsqueda de nuevas sustancias debido a la aparición de resistencias en este microorganismo, se han estudiado, entre otros agentes antibacterianos, las fluoroquinolonas. Asimismo, la biología molecular ha ayudado a estudiar y comprender casi todos los mecanismos bioquímicos de resistencia y las rutas para la diseminación de la información genética entre las bacterias. En esta revisión se repasa el mecanismo de acción de las quinolonas y los mecanismos causantes de la resistencia de *S. pneumoniae* a ellas, por su importancia clínica y epidemiológica. *S. pneumoniae* es un caso peculiar, puesto que en este microorganismo la actividad bactericida puede producirse a través de la girasa, la topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona, lo cual implica una influencia de la estructura en el logro del éxito antimicrobiano. Es importante, pues, conocer el prototipo de resistencia para hacer una recomendación de la antibiótico-terapia adecuada, cuando esté indicada.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae* - Quinolona - Mecanismo de acción - Girasa - Topoisomerasa IV - Resistencias bacterianas - Región QRDR - Penetración intracelular

Quinolones and *Streptococcus pneumoniae*. Mechanisms of action and resistance

SUMMARY *Streptococcus pneumoniae* is considered the most frequent bacterial cause of community-acquired pneumonia, and is involved in a significant number of cases of acute exacerbations of chronic bronchitis, acute otitis, sinusitis, meningitis and other infectious diseases. Fluoroquinolones have been extensively investigated in recent years in the search for new agents that has been prompted by the emergence of resistance in this microorganism. Furthermore, the study of resistance from a molecular biology standpoint has helped in elucidating almost all the biochemical mechanisms of resistance and the routes of dissemination of genetic information between bacteria. This short review is focused on the mechanism of action of quinolones and on the mechanisms responsible for resistance of *S. pneumoniae* to them, given their clinical and epidemiological relevance. *S. pneumoniae* is a case apart because bactericidal activity against this microorganism can be produced through gyrase, topoisomerase IV or both, depending on the quinolone structure, which shows that structure has an influence on the success of treatment. Knowledge of the resistance prototype is therefore important so that the appropriate antibiotic therapy can be recommended when indicated.

Key words: *Streptococcus pneumoniae* - Quinolone - Mechanism of action - Gyrase - Topoisomerase IV - Bacterial resistance - QRDR - Intra-cellular penetration

INTRODUCCIÓN

La neumonía nosocomial se define como aquella neumonía que desarrolla un paciente que lleva más de 48 horas ingresado en un hospital. Se trata de la segunda infección nosocomial por orden de frecuencia y es una de las que tienen peor pronóstico. Asimismo causa graves consecuencias a los pacientes, no sólo en morbilidad y mortalidad sino también en términos económicos, ya que este tipo de infección suele alargar la estancia hospitalaria en una media de ocho días (1). La neumonía nosocomial ocurre con una frecuencia del 0,5% al 1,5% de todos los pacientes hospitalizados, y del 10% al 30% de aquéllos sometidos a ventilación artificial (2). Por otro lado, la neumonía adquirida en la comunidad es una enfermedad común y grave, cuyo principal agente causal es *Streptococcus pneumoniae*, que origina más del 50% de los casos, con una mortalidad del 7% al 36% (3); sin embargo, más de cien microorganismos pueden ser la causa de dicha enfermedad (4). Aunque existe cierto solapamiento, los microorganismos productores de neumonía nosocomial difieren enormemente de los que causan la neumonía adquirida en la comunidad, estando involucrados con frecuencia en la primera bacilos gramnegativos y algunos cocos grampositivos (2, 5).

Durante muchos años el tratamiento de elección de las infecciones por *S. pneumoniae* fue la penicilina, pero a partir de los años 1960 se apreció un aumento cada vez mayor de las infecciones neumocócicas por cepas resistentes a ella. Ciertamente, durante la última década, *S. pneumoniae* ha cambiado considerablemente en el contexto de las resistencias antimicrobianas. Las resistencias a diferentes clases de antibióticos, incluyendo betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas y asociaciones con inhibidores de betalactamasas), macrólidos, clindamicina, tetraciclinas, cloranfenicol y cotrimoxazol, han surgido en elevada proporción en este importante patógeno de las vías respiratorias (6). Además, la resistencia a más de una clase de antibióticos es común. Por otra parte, si bien estas resistencias son especialmente elevadas en determinadas áreas geográficas, se difunden rápidamente por todo el mundo. De esta forma, la elección del antimicrobiano para el tratamiento de las infecciones neumocócicas se ha convertido en un proceso complicado y ha propulsado la realización de estudios con los compuestos que tienen una mayor actividad *in vitro* frente a las cepas neumocócicas, incluidas las fluoroquinolonas. De hecho, las resistencias del neumococo a las fluoroquinolonas ocurren de forma poco frecuente, incluso entre las cepas que muestran elevada resistencia a la penicilina, pero ya se han comunicado algunos fracasos en el tratamiento con quinolonas en diferentes partes del mundo (7, 8). Sin embargo, durante los últimos años se han desarrollado nue-

vas fluoroquinolonas con elevada actividad frente a patógenos grampositivos, incluyendo *S. pneumoniae*.

En este sentido, las quinolonas de primera y segunda generación han sido muy utilizadas en clínica por sus buenas cualidades, las primeras hasta finales de los años 1970 y las de segunda generación durante las décadas de 1980 y 1990, llegándose a afirmar que estas últimas han sido probablemente los antimicrobianos más importantes en la quimioterapia antibacteriana durante dicho periodo (9, 10). Sin embargo, tienen una limitación importante: son poco activas frente a cocos grampositivos aerobios y apenas son eficaces sobre bacterias anaerobias. En consecuencia, no se han podido utilizar para el tratamiento de las infecciones por *S. pneumoniae* ni en infecciones por microorganismos anaerobios.

Con el fin de obviar este problema, en los últimos años la investigación ha llevado a cabo nuevas modificaciones en la molécula de la quinolona. Así, se han obtenido compuestos bifluorados o trifluorados, con mayor semivida plasmática y superior potencia antibacteriana *in vitro* sobre cocos grampositivos y bacterias anaerobias. Las primeras son las quinolonas de tercera generación, y las que además presentan actividad anaerobocida son las de cuarta generación. Ambos tipos son muy bien tolerados y parecen destinados a ocupar un lugar importante en la terapéutica antiinfecciosa, fundamentalmente en los procesos graves o producidos por bacterias con resistencia a otros antimicrobianos (11). La tercera generación de quinolonas incluye compuestos con mayor complejidad estructural que los predecesores. Son más potentes frente a patógenos grampositivos (incluyendo *S. pneumoniae*) (12) y tienen un espectro más amplio, que incluye anaerobios (13) y microorganismos intracelulares (14). Asimismo, presentan algunas ventajas farmacocinéticas respecto a las quinolonas de la segunda generación, como una semivida de eliminación más prolongada y mayor penetración hística (15, 16). Se incluyen en este grupo algunos derivados con varios átomos de flúor, como esparfloxacino, temafloxacino y tosufloxacino, y con un solo átomo como grepafloxacino y levofloxacino. El grupo de las quinolonas de cuarta generación incluye compuestos con una potencia similar a los de tercera generación frente a microorganismos grampositivos, gramnegativos e intracelulares, pero son más potentes y actúan frente a un mayor número de patógenos anaerobios (13, 17-19). Desde el punto de vista farmacocinético presentan las mismas ventajas que sus predecesoras (20). Pertenecen a este grupo clinafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, trovafloxacino, sitafloxacino y gemifloxacino.

