

**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Ciències

Departament de Genètica i de Microbiologia

**IDENTIFICACIÓ MOLECULAR DE MUTACIONS
ASSOCIADES A RESISTÈNCIA A QUINOLONES EN
Escherichia coli I *Salmonella enterica* serovarietat
Typhimurium**

Montserrat Rebollo Casas

2003

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Ciències

Departament de Genètica i de Microbiologia

**IDENTIFICACIÓ MOLECULAR DE MUTACIONS
ASSOCIADES A RESISTÈNCIA A QUINOLONES EN
Escherichia coli I *Salmonella enterica* serovarietat
Typhimurium**

Memòria presentada per optar al Grau
de Doctora en Ciències Biològiques per
la Universitat Autònoma de Barcelona
per

Montserrat Rebollo Casas

Vist-i-plau de la Directora de la Tesi

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Bellaterra, 2003

***Al meu pare, segur que des d'allà
dalt ha estat al meu costat en tot
moment.***

***A la meva mare, per estimar-me
tant.***

***Al meu marit, simplement per ser-
ho.***

“Metafóricamente puede decirse que la selección natural está buscando cada día y cada hora por todo el mundo las más ligeras variaciones; rechazando las que son malas; conservando y sumando todas las que son buenas; trabajando silenciosa e insensiblemente, *cuando quiera y donde quiera que se ofrece la oportunidad*, por el perfeccionamiento de cada ser orgánico en relación con sus condiciones orgánicas e inorgánicas de vida. Nada vemos de estos cambios lentos y progresivos hasta que la mano del tiempo ha marcado el transcurso de la edades; y entonces, tan imperfecta es nuestra visión de las remotas edades geológicas, que vemos sólo que las formas orgánicas son ahora diferentes de lo que fueron en otro tiempo.”

El origen de las especies

Charles Darwin

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Ara ha arribat aquell moment en el que, després de “patir” tant per tal de redactar de la millor manera possible cadascun dels apartats d’una tesi doctoral, toca recordar-se de totes aquelles persones que, d’una manera o altra, han col·laborat o influït en l’elaboració de la mateixa. I la veritat és que, encara que potser fins i tot costa més que tota la resta, realment val la pena. Sense l’ajut inestimable de certes persones ni el recolzament incondicional d’unes altres tot aquest treball no hagués estat possible.

Primer de tot m’agradaria agrair sincerament a la Dra. Montserrat Llagostera haver-me ofert la possibilitat de treballar en aquest projecte, en el que realment he disfrutat treballant, i haver-me ajudat tant, en tots els aspectes, al llarg d’aquests més de quatre anys; així com al Dr. Jordi Barbé, per acollir-me en el seu grup de treball (es pot dir que, segons el meu criteri, és un dels millors!).

També m’agradaria agrair de tot cor a Montse Saco tot el que em va ensenyar mentre realitzava les meves “Pràctiques en Empreses i Institucions Públiques”. Crec que tot allò realment m’ha servit de molt i segur que em servirà a partir d’ara. De la mateixa manera, m’agradaria agrair-li immensament la seva col·laboració en aquesta tesi. Sense el seu ajut una important part d’aquest treball no s’hagués pogut realitzar. També m’agradaria agrair a Ignasi Badiola la seva col·laboració així com la seva pròpia tesi doctoral, sense la qual una altra part d’aquest treball tampoc hagués estat possible.

Tot i que indirectament, ja que no hem mantingut cap contacte directe, m’agradaria agrair a la doctora Beatriz Mirelis i a la gent del Departament de Microbiologia de l’Hospital de Sant Pau tot el munt de “soques d’E. coli d’origen humà” que m’han fet arribar, així com totes les dades sobre les mateixes.

Aquesta tesi tampoc hauria estat possible sense la “col·laboració”, malgrat la poca gràcia que li feia a tothom, del temut, però al cap i a la fi imprescindible, ^{33P}. En aquest punt tinc que agrair al Dr. Oriol Cabré haver-me permès treballar en la “seva” instal·lació radioactiva i també a la gent del Departament de Genètica amb la que hi he “topat” mentre marcava les meves sondes, especialment a l’Arturo (no l’he marejat vegades demanant-li les

claus!) però també a l'Eli, la Laura, l'Aida,...amb els que he tingut que compartir, molt agradablement per cert, la instal·lació.

Un altre personatge curiós de tota aquesta història és el Salva, de Bioquímica. Moltes gràcies per deixar-me venir a exposar els meus filtres a hores intempestives!!!!

Moltes gràcies també a les secretàries del Departament, per tot el "papeleo" i a la resta de gent de la quarta i la tercera planta, gràcies per la vostra simpatia.

He preferit esperar-me una mica per recordar als meus companys, la meua família durant un munt d'hores al dia. Sembla mentida com pots arribar a apreciar a les persones que treballen amb tu.

Els que ja heu marxat, sapiguen que se us troba molt a faltar: Mar, que seas muy feliz allá en Madrid y felicidades por tu matrimonio!!!!, muchísimos besos; Raül i Maribel, espero que tot us vagi molt bé i que, encara que sigui molt de tant en tant, es puguem anar veient; Àngels, encara que no vam tenir massa contacte sempre em va impressionar la teua dedicació; José Antonio, felicidades a ti también y un abrazo muy fuerte; Alfonso, felicitats pel 5 de 8 i el 3 de 9, va ser impressionant!!!!, pel que fa a la feina, et desitjo tota la sort del món; Ricardo, ¿como va todo por ahí?, muchos besos a tus niños y uno muy grande para ti; Xavi, encara que hi vas ser durant molt poc temps va ser un plaer tenir-te al Lab2, que et vagi sempre tot bé; Susana E., mucha suerte a ti también en tu matrimonio y en tu nuevo trabajo, y sigue siempre así de simpática.

Els que encara hi sou, no us oblidaré mai: Joan, què hagués estat de mi sense tu?, moltes gràcies per tot; Toni, aunque "llegaste tarde" siempre me echaste una mano cuando hizo falta; Mònica, Gerard, Núria, Jordi, Marc, Anna, René, encara que uns més que els altres, teniu molt camí per endavant, disfruteu molt amb la vostra feina (això és molt important) i molta sort!!!!; José, deseo de todo corazón que te salga todo muy bien y que cuando te reúnas con tu familia les des un fuerte abrazo de mi parte; Pilar, sin ti tampoco sé lo que hubiese hecho, desde que llegaste me has ayudado muchísimo, muchas gracias por todo, de verdad; Susanita, espero que me salga tan bien como a ti, no sabes cuánto te he admirado siempre; Montse (jo no, la Bosch), moltes gràcies per tot....ho sento no puc continuar, sempre he sigut una bleada i ara mateix estic tant emocionada que se'm salten les

llàgrimes, i no és broma. Montse B., Lorena, Mirle, MariaElenchu, m'agradaria poder dir alguna cosa molt especial de vosaltres però no sóc capaç, tan sols vull que sapiguen que us estimo moltíssim, que espero que això no acabi aquí i que sempre ocupareu un lloc important en el meu cor.

Als meus amics de sempre i als que, encara que han arribat una mica més tard, ja ho són per tota la vida, Ester, Jaume, Núria, David, Maribel, Juli, Isma, Rafa, Isa, Isra, Rocío, Jose, Glòria, Lara, Joaquin, Abi, Sandra, Jordi, Sara, Sam, Alfonso, Loli, Cris, Anna, Azu, Eva, Susana, Marta, Mónica, moltes gràcies per estar allí quan us he necessitat, per aguantar-me en les meves "crisis" i les meves paranoies, per donar una mà quan fa falta, en definitiva, moltes gràcies per ser els meus amics. Us estimo.

A la meva família, sense la que res de tot això s'hagués fet realitat. Sobretot gràcies mama per ajudar-me tant, per estar sempre al meu costat i per estimar-me tant. Gràcies papa per deixar-me fer el que més m'agradava, encara que moltes vegades no estiguéssim d'acord sempre vas estar orgullós de mi, segur que ara series l'home més feliç del món de veure fins on he arribat, et trobo molt a faltar, sempre t'estimaré. Iaia, tiet, Pere, Carol, molts petonets.

Antonio, te quiero, te adoro, te amo.

ÍNDEX

ÍNDIX

RESUM	i
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. ENTEROBACTÈRIES, CARACTERÍSTIQUES GENERALS	1
1.1.1. Gènere <i>Escherichia</i>	3
A. Infeccions del tracte urinari	5
B. Meningitis neonatal	6
C. Malalties intestinals	7
• <i>E. coli</i> enterotoxigèniques (ETEC)	8
• <i>E. coli</i> enteroinvasives (EIEC)	8
• <i>E. coli</i> enterohemorràgiques (EHEC)	9
• <i>E. coli</i> enteropatogèniques (EPEC)	9
• <i>E. coli</i> enteroagregatives (EAggEC)	10
1.1.2. Gènere <i>Salmonella</i>	10
1.1.2.1. Patogènia de <i>Salmonella</i>	11
A. <i>Salmonella</i> en els humans	11
B. <i>Salmonella</i> en els animals	13
C. <i>Salmonella</i> en el medi ambient	13
1.1.2.2. Estructura antigènica	14
A. Antígens somàtics (“O”) o de paret cel·lular	14
B. Antígens de superfície (capsulars)	15
C. Antígens flagel·lars (“H”)	15
1.1.2.3. Classificació i nomenclatura	16
1.2. ESTRUCTURA DEL DNA	18
1.3. TOPOISOMERASES	22
1.3.1. DNA girasa	23
1.3.2. Topoisomerasa IV	25
1.4. QUINOLONES	26
1.4.1. Estructura	26
1.4.2. Classificació	35
1.4.3. Diana funcional i diana primària d’unió de les quinolones	40

1.4.4. Models moleculars d'inhibició de la DNA girasa.....	42
1.5. RESISTÈNCIA BACTERIANA A QUINOLONES.....	49
1.5.1. Mecanismes de resistència a quinolones.....	51
1.5.2. Resistència a quinolones deguda a mutacions en les topoisomerases bacterianes.....	53
1.5.2.1. <i>E. coli</i>	53
• Mutacions en la DNA girasa.....	53
• Mutacions en la topoisomerasa IV.....	56
1.5.2.2. <i>S. typhimurium</i>	59
1.5.3. Resistència deguda a mutacions que provoquen una disminució en l'acumulació de quinolones.....	62
• Alteracions en la permeabilitat de la membrana externa.....	62
• Alteracions en els sistemes d'expulsió activa.....	63
1.5.4. Resistència plasmídica a quinolones.....	67
1.6. DETECCIÓ DE MUTACIONS QUE CONFEREIXEN RESISTÈNCIA A QUINOLONES.....	68
1.6.1. Seqüenciació.....	68
1.6.2. RFLP.....	69
1.6.3. SSCP.....	69
1.6.4. "Rapid PCR Mismatch Amplification Mutation Assay", MAMA PCR.....	70
1.6.5. "LightCycler-based PCR-hybridization <i>gyrA</i> mutation assay", GAMA.....	71
2. OBJECTIUS.....	73
3. MATERIALS I MÈTODES.....	75
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC.....	75
3.1.1. Soques bacterianes.....	75
3.1.2. Plasmidis.....	77
3.2. MÈTODES MICROBIOLÒGICS BÀSICS.....	77
3.2.1. Mètodes de cultiu i condicions de creixement.....	77
3.2.2. Manteniment i conservació de les soques.....	78

3.2.3. Medis de cultiu.....	79
3.2.4. Solucions d'antibiòtics.....	81
3.2.5. Material i solucions.....	82
3.3. DETERMINACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT A ANTIMICROBIANS.....	92
3.4. ESTUDI DE LES SOQUES BACTERIANES PER CINÈTIQUES BIOQUÍMIQUES.....	96
3.5. MÈTODES GENÈTICS.....	99
3.5.1. Electrotransformació.....	99
3.6. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE DNA.....	101
3.6.1. Miniextraccions de DNA cromosòmic.....	101
3.6.2. Miniextraccions de DNA plasmídic.....	103
3.6.3. Digestió del DNA amb enzims de restricció.....	106
3.6.4. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa.....	106
3.6.5. Recuperació de fragments de DNA.....	110
3.6.6. Lligació de fragments de DNA a vectors plasmídics.....	111
3.6.7. Amplificació de fragments de DNA per PCR.....	112
3.6.8. Marcatge i seqüenciació de DNA.....	119
3.7. MÈTODES DE DETECCIÓ DE MUTACIONS.....	121
3.7.1. Hibridació de colònies amb sondes específiques.....	121
3.7.1.1. Sondes utilitzades.....	121
3.7.1.2. Marcatge de les sondes.....	123
3.7.1.3. Preparació de les soques.....	125
3.7.1.4. Transferència de les colònies als filtres.....	126
3.7.1.5. Determinació de la T_m de les sondes i de la temperatura d'hibridació.....	127
3.7.1.6. Hibridació.....	127
3.7.1.7. Rentats.....	128
3.7.1.8. Exposició i revelat.....	129
3.7.1.9. Lectura dels resultats.....	130
3.7.2. PCR a temps real per a la detecció fluorimètrica de les mutacions.....	130
3.8. BASES DE DADES.....	136

4. RESULTATS	137
PART A. <i>Escherichia coli</i>	137
4.1. CINÈTIQUES BIOQUÍMIQUES	137
4.2. SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES	143
4.3. DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ELS GENS <i>gyrA</i> I <i>parC</i>	155
4.3.1. Seqüenciació de les regions QRDR dels gens <i>gyrA</i> i <i>parC</i>	155
4.3.2. Desenvolupament i optimització del mètode d'hibridació de colònies amb sondes específiques	160
4.3.3. Mutacions en les regions QRDR dels gens <i>gyrA</i> i <i>parC</i>	164
4.4. RELACIÓ ENTRE LA PRESENCIA DE MUTACIONS I LA SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES	171
4.5. SUSCEPTIBILITAT A ALTRES ANTIMICROBIANS	174
4.6. RELACIÓ ENTRE ELS DENDOGRAMES I ELS GRUPS MUTACIONALS	187
PART B. <i>Salmonella typhimurium</i>	199
4.7. CINÈTIQUES BIOQUÍMIQUES	199
4.8. SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES	202
4.9. DETECCIÓ DE MUTACIONS EN EL GEN <i>gyrA</i>	205
4.10. RELACIÓ ENTRE LES MUTACIONS EN LA REGIÓ QRDR DEL GEN <i>gyrA</i> I LA SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES	209
4.11. SUSCEPTIBILITAT A ALTRES ANTIMICROBIANS	212
4.12. RELACIÓ ENTRE ELS DENDOGRAMES I ELS GRUPS MUTACIONALS	217
5. DISCUSSIÓ	223
PART A. <i>Escherichia coli</i>	223
PART B. <i>Salmonella typhimurium</i>	238
6. CONCLUSIONS	247
7. BIBLIOGRAFIA	251

RESUM

RESUM

La finalitat del present treball ha estat l'estudi de les mutacions relacionades amb la resistència a quinolones en aïllats d'*E. coli* i de *S. enterica* ser. Typhimurium, a través del desenvolupament i l'aplicació de diferents metodologies. Tanmateix, s'ha determinat la susceptibilitat de les soques front a les quinolones i a altres antimicrobians i s'ha determinat el seu grau de similitud relativa (SR).

Així, s'han estudiat les 118 soques d'*E. coli* aïllades en el Laboratori de Sanitat Animal del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya des de l'any 1994 fins al 2000, i una representació, integrada per 88 soques d'*E. coli*, de les aïllades en el Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, entre els anys 1993 i 2000, sent totes aquestes resistents a l'àcid nalidíxic (Nal^R), donat que són majoritàries entre les aïllades en clínica.

Amb l'objectiu d'identificar les principals mutacions en els gens *gyrA* i *parC* associades amb la resistència a quinolones en *E. coli*, s'ha posat a punt un mètode d'hibridació de colònies amb sondes específiques. Prèviament, però, s'han seqüenciat les regions QRDR d'aquests gens d'algunes de les soques per tal de conèixer les diferents seqüències possibles i dissenyar les sondes específiques. Els resultats obtinguts per seqüenciació indiquen que la majoria són mutants en el codó 83 del gen *gyrA* i que moltes són salvatges pel codó 87 del gen *gyrA* i pel 80 del gen *parC*, sent pràcticament totes salvatges pel 84 del gen *parC*. La mutació majoritària en el codó 83 del gen *gyrA* és el canvi Ser83 → Leu, ja que només una soca és un mutant Ser83 → Ala. Totes les mutacions detectades en el codó 87 són conegudes, a excepció del canvi Asp87 → Ala. Igualment, s'han trobat mutacions silencioses en els codons 85 i 91 i, per primera vegada, el canvi Ala84 → Ser. Pel que fa al gen *parC*, totes les mutacions en els codons 80 i 84 són conegudes, així com els dos codons salvatges codificants de la Ser80 (AGC i AGT).

El mètode d'hibridació de colònies amb sondes específiques, conjuntament amb la seqüenciació de les regions QRDR dels gens *gyrA* i/o *parC* d'algunes soques, ha permès classificar les soques en vuit grups mutacionals. L'anàlisi de la susceptibilitat a quinolones de les soques d'aquests grups mutacionals indica que, d'acord amb el proposat per Vila i col. (1996), una substitució específica en el gen *gyrA* s'associa amb un alt nivell resistència a l'àcid nalidíxic i amb una susceptibilitat reduïda a les fluoroquinolones; un canvi en el gen *gyrA* i un segon en el *parC* confereixen una menor susceptibilitat a fluoroquinolones; dues mutacions en el gen *gyrA* i una en el *parC* s'associen amb resistència a aquests compostos; i dues substitucions en el gen *gyrA* i dues en el gen *parC* donen lloc a alts nivells de resistència a tots aquests compostos.

En el grup mutacional en el que s'inclouen totes les soques d'origen animal sense mutacions, la majoria són sensibles a totes les quinolones o bé presenten un nivell intermig de susceptibilitat a l'àcid nalidíxic, a excepció d'una soca que és resistent només a l'enrofloxacina. En canvi, l'única soca d'origen humà que tampoc presenta cap mutació és Nal^R i sensible a les fluoroquinolones. S'han observat clares diferències entre les soques Nal^R d'origen animal i d'humans, pel que fa a la presència de mutacions en els gens *gyrA* i *parC* i també a la seva susceptibilitat a les quinolones. Així, mentre que més d'un 51% de les soques d'humans acumulen tres mutacions, aquest percentatge és d'un 24%, aproximadament, per a les d'origen animal. Entre aquestes últimes no s'han trobat tampoc soques amb quatre mutacions. El percentatge de mutants simples en el codó 83 del gen *gyrA* és molt similar entre les soques dels dos orígens, mentre que el de dobles mutants és de més d'un 27% entre les d'origen animal i d'un 5%, aproximadament, entre les d'humans. Un altra diferència destacable és que només s'han detectat mutants simples en el codó Asp87 del gen *gyrA* entre els aïllats d'animal, amb un percentatge d'un 8,33%. El conjunt de resultats obtinguts amb les soques d'*E. coli* Nal^R indiquen que el 55% dels aïllats d'animal presenten uns valors de CMI_s front a les quinolones que es poden correlacionar amb les mutacions detectades en els gens *gyrA* i *parC*. En canvi, aquest percentatge és molt menor, d'un 29%, per a les soques d'origen humà. De fet, en aquest últim grup, un 48% de les soques presenta uns valors molt elevats de CMI_s front a les quinolones, el que contrasta amb el baix percentatge, un 19%, trobat entre les soques d'origen animal. Aquests resultats indiquen que al voltant d'un 71% de les soques aïllades en clínica contenen altres canvis, probablement a nivell de permeabilitat i de bombes d'expulsió, que les fa altament resistents a les quinolones i, en general, aquestes soques són també multiresistents a altres antimicrobians. Aquest percentatge és de tan sols un 45% entre les soques d'origen animal. Per altra banda, també s'ha observat que el conjunt de soques d'origen humà presenta un espectre més ampli de resistència a diferents antimicrobians que les d'animal.

Finalment, s'ha determinat que el grau de relació entre les soques aïllades d'animal és més elevat que entre les d'humans, ja que la majoria d'aquestes últimes presenten uns valors de similitud relativa inferiors al 95%. És de ressaltar que les soques d'animal s'agrupen preferentment segons el tipus d'animal del qual provenen i l'any d'aïllament, i que, a més a més, també presenten el mateix patró mutacional i, en molts casos, la mateixa susceptibilitat a quinolones i també el mateix patró de resistència a altres antimicrobians. De totes maneres, en els diferents grups obtinguts amb els aïllats d'humans, també s'ha trobat que les incloses en cada grup presenten característiques molt similars. Aquests resultats podrien indicar que hi ha una clonalitat més elevada entre els aïllats d'animal que entre els d'humans. Malgrat això, cal considerar que el conjunt de soques d'origen animal inclou soques aïllades de mostres molt diferents i també de llocs ben diferenciats geogràficament de Catalunya i d'arreu d'Espanya. Per això, els resultats obtinguts poden ser també un indicatiu de que la variabilitat de soques d'*E. coli* en animals és més baixa que la que es dona en humans.

L'estudi en *S. enterica* ser. Typhimurium s'ha centrat en soques procedents de la col·lecció del Laboratori de Sanitat Animal, i donat que la majoria són Nal^S, per aquest estudi s'han escollit 61 soques Nal^R, aïllades entre les anys 1992 i 1998, i dues soques Nal^S com a controls, a més de la LT2. Per a identificar les soques salvatges i les mutants en el gen *gyrA*, s'han posat a punt dues metodologies: un mètode d'hibridació de colònies amb una sonda específica que detecta la seqüència salvatge en posició 83 i un altre basat en la PCR a temps real amb sondes FRET. Prèviament, s'ha procedit a la seqüenciació de la regió QRDR del gen *gyrA* de totes les soques, detectant-se mutacions en els codons 83 i 87 (Ser83 per Tyr o Phe i Asp87 per Asn o Gly), sent les de l'Asp87 les més freqüents. No s'ha trobat cap nova mutació ni tampoc dobles mutants. El mètode d'hibridació de colònies desenvolupat ha permès distingir entre soques salvatges i mutants en la Ser83 amb una elevada fiabilitat. Pel mètode de PCR a temps real s'han distingit les soques salvatges en els codons 83 i 87 i també els mutants Asp87 → Gly i Ser83 → Tyr, sent necessari el disseny futur d'una altra sonda per a identificar les altres tres mutacions conegudes (Asp87 → Asn, Asp87 → Tyr i Ser83 → Phe) en *S. typhimurium*.

Les mutacions detectades en el gen *gyrA* de *S. typhimurium* es corresponen amb que siguin Nal^R i sensibles a les quinolones fluorades, si bé en algunes s'observa una susceptibilitat disminuïda. A més a més, és de destacar que la mutació que presenten es relaciona amb el tipus d'animal del qual es van aïllar i amb l'any d'aïllament, a l'igual que amb el patró de resistència a diferents antimicrobians. Tots aquests resultats suggereixen un alt grau de relació entre les soques estudiades, el que es va confirmar a l'obtenir els dendogrames de SR, on s'observen grups, amb valors de SR superior al 93%, que inclouen soques amb unes mateixes característiques. Aquests resultats suggereixen que hi ha molt poca variació entre les soques de *S. typhimurium* presents en un determinat tipus d'animal al llarg de la geografia del nostre país.

Dels estudis presentats en aquesta memòria es pot proposar, com a estratègia experimental per a futurs treballs, l'elaboració dels dendogrames de SR entre les diferents soques i l'elecció de representants de cada grup per a determinar la susceptibilitat a quinolones i el patró de resistència a altres antimicrobians, així com les mutacions a nivell molecular pels mètodes desenvolupats.

Finalment, assenyalar que, segons les dades obtingudes, les soques de *S. typhimurium* Nal^R d'animals no presenten una acumulació de mutacions i són majoritàriament sensibles a les fluoroquinolones. Igualment, l'acumulació de mutacions en els gens *gyrA* i *parC* d'*E. coli* o la presència d'altres mecanismes de resistència a quinolones no sembla tenir una elevada incidència entre els aïllats d'animals, sobretot si es compara amb la dels aïllats clínics estudiats.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ENTEROBACTÈRIES, CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Les **enterobactèries** o **bactèries entèriques** comprenen un grup filogenètic relativament homogeni dins el **grup gamma** de les **Proteobactèries** (Madigan *et al.*, 2000). Aquest grup entèric, considerat un dels grups bacterians més important a nivell mèdic, inclou alguns **patògens humans**, i també animals, la majoria dels quals infecten el sistema digestiu. Alguns exemples són *Salmonella typhi*, causant de les febres tifoïdes, diverses espècies del gènere *Shigella*, que causen la shigel·losis (un tipus de disenteria, malaltia caracteritzada per diarrees que freqüentment contenen sang i moc) i *Vibrio cholerae*, causant del còlera. Dins aquesta família també s'inclou *Yersinia pestis*, agent causal de la peste bubònica (Ingraham i Ingraham, 1998). Altres membres d'aquest grup són **colonitzadors "normals" del tracte gastrointestinal humà**, com per exemple espècies dels gèneres *Escherichia*, *Enterobacter* i *Klebsiella*, encara que aquestes bactèries poden estar també relacionades, ocasionalment, amb malalties en humans (Todar, 2002). Una de les espècies més coneguda és *Escherichia coli*, ja que s'ha utilitzat per a la investigació en totes les ciències de la vida i actualment és un dels instruments principals de la tecnologia del DNA recombinant.

Encara que el terme "entèric" significa "intestinal", no tots els membres del grup es troben en el tracte digestiu dels animals, tant sans com malalts. El grup entèric es caracteritza per un metabolisme similar i no per el seu hàbitat, així alguns organismes, entre els que s'inclouen alguns membres del gènere *Erwinia*, causen malalties en les plantes. Per exemple, *E. amylovora* provoca malalties necròtiques en els perers i altres arbres fruiters relacionats, o *E. caratovora* causant de l'estovament de les arrels de moltes plantes (Ingraham i Ingraham, 1998).

Els membres de la família *Enterobacteriaceae* es distingeixen, per exemple, dels de la família *Pseudomonadaceae* per una sèrie de característiques "claus". Mentre que les pseudomones són respiradores, mai fermentatives, oxidasa positiu i mòbils mitjançant flagels polars, les enterobactèries fermenten la glucosa produint àcid i gas, són típicament oxidasa negatiu i, quan són mòbils, ho són per flagels peritrics (Todar, 2002).

En general, les **enterobactèries** presenten les següents **característiques fenotípiques**:

- bacils gramnegatius,
- alguns són immòbils i altres són mòbils per flagels peritrics,
- anaerobis facultatius,
- catalasa positiu,
- oxidasa negatiu,
- normalment redueixen el nitrat a nitrit, no a N₂,
- tenen requeriments de nutrició relativament simples,
- quan no disposen d'oxigen, les bactèries entèriques metabolitzen els sucres mitjançant fermentació (produint una varietat de productes finals, principalment àcid i gas).

Totes aquestes característiques fenotípiques són les que s'utilitzen per a separar les bactèries entèriques d'altres bactèries de morfologia i fisiologia similars (Madigan *et al.*, 2000).

Pel que fa a la **fermentació**, dins el grup entèric són típics dos tipus diferents de fermentacions complexes: la **fermentació àcid-mixta** i la **fermentació butanodiòlica** (Ingraham i Ingraham, 1998). Mentre que la fermentació àcid-mixta produeix una barreja d'àcids orgànics relativament forts, els productes de la fermentació butanodiòlica són menys àcids i es forma butanodiol, un dihidroxí alcohol de quatre àtoms de carboni. Les dues fermentacions es diferencien per tres característiques fonamentals: la fermentació àcid-mixta produeix grans quantitats d'àcid; a més, alguns fermentadors àcid-mixtes poden convertir l'àcid fòrmic en CO₂ i H₂, produint

gas, habitualment en quantitats fàcilment detectables; la fermentació butanodiòlica, per altra banda, produeix el butanodiol i petites quantitats d'àcid. La capacitat de les diferents espècies entèriques de realitzar una o altra fermentació s'utilitza com a criteri per a subdividir el grup de la següent manera:

FERMENTACIÓ ÀCID-MIXTA		FERMENTACIÓ BUTANODIÒLICA	
Produeixen H ₂ i CO ₂	No produeixen gasos	Produeixen H ₂ i CO ₂	Produeixen només CO ₂
<i>Escherichia</i> <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> (la majoria de les espècies)	<i>Shigella</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Yersinia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i> <i>Erwinia</i>

Com ja s'ha dit abans, entre les bactèries entèriques hi ha moltes espècies patògenes tant per a l'home com per als animals, però també n'hi ha d'altres d'importància industrial. Gràcies al gran nombre d'estudis realitzats, probablement es sap més sobre *Escherichia coli* que sobre qualsevol altra espècie bacteriana. Degut a l'enorme importància mèdica de les bactèries entèriques, s'ha estudiat extremadament gran quantitat d'aïllats que han permès caracteritzar i definir gran quantitat de gèneres diferents. Entre moltes de les bactèries entèriques hi ha una marcada relació genètica, com es demostra per les homologies de DNA i la recombinació genètica, malgrat això, es mantenen en gèneres separats, sobretot per raons pràctiques (Madigan *et al.*, 2000).

1.1.1. Gènere *Escherichia*

El gènere *Escherichia* i la seva principal espècie, *E. coli*, estan constituïts per enterobactèries mòbils que fermenten la lactosa (bacils coliformes) i la glucosa, amb producció de gas i àcids diversos (realitzen la fermentació àcid-mixta). Són bacils gramnegatius poc exigents en les seves necessitats nutritives i relativament resistent als agents externs, que es

cultiven en medis comuns, fins i tot a temperatures de 45°C, el que permet diferenciar-los de la resta de coliformes (Madigan *et al.*, 2000).

Els membres del gènere *Escherichia* són **habitants pràcticament universals del tracte intestinal dels humans i dels animals de sang calenta** (formen la major part de la flora comensal anaeròbia facultativa del tub digestiu), encara que això no significa que siguin els organismes dominants en aquests hàbitats. Malgrat que *E. coli* és l'organisme facultatiu predominant en el tracte gastrointestinal humà, representa una petita porció del total del contingut bacterià; per exemple, les espècies anaeròbiques del gènere *Bacteroides* sobrepassen en nombre a *E. coli*, en l'intestí, en una proporció de 20:1 (Todar, 2002).

El tracte gastrointestinal de la majoria d'animals de sang calenta és colonitzat per *E. coli*, que és capaç d'adherir-se a la mucosa que recobreix l'intestí, poques hores o dies després del naixement (l'intestí humà és colonitzat, normalment, en les 40 primeres hores després del naixement). La bactèria és ingerida a través de l'aliment o de l'aigua, o s'obté directament d'altres individus en contacte amb el recién nascut. Una vegada s'ha establert, una soca d' *E. coli* pot persistir durant mesos o anys. Les soques residents canvien passat un llarg període, però aquest canvi té lloc molt més ràpidament després d'una infecció entèrica o després d'un tractament amb antimicrobians, que pertorben la microbiota normal. La base d'aquests canvis així com l'ecologia d'*E. coli* dins l'intestí humà són poc coneguts, malgrat la gran quantitat d'informació sobre molts altres aspectes de la vida d'aquests microorganismes (Todar, 2002).

Tenen un paper nutricional en el tracte intestinal, sintetitzant vitamines, en especial vitamina K. Com anerobis facultatius és probable que també ajudin a consumir oxigen; per tant, en aquestes condicions, "viuen" anaeròbicament. En rara ocasió requereixen factors de creixement i són capaços de créixer en una ampla varietat de fonts de carboni i energia com sucres, aminoàcids, àcids orgànics, etc (Madigan *et al.*, 2000). Metabòlicament, poden transformar la glucosa en tot el conjunt de

macromolècules que formen la cèl·lula. Com ja s'ha dit, poden viure en presència o absència d'oxigen. Sota condicions anaeròbiques poden créixer mitjançant la fermentació, produint els característics "àcids i gas" com a productes finals, però també són capaços de créixer mitjançant respiració anaeròbica, ja que poden utilitzar NO_3^- i fumarat com a acceptors finals d'electrons en els processos de transport electrònic de la respiració (Ingraham i Ingraham, 1998). S'eliminen per la fempta a l'exterior, pel que no és infreqüent que es trobin en el medi ambient on són capaços de sobreviure durant un cert temps en l'aigua i els aliments, de manera que el seu aïllament constitueix un indicador de contaminació fecal recent (Madigan *et al.*, 2000).

Com succeeix amb tots els microorganismes, existeixen moltes soques, variants naturals, d'*E. coli*. La majoria de les soques actuen, a l'intestí, com a **comensals** que protegeixen front a la infecció, ja que competeixen amb patògens intestinals tals com *Shigella* i *Salmonella*. Malgrat això, algunes soques d'*E. coli* són **patògens virulents**, responsables de tres tipus d'infeccions en els humans: **infeccions del tracte urinari (UTI_s)**, **meningitis neonatal** i **malalties intestinals (gastroenteritis)**. Les soques patògenes d'*E. coli* presenten una sèrie de factors de virulència dels que careixen les soques no patògenes. Hi ha reconeguts més de 700 tipus antigènics (**serotips**) en base als **antígens "O"**, **"H"** i **"K"** i el serotipat segueix sent important per tal de distingir el petit nombre de soques que actualment causen malalties (Ingraham i Ingraham, 1998; Todar, 2002).

A. Infeccions del tracte urinari

En aproximadament un 90% de les persones que contrauen la seva primera infecció urinària aquesta és produïda per *E. coli*, així doncs és el patògen que infecta amb major freqüència les vies urinàries. La majoria de les infeccions nosocomials, és a dir aquelles que s'adquireixen dins l'hospital, de l'aparell urinari són produïdes també per aquesta bactèria. Els

microorganismes provenen de la femta o de la regió perineal i ascendeixen pel tracte urinari fins a la bufeta de l'orina, on són capaços d'adherir-se amb l'ajuda d'adhesines específiques. Les infeccions de la bufeta són 14 vegades més comuns en les dones que en els homes, degut a la diferència en la llargada de la uretra (Ingraham i Ingraham, 1998; Todar, 2002).

Aquesta capacitat d'adherència és un dels factors més importants en la virulència de les soques **uropatogèniques** d'*E. coli*, és a dir, aquelles soques que són capaces de produir infeccions en el tracte urinari. Cada soca d'*E. coli* que inicia una infecció urinària presenta de 10 a 200 **fimbries** amb **adhesines** que s'uneixen fortament als receptors cel·lulars situats a l'epiteli urinari, el que fa que la bactèria pugui suportar el flux normal de l'orina sense ser expulsada de l'organisme (Ingraham i Ingraham, 1998). Les soques uropatogèniques d'*E. coli* posseeixen, a més, altres factors de virulència: normalment produeixen **sideròfors**, que probablement juguen un paper essencial en l'adquisició de ferro per part de la bactèria durant o després la colonització; algunes són capaces de produir **hemolisines** i, per tant, són citotòxiques, degut a que indueixen la formació de porus transmembrana en les cèl·lules hoste, i **colicines**, que són utilitzades per a inhibir altres soques d'*E. coli*; altres són resistents a l'acció bactericida del sèrum humà (bàsicament gràcies a la presència de l'**antigen "K"**); moltes altres són portadores de plasmidis de resistència a antimicrobians; etc... (Ingraham i Ingraham, 1998; Todar, 2002).

B. Meningitis neonatal

E. coli és l'agent responsable de tan sols un 5% de totes les meningitis bacterianes. Malgrat això, els nadons i els malalts convalescents d'operacions de neurocirurgia estan especialment predisposats a contraure aquesta infecció, que pot ser mortal (Ingraham i Ingraham, 1998).

La meningitis neonatal afecta a un de cada 2000-4000 infants. Les soques d'*E. coli* invaeixen el flux sanguini dels infants des de la nasofaringe

o el tracte gastrointestinal i són transportades fins a les meninges. Un 80% de les soques d'*E. coli* involucrades en aquestes infeccions sintetitzen l'**antigen capsular K-1**. Aquest antigen està present només en un 20-40% dels aïllats intestinals i està considerat com el principal determinant de virulència entre les soques d'*E. coli* que causen meningitis neonatal. Altres determinants de virulència d'aquestes soques són la producció de **sideròfors** i **endotoxines** (Todar, 2002).

C. Malalties intestinals

Com a patògen, és clar, *E. coli* és més conegut per la seva capacitat de provocar malalties intestinals (Todar, 2002). Com ja s'ha dit abans, la majoria de soques actuen com a comensals a l'intestí i protegeixen front a la infecció per altres microorganismes. No obstant això, algunes soques d'*E. coli* són **patògens virulents**. Aquestes soques "virulentes" constitueixen la principal causa de les diarrees infantils ens els països en vies de desenvolupament, on causen la mort d'un gran nombre de nens; també són la causa principal de l'anomenada "diarrea del viatger", que afecta a la major part dels occidentals quan visiten aquests països en vies de desenvolupament. També es produeixen, però, brots epidèmics de diarrees per *E. coli* en els països més desenvolupats, per la ingesta d'aliments o aigües contaminades (Ingraham i Ingraham, 1998).

En funció dels factors de virulència que presenten les soques d'*E. coli* patògenes que afecten al tracte intestinal hi ha reconegudes cinc classes (**virotips**) d'*E. coli* que causen malalties intestinals: **enterotoxigèniques (ETEC)**, **enteroinvasives (EIEC)**, **enterohemorràgiques (EHEC)**, **enteropatogèniques (EPEC)**, i **enteroagregatives (EAggEC)**. Cadascuna d'aquestes classes s'inclou dins un subgrup serològic i manifesta diferents característiques en la patogènesi (Todar, 2002).

• *E. coli* enterotoxigèniques (ETEC)

Les ETEC són una de les causes més importants de diarrea en infants i viatgers en els països subdesenvolupats o en regions amb poques mesures higièniques. La malaltia pot variar des d'un lleuger malestar fins a un síndrome sever semblant al del còlera. Les ETEC són adquirides per ingestió d'aliments o aigües contaminades. En les àrees endèmiques, els adults han desenvolupat immunitat front a aquestes malalties. Per a desenvolupar la malaltia es requereix colonització, per mitjà d'adhesines, i elaboració d'una o més enterotoxines. Aquestes dues característiques estan codificades en plasmidis. Les **adhesines** de les ETEC són **fímbrics** específiques que s'adhereixen a determinats receptors dels enteròcits de l'intestí prim. Les **enterotoxines** produïdes per les ETEC inclouen **toxines termolàbils (LT)** i/o **toxines termoestables (ST)**, els gens de les quals poden trobar-se en el mateix o en diferent plasmidi. Els símptomes de les infeccions produïdes per ETEC són diarrees sense febre. La bactèria colonitza el tracte gastrointestinal per mitjà de les fímbrics i no és invasiva, però produeix una o altra enterotoxina (LT o ST) (Todar, 2002).

• *E. coli* enteroinvasives (EIEC)

Les EIEC s'assemblen molt a *Shigella* en els seus mecanismes de patogènia i en el tipus de malaltia clínica que produeixen. Les EIEC penetren i es multipliquen dins les cèl·lules epitelials del còlon provocant destruccions cel·lulars massives. El síndrome clínic és idèntic a la disenteria causada per *Shigella* i es tracta d'una diarrea semblant a la disenteria, amb febre. Les EIEC han perdut, aparentment, les fímbrics però poseeixen una **adhesina específica** que, com en *Shigella*, es pensa que és una **proteïna de la membrana externa**. També, com *Shigella*, les EIEC són **organismes invasius** (Todar, 2002). No produeixen, però, enterotoxines, encara que sí una toxina semblant a la que produeix *Shigella* i que provoca la inhibició de la síntesi proteica i la destrucció les cèl·lules de la mucosa intestinal (Ingraham i Ingraham, 1998).

- ***E. coli* enterohemorràgiques (EHEC)**

Les EHEC estan representades per una sola soca (**serotip O157:H7**), que causa un síndrome de diarrea diferent del provocat per les EIEC en que hi ha una gran pèrdua de sang i no hi ha febre. Una freqüent situació que es dona i que suposa una greu amenaça per la vida són els seus efectes tòxics sobre els ronyons (urèmia hemolítica). Les EHEC estan considerades com a “**moderadament invasives**”. No es coneix pràcticament res sobre els seus antígens de colonització però es pensa que hi ha **fímbrics** implicades. Aquestes bacteries no invaeixen les cèl·lules de la mucosa tant eficientment com *Shigella*, però sí que produeixen una toxina pràcticament idèntica a la “**Shiga toxin**” produïda per *Shigella*. Aquesta toxina, codificada en un fag, juga un important paper en la intensa resposta inflamatòria produïda per les EHEC i la seva producció es veu augmentada per la deficiència de ferro (Todar, 2002).