Esta revisión se centra en el estudio del mecanismo de acción de las quinolonas y la resistencia de *S. pneumo-*

niae, por su importancia clínica y epidemiológica y por la influencia de la estructura en el logro del éxito terapéutico, sin entrar en consideraciones de toxicidad y efectos secundarios. Estudiar y diferenciar los mecanismos bioquímicos de resistencia nos ayuda a esclarecer la biología de la bacteria, así como los puntos de acción de las quinolonas. Previo a ello se describe de forma resumida el mecanismo de acción general de las quinolonas para a continuación abordar el mecanismo de acción específico frente a *S. pneumoniae*.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas ejercen su acción tras penetrar en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembrana de las porinas, o de la capa de los lipopolisacáridos (21). Una vez en el interior de la célula actúan por mecanismos complejos y no del todo conocidos, aunque se sabe que consisten en fijarse sobre su diana, es decir, sobre alguna estructura, o interferir sobre algún mecanismo bioquímico que le sea necesario para multiplicarse o para sobrevivir. De modo general se puede afirmar que la acción de las quinolonas consiste en inhibir la DNA girasa y la topoisomerasa IV, dos enzimas que pertenecen al grupo de las topoisomerasas y que son sus principales dianas.

Las topoisomerasas son enzimas necesarias para la viabilidad de todos los organismos, desde las bacterias hasta el hombre, puesto que controlan y modifican el estado topológico del DNA mediante roturas transitorias y su posterior unión (22). Para muchas topoisomerasas, un residuo específico de tirosina forma una unión covalente reversible con el extremo 5', o menos frecuentemente con el extremo 3', del DNA. Se dividen en dos clases dependiendo de si actúan en una hélice del DNA (tipo I) o en ambas (tipo II) (23). En cualquier caso, se cree que utilizan un mecanismo de puente enzimático, en el cual se forma un corte transitorio en una cadena de DNA, de modo que se abre un hueco entre las partes rotas que permite el paso de una segunda cadena de DNA o un segmento de doble cadena. Las topoisomerasas I y III son enzimas de tipo I, mientras que la girasa y la topoisomerasa IV son enzimas de tipo II. En concreto, las topoisomerasas I, II y IV están implicadas en la eficacia de la replicación y transcripción del DNA (24), pero mientras las topoisomerasas de tipo II son esenciales para el crecimiento bacteriano, las topoisomerasas de tipo I no lo son, puesto que su pérdida puede compensarse por alteración en los genes de las topoisomerasas del tipo II (24, 25). Conviene matizar que en las células de los mamíferos las topoisomerasas I y III α , que pertenecen a la fami-

lia tipo I, sí resultan esenciales para el crecimiento y la división celular *in vivo* (26, 27).

En resumen, la acción de las quinolonas consiste en inhibir las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV, formando un complejo ternario entre quinolona, enzima y DNA (28, 29), que tratado con detergente y proteinasa K genera roturas en la doble hélice de DNA (30). De igual modo, se cree que el proceso celular que actúa en el complejo ternario formado *in vivo* produce una inhibición de la síntesis de DNA rápida y reversible, cese del crecimiento e inducción de la respuesta SOS, que consiste en un complejo mecanismo de reacción que actúa en respuesta a las acciones que pueden dañar al DNA (31). A dosis más elevadas de antibiótico se cree que tiene lugar la muerte celular por rotura irreparable de la doble hélice de DNA (23, 28, 30, 32, 33). La naturaleza reversible del complejo ternario formado y la posterior muerte celular son importantes para comprender y explicar los efectos fisiológicos de las quinolonas como agentes bactericidas (28), aunque conviene recordar que esta explicación está basada en hipótesis. Además, puesto que ambas enzimas tienen funciones distintas en la célula bacteriana, la respuesta a las quinolonas por parte del microorganismo difiere según cual sea la primera diana (30). Esto tiene mucha trascendencia, puesto que estudios en *Escherichia coli* han sugerido que la girasa actúa antes de la replicación de la horquilla, mientras que la topoisomerasa IV actúa predominantemente después, de forma que existe un intervalo de tiempo que permite reparar el daño producido por la quinolona en el DNA (34). Ello supone que la formación del complejo ternario a través de la girasa implicaría una muerte rápida de la bacteria, mientras que a través de la topoisomerasa IV sería un proceso lento (35).

Molecularmente la DNA girasa es un complejo tetramérico, A₂B₂, formado por dos monómeros A (GyrA) y dos monómeros B (GyrB) codificados por los genes *gyrA* y *gyrB* (36). Las proteínas GyrA y GyrB son las dianas de las 4-quinolonas y de las cumarinas, respectivamente.

Para que la DNA girasa pueda ejercer su acción requiere la presencia de ambas subunidades y de ATP. En concreto, los monómeros A llevan a cabo los cortes en determinados puntos de la molécula de DNA y su posterior cierre, y los monómeros B inducen los superenrollamientos en torno al núcleo de RNA (32), se unen al ATP y participan en la transducción de la energía (37, 38). Parece que las quinolonas inhiben la acción de la DNA girasa en la subunidad A, aunque el ciprofloxacino podría afectar también a la subunidad B. Las quinolonas, al actuar sobre la subunidad A, impiden el cierre de los cortes producidos en el DNA, por lo que se inhibe su replicación. Dado que la inhi-

bición de la girasa impide la replicación, el efecto de las quinolonas debería ser bacteriostático, pero en realidad son bactericidas (39-41). Por tanto, se corrobora la hipótesis de que el mecanismo de acción de las quinolonas es complejo y comporta otros efectos sobre la bacteria.

La topoisomerasa IV (33), otra enzima de tipo II, es también un tetrámero, C_2E_2 , formado por dos subunidades C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE* respectivamente. Para ejercer su acción, al igual que la DNA girasa, también precisa la presencia de las dos subunidades y de ATP.