- ***E. coli* enteropatogèniques (EPEC)**

Les EPEC causen una diarrea aquosa semblant a la produïda per les ETEC, però no posseeixen els mateixos factors de colonització ni fabriquen toxines ST ni LT. Produeixen una **adhesina**, una **proteïna de la membrana externa**, no associada a fímbrics i anomenada **intimina**, que és la responsable dels últims passos de l'adherència. Encara que no produeixen les toxines ST ni LT, sintetitzen una **enterotoxina** semblant a la produïda per *Shigella*. Es diu que les EPEC són també soques “**moderadament invasives**” ja que no són tant invasives com *Shigella* i, a diferència de les ETEC i les EAggEC, donen lloc a una resposta inflamatòria. La diarrea i els altres símptomes de les infeccions per EPEC es deuen, probablement, a la invasió de les cèl·lules de l'hoste per part de la bactèria i a la interferència en la transducció normal dels senyals cel·lulars, més que a la producció de toxines (Todar, 2002).

• *E. coli* enteroagregatives (EAggEC)

La característica més destacable de les EAggEC és la seva capacitat d'atacar els cultius tissulars d'una manera agregativa. Aquestes soques s'han associat amb la diarrea persistent dels nens petits. S'assemblen a les ETEC en que s'adhereixen a la mucosa intestinal i donen lloc a una diarrea sense sang i sense envair o causar inflamació. Produeixen una toxina termoestable codificada en un plasmidi i que reb el nom de **toxina EAST (ST EnteroAgregativa)**. També produeixen **hemolisina**, semblant a l'hemolisina de les soques d'*E. coli* involucrades en les infeccions del tracte urinari. No s'ha provat, però, el paper de la toxina ni de l'hemolisina en la virulència de les EAggEC (Todar, 2002).

1.1.2. Gènere *Salmonella*

Els membres del gènere *Salmonella* són bacils gramnegatius, la majoria mòbils, que pertanyen també a la gran família d'enterobactèries. Els membres d'aquest gènere s'identifiquen en el laboratori per les seves característiques bioquímiques: no fermenten la lactosa, produeixen sulfur d'hidrogen a partir de tiosulfat i diferents gasos al fermentar els sucres (Ingraham i Ingraham, 1998). Aquest gènere està integrat per bacteries altament relacionades les unes amb les altres tant fenotípica com genotípicament, així com a nivell de seqüència de DNA (Le Minor, 2002). Les espècies del gènere *Salmonella* s'assemblen força a les del gènere *Escherichia*. Els dos gèneres tenen prop del 45 al 50% de les seves seqüències de DNA en comú, encara que les seqüències relacionades contenen un 13% de bases no aparellades (Madigan *et al.*, 2000). A nivell del DNA també es relacionen de forma bastant estreta amb els gèneres *Shigella* i *Citrobacter* (Le Minor, 2002).

Les soques de *Salmonella* estan àmpliament distribuïdes a la natura i el seu principal hàbitat és el **tracte intestinal dels humans i els animals**, tant de sang calenta com freda (mamífers, ocells i rèptils), on hi actuen, al

contrari que els membres del gènere *Escherichia*, principalment com a **patògens** (Ingraham i Ingraham, 1998). Les diferents serovarietats de *Salmonella* poden trobar-se predominantment en un hoste particular, poden ser ubiqües o poden tenir un hàbitat desconegut (Le Minor, 2002). S'eliminen per la fempta i es disseminen pel medi ambient, on poden sobreviure durant un temps variable, segons les condicions de temperatura, pH i humitat (Madigan *et al.*, 2000). Les serovarietats de *Salmonella* associades a humans solen ser responsables de greus malalties i sovint es troben en sang. Typhi, Paratyphi A i Sandai són serovarietats estrictament humanes i la salmonel·losi (gastroenteritis), en aquests casos, es transmet a través de la contaminació fecal d'aliments. Gallinarum, Abortusovis i Typhisuis són serovarietats de *Salmonella* associades, respectivament, a ocells, ovins i porcs. Aquestes serovarietats "adaptades a l'hoste" no poden créixer en medi mínim sense determinats factors de creixement, al contrari que les serovarietats de *Salmonella* ubiqües. Aquestes últimes, no "adaptades a l'hoste", com per exemple Typhimurium, causen símptomes clínics molt diversos, des d'una infecció asimptomàtica fins a greus síndromes en infants i animals, com ratolins, altament susceptibles. En els humans adults, les serovarietats de *Salmonella* ubiqües són majoritàriament responsables de les infeccions tòxiques associades a aliments (Le Minor, 2002).

1.1.2.1. Patogènia de *Salmonella*

A. *Salmonella* en els humans

Les característiques de l'acció patogènica de *Salmonella* depenen de diversos factors com són la serovarietat, la soca en concret que produeix la infecció, la dosi infectiva, la natura de l'aliment contaminat i l'estat de l'hoste. Algunes serovarietats són altament patògenes per als humans i hi ha algunes serovarietats molt rares de potencial patogènic encara desconegut. Soques de la mateixa serovarietat poden ser també diferents en la seva patogenicitat. En experiments amb voluntaris humans s'ha demostrat que es necessita una dosi oral d'unes 10^5 cèl·lules de la serovarietat Typhi per a

produir febre tifoidea en un 50% dels voluntaris, mentre que cal una dosi oral d'aproximadament 10^9 cèl·lules de la serovarietat Typhimurium per a donar lloc als símptomes d'una infecció tòxica. Els infants, els pacients immunodeprimits i aquells afectats d'una malaltia sanguínia són més susceptibles d'una infecció per *Salmonella* que els adults sans (Le Minor, 2002).

Les infeccions tòxiques produïdes per *Salmonella* i associades a aliments contaminats són causades, com s'ha comentat anteriorment, per serovarietats ubiques de *Salmonella*, com per exemple la serovarietat Typhimurium. Unes 12 hores després de la ingesta de l'aliment contaminat amb un nombre suficient de cèl·lules de *Salmonella* apareixen els símptomes, diarrea, vòmits i febre, que duren de 2 a 5 dies. Els pacients solen curar-se espontàniament, sense tractament. Aquestes infeccions per *Salmonella* poden associar-se amb tot tipus d'aliments. La contaminació de la carn (bovins, porcs, cabres, pollastres,...) pot originar-se a partir d'una salmonel·losi en l'animal, però la major part de les vegades aquesta contaminació prové del contingut intestinal que ha entrat en contacte amb la carn durant el sacrifici de l'animal, el rentat o el transport (Le Minor, 2002). S'ha comprovat que animals com els porcs i els bovins solen contenir salmonel·les i que les aus de corral constitueixen un dels principals reservoris d'aquests microorganismes (Lindquist, 2001). La contaminació superficial de la carn sol tenir poques conseqüències si es fa una adequada cocció. Quan la contaminació és profunda, però, les bacteries poden multiplicar-se a l'interior d'aquesta carn contaminada i, si la cocció és superficial, la ingesta d'aquest aliment altament contaminat donarà lloc a una infecció tòxica per *Salmonella*. Aquesta infecció pot ser produïda també per la ingesta de qualsevol aliment en el que es permeti la multiplicació de *Salmonella*, però sobretot de productes elaborats amb ous com cremes, maioneses, gelats, etc..., sent necessària la presència d'un gran nombre de cèl·lules bacterianes per a donar lloc als símptomes de la infecció. La fruita i els vegetals poden també "transportar" cèl·lules de *Salmonella* quan es contaminen amb adobs d'origen fecal o quan es renten amb aigües contaminades (Le Minor, 2002).

Per tal de prevenir la infecció tòxica produïda per *Salmonella* és molt important evitar, en primer lloc, la contaminació dels aliments destinats al consum humà amb l'aplicació d'adequades mesures higièniques, així com impedir la multiplicació de les cèl·lules *Salmonella* en els aliments, conservant-los constantment a 4°C, i pasteuritzar o esterilitzar els aliments quan sigui possible (Le Minor, 2002).

B. *Salmonella* en els animals

Les infeccions produïdes per *Salmonella* en els animals de granja són responsables d'importants pèrdues econòmiques. La industrialització de la producció animal, especialment de pollastres i galls d'indi, en la que es manté un gran nombre d'animals en un espai limitat, dona lloc a una ràpida propagació d'aquestes infeccions entre els animals. La contaminació de la carn destinada al consum humà té lloc sovint en els escorxadors o en els banys d'aigua o aparells utilitzats per a desplomar les aus de corral. El rebuig de la carn contaminada per part dels possibles compradors ocasiona aquestes grans pèrdues econòmiques (Le Minor, 2002).

Les salmonel·losis animals també poden provenir d'una contaminació a través dels aliments ingerits per aquests animals o per una penetració de salmonel·les transportades per l'aire a través de l'aparell respiratori. Els ingredients proteics de carn o peix, utilitzats en l'elaboració de l'aliment dels animals, poden estar contaminats amb *Salmonella*. Probablement aquesta contaminació s'origina per la falta de mesures higièniques en els escorxadors o en les indústries on es fabriquen aquests suplementes proteics (Le Minor, 2002).

C. *Salmonella* en el medi ambient

Les salmonel·les poden disseminar-se pel medi ambient com l'aigua, el sòl, vegetals que després seran utilitzats com a aliment, etc, a partir dels

productes d'excreció dels humans o dels animals, tant salvatges com domèstics. Els humans i els animals poden excretar cèl·lules de *Salmonella* tant quan estan clínicament malalts com després d'haver patit una salmonel·losi, si es mantenen com a portadors del bacteri. Les salmonel·les no es multipliquen significativament en el medi ambient, fóra del tracte intestinal, però poden sobreviure durant diverses setmanes a l'aigua i durant diversos anys al sòl si les condicions de temperatura, d'humitat i de pH els són favorables (Le Minor, 2002).

1.1.2.2. Estructura antigènica

Com totes les enterobactèries, el gènere *Salmonella* posseeix tres tipus principals d'antígens amb aplicacions diagnòstiques o identificatives: antígens somàtics o de paret cel·lular, antígens de superfície o capsulars i antígens flagel·lars (Le Minor, 2002).

A. Antígens somàtics ("O") o de paret cel·lular

Els antígens somàtics ("O") o de paret cel·lular són termoestables i resistent a alcohols. S'ha identificat un gran nombre de factors antigènics, molts dels quals són o han sigut utilitzats per a la identificació serològica. L'especificitat antigènica recau en el lipopolisacàrid. Aquest lipopolisacàrid es pot dividir en tres parts: el lípid A, la part central o "cor" i les cadenes de polisacàrid específiques. L'especificitat antigènica dels antígens "O" s'associa amb l'estructura de les unitats repetitives d'aquesta cadena de polisacàrid (Le Minor, 2002); és a dir, els epitops antigènics "O" estan determinats pel tipus, la disposició i la forma dels residus glucídics en unitats oligosacàrides repetitives, dels quals s'han identificat més de 50 classes principals diferents. La variació en aquests antígens "O" està normalment determinada per un locus gènic anomenat *rfb*, localitzat en el cromosoma de *Salmonella*. Al menys un tipus, però, l'O54, està determinat per gens *rfb* localitzats en un plasmidi. Alguns serotips "O" estan subjectes a conversió fàgica, de manera

que els factors antigènics existents són modificats o, fins i tot, s'expressen factors antigènics addicionals com a conseqüència de la infecció amb determinats bacteriòfags.

B. Antígens de superfície (capsulars)

En algunes serovarietats de *Salmonella* poden trobar-se antígens de superfície, comunament observats en altres gèneres de bactèries entèriques, com per exemple *E. coli* i *Klebsiella*. Els antígens de superfície de *Salmonella* poden emmascarar els antígens "O" i fer que la bactèria no aglutini amb l'antisèrum "O" corresponent. Un dels antígens de superfície específics més conegut és l'antigen "Vi". El tractament a 100°C generalment solubilitza aquest antigen "Vi" i les bactèries tractades amb calor poden llavors aglutinar amb l'antisèrum "O" apropiat. Aquest antigen "Vi" es troba tan sols en tres serovarietats de *Salmonella*: Typhi, Paratyphi C i Dublin. Les soques pertanyents a aquestes serovarietats poden presentar o no l'antigen "Vi". La presència d'aquests antígens "Vi" està controlada per dos gens, *viaA* i *viaB* (Le Minor, 2002).

C. Antígens flagel·lars ("H")

Els antígens flagel·lars són proteïnes termolàbils anomenades flagelina i que constitueixen el filament del flagel. Unes poques serovarietats de *Salmonella*, per exemple Enteritidis i Typhi, produeixen flagels que sempre tenen la mateixa especificitat antigènica; l'antigen "H", en aquests casos, s'anomena monofàsic. Dues serovarietats, Gallinarum i Pullorum, no tenen flagels. La majoria de les serovarietats de *Salmonella*, però, poden produir alternativament flagels amb dos especificitats antigèniques "H" diferents; l'antigen "H", en aquests casos, s'anomena difàsic (antígens "H1" i "H2" de fase 1 i 2, respectivament) (Le Minor, 2002). En aquests casos, s'expressen alternativament els productes de dos gens, *fliC* i *fljB*, que codifiquen la producció de flagelines amb característiques antigèniques

diferents. Per exemple, les cèl·lules de la serovarietat Typhimurium poden sintetitzar flagels tant amb l'**antigen i** com amb l'**antigen 1,2**. Un clon derivat d'una cèl·lula bacteriana amb l'**antigen "H1"** i estarà format per bacteries amb l'**antigen flagel·lar i (antigen "H1")**. De totes maneres, amb una freqüència de 10^{-3} - 10^{-5} , apareixeran cèl·lules bacterianes amb l'**antigen flagel·lar 1,2 (antigen "H2")**. Cèl·lules de la serovarietat Typhimurium sembrades en el centre d'una placa amb medi d'agar semisòlid podran créixer i desplaçar-se ràpidament a través d'aquest medi, des del centre cap a la part més exterior de la placa. Si en aquest medi s'afegeix, en el centre de la placa i previ a la inoculació, un antisèrum específic "anti-i", s'inhibirà la mobilitat de les cèl·lules bacterianes amb l'antigen flagel·lar i, quedant aquestes cèl·lules immobilitzades en el centre de la placa. Les cèl·lules bacterianes amb l'altre fase flagel·lar (1,2) sí que podran avançar pel medi. L'experiment contrari, l'addició d'un antisèrum específic "anti-1,2", donarà lloc a la immobilització de les bacteries amb l'antigen 1,2 i a la difusió de les bacteries amb l'altre fase flagel·lar (i). Aquest mètode és àmpliament utilitzat per a la completa identificació de les serovarietats de *Salmonella* (Le Minor, 2002).

1.1.2.3. Classificació i nomenclatura

Com s'ha comentat anteriorment, el gènere *Salmonella* està constituït per microorganismes gramnegatius, que pertanyen a la família *Enterobacteriaceae* i a la tribu *Salmonelleae*. **Genèticament** s'han definit **dues espècies** dins el gènere *Salmonella*: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Aquestes dues espècies de *Salmonella* poden també diferenciar-se clarament a **nivell bioquímic**. Dins l'espècie *S. enterica* s'han definit, en funció d'**estudis bioquímics**, **sis subespècies** diferents:

subespècie I	<i>enterica</i>
subespècie II	<i>salamae</i>
subespècie IIIa	<i>arizonae</i>
subespècie IIIb	<i>diarizonae</i>

subespècie IV	<i>houtenae</i>
subespècie VI	<i>indica</i>

La subespècie V estava constituïda pels membres de l'espècie *S. bongori*, que com queden una mica més allunyats, estan menys relacionats amb els altres, s'han considerat com una espècie diferent (Le Minor, 2002).

S'ha comprovat també **genèticament** l'existència d'una clara diferenciació entre les sis subespècies de *S. enterica* i, a més a més, aquests estudis genètics han permès la definició d'una setena subespècie (VII sense nom) que seria, en un principi, un cluster genètic aïllat dins la subespècie IV (M. Saco, comunicació personal).

Cada **subespècie**, per la seva banda, conté diverses **serovarietats** definides per una **fórmula antigènica** característica. Moltes serovarietats, bàsicament les de la subespècie I, que representen més del 99,5% de les soques de *Salmonella* aïllades d'humans i altres animals de sang calenta, segueixen sent conegudes i anomenades pels seus noms antics, que s'utilitzen per conveniència com a noms d'espècie (per exemple, *Salmonella typhimurium* en lloc de *S. enterica* ser. Typhimurium). De la mateixa manera, en aquest treball s'utilitzarà, per raons pràctiques i a partir d'aquest moment, *S. typhimurium* per referir-nos a *S. enterica* ser. Typhimurium. Actualment es coneixen més de 2000 **serovarietats** diferents, la majoria de les quals pertanyen a la subespècie I (Lindquist, 2001; Le Minor, 2002).

En l'apartat anterior s'ha explicat detalladament l'**estructura antigènica** dels membres del gènere *Salmonella*. El llistat complet de totes les **fórmules antigèniques** de les diferents **serovarietats** del gènere *Salmonella* està recopilat en l'"**Esquema de Kauffmann-White**". Per al **serotipat** de *Salmonella*, els antígens considerats primàriament en aquest esquema antigènic de Kauffmann-White són els del component polisacàrid del lipopolisacàrid de la superfície cel·lular (antígens "O") i les proteïnes de flagelina que constitueixen els filaments dels flagels de fase 1 i de fase 2 (antígens "H1" i "H2", respectivament). A cadascuna de les diferents

combinacions d'antígens "O", "H1" i "H2" se la reconeix formalment com a una **serovarietat** individual. S'ha de tenir en compte que es poden trobar soques amb combinacions iguals de serotip (**fórmules antigèniques**) però com pertanyen a subespècies diferents són considerades com a serovarietats diferents (M. Saco, comunicació personal). Com a exemple, la **fórmula antigènica** per a la serovarietat Typhimurium és la següent:

ser Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2

antígens somàtics "O": 1, 4, 5, 12

antígens flagel·lars "H"

de fase 1: i

de fase 2: 1,2

Els nombres subratllats indiquen un determinant antigènic degut a la presència d'un bacteriòfag i són variables, és a dir, algunes soques els presenten i d'altres no, en funció de si tenen o no el bacteriòfag integrat en el seu genoma. Els nombres entre corxets indiquen un determinant antigènic variable, és a dir, algunes soques el presenten i d'altres no.

1.2. ESTRUCTURA DEL DNA

El DNA, dins les cèl·lules tant eucariotes com procariotes, no es troba en forma lineal sinó que està "compactat" d'alguna manera per tal d'ocupar el menor espai possible. En el procés de "compactació" del DNA es poden distingir diferents estructures, relacionada cadascuna amb un estat cada vegada més condensat del DNA. L'**estructura primària** d'un àcid nucleic és la seva estructura covalent i la seva seqüència de nucleòtids. Qualsevol estructura regular i estable adoptada per alguns o tots els nucleòtids d'aquest àcid nucleic pot ser considerada com a **estructura secundària** i, en general, es denomina **estructura terciària** al plegament complex de grans cromosomes en el nucleòide bacterià o en la cromatina eucariota (Lehninger

et al., 1993). A finals de la dècada dels 40, Chargaff va proposar les lleis que van permetre deduir l'estructura tridimensional del DNA i entendre com la informació genètica està codificada en el DNA i es traspasa d'una generació a la següent:

- La composició de bases del DNA varia d'una espècie a una altra. (Les quatre bases dels nucleòtids del DNA estan presents en relacions diferents en els DNA d'organismes diferents, i hi ha una estreta relació entre les quantitats relatives de certes bases).
- Les mostres de DNA aïllades a partir de teixits diferents de la mateixa espècie tenen la mateixa composició de bases.
- La composició de bases del DNA d'una espècie determinada no varia amb l'edat de l'organisme, ni amb el seu estat nutricional, ni amb les variacions ambientals.
- En tots els DNA, independentment de l'espècie, el número de residus d'adenina és igual al de residus de timina (és a dir, $A=T$), i el número de residus de guanina és igual al de residus de citosina (és a dir, $G=C$). A partir d'aquestes relacions, es dedueix que el número de residus de purina és igual al de residus de pirimidina; és a dir, $A+G = T+C$.

En 1953, Watson i Crick van descriure el DNA com una **dobla hèlix**: dues cadenes helicoidals de DNA enrotllades al voltant d'un mateix eix que formen una doble hèlix dextrògira. Els esquelets hidrofílics formats per unitats alternes de desoxiriboses i grups fosfat carregats negativament es troben a l'exterior d'aquesta doble hèlix, en contacte amb l'aigua circumdant. Les bases puríniques i pirimidíniques d'ambdues cadenes estan apilades a l'interior de la doble hèlix, amb les seves estructures en anell hidrofòbiques i pràcticament planes situades a molt curta distància les unes de les altres i en posició perpendicular en relació a l'eix longitudinal de l'hèlix. Cada base d'una cadena està aparellada amb una base de l'altra cadena ($G=C$ i $A=T$), i

ambdues bases estan situades en el mateix pla a través d'enllaços d'hidrogen. Les dues cadenes són antiparal·leles i complementàries (Lehninger *et al.*, 1993).

L'estructura lineal del DNA, en doble hèlix, codifica la informació genètica, permet la mutació i la recombinació i serveix com a motlle per a que tingui lloc la replicació semiconservativa i la transcripció. La configuració de la molècula de DNA, però, comporta certes dificultats (Hooper i Wolfson, 1993a):

- Un problema sorgeix de l'estat altament condensat del DNA dins de la cèl·lula (Hooper i Wolfson, 1993a). Per exemple, el DNA d'una cèl·lula d'*E. coli* és una única molècula de DNA circular de doble cadena tancada covalentment, que conté uns $4,7 \times 10^6$ parells de bases i té una longitud de contorn d'aproximadament 1,7 mm, unes 850 vegades la longitud d'una cèl·lula d'*E. coli*. Per tant, aquest DNA ha d'estar altament compactat per a poder cabre dins de la cèl·lula. Això porta implícit un alt grau d'organització estructural. De totes maneres, no es tracta únicament de plegar el DNA en un espai limitat. L'empaquetament ha de permetre l'accés a la informació continguda en el DNA i fer possibles, per exemple, processos com la replicació i la transcripció (Lehninger *et al.*, 1993).

- Un segon problema és degut a la natura helicoidal del dúplex de DNA. Amb cada volta de l'hèlix, que té lloc aproximadament cada 10,4 pb, dues cadenes senzilles són enrotllades una al voltant de l'altra. En el cromosoma d'*E. coli*, que conté més de 4 milions de pb, les cadenes estan entrellaçades unes 400.000 vegades, el que genera un **nombre d'enllaç** de 400.000 (Hooper i Wolfson, 1993a). El **nombre d'enllaç** d'una molècula de DNA específica representa el nombre de voltes de l'hèlix d'un DNA circular tancat, en absència de qualsevol tipus de superenrotllament. És una propietat topològica, ja que no varia amb les torsions o deformacions que pugui sofrir el DNA de doble cadena, sempre que les dues cadenes es mantinguin intactes (Lehninger *et al.*, 1993). Les dues cadenes de DNA d'*E. coli* han de desenrotllar-se, doncs, 400.000 vegades per a permetre la

replicació semiconservativa. En 1963, John Cairns va reconèixer la magnitud del problema de desenrotllament quan va ser el primer en visualitzar el cromosoma replicatiu d'*E. coli* i va deduir que era necessària una “peça giratòria” per a permetre el desenrotllament del DNA en doble hèlix durant la separació de les cadenes (Hooper i Wolfson, 1993a).

- Una tercera situació especial es dona en els procariotes, ja que en DNA aïllat de bacteris s'ha vist que hi ha **superenrotllaments negatius**. Aquests superenrotllaments negatius donen lloc a un DNA bacterià que conté escassament menys d'un gir helicoidal per cada 10,4 pb i, per tant, té un nombre d'enllaç menor que el d'un DNA eucariota. Això facilita la separació de les cadenes requerida per a la replicació del DNA i la iniciació de la transcripció. Els superenrotllaments negatius, però, són energèticament desfavorables sent necessari, per tant, un procés de consum d'energia dins la cèl·lula bacteriana per a la seva generació (Hooper i Wolfson, 1993a).

- S'ha descrit un quart problema en la topologia del DNA que té lloc durant la transcripció de certs gens per la RNA polimerasa. En aquells fragments de DNA que es troben associats a la membrana, el pas de la RNA polimerasa al llarg de la plantilla de DNA helicoidal genera superenrotllaments positius del DNA davant i superenrotllaments negatius del DNA darrere l'enzim. Si no es resolen, l'acumulació de superenrotllaments de polaritat oposada en aquests dominis podria, probablement, limitar l'eficiència de la transcripció (Hooper i Wolfson, 1993a).

Tots aquests problemes es resolen per un o altre membre de la classe d'enzims anomenats **topoisomereses**.

1.3. TOPOISOMERASES

El superenrotllament del DNA és un procés regulat de forma precisa en totes els cèl·lules i que té influència sobre molts aspectes del metabolisme del DNA. No resulta sorprenent el fet que existeixin enzims cel·lulars amb l'única missió de desenrotllar el DNA, de relaxar-lo, o ambdues coses a la vegada. Aquests enzims que augmenten o disminueixen el grau d'enrotllament del DNA reben el nom de **topoisomerases**, i el seu efecte és el de fer variar el nombre d'enllaç, alterant el nombre de vegades que una de les cadenes d'un dúplex de DNA s'enrotlla al voltant de la seva cadena complementària. Aquests enzims juguen un paper especialment important en processos tals com la transcripció i l'empaquetament del DNA. Les molècules de DNA que difereixen només en el nombre d'enllaç s'anomenen isòmers topològics o topoisòmers (Hooper i Wolfson, 1993a; Lehninger *et al.*, 1993). Per al DNA de procariotes, els problemes d'enrotllament, desenrotllament de la cadena i superenrotllament estan solucionats, al menys en part, per topoisomerases (Hooper i Wolfson, 1993a).

Hi ha dues classes principals de **topoisomerases**. Les **topoisomerases del tipus 1**, representades per les **topoisomerases I i III** en procariotes, actuen produint un tall transitori en una de les cadenes de DNA al hidrolitzar l'enllaç fosfodiéster entre dos nucleòtids consecutius, fent rotar un dels extrems al voltant de la cadena intacta i tornant a unir els extrems abans separats. Aquests enzims canvien el nombre d'enllaç en increments de 1. Solen actuar relaxant el DNA mitjançant l'eliminació de superenrotllaments negatius. Les **topoisomerases del tipus 2**, representades per la **topoisomerasa II** o **DNA girasa** i la **topoisomerasa IV** en procariotes, tallen transitòriament ambdues cadenes de la doble hèlix i passen un segment de doble hèlix a través d'aquesta ruptura, fent variar el nombre d'enllaç en increments de 2. La DNA girasa, per exemple, introdueix superenrotllaments negatius, utilitzant per a tal fi l'energia de l'ATP. La densitat supelhelicoidal del DNA bacterià està equilibrada com a

conseqüència de la regulació de les activitats netes de les topoisomereses I i II (Hooper i Wolfson, 1993a; Lehninger *et al.*, 1993).

S'han descrit també unes "topoisomereses especials", representades per enzims que catalitzen la transposició o la integració de certs transposons i l'escissió del DNA de bacteriòfags del cromosoma bacterià (Hooper i Wolfson, 1993a).

1.3.1. DNA girasa

La **DNA girasa** d'*E.coli* és un enzim essencial per a la cèl·lula, responsable del superenrotllament negatiu del DNA i que, conjuntament amb la topoisomerasa I, s'encarrega de mantenir la correcta superhelicitat del DNA dins la cèl·lula, ja que la DNA girasa introdueix superenrotllaments negatius mentre que la topoisomerasa I n'elimina. És un enzim format per 4 subunitats. L'holenzim, de 374 KDa, conté dues subunitats A (GyrA) i dues subunitats B (GyrB). La subunitat GyrA està codificada pel gen *gyrA* i conté 875 aminoàcids (97 KDa). La subunitat GyrB, de 804 aminoàcids (90 KDa), està codificada pel gen *gyrB*. L'enzim funcional requereix les dues subunitats (A₂B₂), si bé presenta diferents dominis que participen en diferents funcions.

La subunitat GyrA és responsable del trencament de la cadena de DNA i de la unió amb un residu tirosina a la posició 122 (Tyr-122), formant una unió transitòria fosfo-tirosina amb la cadena de DNA tallada. La subunitat GyrB és responsable de l'activitat ATPasa de l'enzim.

Estudis en que s'han utilitzat fragments de la subunitat GyrA i de la subunitat GyrB han suggerit la presència de subdominis funcionals en aquests polipèptids. En la subunitat GyrA, la regió amino terminal (N-terminal) acomplexada amb GyrB és suficient per a mantenir una dèbil activitat de superenrotllament del DNA. L'adició de la regió carboxi terminal (C-terminal) de la subunitat GyrA millora l'eficiència de l'enzim i es pensa que estabilitza el complex. En la subunitat GyrB, la regió C-terminal

acomplexada amb GyrA manté la relaxació del DNA però no el superenrotllament o l'hidròlisi d'ATP. El domini N-terminal de la subunitat GyrB conté el lloc d'unió de l'ATP (Hooper i Wolfson, 1993a).

Les **reaccions catalitzades** per la DNA girasa en la cèl·lula bacteriana són:

- a) introducció del superenrotllament negatiu en el DNA,
- b) participació en l'inici i elongació de la replicació i, probablement, en la terminació,
- c) segregació dels cromosomes replicats,
- d) resolució de les estructures intermitges de DNA entrellaçat durant el procés de recombinació,
- e) participació en la transcripció i regulació de promotors dependents del superenrotllament del DNA,
- f) participació en els processos d'integració de certs bacteriòfags i en la transposició d'alguns transposons com el Tn5.

In vitro s'ha demostrat que aquest enzim purificat és capaç d'introduir superenrotllaments negatius en el DNA, formar i resoldre molècules de DNA circular covalentment tancat (cccDNA) entrellaçades, i formar i eliminar nusos en el dúplex de DNA. Totes aquestes reaccions són **dependents d'ATP** i requereixen un catió divalent, òptimament magnesi, encara que pot ser substituït per manganès. A més, *in vitro*, la DNA girasa també pot eliminar superenrotllaments positius en presència d'una anàleg no hidrolitzable de l'ATP i els negatius en absència d'ATP (Hooper i Wolfson, 1993a; Reece i Maxwell, 1991).

Les reaccions de superenrotllament catalitzades per la DNA girasa impliquen diferents passos. En primer lloc, l'enzim s'uneix a DNA de doble cadena (dsDNA) superenrotllat positivament, essent necessària una regió de 120 a 150 parells de bases per a que es produeixi una correcta interacció entre l'enzim i el DNA. Després d'unir-se al DNA, l'enzim produeix talls asimètrics en ambdues cadenes separats per 4 parells de bases. Es pensa

que els llocs de tall són regions específiques del DNA, havent-se proposat que podrien ser una família de seqüències palindròmiques extragèniques i repetitives, localitzades en el cromosoma d'*Escherichia coli* i de *Salmonella typhimurium*, i s'ha suggerit una seqüència consens a l'analitzar els llocs de tall d'aquest enzim en el plàsmid pBR322. Després dels talls, es formen transitòriament enllaços fosfo-tirosina entre la Tyr-122 de cadascuna de les subunitats A de la DNA girasa i els grups fosfat 5' lliures de les cadenes de DNA tallades. Al mateix temps, una molècula d'ATP s'uneix a cada subunitat B i es produeix un canvi conformacional de l'enzim. Es creu que això permet la translocació del segment de DNA a través de la ruptura, amb el que s'inverteix el sentit del superenrotllament. És a dir, el dúplex de DNA passa a través del lloc de trencament, i també presumiblement de l'estructura proteica, el que fa que el nombre d'enllaç es redueixi en 2. Finalment, la DNA girasa segella la ruptura que havia introduït en el DNA i s'allibera l'enzim, requerint-se la hidròlisi de les dues molècules d'ATP a ADP + P_i per a posteriors cicles catalítics (Hooper i Wolfson, 1993a; Reece i Maxwell, 1991). Encara que no està gaire clar en quin moment es requereix aquesta energia, sí que se sap que la hidròlisi de l'ATP està catalitzada per les subunitats B de l'enzim.

1.3.2. Topoisomerasa IV

Com la DNA girasa, la topoisomerasa IV bacteriana és una topoisomerasa del tipus 2 i és també tetramèrica (A₂B₂), és a dir, formada per 4 subunitats: dues subunitats A (ParC) i dues subunitats B (ParE). La subunitat ParC, de 75 KDa, està codificada pel gen *parC* i la subunitat ParE, de 70 KDa, pel gen *parE*. Les seqüències dels gens *gyrA* i *parC* són altament concordants, a l'igual que les seqüències dels gens *gyrB* i *parE*, presentant una elevada identitat les seves seqüències aminoacídiques. L'homologia entre les subunitats A dels dos enzims és molt més gran en la regió amino terminal (N-terminal), on hi ha una regió, que es descriurà més endavant, coneguda amb el nom de "Quinolone-Resistance Determining Region" (QRDR) o "Regió Determinant de Resistència a les Quinolones".

Al contrari del que passa amb la DNA girasa, les funcions i els mecanismes d'acció de la topoisomerasa IV no estan tan clars. Sembla ser, però, que la funció principal d'aquest enzim seria la de permetre una correcta segregació dels cromosomes un cop finalitzada la replicació, per facilitar així que cadascun dels bacteris resultants de la bipartició contingui el seu material genètic corresponent (Drlica i Zhao, 1997). Les subunitats d'aquest enzim reben el nom de "Par" per "*partitioning*" (Gootz i Brighty, 1996). La topoisomerasa IV també tindria un paper particular en la segregació de les molècules de plasmidis durant la replicació dels mateixos. *In vitro*, catalitza la relaxació ATP-dependent de DNA_s superenrotllats negativa i positivament i resol dúplex de DNA no tallats. Al contrari de la DNA girasa, però, no presenta activitat de superenrotllament del DNA (Hooper i Wolfson, 1993a).

1.4. QUINOLONES

Es poden definir genèricament les **quinolones** com un conjunt de compostos antimicrobians d'acció bactericida, d'ampli espectre, obtinguts per síntesi química i anàlegs a l'àcid nalidíxic. Aquest grup de compostos rep també altres noms com 4-quinolones, carboxiquinolones o àcids quinolona carboxílics. Des de l'obtenció de la primera quinolona, l'àcid nalidíxic (Leshner *et al.*, 1962), fins als nostres dies s'han obtingut i descrit, en base a modificacions estructurals d'aquesta primera molècula, un gran nombre de compostos que pertanyen a aquesta família química, i s'ha arribat ja a una quarta generació de molècules.

1.4.1. Estructura

El nucli central de l'estructura de les molècules de **quinolona** és un anell 4-oxo-1,4-dihidroquinoleïna (Figura 1.1). La mínima estructura química que posseeix activitat farmacològica (o **farmacòfor**), i que és comú a totes les molècules de quinolona, és en un anell piridona, que posseeix un àcid

carboxílic com a substituent en la posició 3. Aquesta unitat mínima per si mateixa presenta baixa potència i especificitat. L'altre part de la molècula (o **auxofarmacòfor**) és, generalment, un anell aromàtic amb diferents substituents i és la que confereix a les quinolones les seves característiques farmacològiques i farmacocinètiques, permetent una unió més forta amb el receptor, una major selectivitat, una major absorció, distribució, metabolisme, excreció, una major solubilitat, etc. Els nombrosos estudis realitzats sobre la relació entre l'estructura i l'activitat d'aquests compostos han demostrat que el N-1 de l'anell piridona no pot ser reemplaçat, encara que els grups units a ell poden variar substancialment, el C-2 admet molt poques variacions, el grup carboxílic del C-3 només pot ser substituït per un anell tiazolidona fusionat amb el C-2, mentre que no hi ha masses dades sobre l'efecte de variacions en el C-4. Totes les altres posicions de les molècules de quinolona, però, admeten variacions bastant grans (Mitscher *et al.*, 1993).

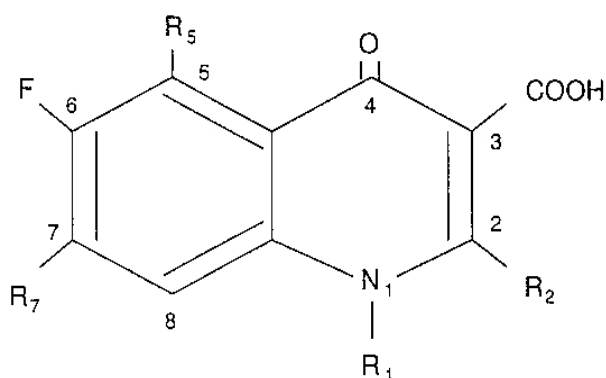


Figura 1.1. Estructura de la molècula de quinolona.

En termes generals, s'ha considerat que la presència dels **radicals ceto i carboxil**, en les posicions 4 i 3 de la molècula, respectivament, és imprescindible per a l'activitat bactericida de les quinolones. Això significa que la mínima alteració en alguna d'aquestes dues posicions provoca un important descens o una falta total de l'activitat. Es creu que la necessitat

d'aquests radicals es basa en que tenen un paper important en la interacció de les quinolones amb les seves dianes i s'ha proposat que fonamentalment podrien estar implicats en la formació de ponts d'hidrogen o de ponts via Mg^{2+} amb el DNA (Shen *et al.*, 1989; Shen, 1993; Maxwell, 1992; Palumbo *et al.*, 1993). També s'han implicat en altres processos, com per exemple en l'entrada de les quinolones al citoplasma bacterià, ja que podrien interactuar amb els components de la membrana externa com a agents quelants i facilitar així la seva entrada (Chapman i Georgopapadaku, 1988).

Des de la síntesi de l'àcid nalidíxic, en 1962, s'ha anat modificant aquesta estructura per obtenir noves quinolones cada vegada més efectives arribant, com ja s'ha comentat, a una quarta generació de molècules. A la figura 1.2 hi ha representada l'estructura química d'algunes d'aquestes quinolones. El fet més important que s'hauria de destacar en el desenvolupament de les noves molècules és que l'estructura de totes les quinolones ha incorporat, des de 1978, un **àtom de fluor unit al carboni 6** de la seva molècula. Així, tots els compostos amb l'àtom **fluor**, coneguts com a **fluoroquinolones**, presenten un elevat augment de l'activitat antimicrobiana respecte a aquelles molècules que careixen d'aquest àtom o que presenten altres substituents en aquesta posició (Mitscher *et al.*, 1993). Això va suposar el gran salt qualitatiu de les quinolones, ja que van passar d'utilitzar-se únicament per al tractament d'infeccions urinàries a ser un dels agents antibacterians d'ampli espectre més utilitzats. La presència de l'àtom de fluor millora considerablement les característiques de les quinolones, donant lloc a una inhibició fins a 10 vegades superior de l'activitat de la DNA girasa i a uns valors de concentracions mínimes inhibidores fins a 100 vegades inferiors respecte als de les altres quinolones (Domagala, 1994). La presència d'aquest àtom de fluor no facilita tan sols la penetració de les molècules al citoplasma bacterià, sinó que també facilita la seva interacció amb les dianes, pel que es millora significativament l'activitat bactericida d'aquestes molècules fluorades (Chu i Fernandes, 1989).

Les característiques de cada quinolona en particular venen determinades pels radicals lligats a les posicions restants. La diferència

estructural entre les **fluoroquinolones** està basada en els canvis en les posicions 1, 5, 7 i 8 de la molècula. Això explica la diferent activitat, vida mitja i toxicitat dels diferents components de la família i ha portat a la classificació de les quinolones en primera, segona, tercera i quarta generació (Mitscher *et al.*, 1993; Gootz i Brighty, 1996).

Variacions en el N-1.

Els radicals units a l'àtom de nitrogen en posició 1 tenen efecte sobre la farmacocinètica de la molècula i, en funció del radical, la quinolona tindrà una major o menor potència. S'ha descrit un gran nombre de molècules de quinolona amb diferents substituents en la posició N-1. Els grups més habituals són l'etil, el ciclopropil i el 2,4-difluorofenil. La primera de les quinolones utilitzada a nivell clínic, l'àcid nalidíxic, presenta un grup etil en la posició N-1. La ciprofloxacina, desenvolupada uns 20 anys més tard que l'àcid nalidíxic, presenta un grup ciclopropil en aquesta posició, i es creu que aquest és el responsable de l'excel·lent activitat de la ciprofloxacina davant gramnegatius. Altres compostos com la difloxacina o la tosufloxacina presenten, com a substituent en posició N-1, un 4-fluorofenil o un 2,4-difluorofenil, respectivament. Aquests grups els confereixen una potent activitat *in vitro* i, encara que confereixen una menor potència general, presenten una activitat incrementada davant d'anaerobis. Es poden trobar altres radicals en aquesta posició, com el t-butil que confereix una potent activitat antibacteriana, sobretot davant organismes grampositius.

Variacions en el C-2.

En posició 2 és preferible la presència d'un àtom d'hidrogen, ja que es detecten problemes estèrics quan es proven substituents d'elevat pes molecular en aquesta posició.