Resulta interesante que los aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los codificados por *gyrA* y *gyrB*, respectivamente (33). Secuencias similares se sitúan especialmente alrededor de la región de la DNA girasa conocida como región determinante en la aparición de resistencias bacterianas a las quinolonas (QRDR, del inglés *quinolone resistance-determining regions*) (42). Esta similitud en la secuencia de aminoácidos entre la DNA girasa y la topoisomerasa IV, especialmente en las posiciones productoras de resistencia a las quinolonas de la proteína GyrA de la girasa, implica que estos compuestos pueden inhibir la actividad de la topoisomerasa IV tanto como la de la DNA girasa (43).

En general, se acepta que las quinolonas ejercen su actividad a través de la girasa en las bacterias gramnegativas (30, 44, 45), mientras que en las grampositivas su primera diana es la topoisomerasa IV (30, 45-49); sin embargo, en *S. pneumoniae* la actividad bactericida puede producirse a través de la girasa, la topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona (50, 51). Este hecho apunta a que la relación entre estructura y actividad puede ser diferente para cada especie bacteriana, según la actividad se produzca sobre una u otra enzima o en ambas. En la Fig. 1 se muestra un esquema de las principales dianas de las quinolonas.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS E IMPLICACIONES EN *S. PNEUMONIAE*

Aunque en una revisión reciente (52) ya se han detallado los mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas, conviene recordar brevemente que para ejercer su efecto citotóxico las quinolonas deben penetrar a través de la membrana bacteriana para alcanzar su diana celular, la DNA girasa o la topoisomerasa IV, y de esta forma producir la muerte celular. Por ello, en principio, las resistencias a las quinolonas pueden deberse a mutaciones que afecten cualquier paso de este proceso. Así, aunque se han descri-

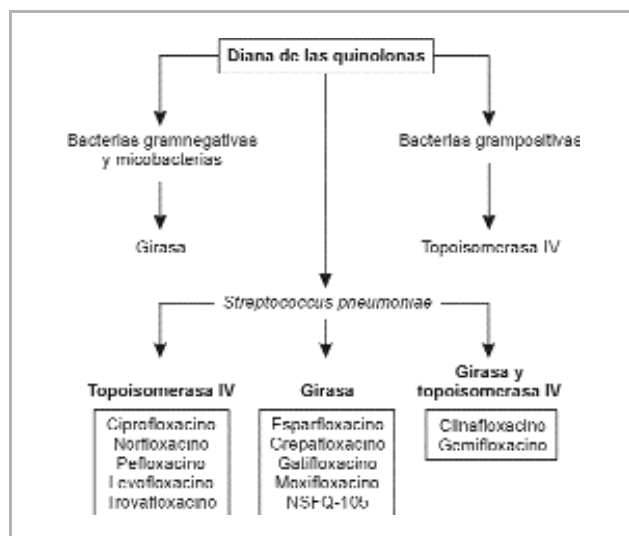


Figura 1. Resumen de las principales dianas de las quinolonas.

to varios mecanismos de resistencia a las quinolonas, éstos pueden agruparse en tres categorías: resistencias de tipo cromosómico, resistencias por alteraciones en la membrana externa bacteriana y resistencias basadas en la expulsión del fármaco. No se han descrito enzimas bacterianas capaces de degradar o inactivar a las quinolonas (53).

Resistencias de tipo cromosómico

De forma resumida, las resistencias de tipo cromosómico dan lugar a mutaciones de los cromosomas en segmentos definidos de los genes que se traducen en alteraciones en la girasa y la topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (42, 53).

Los primeros estudios, centrados en *E. coli*, demostraron que la resistencia a las quinolonas se produce normalmente por mutaciones en regiones definidas de las proteínas GyrA o GyrB (43, 54, 55). Las mutaciones en las regiones equivalentes de las proteínas ParC o ParE tienen lugar tras las producidas en la girasa y se asocian con altos grados de resistencia a estos fármacos (56). Sin embargo, a pesar de que en *E. coli* y otras bacterias gramnegativas las quinolonas tienen como primera diana la DNA girasa (30, 44, 45), en algunas bacterias grampositivas la situación es la inversa: las primeras resistencias tienen lugar por mutaciones producidas en la topoisomerasa IV, mientras que las mutaciones en la girasa proporcionan resistencias adicionales (30, 45).

Los estudios posteriores se han realizado fundamentalmente en *S. pneumoniae*, y se ha observado que en este microorganismo la actividad bactericida puede producirse

a través de la girasa, la topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona. En función del orden de las consecutivas mutaciones QRDR en las topoisomerasas de mutantes resistentes seleccionados en *S. pneumoniae*, las quinolonas se pueden agrupar en tres clases (50, 51) (Fig. 1). En el primer grupo, con ciprofloxacino como principal exponente, levofloxacino, norfloxacino, pefloxacino y trovafloxacino, las mutaciones QRDR en la topoisomerasa IV se inducen antes que en la girasa, lo que sugiere que *in vivo* estos fármacos actúan preferentemente a través de la topoisomerasa IV (48, 49, 57-60). En cambio, en un segundo grupo de quinolonas, como esparfloxacino, grepafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino y NSFQ-105 (homólogo del ciprofloxacino con un grupo 4-(4-aminofenilsulfonil)-1-piperacínico en C₇), se producen mutaciones en la girasa antes que en la topoisomerasa IV, lo que señala como su diana principal a la girasa (51, 57, 61, 62). Finalmente, el clinafloxacino y el gemifloxacino actúan a través de ambas dianas, girasa y topoisomerasa IV (50, 63), pues aunque se generan en primer lugar mutaciones QRDR en *gyrA* o *gyrB*, esta mutación simple se produce con poca frecuencia y la resistencia es de bajo grado, lo que indicaría que ambas contribuyen de forma importante en la acción del fármaco (50, 64).

Con objeto de facilitar la comprensión de la influencia de los diferentes sustituyentes en la actividad de estos compuestos, en la Fig. 2 y la Tabla 1 se presenta la estructura básica de las quinolonas y los diferentes radicales de cada una de las mencionadas.