Variacions en el C-5.

En la síntesi de les primeres quinolones, com l'àcid nalidíxic, la norfloxacin, la ciprofloxacina, etc., aquesta posició no va ser variada i aquestes molècules presenten un àtom d'hidrogen. Més endavant, es va veure que certs substituents, com un grup amino (NH_2), per exemple en l'esparfloxacina, o un grup metil (CH_3), com en la grepafloxacina, podien conferir avantatges.

Els efectes del grup amino en posició 5 depenen extraordinàriament, però, de la natura del substituent en posició N-1. Per aquelles molècules amb un grup 2,4-difluorofenil o un grup etil en posició N-1, la incorporació d'un grup amino en posició 5 provoca una disminució de l'activitat *in vitro*. En canvi, en les que contenen un grup ciclopropil en posició N-1, la presència d'un grup amino en posició 5 augmenta l'activitat davant grampositius i, fins i tot, pot augmentar la seva activitat davant gramnegatius. Aquest increment depèn també del substituent en posició 8 i s'ha vist que el més eficient és la presència d'un àtom de fluor en aquesta posició.

L'altre substituent en posició 5, també efectiu, és un grup metil. Com en el cas anterior, grups més grans com són els grups etil, formil o hidroximetil, donen lloc a una pèrdua significant de l'activitat antibacteriana. El grup metil augmenta també l'activitat *in vitro* de les molècules amb un grup ciclopropil en posició N-1 i té un efecte deleteri en aquells compostos amb grups etil o t-butil en la mateixa posició. Per aquelles molècules amb un grup 2,4-difluorofenil en posició N-1, l'efecte depèn, a més, de la natura del substituent en posició C-7. El substituent metil en posició 5 dóna lloc també a un augment de les propietats farmacocinètiques. La grepafloxacina, que presenta una més gran activitat davant grampositius que la ciprofloxacina, mostra també una major penetració dels teixits, ja que s'aconsegueixen uns nivells en el pulmó significantment més grans que amb la ciprofloxacina després de l'administració oral en ratolins.

Variacions en el C-7.

La posició 7 és considerada com una de les més importants i és la que ha sofert una variació més gran de modificacions estructurals. Els substituents que ocupen aquesta posició modifiquen de manera directa tant l'activitat i l'espectre d'acció, com la farmacocinètica de la molècula. Degut a la importància que presenta aquest radical en l'increment de l'activitat de les quinolones, alguns autors l'han implicat, conjuntament o per separat amb els radicals situats en posició 1, directament en els models d'unió entre les quinolones i les seves dianes, com a punt directe d'ancoratge i interacció entre les mateixes.

S'ha demostrat que un centre bàsic en posició C-7 és el més òptim, i s'ha vist que hi ha una certa flexibilitat en el substituent que conté aquest centre. Hi ha límits, però, en la mida que ha de tenir el substituent, encara que aquest paràmetre pot ser també una mica flexible. Segons sembla, petits canvis en el substituent en posició C-7 poden afectar significativament a la solubilitat, a la potència o a les propietats farmacocinètiques. De fet, la posició C-7 és una de les millors posicions on fer canvis per tal de millorar l'absorció, la distribució, el metabolisme i l'excreció dels compostos.

Des de que es va veure en la ciprofloxacina que un grup piperazina unit al carboni 7, en combinació amb un àtom de fluor en el carboni 6, proporcionava un ampli espectre, la majoria dels substituents que s'han anat provant en posició 7 han sigut diamines monocíclics. Normalment, els radicals que s'uneixen en aquesta posició són anells heterocíclics nitrogenats, excepte en el cas de l'àcid nalidíxic. Els grups més intensament investigats durant els anys 80, com ho demostren els compostos que es troben en el mercat, van ser la piperazina i els seus derivats alquilats. La presència d'un grup piperazina en posició 7 proporciona una major activitat davant bacteris gramnegatius. La modificació d'aquest anell heterocíclic, mitjançant la substitució per radicals alquil, també augmenta l'activitat contra bacteris grampositius, al mateix temps que allarga la vida mitja de les quinolones en sèrum. Un altre dels grups amplament utilitzats en aquesta

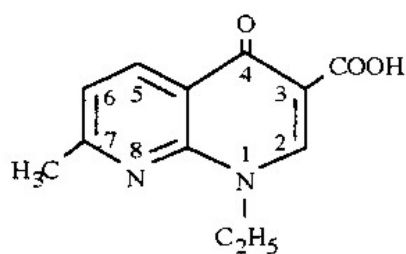
posició són les aminopirrolidines, que proporcionen una major activitat davant bacteris grampositius.

Variacions en el C-8.

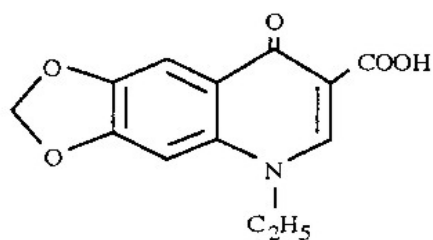
Aquesta és l'última de les posicions on és possible variar els substituents. Els radicals presents en aquesta posició afecten a la farmacocinètica i a l'activitat específica davant bacteris anaerobis. Els més comunament utilitzats són l'hidrogen, com en la ciprofloxacina, el fluor, com en la lomefloxacina i el clor, com en la clinafloxacina i altres quinolones clorades en fase experimental.

Figura 1.2. Estructura química d'algunes quinolones.

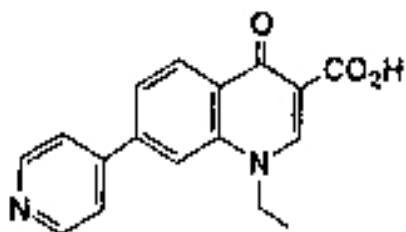
Quinolones de primera generació:



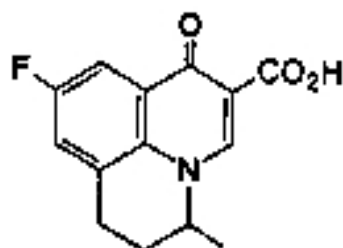
Àcid Nalidíxic



Àcid Oxolínic

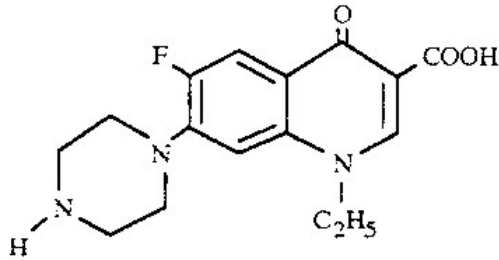


Rosoxicina

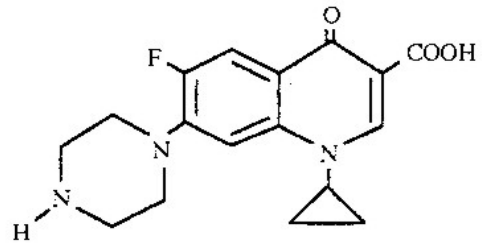


Flumequino

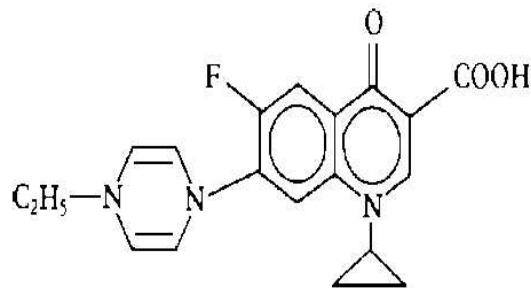
Quinolones de segona generació:



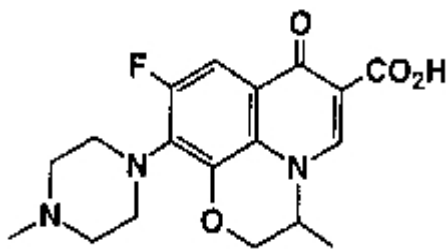
Norfloxacin



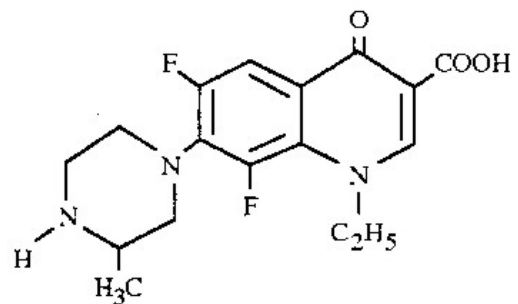
Ciprofloxacin



Enrofloxacin

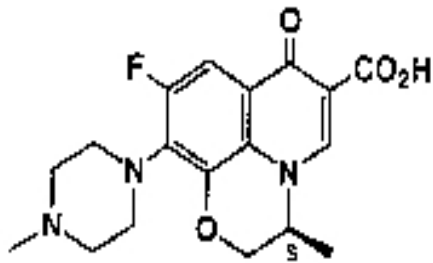


Ofloxacin

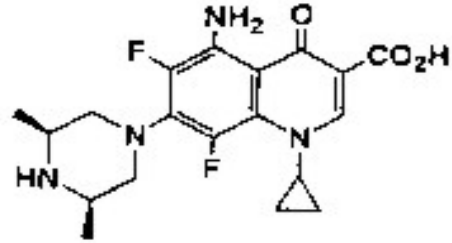


Lomefloxacin

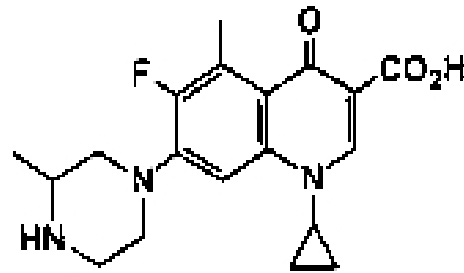
Quinolones de tercera generació:



Levofloxacin

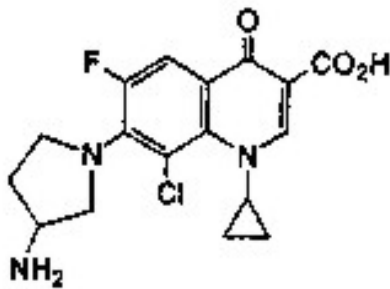


Esparfloxacin

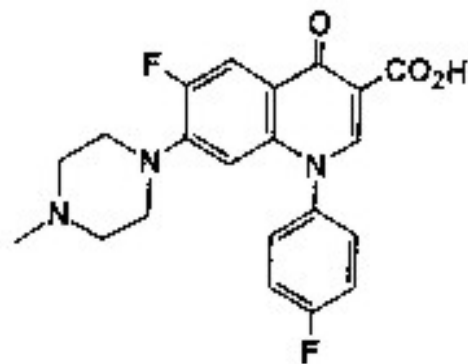


Grepafloxacin

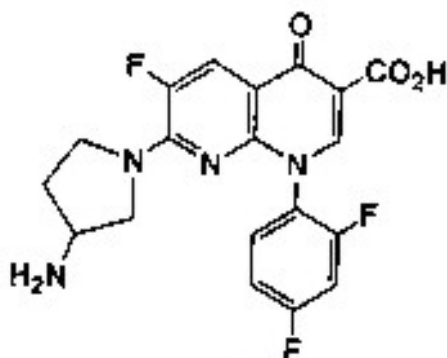
Quinolones de quarta generació:



Clinafloxacin

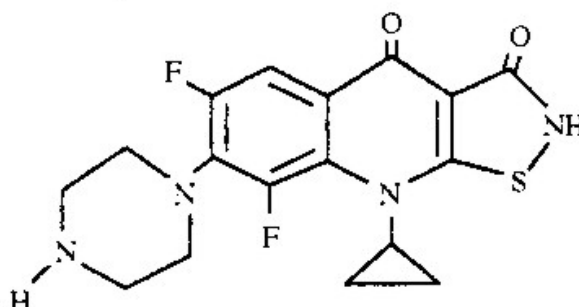


Difloxacin



Tosufloxacina

Quinolona amb activitat antitopoisomera II d'eucariotes:



A-65281

1.4.2. Classificació

Les quinolones es classifiquen en base a la seva **estructura**. La classificació en diferents generacions atent també a l'**espectre antimicrobià** i a les **aplicacions clíniques** de cada quinolona en particular (Taula 1.1) (King *et al.*, 2002; Oliphant i Green, 2002; Rivera, 2000).

Es consideren **quinolones de primera generació** aquelles que no presenten l'àtom de fluor en posició 6, és a dir, l'àcid nalidíxic i els seus primers derivats, com l'àcid oxolínic, l'àcid pipemídic o la cinoxacina. Dins aquest grup s'inclou també el flumequino que, encara que presenta un àtom de fluor en posició 6, és considerat, per alguns autors, com de primera generació degut a les seves característiques específiques. Aquestes **primeres quinolones** van tenir una aplicació clínica força limitada, ja que tan sols mostraven activitat davant algunes espècies d'enterobactèries i altres organismes gramnegatius. No actuen, però, contra *Pseudomonas aeruginosa*, ni presenten activitat davant cocs grampositius ni microorganismes anaerobis. Aquests compostos, per les seves característiques, assolixen nivells mínims en sèrum i concentracions terapèutiques només a nivell d'orina, pel que es van destinar únicament a combatre infeccions urinàries. Aquests agents requereixen una administració més freqüent que les altres quinolones i són molt més susceptibles de desenvolupar resistències bacterianes (King *et al.*, 2000).

Posteriorment es va sintetitzar una **segona generació** de quinolones, representada per molècules com la norfloxacina, la ciprofloxacina, l'ofloxacina, l'enoxacina i la lomefloxacina, amb una clara aplicació clínica. Dins aquest grup també s'inclou l'enrofloxacina, utilitzada tan sols a nivell veterinari (Otero *et al.*, 2001). La característica principal d'aquests compostos és la incorporació d'un àtom de fluor unit al carboni 6 i d'una diamina cíclica, és a dir, un substituent piperacínil o pirrolidinil, en el carboni 7 de la seva molècula. Això va suposar el gran salt qualitatiu de les quinolones que, tal com ja s'ha comentat, a partir d'aquest moment reben el nom de **fluoroquinolones**. La incorporació definitiva d'aquest àtom de fluor, a partir de 1978, va ampliar el camp d'acció de les quinolones, millorant els seus paràmetres farmacocinètics, i va proporcionar, al mateix temps, uns nivells d'activitat bactericida lleugerament superiors, pel que va ser possible la seva introducció en el tractament d'altres infeccions com infeccions sistèmiques. Aquestes molècules tenen una major activitat i presenten un ampli espectre antimicrobià amb una activitat excel·lent davant bacteris gramnegatius, així com efecte sobre grampositius i patògens atípics. Les

quinolones de segona generació són molt més actives que les primeres quinolones davant moltes espècies d'enterobactèries i també front *P. aeruginosa*, algunes bactèries grampositives com *Staphylococcus aureus* i altres patògens com micobactèries, clamídies i riquetsies. A més a més, tenen una menor toxicitat, produeixen escassos efectes secundaris i l'aparició de resistències és menys freqüent que front els primers compostos.

La ciprofloxacina és la fluoroquinolona més potent contra *P. aeruginosa* i la que presenta un major espectre d'acció. Degut a la seva bona penetració òssia, l'administració oral de ciprofloxacina és una bona alternativa als principals antibiòtics administrats per al tractament d'osteomielitis causades per organismes susceptibles. D'entre els agents de segona generació, l'ofloxacina és la que presenta la més gran activitat contra *Clamidia trachomatis*. Malgrat posseir una activitat antimicrobiana més elevada que les de primera generació, fins i tot davant de cocs grampositius, les quinolones de segona generació actuen, però, de manera moderada contra *S. aureus*, de manera molt lleu davant de *Streptococcus pneumoniae* i no tenen efecte front anaerobis.

Bàsicament, les quinolones de **tercera i quarta generació** es diferencien estructuralment de les quinolones de segona generació en els substituents localitzats en les posicions 1, 7 i 8 del nucli de quinolona. Pel que fa a l'acció antimicrobiana, cal destacar que les **quinolones de tercera generació** presenten una major activitat davant de cocs grampositius i que les **quinolones de quarta generació** són, a més a més, actives front anaerobis.

Les quinolones de **tercera generació**, com la levofloxacina, la gatifloxacina, la moxifloxacina o l'esparfloxacina, solen presentar substituents fluorats addicionals en altres posicions de la seva molècula. Això va fer millorar algunes de les propietats que presenten els seus anàlegs de la segona generació, ja sigui a nivell farmacocinètic o d'espectre antibacterià (Eliopoulos i Eliopoulos, 1993; Mitscher *et al.*, 1993). Aquestes molècules es van separar dins una tercera classe degut a la seva bona

activitat davant microorganismes grampositius, particularment front soques de *S. pneumoniae* sensibles i resistents a la penicil·lina, i patògens atípics com *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae*. Encara que les quinolones de tercera generació segueixen sent actives davant gramnegatius, ho són menys que la ciprofloxacina front *Pseudomonas* (King *et al.*, 2000).

Actualment existeix una **quarta generació** de quinolones, representada per compostos com la trovafloxacina i la clinafloxacina. Aquestes presenten una activitat antimicrobiana significativament augmentada davant bacteris anaerobis, mentre mantenen l'activitat de les quinolones de la tercera generació front gramnegatius i grampositius. Presenten també activitat, comparable amb la de la ciprofloxacina, davant les espècies de *Pseudomonas* (King *et al.*, 2000).

En els últims anys s'estan sintetitzant també nous compostos, emparentats estructuralment amb les quinolones, però amb unes característiques lleugerament diferents. Aquests nous compostos presenten activitat davant la topoisomerasa II d'eucariotes i tenen efectes antitumorals en models animals experimentals, la qual cosa obre la possibilitat d'utilitzar-los com quimioterapèutics aptes pel tractament de tumors malignes.

Taula 1.1. Classificació de les quinolones.

Classificació	Quinolones	Espectre antimicrobià	Indicacions clíniques generals
Primera generació	Àcid Nalidíxic Cinoxacina Àcid oxolínic Àcid pipemídic Rosoxacina Flumequino	Organismes gramnegatius (però no espècies de <i>Pseudomonas</i>).	Infeccions no complicades del tracte urinari. No utilitzades pel tractament d'infeccions sistèmiques.
Segona generació	Norfloxacina Ciprofloxacina Ofloxacina Enoxacina Pefloxacina Lomefloxacina Enrofloxacina (ús exclusiu en veterinària)	Organismes gramnegatius (incloent espècies de <i>Pseudomonas</i>), alguns organismes grampositius (incloent <i>Staphylococcus aureus</i> però no <i>Streptococcus pneumoniae</i>) i alguns patògens atípics.	Infeccions complicades i no complicades del tracte urinari, i altres com pielonefritis, malalties de transmissió sexual, prostatitis, infeccions de la pell i de teixits tous, gastroenteritis amb diarrea severa, infeccions nosocomials,...
Tercera generació	Levofloxacina* Esparfloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina Grepafloxacina	Igual que per les quinolones de segona generació però amb més activitat front a grampositius (<i>S. pneumoniae</i> sensible i resistent a penicil·lina) i front a patògens atípics.	Mateixes indicacions que per les de segona generació més casos aguts de bronquitis crònica, pneumònia adquirida en la comunitat en pacients hospitalitzats o quan hi ha raons per creure que es tracta de patògens atípics, pneumònia adquirida en la comunitat en pacients no hospitalitzats amb factors de risc per una infecció amb pneumococs resistents,....
Quarta generació	Trovafoxacina Clinafloxacina Difloxacina Tosufloxacina	Igual que per les quinolones de tercera generació però amb activitat front a anaerobis	Igual que per les quinolones de primera, segona i tercera generació (excloent les infeccions complicades del tracte urinari i les pielonefritis) més infeccions intraabdominals, pneumònia nosocomial, infeccions pèlviques,...

(King *et al.*, 2000; Oliphant i Green, 2002; Rivera, 2000).

*La levofloxacina es considera com una quinolona de tercera generació degut a que és més activa davant cocs grampositius que el seu enantiòmer, l'ofloxacina. Això és possible perquè en el pic de màxima concentració en sèrum s'assoleixen concentracions terapèutiques més bones i això fa que pugui actuar davant d'aquests microorganismes.

1.4.3. Diana funcional i diana primària d'unió de les quinolones

Actualment es coneixen moltes de les activitats i els efectes que produeix el tractament amb **quinolones**, i se sap que aquestes molècules tenen un marcat efecte sobre la **DNA girasa** i la cèl·lula bacteriana. La majoria dels efectes que les quinolones produeixen sobre les cèl·lules bacterianes, però, es van determinar molt abans del descobriment de la diana d'acció sobre la que actuen aquests compostos, és a dir, moltes de les conseqüències de l'exposició de bacteris a quinolones van ser determinades, per a l'àcid nalidíxic i l'àcid oxolínic, abans del descobriment de la DNA girasa (Hooper i Wolfson, 1993a). A mitjans dels anys 60, es va veure que l'àcid nalidíxic interferia selectivament la síntesi de DNA, causava la degradació del DNA i induïa la filamentació dels bacteris. Aquest efecte bactericida, però, era bloquejat en condicions en les que s'inhibia la síntesi proteica (experiments en presència de cloranfenicol, dinitrofenol o en condicions de carència d'aminoàcids) (Goss *et al.*, 1964; Goss *et al.*, 1965; Cook *et al.*, 1966; Deitz, *et al.*, 1966). No va ser fins el 1977 quan es va demostrar, en *E. coli*, que l'àcid nalidíxic inhibia específicament l'activitat de la **DNA girasa** (Gellert *et al.*, 1977; Sugino *et al.*, 1977). Això va permetre deduir que aquest enzim era la diana primària i funcional d'aquest compost. Més tard es va demostrar que la DNA girasa d'*E. coli* i de diferents espècies bacterianes també és inhibida per les altres quinolones i en els últims anys s'ha comprovat que aquests compostos també poden inhibir les activitats de la topoisomerasa IV. Per tant, està àmpliament acceptat que les **quinolones** actuen específicament contra les **topoisomerases bacterianes del tipus 2**, ja sigui la **DNA girasa** o la **topoisomerasa IV**.

En diferents experiments s'ha comprovat que les quinolones inhibeixen totes les activitats *in vitro* de la DNA girasa i també totes les reaccions *in vivo*, exceptuant els processos integratius de certs bacteriòfags i la transposició d'alguns transposons.

També s'ha vist que determinades mutacions en posicions concretes del gen *gyrA* confereixen resistència a aquests compostos, havent-se

demostrat, en diversos treballs, que les quinolones s'uneixen, després del trencament del DNA, al complex DNA girasa-DNA estabilitzant-lo i impedit així el "turnover" de l'enzim. Per tot això, durant molt de temps es va pensar que la DNA girasa era la diana funcional d'aquests compostos i que la seva subunitat A era la diana primària d'unió de les quinolones. No obstant, més endavant es van aïllar algunes soques resistents que presentaven mutacions en el gen *gyrB*, el que va fer qüestionar el fet que la subunitat A fos l'única diana primària d'unió de les quinolones (Yoshida *et al.*, 1991). La subunitat B podria ser també diana de les quinolones, potser per interacció directa amb l'antibiòtic o, alternativament, per interaccions indirectes que afectarien a la subunitat A (Hooper i Wolfson, 1993a).

Els efectes que produeixen les quinolones sobre la topoisomerasa IV *in vitro* (Kato *et al.*, 1992) suggereixen la possibilitat de que aquest enzim sigui també una diana *in vivo*. Recentment s'han aïllat soques de bacteris gramnegatius resistents que presenten mutacions en els gens que codifiquen les subunitats de la topoisomerasa IV (*parC* i *parE*). Aquestes mutacions sempre acompanyen, però, a mutacions en el gen *gyrA*. La topoisomerasa IV, doncs, seria probablement una diana secundària de les quinolones *in vivo* (Khodursky *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 1996). En aquest sentit s'ha vist que les primeres mutacions, associades amb la resistència a quinolones, afecten primer a la DNA girasa i, posteriorment, a la topoisomerasa IV. A més, en estudis sobre la inhibició de l'activitat enzimàtica, s'ha demostrat que l'àcid nalidíxic i les fluoroquinolones són de 3 a 30 vegades menys potents contra la topoisomerasa IV d' *E. coli* que contra la DNA girasa (Peng i Mariani, 1993; Hoshino *et al.*, 1994). Tot això és el que ha portat als investigadors a pensar que la topoisomerasa IV no és una diana primària de les quinolones en aquests microorganismes.

No obstant, s'ha demostrat que en microorganismes grampositius, com *S. aureus* o *S. pneumoniae*, succeeix tot al contrari; sembla ser que la topoisomerasa IV és la diana primària d'unió de les quinolones, ja que s'ha observat que les primeres mutacions detectades en soques resistents de grampositius corresponen a la topoisomerasa IV, essent les mutacions en la

DNA girasa complementàries i de posterior aparició. En aquests microorganismes, doncs, el paper de la diana principal de les quinolones el fa la topoisomerasa IV (Ferrero *et al.*, 1994; Tankovic *et al.*, 1996).

En altres microorganismes, com per exemple *S. typhimurium*, encara no s'han identificat mutacions en els gens que codifiquen les subunitats de la topoisomerasa IV. Les mutacions presents en soques resistents només s'han localitzat a nivell del gen *gyrA* (Piddock *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 1997b).

1.4.4. Models moleculars d'inhibició de la DNA girasa

A mesura que es van anar desenvolupant les diferents molècules de quinolones i s'abordaven els estudis d'estructura-activitat, es van postular diferents models per tal d'explicar el mecanisme d'acció d'aquests compostos sobre la DNA girasa.

Shen i col·laboradors van postular un **model d'unió cooperativa quinolona-DNA** en el que tindria lloc una inhibició indirecta de la DNA girasa deguda a la unió de les quinolones al DNA (Figura 1.3 A) (Shen *et al.*, 1989). Aquests autors proposaven que s'induiria un lloc d'unió de les molècules de quinolona al substrat de DNA relaxat i que aquest lloc es generaria durant el trencament del DNA per acció de la DNA girasa. El tall produiria un desaparellament de 4 parells de bases, la qual cosa simularia una regió desnaturalitzada. Aquesta regió de ssDNA podria ser un lloc ideal d'unió de les molècules de quinolona a les bases del DNA, a través de ponts d'hidrogen i en presència d'ATP. A més a més, les molècules de quinolona podrien unir-se cooperativament, a través d'un procés d'autoassociació, interaccionant entre elles per apilaments π - π entre els anells de quinolona i/o per interaccions hidrofòbiques entre els substituents en el N-1. Això podria donar lloc a l'aparició d'una "supermolècula" que formaria una unitat consolidada i podria saturar l'espai obert en la molècula de DNA per la DNA girasa. D'aquesta manera podria tenir lloc la inhibició dels passos posteriors del procés de superenrotllament catalitzat per la DNA girasa.

Aquest model d'unió cooperativa quinolona-DNA proposava que la diana primària d'unió de les quinolones és el DNA i partia de dues suposicions. La primera és la geometria del lloc d'unió generat per la DNA girasa, la qual podria generar en el DNA un lloc favorable d'unió. La segona suposició és la capacitat que presenten les molècules de quinolona d'autoensamblar-se i d'ocupar aquests llocs, basant-se en reactivitat de les quinolones i la seva relació estructura-activitat que justificarien l'autoassociació d'aquestes molècules.

En aquest model es distingien diferents dominis funcionals en la molècula de quinolona: una regió d'unió al DNA a través de ponts d'hidrogen, una regió lipofílica que podria permetre l'autoassociació de les molècules de quinolona i una altra regió d'interacció amb la DNA girasa, hipotetitzant que els substituents en el C-7 de la molècula podrien interaccionar amb la subunitat B de l'enzim (Figura 1.3 B) (Shen *et al.*, 1989; Shen, 1993). Aquest model predeia que qualsevol mutació en la DNA girasa, tant en la subunitat GyrA com en la subunitat GyrB, que donés lloc a una alteració de la geometria del lloc d'unió de les quinolones al DNA, podria causar un fenotip de resistència.

Posteriorment, altres autors van proposar un **model revisat d'unió quinolona-DNA** (Palumbo *et al.*, 1993), basant-se en la possible modulació del procés d'unió de la quinolona al DNA mitjançant ions magnesi (Palù *et al.*, 1992). Aquests autors van postular que la molècula de quinolona no s'uniria al DNA a través de ponts d'hidrogen sinó via ponts de Mg^{2+} entre les seves meitats carbonil i carboxil i els grups fosfat del DNA (Figura 1.4 A). En aquest model, les bases de la regió de ssDNA interaccionarien amb el sistema planar de l'anell de la molècula de quinolona i s'estabilitzaria així el complex format. No es requeriria l'autoassociació entre les molècules de quinolona. Es va suggerir també que els substituents en el C-7 i en el N-1 podrien estar implicats en la unió de la quinolona a la DNA girasa (Figura 1.4 B) (Palumbo *et al.*, 1993).

Aquests dos models d'acció parteixen de la suposició de que el DNA és la diana primària d'unió de les quinolones, però aquesta hipòtesi ha sigut qüestionada per diferents autors (Reece i Maxwell, 1991; Yoshida *et al.*, 1991; Maxwell, 1992). Així, Maxwell i col·laboradors van proposar un **model alternatiu** en el que la DNA girasa és la diana primària d'unió de les quinolones. Aquests autors van postular que **es requeriria tant DNA girasa com DNA per a que les quinolones interaccionessin de manera estable** però que **la unió es produiria amb la DNA girasa** (Maxwell, 1992; Willmott i Maxwell, 1993). Aquesta hipòtesi es va basar en que la majoria de mutants resistents a les quinolones presenten canvis concrets de bases en l'anomenada "regió determinant de resistència a quinolones" del gen *gyrA* i en estudis *in vitro* que demostraven que una determinada mutació en aquest gen provoca una dràstica reducció de la unió de la norfloxacin al complex DNA girasa-DNA. Maxwell i col·laboradors van postular que les molècules de quinolona segurament s'unirien a aquesta "regió determinant de resistència a quinolones", probablement al residu Ser-83 i, segons altres autors, també al residu Asp-87. En aquesta teoria es va tenir també en compte la possibilitat de que mutacions en la subunitat B de la DNA girasa tinguessin efectes secundaris a través de les seves interaccions amb la subunitat A.

Un altre model fou el proposat per Yoshida i col·laboradors (1993), anomenat "**quinolone pocket model**", en el que les quinolones interaccionarien en la cavitat que es formaria en el complex DNA girasa-DNA durant les reaccions de trencament i reunió del DNA, i seria així com exercirien la seva acció. L'afinitat d'unió vindria determinada conjuntament per les subunitats GyrA i GyrB. Els ions Mg^{2+} també podrien constituir un altre lloc d'unió d'aquests compostos ja que probablement estarien presents en el lloc de trencament i reunió del DNA, donat que són necessaris per a la formació dels complexos DNA girasa-DNA. Aquest model estaria més d'acord amb la hipòtesi de que hi ha una interacció quinolona-DNA girasa que amb els models basats en la unió quinolona-DNA.

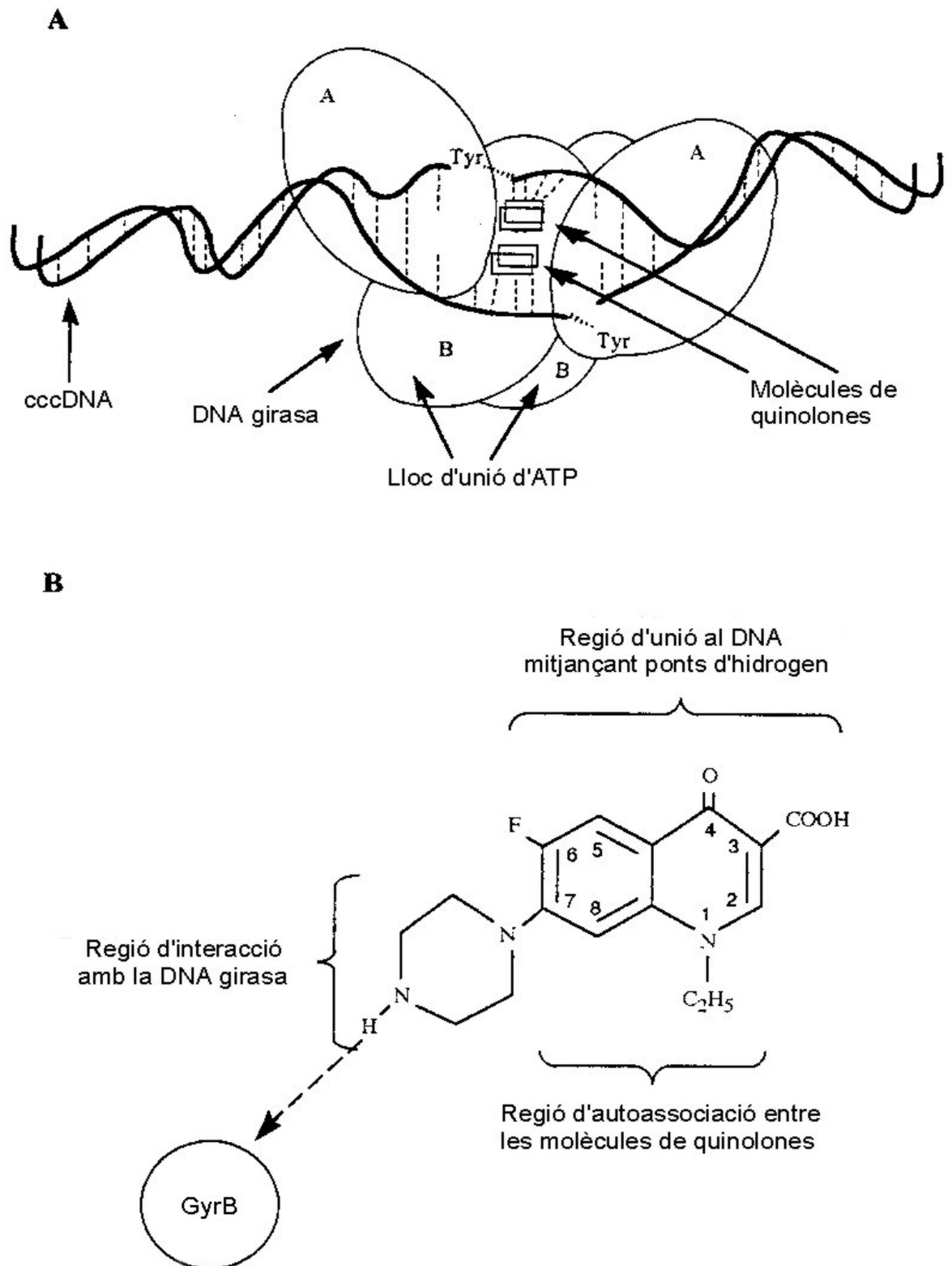
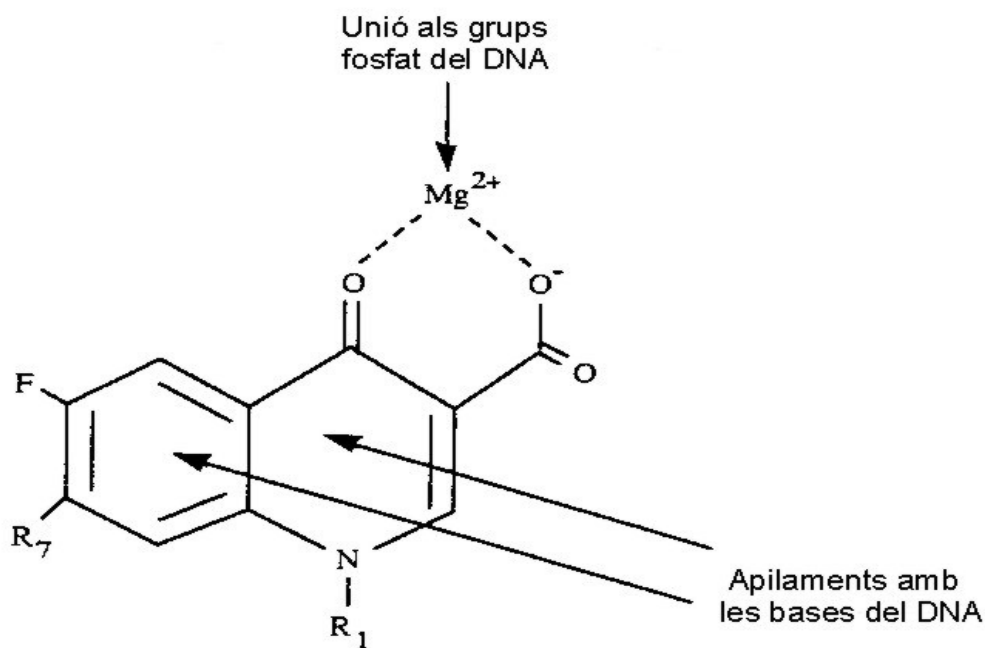


Figura 1.3. Model d'unió cooperativa quinolona-DNA (A) i dominis funcionals de les quinolones (B). (Modificat de Shen *et al.*, 1989; Shen, 1993). (Clerch, 1995)

A



B

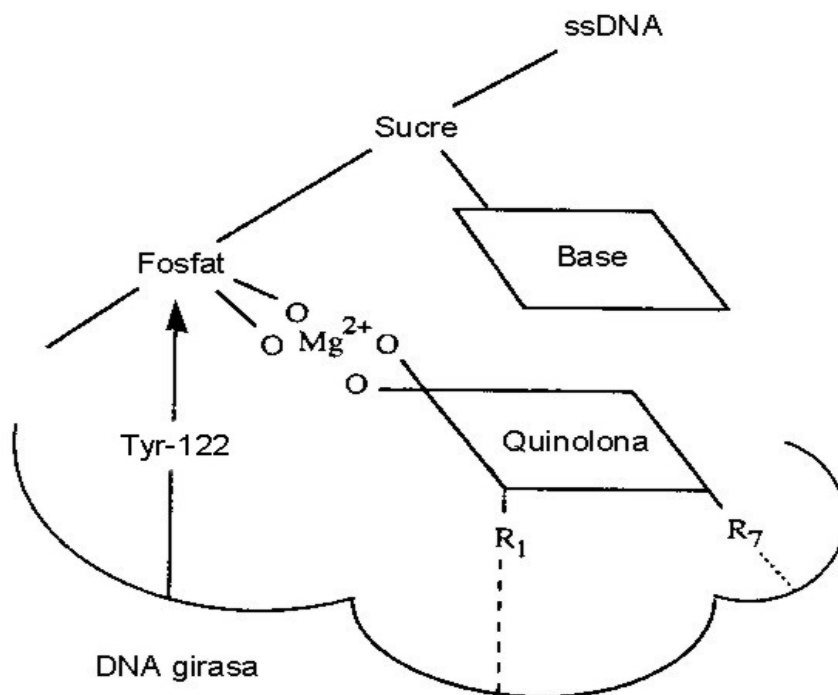


Figura 1.4. Model revisat d'unió quinolona-DNA. Interacció quinolona-DNA a través de l'ió Mg^{2+} (A) i model molecular d'interacció de la quinolona amb una regió ssDNA en el complex DNA girasa-DNA (B). (Modificat de Palumbo *et al.*, 1993). (Clerch, 1995)

Shen va criticar aquestes altres propostes formulades sobre el mecanisme molecular d'inhibició de la DNA girasa per part de les quinolones amb els següents arguments (Shen, 1993):

- va qüestionar el paper que Palumbo i col·laboradors atribuïen al Mg^{2+} en el model revisat d'unió quinolona-DNA, encara que aquest podria jugar algun paper en la unió de les quinolones al DNA. Aquest model no explicava tampoc el fenomen d'autoassociació de les molècules de quinolona observat en presència de DNA superenrotllat o del complex DNA girasa-DNA;

- pel que fa a la proposta de Maxwell i col·laboradors, argumentava que el seu model també predeïa que determinades mutacions en la DNA girasa podrien donar lloc a un fenotip de resistència per alteració de la geometria del lloc d'unió de les quinolones al DNA. Per tant, el model d'unió cooperativa quinolona-DNA no estaria en contradicció amb el fet de que les soques resistents a les quinolones presentin mutacions en els gens *gyrA* o *gyrB*.

Actualment està acceptat el fet que **les quinolones s'uneixen a la DNA girasa en presència del DNA** formant un complex, ja que no s'observa interacció quan es posa en contacte quinolona i DNA per una banda o quinolona i DNA girasa per una altra. Malgrat això, encara no està del tot clar el mecanisme pel que té lloc aquesta interacció. Recentment s'ha proposat una modificació al model de Palumbo abans esmentat que consisteix en la formació d'un **complex quaternari entre DNA - DNA girasa - quinolones i Mg^{2+}** (Rivera, 2000). Aquesta hipòtesi es basa en la distància entre la Ser-83 i l'Asp-87 de la subunitat A de la DNA girasa. S'ha observat que aquesta distància, calculada mitjançant modelatge molecular, coincideix amb la distància que presenten les quinolones entre els substituents en posició 1 i 7, i s'ha proposat que la quinolona podria unir-se, mitjançant aquests substituents, a la "Regió Determinant de Resistència a Quinolones" (QRDR) de la DNA girasa (Figura 1.5).