Relación entre estructura y modo de acción

En conjunto, los resultados demuestran que la estructura de las quinolonas determina su mecanismo de acción en *S. pneumoniae* (51, 61). Recientemente se han descrito sustituciones en las posiciones C₇ y C₈ que cambian la primera diana de acción de las quinolonas, de la topoisomerasa IV a la girasa o a ambas, y por tanto mejoran en gran medida la actividad antibacteriana en comparación con las quinolonas del grupo de ciprofloxacino (61, 65). En particular,

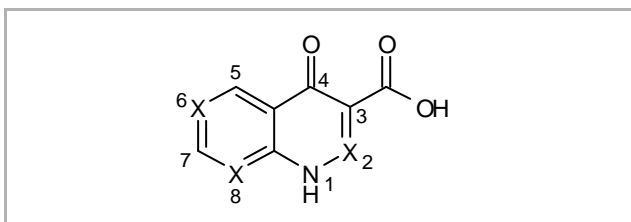







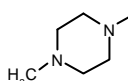
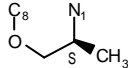
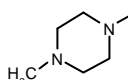
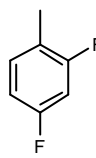
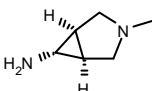


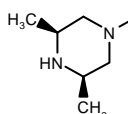



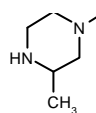

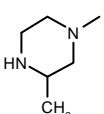


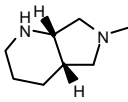


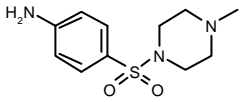

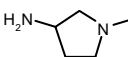


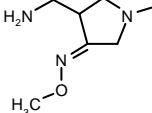
Figura 2. Estructura básica de las quinolonas: Ácido 4-quinolin 3-carboxílico. X: posiciones que pueden contener también un átomo de N.

el sustituyente de la posición 7 determina no sólo la diana preferente de las fluoroquinolonas sino también la potencia, como demuestra el trabajo publicado por Alovero y cols. (61), quienes observan que la adición de un grupo benzenosulfonamida en el anillo piperazínico de la posición 7 del ciprofloxacino es suficiente para hacer que la diana preferente de estos derivados cambie de la topoisomerasa IV a la girasa. Además, establecen que este cambio en la selección de la girasa como primera diana es la causa del aumento de potencia de estos compuestos con respecto al ciprofloxacino. También otros estudios demuestran que el sustituyente de la posición 7 establece contactos críticos con la enzima que determina el reconocimiento de la diana bacteriana *in vivo* e *in vitro* (66). Estos trabajos confirman el modelo propuesto por Shen y cols. (29), que tras observar que quinolonas con distintos sustituyentes en la citada posición mostraban diferentes actividades inhibitoras de la girasa *in vitro*, proponían que el sustituyente en C₇ está relacionado con las interacciones de fármaco y enzima.

En lo que se refiere a la posición 8 de las fluoroquinolonas, debemos destacar que el sustituyente de dicha posición parece favorecer la acción a través de la girasa en *S. pneumoniae*. Es fácil mencionar algunos ejemplos, como el esparfloxacino y el clinafloxacino, que presentan un átomo de flúor y un átomo de cloro como sustituyentes en la posición C₈, respectivamente, y que actúan a través de la girasa, mientras que el ciprofloxacino y el trovafloxacino, que no presentan ningún sustituyente en dicha posición, actúan a través de la topoisomerasa IV en esta especie. Además, se cree que el sustituyente en C₈ hace a las fluoroquinolonas especialmente activas frente a cepas resistentes por mutaciones en la girasa y la topoisomerasa IV en *S. pneumoniae*. Así lo demuestran algunos estudios (62, 67) realizados con moxifloxacino y gatifloxacino, que poseen un grupo metoxi en C₈, pues establecen que este sustituyente confiere un aumento de la actividad antibacteriana tanto frente a cepas con mutaciones en las dianas como en la cepa libre de mutaciones. Por otro lado, las quinolonas que poseen este sustituyente no son fototóxicas, a diferencia de las que tienen sustituciones halogenadas (68).

Por citar un ejemplo de la elevada actividad de estos compuestos, un estudio muy reciente (69) ha encontrado que el moxifloxacino es cuatro y diez veces más efectivo que el levofloxacino en la selección de mutantes resistentes y en matar a dichos mutantes, respectivamente. Además, la frecuencia de selección del mutante de primer paso fue mil veces menor para el moxifloxacino que para el levofloxacino, aunque no hubo diferencias cuando se seleccionó el mutante de segundo paso. Otros autores han comunicado una resistencia al moxifloxacino de sólo un 0,1% en *S. pneumoniae* (70).

Tabla 1. Relación entre estructura y modo de acción.

Quinolona	C ₁	C ₅	C ₇	C ₈	Primera diana (gen)
Ciprofloxacino		-		-	Topo IV (<i>parC</i>)
Norfloxacino		-		-	Topo IV (<i>parC</i>)
Pefloxacino		-		-	Topo IV (<i>parC</i>)
Levofloxacino		-		-	Topo IV (<i>parC</i>)
Trovafloxacino		-		N	Topo IV (<i>parC</i>)
Esparfloxacino					Girasa (<i>gyrA</i>)
Grepafloxacino				-	Girasa (<i>gyrA</i>)
Gatifloxacino		-			Girasa (<i>gyrA</i>)
Moxifloxacino		-			Girasa (<i>gyrA</i>)
NSFQ-105		-		-	Girasa (<i>gyrA</i>)
Clinafloxacino		-			Ambas (<i>parC</i> , <i>gyrA</i>)
Gemifloxacino		-		N	Ambas (<i>parC</i> , <i>gyrA</i>)

Las posiciones C₂, C₃, C₄ y C₇ son comunes a todas las quinolonas.

También hay que destacar que no sólo las posiciones C₇ y C₈ cambian la primera diana de acción de las quinolonas, pasando de la topoisomerasa IV a la girasa o a ambas, puesto que en marzo de 2002 se publicó un estudio (71) que encontró que el sustituyente de la posición 5 también puede afectar. Los autores del trabajo analizan las QRDR del grepafloxacino, cuya estructura es análoga a la del ciprofloxacino pero además incluye dos grupos metilo, uno en C₅ y otro en 3' del anillo piperazinilo de C₇. Luego las comparan con las QRDR del compuesto AM-1121, cuya estructura coincide con la del grepafloxacino pero carece del metilo en C₅, es decir, sería un compuesto intermedio, estructuralmente hablando, entre el grepafloxacino y el ciprofloxacino. Al hacer esto observan que con el grepafloxacino las mutaciones en *gyrA* preceden a las de *parC*, mientras que el ciprofloxacino y el AM-1121 actúan a través de la topoisomerasa IV. De este modo establecen que el grupo metilo de la posición 5 del grepafloxacino favorece el que este compuesto actúe a través de la girasa en *S. pneumoniae* y no de la topoisomerasa IV como sus homólogos.