Aquesta hipòtesi, basada en els resultats obtinguts en *E. coli*, consisteix en que el substituent en posició 1 de la molècula de quinolona

s'uniria mitjançant interacció hidrofòbica amb la Ser-83, mentre que el substituent en posició 7 (càrrega +) s'uniria per atracció de càrregues amb l'Asp-87 (càrrega -). Aquesta teoria es veu confirmada pels estudis previs publicats pel mateix grup, en els que es va observar que una mutació en el codó de l'aminoàcid Ser-83 del gen *gyrA*, que generava un canvi a Leu, produïa un elevat nivell de resistència a l'àcid nalidíxic, mentre que era necessària una doble mutació en els codons Ser-83 i Asp-87 per a produir un elevat nivell de resistència a fluoroquinolones, com per exemple a ciprofloxacina (Vila *et al.*, 1994; Vila *et al.*, 1996). Aquest autors ho expliquen de la següent manera: l'àcid nalidíxic, que conté només un substituent etil en posició 1, posseiria un únic punt d'ancoratge amb la QRDR de la DNA girasa, la Ser-83, i, per tant, una única mutació en aquest codó seria suficient per a generar un elevat nivell de resistència a l'àcid nalidíxic. Per altra banda, la ciprofloxacina conté un grup ciclopropil en posició 1 i un grup piperazina, el qual pot estar carregat positivament, en posició 7. Així doncs, aquesta molècula presentaria dos punts d'ancoratge a la DNA girasa, la Ser-83 i l'Asp-87, i caldrien dues mutacions al mateix temps per a produir un elevat nivell de resistència a ciprofloxacina.

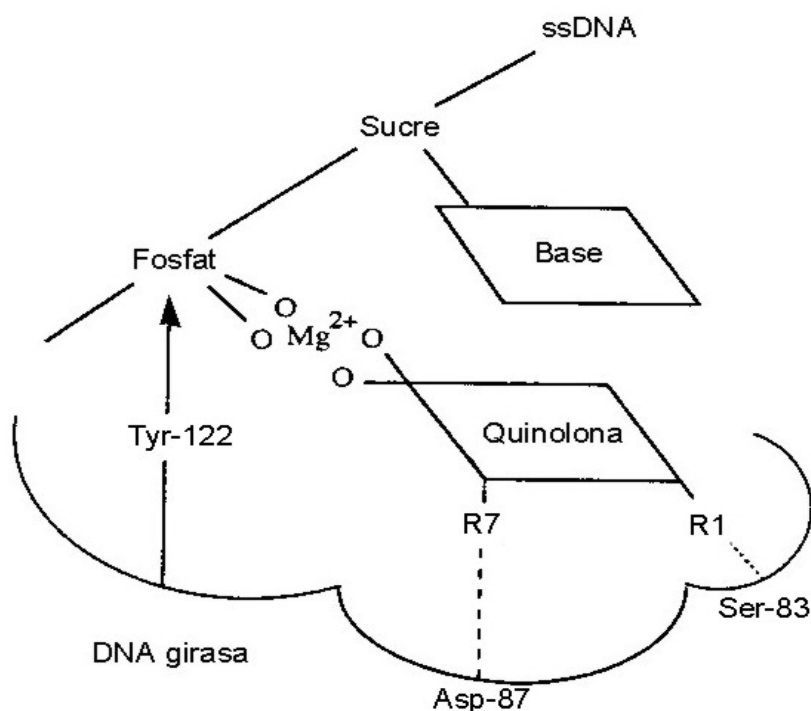


Figura 1.5. Model d'interacció DNA-DNA girasa-quinolona i Mg²⁺. (modificació del model de Palumbo). (modificat de Rivera, 2000)

1.5. RESISTÈNCIA BACTERIANA A QUINOLONES

La introducció, a partir dels anys 80, d'aquest important grup de compostos antibacterians, les **fluoroquinolones**, va proveir els clínics amb una classe d'agents d'ampli espectre, útils front un ampli rang d'infeccions causades per patògens gramnegatius, per una varietat de grampositius i, fins i tot, per anaerobis. Aquest rang inclou infeccions tals com les del tracte genitourinari, gastrointestinals, del tracte respiratori, de la pell i teixits tous, ginecològiques, malalties de transmissió sexual, etc. Dins el grup de microorganismes sensibles a les quinolones s'inclouen la família *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., i *Moraxella* spp., que són altament susceptibles a aquests agents, així com importants patògens nosocomials com *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. Les fluoroquinolones són menys actives però clínicament útils contra *Legionella* spp. (Poole, 2000). Com ja s'ha comentat anteriorment, les fluoroquinolones també són actives contra patògens atípics com determinades soques de micobactèries, clamídies i riquetsies, i la introducció de les quinolones de tercera i quarta generació ha permès augmentar l'activitat contra grampositius com, per exemple, *S. aureus* i *S. pneumoniae* i, fins i tot, contra anaerobis.

Donat aquest ampli espectre d'activitat, és desafortunat el fet de que els aïllats resistents a les fluoroquinolones hagi anat augmentant en un gran nombre de patògens gramnegatius, notablement en *P. aeruginosa*, però també en tots els microorganismes contra els que s'han utilitzat les quinolones (Poole, 2000).

Quan es va començar a descriure, per primera vegada, l'aparició de soques resistents a quinolones, els informes parlaven de casos excepcionals i consideraven que la utilització d'aquests agents antibacterians era una bona eina per al tractament de moltes infeccions. Malauradament, l'administració de quinolones en els últims anys ha sigut espectacular i, malgrat que l'aparició de resistència bacteriana a fluoroquinolones és menor que a l'àcid nalidíxic, la seva utilització en la pràctica clínica ha comportat un augment de soques resistents a aquests compostos en els aïllats clínics.

Cada vegada es publiquen més estudis sobre la resistència bacteriana a quinolones i s'han descrit soques resistents d'un gran nombre d'espècies diferents, entre les que s'inclouen *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Coxiella burnetii*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, etc. En diferents països es va descriure un augment del número de soques de *E. coli* resistents del 0,06% al 2,4% en un període de 5 anys, de soques de *Campylobacter* spp. resistents del 0 al 10% en uns 10 anys i un espectacular augment de soques resistents de *Staphylococcus* spp. en els aïllats de diversos centres hospitalaris.

Pel que fa, concretament, a *E. coli*, Bagel *et al.* (1999) descriuen a Alemanya un augment de la resistència a fluoroquinolones entre els aïllats clínics d'*E. coli* de <1% al 5% entre els anys 1990 i 1995. White *et al.* (2000) comenten un augment, en el nord de Geòrgia, del percentatge d'aïllats clínics d'*E. coli* procedents d'aus resistents a sarafloxacina del 15% en 1996 al 40% en 1999, i un augment de resistència a sarafloxacina i enrofloxacina del 9% en 1997 al 30% en 1999. Wang *et al.* (2001) parlen de que a la Xina, entre les anys 1997 i 1999, aproximadament el 60% de les soques d'*E. coli* aïllades d'infeccions intrahospitalàries i el 50% de les soques d'*E. coli* aïllades de la comunitat eren resistents a ciprofloxacina. D'aquestes soques resistents a fluoroquinolones, el 80% presentaven CMI_s de ciprofloxacina superiors a 32 µg/ml. Garau *et al.* (1999) van estudiar l'evolució de la resistència a quinolones en *E. coli* de l'any 1992 a l'any 1997 a Barcelona i van observar un increment de la proporció d'infeccions causades per soques d'*E. coli* resistents a quinolones. Aquestes soques eren més comuns entre pacients amb infeccions nosocomials però també augmentaven entre pacients amb infeccions adquirides a la comunitat (del 9% en 1992 al 17% en 1996).

Mentre que en un principi es parlava de casos excepcionals, hi ha també un gran nombre de treballs que descriuen l'augment del nombre de soques de *Salmonella typhimurium* resistents a quinolones en els últims anys. Per exemple, Giraud *et al.* (1999) van trobar que un 14% de les

soques de *S. typhimurium* DT104 multiresistents aïllades en 1997 al Regne Unit, eren altament resistents a l'àcid nalidíxic i presentaven una disminuïda susceptibilitat a la ciprofloxacina (CMI de 0,125 a 0,5 µg/ml). Liebana *et al.* (2002) comenten que un 5,3% de totes les soques de *Salmonella* aïllades d'animals en 1999 eren resistents a l'àcid nalidíxic i que, d'entre els aïllats procedents de diferents espècies animals, els d'aus de corral presentaven el més alt percentatge de resistència, amb un 13,4% d'aquests aïllats resistents a l'àcid nalidíxic.

Tot això només és una petita mostra del gran nombre d'estudis que freqüentment es publiquen sobre aquest tema, i indiquen que és esperable, en la pràctica clínica, un continu augment del nombre de soques resistents a quinolones si no es prenen les mesures necessàries per tal d'evitar-ho. És per això i per la clara aplicació terapèutica de les fluoroquinolones, que s'ha considerat molt important l'estudi dels mecanismes bacterians de resistència a aquests compostos, amb la finalitat de poder disposar de procediments clínics adequats i de dissenyar estratègies que minimitzin al màxim la resistència bacteriana emergent.

1.5.1. Mecanismes de resistència a quinolones

Es poden distingir diferents etapes en el procés d'acció antimicrobiana de les quinolones: la primera seria l'entrada del compost al citoplasma bacterià, posteriorment té lloc la seva interacció amb el complex DNA girasa-DNA, produint uns determinats efectes citotòxics que, finalment, condueixen a la mort cel·lular. En un gran nombre de treballs s'ha demostrat que l'adquisició de resistència bacteriana a quinolones és principalment deguda a **mutacions cromosòmiques**, encara que recentment s'ha descrit un plasmidi capaç de codificar per a resistència enfront aquests antibacterians (Martínez-Martínez *et al.*, 1998).

El conjunt de **mutacions cromosòmiques** responsables de conferir un fenotip de resistència a quinolones es pot dividir, bàsicament, en dos grups, ja que hi ha diferents mecanismes involucrats en el desenvolupament de la resistència a aquests compostos (Tavío *et al.*, 1999):

- alguns són conseqüència de **mutacions o alteracions en els gens** (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) que codifiquen les subunitats A i B de la **DNA girasa** i de la **topoisomerasa IV**; és a dir, les proteïnes diana de les quinolones.

- altres **mutacions afecten a l'acumulació de quinolones** i es tracta d'alteracions que provoquen una disminució en l'acumulació de l'agent antibacterià. Aquesta disminució pot ser deguda a **alteracions en la permeabilitat de la membrana** com a conseqüència de mutacions que afecten l'expressió de porines o lipopolisacàrids o a un **augment de l'expressió de sistemes d'expulsió activa** per mutacions que afecten a aquests sistemes.

En resum, els mecanismes de resistència a quinolones utilitzats pels bacteris gramnegatius inclouen mutacions cromosòmiques que disminueixen la permeabilitat de la membrana i redueixen l'acumulació de quinolones o que alteren les subunitats de la DNA girasa o la topoisomerasa IV. De totes maneres, la resistència clínica a fluoroquinolones en *E. coli* està majoritàriament associada amb mutacions que provoquen canvis concrets d'aminoàcids en la subunitat A (codificada pel gen *gyrA*) i en la subunitat B (codificada pel gen *gyrB*) de la DNA girasa i en la subunitat de la topoisomerasa IV codificada pel gen *parC* (White *et al.*, 2000).

1.5.2. Resistència a quinolones deguda a mutacions en les topoisomerases bacterianes

1.5.2.1. *E. coli*

- **Mutacions en la DNA girasa**

Hi ha nombrosos treballs en els que es demostra que la principal causa de resistència bacteriana a quinolones són, majoritàriament, mutacions en la subunitat A de la DNA girasa, codificada pel gen *gyrA*, i, en menor grau, en la seva subunitat B, codificada pel gen *gyrB*. Les mutacions en el gen *gyrB* solen trobar-se, però, més freqüentment en els mutants d'*E. coli* obtinguts *in vitro* que en els aïllats clínics, en els que s'ha trobat una quasi total absència de mutacions en aquest gen.

A la taula 1.2 hi ha representades les diferents mutacions conegudes en els gens *gyrA* i *gyrB* d'*E. coli*.

Quan es va determinar la seqüència de DNA del **gen *gyrA*** de diferents mutants resistents es va observar que la **proteïna GyrA resistent** presenta **canvis concrets d'aminoàcids** en la seva regió amino-terminal i a prop del residu Tyr-122, que tal com s'ha descrit anteriorment és el responsable de la unió covalent de l'enzim al DNA. Aquesta regió comprèn del nucleòtid 199 al 318 en la seqüència gènica d'*E. coli*, la qual correspon des del residu Ala-67 al Gln-106 de la proteïna i es coneix amb el nom de "**regió determinant de resistència a quinolones**" (**QRDR**, "**Quinolone-Resistance Determining Region**"). Les mutacions localitzades en el gen *parC* també s'han trobat en aquesta regió amino-terminal, on hi ha descrita la més gran similitud entre la topoisomerasa IV i la DNA girasa.

S'han descrit, en *E. coli*, mutacions en els codons del gen *gyrA* que codifiquen els aminoàcids 67, 81, 82, 83, 84, 87 i 106, encara que totes aquestes mutacions no tenen la mateixa importància a nivell clínic (Yoshida

et. al., 1988; Yoshida *et al.*, 1990a; Hallett i Maxwell, 1991; Cambau *et al.*, 1993; Vila *et al.*, 1994; Ouabdesselam *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1995; Lehn *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 1996; Vila *et al.*, 1996; Truong *et al.*, 1997; Weigel *et al.*, 1998; Bagel *et al.*, 1999; White *et al.*, 2000; Giraud *et al.*, 2001). Les mutacions que afecten als aminoàcids Ala-67, Asp-82 i Gln-106 només s'han descrit en mutants d'*E. coli* obtinguts *in vitro* i careixen, per tant, d'importància clínica (Yoshida *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990a; Hallett i Maxwell, 1991; Truong *et al.*, 1997).

En aïllats resistents a quinolones d'altres espècies bacterianes s'han descrit també mutacions en les posicions del gen *gyrA* anàlogues a les indicades per *E. coli* (Deguchi *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1997b; Deguchi *et al.*, 1997; Taylor i Chau, 1997; Ruiz *et al.*, 1998; Weigel *et al.*, 1998; Mouneimné *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2002).

D'entre les diferents substitucions que poden trobar-se a nivell de la DNA girasa d'*E. coli*, els canvis en la Ser-83 de la subunitat A són els que produeixen un marcat augment de la resistència a diferents quinolones i, d'entre totes les mutacions, les que s'han descrit més freqüentment es troben a nivell del codó que codifica aquesta Ser-83 (principalment el canvi Ser-83 → Leu). El mateix passa amb variacions en la Ser-84 de la DNA girasa de *S. aureus*, equivalent a la Ser-83 d'*E. coli* i en els altres microorganismes descrits, on el codó que més freqüentment presenta mutacions és l'equivalent a la Ser-83 d'*E. coli*. Els altres canvis que poden tenir lloc en la regió QRDR del gen *gyrA* tenen un cert efecte sobre la resistència bacteriana però és molt inferior al produït pel canvi en la Ser-83. En diferents treballs s'ha demostrat que, a més de les variacions en la Ser-83, una segona mutació en el residu Asp-87 dóna lloc a un elevat augment de la resistència (Vila *et al.*, 1994). La resta de canvis sembla tenir poca importància.

Aquestes mutacions no afecten de la mateixa manera a la susceptibilitat a les diferents quinolones. Així, una única mutació en la Ser-83 és suficient per a generar una elevada resistència a l'àcid nalidíxic, mentre

que les soques que contenen només aquest canvi tan sols presenten susceptibilitats reduïdes a les fluoroquinolones (Vila *et al.*, 1994; Vila *et al.*, 1996). Una excepció és el cas de les mutacions Gly-81 → Asp i Asp-82 → Gly, que confereixen una susceptibilitat reduïda a fluoroquinolones però no a l'àcid nalidíxic. Quan les dues mutacions hi són presents al mateix temps, però, s'expressa resistència tant a l'àcid nalidíxic com a fluoroquinolones (Truong *et al.*, 1997).

Taula 1.2. Mutacions descrites en els gens *gyrA* i *gyrB* de soques d'*E. coli* resistents a quinolones.

Codó	Aminoàcid salvatge	Aminoàcid mutat
<i>gyrA</i>		
67 ¹	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82 ¹	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106 ¹	Gln	His, Arg
<i>gyrB</i>		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu

¹Les mutacions en aquests codons només s'han descrit *in vitro*.

També s'ha descrit que determinades soques bacterianes d'*E. coli* contenen mutacions puntuals en la regió central de la **subunitat B** de la DNA girasa, encara que aquests mutants en el **gen *gyrB*** presenten, generalment, una major susceptibilitat que la dels mutants en el gen *gyrA*.

Les principals mutacions descrites en la subunitat B de la DNA girasa d'*E. coli* afecten tan sols als aminoàcids Asp-426 i Lys-447 (Yoshida *et al.*, 1991). El canvi Asp-426 → Asn confereix una susceptibilitat reduïda a l'àcid nalidíxic i a altres quinolones. De fet, les mutacions en aquesta posició 426 sembla ser que disminueixen, encara que poc, la susceptibilitat a totes les quinolones. Pel contrari, la mutació Lys-447 → Glu confereix un fenotip d'hipersusceptibilitat a certes quinolones que, a diferència de l'àcid nalidíxic, contenen un substituent piperacínil carregat positivament en el C-7 de la seva molècula. Així, les mutacions en aquesta posició 447 generen una menor susceptibilitat a l'àcid nalidíxic i a les quinolones no fluorades en general i, pel contrari, major susceptibilitat a les fluoroquinolones. Yoshida i col·laboradors van proposar que la càrrega negativa de la subunitat B mutant (Glu-447) produiria una atracció electrostàtica directa del grup piperacínil de la quinolona, carregat positivament, el que explicaria aquest augment de susceptibilitat detectat (Yoshida *et al.*, 1991).

• Mutacions en la topoisomerasa IV

Com ja s'ha comentat anteriorment, s'han descrit també, en soques resistents a quinolones, mutacions en els gens que codifiquen les subunitats de la topoisomerasa IV d'*E. coli*. Aquestes mutacions afecten principalment a la subunitat codificada pel **gen *parC*** (Taula 1.3) i es troben localitzades en una zona concreta del gen, també en la regió amino-terminal, on hi ha la més gran homologia entre la topoisomerasa IV i la DNA girasa i on s'ha localitzat l'anomenada "regió determinant de resistència a quinolones". Les mutacions descrites en el gen *parC* afecten principalment als aminoàcids 80 i 84, equivalents als aminoàcids 83 i 87 del gen *gyrA* (Heisig, 1996; Vila *et al.*, 1996; Bagel *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 2001), i, com en el cas del gen *gyrA*, aquestes mutacions es mantenen en posicions anàlogues en soques resistents d'altres patògens (Vila *et al.*, 1997, Georgiou *et al.*, 1996). S'ha descrit també, tant *in vitro* com *in vivo*, la mutació Gly-78 → Asp anàloga a la Gly-81 → Asp del gen *gyrA*. Al igual que el comentat pel gen *gyrA*, les

soques amb aquesta mutació en el gen *parC* tenen valors de CMI de ciprofloxacina més alts i menors front a l'àcid nalidíxic respecte als de les soques que tenen una única mutació en el gen *gyrA* (Heisig, 1996).

S'ha determinat, en estudis portats a terme amb aïllats clínics d'*E. coli*, que la contribució del **gen *parE*** en l'adquisició de resistència a quinolones és pràcticament nula, és a dir, les mutacions implicades en l'aparició d'un fenotip de resistència afecten molt poc a la subunitat B de la topoisomerasa IV (Ruiz *et al.*, 1997a). Tan sols s'ha descrit la mutació Leu-445 → His en el gen *parE* (Breines *et al.*, 1997) (Taula 1.3). En grampositius, on l'aparició de mutacions en el gen *parE* és més freqüent que en els microorganismes gramnegatius, s'han descrit també altres mutacions en aquest gen, com per exemple Glu-422 → Asp; Asp-432 → Gly; Asp-435 → Asn i Pro-451 → Ser (Perichon *et al.*, 1997; Schmitz *et al.*, 1998).