En resumen, aunque no se conocen los grupos causantes de que la interacción de las quinolonas sea con la girasa o la topoisomerasa IV, puesto que las diferencias entre los compuestos hacen difícil discernir la molécula determinante que condiciona la selección de la diana, sería posible diseñar quinolonas que actuaran selectivamente sobre una u otra enzima o en ambas a la vez. Por ejemplo, mutantes en *parC* (y no en *gyrA*) son resistentes a ciprofloxacino pero sensibles a esparfloxacino. Para varios autores (47, 48) lo más deseable es una quinolona que actúe por igual sobre ambas dianas, puesto que las resistencias requieren la selección de dos mutaciones, una en cada diana, lo que ocurre con poca frecuencia. Este hecho explicaría la mejora en la actividad antineumocócica de clinafloxacino y gemifloxacino con respecto a las anteriores quinolonas. Efectivamente, existen varios estudios que establecen la frecuencia de selección de las resistencias a varios compuestos en *S. pneumoniae*, como el de Fung-Tomc y cols. (72), que concluyen que la frecuencia de selección de resistencias al ciprofloxacino y al ofloxacino es diez a cien veces mayor que al gatifloxacino. En este sentido, también debe recordarse que cultivos aislados en clínica con mutaciones en ambas dianas seleccionadas frente a las fluoroquinolonas de primera y segunda generación presentan resistencia cruzada a las nuevas fluoroquinolonas (73). Así, la elección de la quinolona adecuada junto al conocimiento del estado de las QRDR en *parC* y *gyrA* puede ser muy útil para evitar las resistencias a las quinolonas en *S. pneumoniae* (51). Es decir, el hecho de que diferentes quinolonas tengan distintas dianas en la misma especie bacteriana tiene implicaciones importantes en la práctica clínica.

Conviene tener presente que las mutaciones en la primera diana, que disminuyen la afinidad de la fluoroquinolona, se asocian con aumentos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (59, 60, 74-76). La mutación subsiguiente en la diana secundaria produce un aumento aún mayor de la CMI. Por tanto, la identificación en el laboratorio de las cepas con baja sensibilidad a las fluoroquinolonas es crucial para el tratamiento efectivo de los pacientes con enfermedad neumocócica. Igual importancia tiene la detección de cepas con mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas, incluso si todavía son sensibles, puesto que el microorganismo puede hacerse resistente más rápidamente durante el tratamiento cuando tiene lugar una mutación en la segunda diana.

Resistencias por alteraciones en la membrana

Las mutaciones QRDR en la girasa o en la topoisomerasa IV no son los únicos mecanismos que desarrollan los microorganismos frente a la acción de los agentes antibacterianos, pues la resistencia a las quinolonas puede estar condicionada también por los procesos de transporte a través de la membrana (77). Así, las resistencias por alteraciones en la membrana externa bacteriana disminuyen la penetración intracelular del fármaco. Estas modificaciones se originan por alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, que ejercen un papel fundamental en la difusión de la quinolona a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Se ha observado que varios mutantes que mostraban resistencia a las quinolonas hidrofílicas tenían en común la reducción del número de *OmpF*, la principal y mayor proteína de las porinas de la membrana externa de *E. coli* (78). Como norma general se considera que un tamaño voluminoso, la carga negativa y un aumento de la hidrofobicidad retrasan la penetración de los antibacterianos en los microorganismos gramnegativos a través de estos canales (79). Las moléculas hidrofóbicas parecen utilizar una ruta alternativa de difusión a través de lipopolisacáridos (21, 80). Algunos autores (81) han demostrado que la hidrofobicidad de los compuestos parece tener relevancia tanto en microorganismos grampositivos como en gramnegativos, mientras que el peso molecular elevado es un factor limitante sólo para los gramnegativos.

En este sentido, nosotros hemos estudiado (82) un grupo de compuestos que presentan un radical alquílico de diferente tamaño en la posición C₇ del anillo piperazinilo del ciprofloxacino. Dado que no hay cambio en la selección de la diana en *S. pneumoniae*, la mayor actividad que presentan dichos compuestos en esta especie se puede atribuir a una mayor acumulación intracelular en comparación con su

homólogo precursor, y puesto que la única diferencia estructural es el radical alquilo de C₇, estos resultados confirman la relevancia de la hidrofilia en los microorganismos grampositivos.

Por otro lado, las cepas mutantes Mar (del inglés *multiple antibiotic resistant*) expresan resistencias condicionadas por cromosomas frente a una gran variedad de antibióticos hidrofóbicos e hidrofílicos estructuralmente no relacionados, entre ellos las quinolonas. Esto es consecuencia de que las mutaciones en *marA* reducen la permeabilidad al disminuir la expresión de la OmpF (83). Las mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren bajos grados de resistencia a las quinolonas (aumento de 2 a 4 diluciones log₂ de la CMI), pero habitualmente se producen resistencias cruzadas con otros antibióticos estructuralmente no relacionados (78).

Resistencias por expulsión del fármaco

Posteriormente se conoció el tercer mecanismo de resistencia a las quinolonas antes señalado, que consiste en la expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores activos endógenos, impidiendo su acumulación. Las quinolonas son sustratos de estos transportadores.

Se cree que el sistema de expulsión ejerce una función protectora de la célula frente a sales biliares y ácidos grasos, tóxicos habituales de su entorno fisiológico. Este sistema se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y cataliza un proceso dependiente de energía ligado a un gradiente de protones (84). En *E. coli* este sistema de transporte, denominado AcrAB, es una bomba de flujo multifármaco que extrae de la célula una amplia variedad de antibióticos, incluidas las quinolonas y otras sustancias, presumiblemente a través del canal TolC de la membrana externa (85, 86). El sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrB y la proteína periplásmica accesoria AcrA, y codificado por los genes *acrAB*, cuya expresión aumenta de forma considerable en los mutantes Mar, lo cual implica que el locus *marA* de *E. coli* regula no sólo la expresión de la porina OmpF sino también la expresión de la bomba AcrAB (87). Es decir, los mutantes Mar pueden presentar resistencias debido a una disminución de la permeabilidad de la membrana externa y una importante secreción activa a través de la membrana interna, lo que repercute en una disminución de la entrada de fármaco y un aumento de su salida, y como consecuencia una disminución de la sensibilidad a éste.

Recientemente también se ha descrito un mecanismo de expulsión como causa de bajo grado de resistencia a las quinolonas en *S. pneumoniae* (88). A la bomba causante de

esta acción se la denominó bomba PmrA (del inglés *pneumococcal multidrug resistance protein*) (89). Se trata también de una proteína asociada a la membrana que se inhibe con reserpina, aunque las bases genéticas de este mecanismo no se conocen. Sin embargo, por análisis de la CMI obtenida en presencia y ausencia del inhibidor reserpina, se ha demostrado que más del 50% de las cepas de *S. pneumoniae* resistentes al ciprofloxacino presentaban una expulsión aumentada, lo que sugiere que ésta es un mecanismo importante de resistencia clínica en dicha especie (90).

Se han descrito otros transportadores similares que afectan a la sensibilidad de las quinolonas en otras especies bacterianas, como por ejemplo el gen *mexABoprK* de *Pseudomonas aeruginosa*, que proporciona resistencia al ciprofloxacino y al ácido nalidíxico (91). Entre las bacterias grampositivas, se han identificado bombas de expulsión en *Bacillus subtilis* (Bmr) (92, 93) y *Staphylococcus aureus* (NorA) (94, 95).

En resumen, la expresión de los transportadores de expulsión puede determinar el grado de sensibilidad antimicrobiana, y está reconocida como causa de resistencia de bajo grado a las quinolonas. Además, la baja afinidad de algunas quinolonas por estos transportadores contribuye a aumentar su potencia (45). Por otro lado, dado que este efecto es dependiente de la concentración, determina, al menos en parte, que las fluoroquinolonas presenten un mayor efecto letal a concentraciones bajas, y ello dificulta que la bacteria desarrolle mutaciones en los cromosomas que puedan conducir a altos grados de resistencia (76).

Teniendo en cuenta la trascendencia de estos hallazgos se ha intentado establecer una relación entre los procesos de expulsión y la estructura de las quinolonas. Varios autores (95, 96) consideran que el gen *norA* es el principal causante de los altos grados de resistencia a las quinolonas hidrofílicas; sin embargo, estudios en *S. aureus* (97) han demostrado que la hidrofilia de las quinolonas no es un factor exclusivo, y han argumentado que la actividad en las cepas resistentes se correlaciona mejor con el volumen del sustituyente en C₇ y el volumen y la hidrofobia del sustituyente en C₈. Por último, otros autores (88) apoyan la idea de que las fluoroquinolonas hidrofóbicas son sustratos pobres de la bomba de expulsión neumocócica. Sin embargo, un reciente estudio de Piddock y cols. (98) realizado con diez fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*, establece que al disminuir la hidrofobicidad de la quinolona disminuye la concentración acumulada, aunque ésta también disminuye con un aumento en el peso molecular de la forma libre de cada compuesto. Según lo comentado, a la vista de los datos publicados no es fácil establecer una conclusión sobre el efecto de la estructura de la quinolona en la acción de la

bomba de expulsión y, por tanto, en la acumulación intracelular.

Por lo que respecta a *S. pneumoniae*, las resistencias parecen producirse principalmente por mutaciones en los genes que codifican las dianas intracelulares de las fluoroquinolonas, la girasa y la topoisomerasa IV. Ambas enzimas parecen ser la diana principal de estos compuestos en esta especie. Mutaciones en las QRDR de los genes *gyrA* o *parC* confieren resistencia a los mutantes de primer paso, mientras que las mutaciones en *gyrB* y *parE* también se han implicado en la resistencia a las fluoroquinolonas de ciertos mutantes obtenidos *in vitro*. La actividad de todas las quinolonas disminuye cuando están presentes dos o más mutaciones, mientras que cuando sólo hay una mutación la actividad de la quinolona dependerá de si dicha mutación se encuentra o no en su principal diana de acción. Otros importantes mecanismos de resistencia son las alteraciones en la permeabilidad de la membrana y la expulsión de los antimicrobianos desde la célula al exterior, mediada por la proteína asociada a la membrana PmrA, sobre todo de las quinolonas hidrofílicas (99). El proceso de expulsión puede permitir que las bacterias sobrevivan durante un corto periodo de tiempo para desarrollar resistencia a las quinolonas vía mutaciones en los lugares clave de los genes de las dianas de estos fármacos. Los tres mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación, si bien se cree que, *in vivo*, el aumento en el grado de resistencia a las quinolonas debe ser producto de varios mecanismos simultáneos. De hecho, una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos, y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los antimicrobianos.

CONCLUSIONES

La contribución de la biología molecular al estudio de las resistencias ha ayudado a discernir los mecanismos bioquímicos de resistencia y las rutas para la diseminación de la información genética entre las bacterias. Su estudio permite proponer algunas pautas para minimizar las resistencias, como mejorar la interpretación de los fenotipos de resistencia, proveer de una terapia antiinfecciosa más adecuada, promocionar un uso más prudente de los antibióticos y permitir un diseño racional de nuevos fármacos que eviten los mecanismos de resistencia existentes o vayan dirigidos a dianas no explotadas (100).

Particularizando para las quinolonas, los compuestos de tercera y cuarta generación comercializados, con su buena biodisponibilidad oral y su elevada potencia, que permite una dosificación de una vez al día, ofrecen una buena alternativa al tratamiento de las infecciones neumocócicas. Fuera del contexto de esta revisión, como hemos comentado, quedan los problemas de toxicidad que llevaron a la retirada del mercado de algunos compuestos, pero ello no se puede hacer extensivo a la totalidad de la clase (68). Así, compuestos como gatifloxacino, gemifloxacino y moxifloxacino, que tienen mejor actividad antineumocócica *in vitro*, son los agentes más activos y efectivos en la neumonía neumocócica, por lo cual son opciones atractivas para el tratamiento de los adultos con infecciones respiratorias (101), siempre atendiendo a las recomendaciones vigentes.

Correspondencia: Raquel Taléns-Visconti, Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia. e-mail: rtalens@uv.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Niederman, M.S., Mandell, L.A., Anzueto, A. y cols. *American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention.* Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1730-1754.
2. Fagon, J.Y. *Epidemiology and antibiotic therapy in nosocomial pneumonia.* Rev Pneumol Clin 2001; 57: 132-138.
3. Marrie, T.J. *Pneumococcal pneumonia: Epidemiology and clinical features.* Semin Respir Infect 1999; 14: 227-236.
4. Marrie, T.J. *Community-acquired pneumonia: Epidemiology, etiology, treatment.* Infect Dis Clin North Am 1998; 12: 723-740.
5. Marrie, T.J. *Community-acquired pneumonia.* Clin Infect Dis 1994; 18: 501-513.
6. Doern, G.V. *Antimicrobial resistance with Streptococcus pneumoniae: Much ado about nothing?* Semin Respir Infect 2001; 16: 177-185.
7. Thornsberry, C., Ogilvie, P.T., Holley, H.P., Jr., Sahm, D.F. *Survey of susceptibilities of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis isolates to 26 antimicrobial agents: A prospective U.S. study.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2612-2623.
8. Garau, J. *Treatment of drug-resistant pneumococcal pneumonia.* Lancet Infect Dis 2002; 2: 404-415.
9. Blondeau, J.M. *Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: A review.* Clin Ther 1999; 21: 3-40.
10. Talley, J.H. *Fluoroquinolones. New miracle drugs?* Postgrad Med 1991; 89: 101-103, 106-108, 111-113.
11. Jones, R.N. *Perspectives on the development of new antimicrobial agents for resistant gram-positive pathogens.* Braz J Infect Dis 2000; 4: 1-8.
12. Piddock, L.J.V. *New quinolones and gram-positive bacteria.* Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 163-169.
13. Appelbaum, P.C. *Quinolone activity against anaerobes.* Drugs 1999; 58 (Suppl. 2): 60-64.

14. Jacobs, M.R. *Activity of quinolones against mycobacteria*. *Drugs* 1999; 59 (Suppl. 2): 19-22.
15. Kidwai M., Misra, P., Kumar, R. *The fluorinated quinolones*. *Curr Pharm Des* 1998; 4: 101-118.
16. Stein, G.E. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones*. *Clin Infect Dis* 1996; 23 (Suppl. 1): S19-S24.
17. Bauernfeind, A. *Comparison of the antibacterial activities of the quinolones BAY 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 639-651.
18. Blondeau, J.M. *A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new "respiratory quinolones"*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43 (Suppl. B): 1-11.
19. Kenny, G.E., Cartwright, F.D. *Susceptibilities of Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum to a new quinolone, trovafloxacin (CP-99219)*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1048-1049.
20. Stass, H., Kubitzka, D. *Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43 (Suppl. B): 83-90.
21. Nikaido, H., Thanassi, D.G. *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1393-1399.
22. Wang, J.C. *DNA topoisomerases*. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 635-692.
23. Mizuuchi, K., Fisher, L.M., O'Dea, M.H., Gellert, M. *DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1847-1851.
24. Dinardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E., Wright, A. *Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutation in DNA gyrase genes*. *Cell* 1982; 31: 43-52.
25. Dorman, C.J., Lynch, A.S., Bhriain, N.N., Higgins, C.F. *DNA supercoiling in Escherichia coli: topA mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the tolC locus*. *Mol Microbiol* 1989; 3: 531-540.
26. Li, W., Wang, J.C. *Mammalian DNA topoisomerase III alpha is essential in early embryogenesis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1010-1013.
27. Morham, S.G., Kluckman, K.D., Voulomanos, N., Smithies, O. *Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by campothecin selection*. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6804-6809.
28. Chen, C.R., Malik, M., Snyder, M., Drlica, K. *DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage*. *J Mol Biol* 1996; 258: 627-637.
29. Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N. y cols. *Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: A cooperative drug-DNA binding model*. *Biochemistry* 1989; 28: 3886-3894.
30. Drlica, K., Zhao, X. *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 377-392.
31. Lewin, C.S., Howard, B.M., Ratcliffe, N.T., Smith, J.T. *4-quinolones and the SOS response*. *J Med Microbiol* 1989; 29: 139-144.
32. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Nash, H.A. *DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3872-3876.
33. Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Higara, S., Suzuki, H. *New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli*. *Cell* 1990; 63: 393-404.
34. Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R. *Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in Escherichia coli*. *Genes Dev* 1995; 9: 2859-2869.
35. Khodursky, A.B., Cozzarelli, N.R. *The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials*. *J Biol Chem* 1998; 273: 27668-27677.
36. Kevan, L., Wang, J.C. *Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base-pairs of deoxyribonucleic acid and $\alpha\beta_2$ protein core*. *Biochemistry* 1980; 19: 5229-5234.
37. Higgins, N.P., Peebles, C.L., Suguino, A., Cozzarelli, N.R. *Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1773-1777.
38. Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Gellert, M. *DNA gyrase: Subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 5960-5963.
39. Cantón, E., Gobernado, M., Jiménez, T., Izquierdo, R. *Lomefloxacin: Laboratory study of antibacterial activity*. *Rev Esp Quimioterap* 1989; 2: 237-244.
40. Jiménez, T., Cantón, E., Ramón, M.S., Gobernado, M. *Estudio cinético de la actividad bactericida de lomefloxacin sobre S. aureus Sa-1 y P. aeruginosa Psa-1*. *Rev Esp Quimioterap* 1990; 3: 357-361.
41. Lewin, C.S., Smith, J.T. *Bactericidal mechanisms of ofloxacin*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22 (Suppl. C): 1-8.
42. Nakamura, S. *Mechanisms of quinolone resistance*. *J Infect Chemother* 1997; 3: 128-138.
43. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Nakamura, S. *Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1271-1272.
44. Akasaka, T., Onodera, Y., Tanaka, M., Sato, K. *Cloning, expression, and enzymatic characterization of Pseudomonas aeruginosa topoisomerase IV*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 530-536.
45. Hooper, D.C. *Quinolone mode of action*. *Drugs* 1995; 49 (Suppl. 2): 10-15.
46. Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B. y cols. *Cloning and primary structure of Staphylococcus aureus DNA topoisomerase IV: A primary target of fluoroquinolones*. *Mol Microbiol* 1994; 13: 641-653.
47. Ng, E.Y.W., Trucksis, M., Hooper, D.C. *Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: Relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1881-1818.
48. Pan, X.S., Ambler, J., Mehtar, S., Fisher, L.M. *Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2321-2326.
49. Pan X.S., Fisher, L.M. *Cloning and characterization of the parC and parE genes of Streptococcus pneumoniae encoding DNA topoisomerase IV: Role in fluoroquinolone resistance*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4060-4069.
50. Pan, X.S., Fisher, L.M. *DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2810-2816.
51. Pan, X.S., Fisher, L.M. *Targeting of DNA gyrase in Streptococcus pneumoniae by sparfloxacin: Selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 471-474.
52. Taléns-Visconti, R., Garrigues, T.M., Cantón, E. *Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas*. *Rev Esp Quimioterap* 2002; 15: 25-30.

53. Wolfson, J.S., Hooper, D.C. *Fluoroquinolone antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev 1989; 2: 378-424.
54. Cullen, M.E., Wyke, A.W., Kuroda, R., Fisher, L.M. *Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from Escherichia coli that confers clinical resistance to 4-quinolones*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 886-894.
55. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., Nakamura, S. *Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1647-1650.
56. Heisig, P. *Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 879-855.
57. Fukuda, H., Hiramatsu, K. *Primary targets of fluoroquinolones in Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 410-412.
58. Muñoz, R., De la Campa, A.G. *ParC subunit of DNA topoisomerase IV of Streptococcus pneumoniae is a primary target of quinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2252-2257.
59. Gootz, T.D., Zaniewski, R., Haskell, S. y cols. *Activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin (CP-99,219) against DNA gyrase and topoisomerase IV mutants of Streptococcus pneumoniae selected in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2691-2697.
60. Tankovic, J., Perichon, B., Duval, J., Courvalin, P. *Contribution of mutations in gyrA and parC genes to fluoroquinolone resistance of mutants of Streptococcus pneumoniae obtained in vivo and in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2505-2510.
61. Alovero, F.L., Pan, X.S., Morris, J.E., Manzo, R.H., Fisher, L.M. *Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: Benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in Streptococcus pneumoniae from topoisomerase IV to gyrase*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 320-325.
62. Pestova, E., Millichap, J.J., Noskin, G.A., Peterson, L.R. *Intracellular targets of moxifloxacin: A comparison with other fluoroquinolones*. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 583-590.
63. Heaton, V.J., Goldsmith, C.G., Ambler, J.E., Fisher, L.M. *Activity of gemifloxacin against penicillin- and ciprofloxacin-resistant Streptococcus pneumoniae displaying topoisomerase- and efflux-mediated resistance mechanisms*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2998-3000.
64. Heaton, V.J., Ambler, J.E., Fisher, L.M. *Potent antineumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and topoisomerase IV, and in vivo target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavage complexes in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3112-3117.
65. Zhao, X., Xu, C., Domagala, J., Drlica, K. *DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 13991-13996.
66. Gootz, T.D., McGuirk, P.R., Moynihan, M.S., Haskell, S.L. *Placement of alkyl substituents on the C-7 piperazine ring of fluoroquinolones: Dramatic effects on mammalian topoisomerase II and DNA gyrase*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 130-133.
67. Fukuda, H., Kishii, R., Takei, M., Hosaka, M. *Contributions of the 8-methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference, and antibacterial activity against Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1649-1653.
68. Taléns-Visconti, R., Garrigues-Pelufo, T.M., Nalda-Molina, R., Cantón-Lacasa, E. *Las quinolonas: Relación estructura-efectos adversos e interacciones con otros fármacos*. Ciencia y Tecnología Farmacéutica 2002; 12: 67-76.
69. Li, X., Zhao, X., Drlica, K. *Selection of Streptococcus pneumoniae mutants having reduced susceptibility to moxifloxacin and levofloxacin*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 522-524.
70. Liñares, J., Tubau, F., Pallarés, R., Ferrándiz, M.J. *Prevalence of resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of Streptococcus pneumoniae*. 40th ICAAC, Toronto 2000; abstract 2106.
71. Morris, J.E., Pan, X.S., Fisher, L.M. *Grepafloxacin, a dimethyl derivative of ciprofloxacin, acts preferentially through gyrase in Streptococcus pneumoniae: Role of the C-5 group in target specificity*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 582-585.
72. Fung-Tomc, J., Gradelski, E., Huczko, E., Minassian, B., Bonner, D.P. *Activity of gatifloxacin against strains resistant to ofloxacin and ciprofloxacin and its ability to select for less susceptible bacterial variants*. Int J Antimicrob Agents 2001; 18: 77-80.
73. Varon, E., Gutmann, L. *Mechanisms and spread of fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae*. Res Microbiol 2000; 151: 471-473.
74. Janoir, C., Zeller, V., Kitzis, M.D., Moreau, N.J., Gutmann, L. *High-level fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae requires mutations in parC and gyrA*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2760-2764.
75. Jorgensen, J.H., Weigel, L.M., Ferraro, M.J., Swenson, J.M., Tenover, F.C. *Activities of newer fluoroquinolones against Streptococcus pneumoniae clinical isolates including those with mutations in the gyrA, parC, and parE loci*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 329-334.
76. Pestova, E., Beyer, R., Cianciotto, N.P., Noskin, G.A., Peterson, L.R. *Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in Streptococcus pneumoniae to resistance to novel fluoroquinolones*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2000-2004.
77. Nikaido, H. *Preventing drug access to targets: Cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria*. Semin Cell Dev Biol 2001; 12: 215-23.
78. Cohen, S.P., McMurry, L.M., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Levy, S.B. *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 of OmpF reduction*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1318-1325.
79. Hancock, R.E.W. *Role of porin in outer membrane permeability*. J Bacteriol 1987; 169: 929-934.
80. Chapman, J.S., Georgopapadaku, N.H. *Routes of quinolone permeation in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 438-442.
81. Bazile, S., Moreau, N., Bouzard, D., Essiz, M. *Relationships among antibacterial activity, inhibition of DNA gyrase, and intracellular accumulation of 11 fluoroquinolones*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2622-2627.
82. Taléns-Visconti, R. *Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas. Relación estructura-actividad*. Tesis doctoral, Valencia 2002.
83. Cohen, S.P., McMurry, L.M., Levy, S.B. *marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic resistant (Mar) mutants of Escherichia coli*. J Bacteriol 1988; 170: 5416-5422.
84. Cohen, S.P., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., McMurry, L.M., Levy, S.B. *Endogenous active efflux of norfloxacin in suscep-*

- tible Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 1187-1191.
85. Nikaido, H., Zgurskaya, H.I. *AcrAB and related multidrug efflux pumps of Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3: 215-218.
86. Nikaido, H. *Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria*. J Bacteriol 1996; 178: 5853-5859.
87. Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Kikaido, H., Hearst, J.E. *Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of Escherichia coli*. J Mol Microbiol 1995; 16: 45-55.
88. Brenwald, N.P., Gill, M.J., Wise, R. *Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2032-2035.
89. Gill, M.J., Brenwald, N.P., Wise, R. *Identification of an efflux pump gene, pmrA, associated with fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 187-189.
90. Piddock, L.J. *Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994-1998*. Drugs 1999; 58 (Suppl. 2): 11-18.
91. Poole, K., Krebes, K., McNally, C., Neshat, S. *Multiple antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: Evidence for involvement of an efflux operon*. J Bacteriol 1993; 175: 7363-7372.
92. Neyfakh, A.A. *The multidrug efflux transporter of Bacillus subtilis is a structural and functional homolog of the Staphylococcus NorA protein*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 484-485.
93. Neyfakh, A.A., Bidnenko, V.E., Chen, L.B. *Efflux-mediated multidrug resistance in Bacillus subtilis: Similarities and dissimilarities with the mammalian system*. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 4781-4785.
94. Ubukata, K., Itoh-Yamashita, N., Konno, M. *Cloning and expression of the norA gene for fluoroquinolone resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1535-1539.
95. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., Konno, M. *Nucleotide sequence and characterization of the Staphylococcus aureus norA gene, which confer resistance to quinolones*. J Bacteriol 1990; 172: 6942-6949.
96. Ng, E.Y.W., Trucksis, M., Hooper, D.C. *Quinolone resistance mediated by norA: Physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the Staphylococcus aureus chromosome*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1345-1355.
97. Takenouchi, T., Tabata, F., Iwata, Y., Hanzawa, H., Sugawara, M., Ohya, S. *Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decrease activity in efflux-mediated resistant mutants of Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1835-1842.
98. Piddock, L.J., Johnson, M.M. *Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 813-820.
99. Harding, I., Simpson, I. *Fluoroquinolones: Is there a different mechanism of action and resistance against Streptococcus pneumoniae?* J Chemother 2000; 12 (Suppl. 4): 7-15.
100. Courvalin, P., Trieu-Cuot, P. *Minimizing potential resistance: The molecular view*. Clin Infect Dis 2001; 33 (Suppl. 3): S138-146.
101. Appelbaum, P.C. *Resistance among Streptococcus pneumoniae: Implications for drug selection*. Clin Infect Dis 2002; 34: 1613-1620.