Taula 1.3. Mutacions descrites en els gens *parC* i *parE* de soques d'*E. coli* resistents a quinolones

Codó	Aminoàcid salvatge	Aminoàcid mutat
<i>parC</i>		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
<i>parE</i>		
445	Leu	His

Tal com s'ha dit, les **mutacions puntuals** que confereixen **resistència a quinolones** estan localitzades, bàsicament, en **regions particulars dels gen *gyrA* i *parC***. D'acord amb els resultats obtinguts en els estudis amb soques mutants d'*E. coli* seleccionades *in vitro*, les mutacions en el gen *gyrA* donen lloc primer a una substitució de la Ser-83 i, després, a

una substitució de l'Asp-87 (Heisig i Tschorny, 1994). Els resultats obtinguts en els estudis amb soques mutants d'*E. coli* obtingudes *in vivo* semblen ser consistents amb aquesta "successió" de mutacions observada *in vitro*; pràcticament tots els mutants amb una sola mutació presenten substitucions en la Ser-83, i molts dels aïllats amb substitucions a l'Asp-87 també presenten substitucions en la Ser-83 (Ozeki *et al.*, 1997).

Com a resum general pel que fa a les mutacions en el gens *gyrA* i *parC*, sembla ser que, en *E. coli*, el primer punt de mutació estaria en el gen que codifica la subunitat GyrA de la DNA girasa, essent les mutacions en el gen *parC* secundàries. Fins al moment, no s'ha trobat un sol mutant en el gen *parC* sense la presència addicional d'una mutació en el gen *gyrA*. En general, es creu que una substitució específica en el gen *gyrA*, concretament en la Ser-83, està associada amb un alt nivell resistència a l'àcid nalidíxic però amb tan sols susceptibilitats reduïdes a les fluoroquinolones; dos canvis, un en el gen *gyrA* i un segon en el gen *parC*, confereixen una menor susceptibilitat a fluoroquinolones; tres substitucions, dues en el gen *gyrA* i una en el gen *parC*, estan associades amb un alt nivell de resistència a aquests compostos; i quatre canvis, dos en el gen *gyrA* i dos en el gen *parC*, donen lloc al més alt nivell de resistència (Vila *et al.*, 1996).

En diferents treballs s'ha demostrat també que mutacions en gens no-diana, bàsicament mutacions que afecten a l'acumulació de quinolones, poden jugar un paper important en els nivells finals de resistència a aquests compostos. Molts aïllats clínics d'*E. coli* amb un alt nivell de resistència a fluoroquinolones presenten també un fenotip de múltiple resistència a diferents antimicrobians i un augment de la tolerància a solvents orgànics; aquestes soques acumulen menys ciprofloxacina que les soques sensibles de referència i/o han perdut la proteïna de membrana externa OmpF (Kern *et al.*, 2000). Aquest fenotip de múltiple resistència a antibiòtics es creu que és degut tant a una reduïda expressió d'aquesta proteïna OmpF com a la sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa (Tavío *et al.*, 1999).

En altres membres de la família *Enterobacteriaceae* diferents d'*E. coli*, per exemple en *K. pneumoniae* tampoc es troben soques amb alteracions en el gen *parC* sense la presència simultània d'alteracions en el gen *gyrA*. En aquests microorganismes la DNA girasa també és la diana primària de les quinolones i s'ha observat que un simple canvi de nucleòtid en la Ser-83 (per Tyr o Phe) o en l'Asp-87 (per Gly o Asn) del gen *gyrA* és suficient per a generar un alt nivell de resistència a l'àcid nalidíxic i una susceptibilitat disminuïda a ciprofloxacina, mentre que l'acumulació d'alteracions en el gen *gyrA* i la presència simultània d'alteracions en el gen *parC* (Ser-80 → Ile o Arg; Glu-84 → Gly o Lys) juga un paper complementari en el desenvolupament dels més alts nivells de resistència a fluoroquinolones (Deguchi *et al.*, 1997).

1.5.2.2. *S. typhimurium*

Pel que fa a *S. typhimurium*, només s'han descrit mutacions a nivell dels gens que codifiquen les subunitats de la DNA girasa, i particularment en el gen *gyrA*. Fins al moment, sembla ser que les mutacions en el gen *gyrB* són rares, ja que s'han descrit en molt poques ocasions i la majoria d'autors solen trobar una total absència de mutacions en aquest gen. Tampoc es coneixen mutacions en els gens *parC* o *parE* de soques de *Salmonella* resistents a quinolones. La majoria d'aquestes soques són altament resistents a l'àcid nalidíxic i presenten susceptibilitats reduïdes a les fluoroquinolones, no havent-se aïllat gairebé cap soca de *Salmonella* amb alts nivells de resistència a les quinolones fluorades (Reyna *et al.*, 1995; Griggs *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 1997b; Piddock *et al.*, 1998; Giraud *et al.*, 1999; Heurtin-Le Corre *et al.*, 1999; Mølbak *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2001; Piddock, 2002; Liebana *et al.*, 2002).

A la taula 1.4 hi ha representades les diferents mutacions conegudes en els gens *gyrA* i *gyrB* de *S. typhimurium*. Com en *E. coli*, els codons que codifiquen els aminoàcids en posició 83 i 87 de la subunitat GyrA són els que

majoritàriament presenten les mutacions responsables de conferir un fenotip de resistència a les quinolones. Però, i a diferència d'*E. coli*, els mutants de *Salmonella* tant en el codó 83 com en el 87 presenten una elevada resistència a quinolones. Les mutacions en altres posicions són rares, només s'han descrit en alguna ocasió i tenen poca influència en la susceptibilitat a aquests antimicrobians. Així, es coneixen alguns aïllats que presenten una mutació en l'Ala-119, la qual es troba localitzada fóra de la regió QRDR i, encara que està a prop del residu Tyr-122, la seva implicació en la modificació de la susceptibilitat a quinolones no es està del tot clara. S'ha postulat que mutacions en el gen *gyrA* fóra de la regió seqüenciada podrien ser les vertaderes responsables del fenotip de resistència a quinolones en aquestes soques i que aquest canvi en l'Ala-119 no tindria importància (Griggs *et al.*, 1996). En altres casos, s'ha observat *in vitro* que la mutació Gly81 → Ser confereix resistència a l'àcid nalidíxic només quan va acompanyada de la mutació Ala67 → Pro (Reyna *et al.*, 1995), mentre que en altres estudis s'ha descrit que el canvi Gly81 → Cys provoca un augment de la CMI de la ciprofloxacina de 8 vegades. Malgrat aquests resultats, no s'ha aïllat cap mutant en el codó 81 en estudis *in vivo* (Giraud *et al.*, 1999).

Taula 1.4. Mutacions descrites en els gens *gyrA* i *gyrB* de soques de *S. typhimurium* resistents a quinolones

Codó	Aminoàcid salvatge	Aminoàcid mutat
<i>gyrA</i>		
67	Ala	Pro
81	Gly	Ser, Cys
83	Ser	Phe, Tyr
87	Asp	Asn, Gly, Tyr
119	Ala	Glu, Val
<i>gyrB</i>		
464	Ser	Tyr, Asp, Phe

En funció dels diferents treballs realitzats fins al moment, sembla ser que els alts nivells de resistència a quinolones estan associats a **una única mutació** en la “**regió determinant de resistència a quinolones**” del gen ***gyrA*** de *Salmonella*, essent les mutacions més freqüentment descrites: Ser-83 → Phe, Asp-87 → Asn, Asp-87 → Gly i Ser-83 → Tyr. Amb una única mutació, tant a nivell de la Ser-83 com a nivell de l’Asp-87, s’aconsegueixen alts nivells de resistència a l’àcid nalidíxic i una susceptibilitat reduïda a fluoroquinolones, encara que en algunes ocasions es creu que aquesta única mutació és la responsable d’alts nivells de resistència a quinolones en general; de totes maneres sembla ser que la majoria dels aïllats amb mutacions a la Ser-83 presenten uns nivells de resistència a ciprofloxacina més elevats que els portadors de mutacions a l’Asp-87. En diferents treballs s’ha suggerit que aquestes diferències, però, podrien estar associades amb la presència d’altres mecanismes de resistència (Giraud *et al.*, 1999; Liebana *et al.*, 2002). S’han descrit en poques ocasions dobles mutants en el gen *gyrA*. En estudis *in vitro*, s’han obtingut dobles mutants amb el canvi Gly-81 → Cys o Ser-83 → Phe associat al canvi Asp-87 → Gly. En els dos casos, aquesta segona mutació en la posició 87 dóna lloc a un increment de la CMI de la ciprofloxacina de tan sols 2 vegades respecte a la de les soques amb una única mutació en les posicions 81 o 83 (Giraud *et al.*, 1999).

Com en *E. coli*, es pensa també que altres mutacions que donin lloc a una alteració de la permeabilitat de la membrana o dels sistemes d’expulsió activa poden modular, en últim terme, el nivell final de resistència a quinolones que presenten les soques de *Salmonella*.

1.5.3. Resistència deguda a mutacions que provoquen una disminució en l'acumulació de quinolones

- **Alteracions en la permeabilitat de la membrana externa**

Per a que les molècules de quinolones puguin exercir la seva acció bactericida, és a dir, puguin interaccionar amb la DNA girasa, aquestes han de travessar la membrana externa, formada per un entramat de proteïnes i lipopolisacàrids, i la membrana citoplasmàtica dels bacteris gramnegatius. S'han descrit, per a les quinolones, diferents vies de penetració. Sembla ser que les molècules de quinolona més hidrofíliques travessarien la membrana externa a través dels canals de porines. La mida de moltes d'aquestes molècules així com la seva configuració són compatibles amb la seva penetració a través dels canals OmpF i també dels OmpC. Per a les molècules més hidrofòbiques s'ha suggerit que, a més de penetrar a través d'aquests canals de porines, elles mateixes podrien estimular la seva pròpia difusió a través de la bicapa de fosfolípids, gràcies a la seva capacitat de quelació amb l'ió magnesi, el qual es troba present en la membrana externa estabilitzant el lipopolisacàrid (Chapman i Georgopapadaku, 1988).

La impermeabilitat de la membrana a les quinolones està associada, bàsicament, a una disminució o a una pèrdua total de l'expressió de les porines, encara que s'han descrit també determinades modificacions de l'estructura de lipopolisacàrids. Els nivells de resistència que s'assoleixen, però, en aquests tipus de mutants no són molt elevats. En *E. coli* s'ha descrit que les encarregades de l'entrada de quinolones són la OmpF i la OmpC, l'expressió de les quals depèn bàsicament de l'estimulació ambiental. Es coneixen diferents tipus de mutacions en certs gens que provoquen una disminució en l'expressió de la proteïna OmpF i, per tant, un augment en el nivell de resistència a quinolones. Aquestes mutacions provoquen una reducció en l'expressió de la proteïna OmpF després de la transcripció i aquesta reducció està relacionada amb l'expressió del locus *micF*, un RNA antisentit complementari al mRNA *ompF* (Tavío *et al.*, 1999).

Aquestes alteracions no tan sols donen lloc a un cert augment del nivell de resistència a quinolones, sinó que solen provocar resistència creuada amb altres agents antibacterians. Així, se sap, per exemple, que un descens en el nivell d'expressió de la proteïna OmpF no comporta tan sols una menor susceptibilitat a les quinolones sinó també un major nivell de resistència a altres agents antibacterians molt diferents, tals com β -lactàmics, tetraciclins i cloramfenicol (Cohen *et al.*, 1989).

• Alteracions en els sistemes d'expulsió activa

La funció biològica de les bombes bacterianes d'expulsió és la d'excretar determinades molècules, claus per a la vida dels bacteris, o bé la d'eliminar substàncies que poden ser tòxiques. Com a exemple, la bomba MexAB/oprM de *P. aeruginosa* que s'utilitza per a expulsar sideròfors per a la captació d'àtoms de ferro, o l'AcrAB d'*E. coli* implicada en l'eliminació de sals biliars o de certs àcids grassos.

Es coneixen dos tipus de mecanismes d'expulsió activa, segons depenguin d'ATP o del flux de protons. Aquests últims són els responsables de l'aparició d'un fenotip de multiresistència a antibiòtics en bacteris gramnegatius, ja que confereixen resistència a diversos agents antimicrobians els quals difereixen estructuralment entre sí, tals com β -lactàmics, quinolones, tetraciclins i cloramfenicol. Aquest efecte s'observa quan hi ha una sobreexpressió de determinades bombes d'expulsió activa (Nikaido, 1996; Paulsen *et al.*, 1996).

El sistema d'expulsió de les fluoroquinolones predominantment utilitzat en *E. coli* està codificat pels gens *acrAB-tolC*. Les proteïnes AcrAB són altament homòlogues a les proteïnes Mex de *P. aeruginosa*, mentre que la proteïna TolC presenta una limitada homologia amb les OEPs ("Outer membrane Efflux Proteins") d'aquest microorganisme. S'ha demostrat, però, que aquesta proteïna TolC és capaç de formar canals en les bicapes

lipídiques, el que és consistent amb el seu paper d'exportar els antibiòtics a través de la membrana externa d'*E. coli*. AcrB és un transportador que afavoreix l'expulsió a través de la membrana interna i AcrA és una proteïna de fusió, que contacta amb la membrana externa. Aquesta proteïna AcrA pertany a la família de proteïnes fusionades a la membrana que es creu connecten físicament el transportador proteic amb un canal de la membrana externa pel que els antibiòtics poden ser transportats directament fins al medi extern, travessant la barrera que constitueix aquesta membrana externa. Aquest sistema és generalment específic i engloba un gran nombre d'antimicrobians clínicament rellevants a més de les fluoroquinolones. S'ha comprovat que aquest sistema està normalment expressat en cèl·lules salvatges en condicions de creixement en el laboratori, el que dóna lloc a un cert grau de resistència intrínseca. La seva sobreexpressió en cèl·lules mutants provoca una elevada resistència a fluoroquinolones i a altres compostos (Okusu *et al.*, 1996; Poole, 2000). Recentment també s'han descrit mutants de *S. typhimurium* que sobreexpressen la bomba d'expulsió AcrAB, sent més resistents a una ampla varietat d'agents químics entre els que s'inclouen les fluoroquinolones (Giraud *et al.*, 2000).

L'expressió d'*acrAB* està regulada principalment per AcrR, el producte d'un gen repressor localitzat immediatament adjacent als gens d'expulsió, i per MarA, un regulador positiu codificat pel gen *marA* de l'operó *marRAB*. Mutacions en el repressor *acrR* produeixen modestos increments en l'expressió dels gens d'expulsió i, per tant, un lleuger augment en el nivell de resistència als antibiòtics expulsats per aquesta bomba. En canvi, és ben conegut que l'operó *marRAB* d'*E. coli*, també anomenat locus *mar* ("multiple antibiotic resistance"), és on es produeixen les mutacions responsables d'un fenotip de multiple resistència a diferents antimicrobians no relacionats estructuralment entre ells. El gen *marR* codifica el repressor de l'expressió de *marRAB*, mentre que el producte del gen *marA* activa una varietat de gens, entre ells els gens *acrAB* i altres de resposta a l'estrès oxidatiu com per exemple *micF*, que codifica el RNA antisentit que controla l'expressió d'OmpF, *sodA*, que codifica una superòxid dismutasa que conté Mn, i *fpr*, que codifica una ferredoxin reductasa (Aleksun i Levy, 1997); a la vegada

que també activa la seva pròpia expressió. La funció del gen *marB* és encara desconeguda.

S'ha demostrat que una determinada proporció dels aïllats clínics d'*E. coli* amb alts nivells de resistència a fluoroquinolones i que presenten un fenotip de "múltiple resistència a antibiòtics", expressen constitutivament els gens reguladors *marA* o *soxS* (Maneewannakul i Levy, 1996; Oethinger *et al.*, 1998). Tant MarA com SoxS, el regulador positiu del reguló *soxRS*, confereixen un increment de la resistència a diferents antimicrobians no relacionats químicament per activació o depressió d'un determinat nombre de loci genètics que contribueixen al fenotip Mar (Miller i Sulavik, 1996). La proteïna SoxR d'*E. coli* respon als senyals generats per l'estrès oxidatiu activant la transcripció del gen *soxS*, que codifica un altre activador transcripcional que directament estimula els gens encarregats de fer front a aquest estrès oxidatiu (Hidalgo *et al.*, 1998). El locus *soxRS* protegeix a *E. coli* d'una varietat d'espècies reactives de l'oxigen que inclou l'òxid nítric, l'ió superòxid i el peròxid d'hidrogen. Així, SoxS activa tant un determinat nombre de gens per fer front a l'estrès superòxid com gens de resistència a diferents antimicrobians (Alekshun i Levy, 1997).

S'ha demostrat també, en diferents treballs, que l'expressió d'*acrAB* està augmentada en els mutants *marR*, probablement per l'augment de l'expressió del gen *marA*, i que la múltiple resistència a antibiòtics d'aquests mutants està compromesa en soques amb delecions a *acrAB*. La bomba d'expulsió AcrAB juga un paper predominant a l'hora de fer els mutants en el gen *marR* resistents a una varietat d'antimicrobians, ja que en absència d'aquesta bomba els mutants en el gen *marR* no mostren diferències en els valors de CMI_s respecte a les soques salvatges (Okusu *et al.*, 1996; Oethinger *et al.*, 2000). S'ha demostrat també que el gen *marA* augmenta l'expressió tant d'*acrA* com de *tolC* (Poole, 2000). Elevats nivells de MarA també incrementen, com ja s'ha dit, la transcripció del gen *micF*, donant lloc, al mateix temps, a una disminució en l'expressió de la proteïna OmpF. Malgrat això, aquest efecte no seria suficient per explicar els alts nivells de resistència a diferents antibiòtics que presenten els mutants Mar (Cohen *et*

al., 1988). Uns altres dos gens, *robA* i *soxS*, també incrementen l'expressió d'*acrA* i de *tolC*, el que demostra l'elevada complexitat de la regulació dels gens *acrAB-tolC* en *E. coli* (Poole, 2000).

La proteïna MarA és homòloga tant a la proteïna SoxS com a la proteïna RobA, la qual s'uneix a l'origen de replicació d'*E. coli* i als operadors de certs gens induïbles per estrès oxidatiu, com per exemple *sodA* (Ariza *et al.*, 1995). La sobreexpressió d'algun d'aquests dos gens, *soxS* o *robA*, en *E. coli* dóna lloc a un increment de la resistència a solvents orgànics i a un baix nivell de resistència a múltiples agents antibacterians. La sobreexpressió del gen *marA*, al contrari, dóna lloc a un important increment de l'expulsió de diferents antimicrobians, entre els que s'inclouen les fluoroquinolones, la tetraciclina i el cloramfenicol, ja que la transcripció de l'operó *acrAB*, la bomba d'expulsió de múltiples antimicrobians l'expressió de la qual està modulada pel senyals d'estrès, està elevada en les soques que contenen mutacions en el gen *marR* i que mostren un fenotip Mar. La inactivació d'*acrAB*, però, com ja s'ha comentat, dóna lloc a un augment de la susceptibilitat a antimicrobians tant en les soques salvatges com en el mutants Mar (White *et al.*, 1997).

De totes maneres, sembla ser que les mutacions en la DNA girasa, i en la topoisomerasa IV, són els principals factors determinants en l'adquisició dels més alts nivells de resistència a quinolones. Una disminució en la permeabilitat, provocada per canvis en les OMPs, i un augment de l'expulsió activa són complementaris en la determinació de les CMI_s de les quinolones i l'adquisició de mutacions en aquests gens és secundària a l'adquisició de mutacions en els gens que codifiquen les proteïnes diana de les quinolones (Tavío *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 2000; Poole, 2000).

Tots aquests mecanismes addicionals que serveixen per modular en nivell de resistència a quinolones (*acrAB*, *marRAB*, *soxRS*) també s'han estudiat i descrit en *S. typhimurium* (Sulavik *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 2000; Pomposiello i Demple, 2000; Koutsolioutsou *et al.*, 2001; Randall i Woodward, 2001).

1.5.4. Resistència plasmídica a quinolones

Fins fa poc es pensava que la resistència a quinolones era deguda exclusivament a les **mutacions cromosòmiques** que s'han comentat anteriorment. Recentment s'ha descrit nou **mecanisme de resistència associat a un plasmidi** i transmissible entre bacteris (Martínez-Martínez *et al.*, 1998).

Així, en 1998, es va descriure un aïllat multiresistent de *Klebsiella pneumoniae* que contenia un plasmidi d'ampli rang d'hoste que incrementava la resistència a l'àcid nalidíxic de 4 a 32 µg/ml i a la ciprofloxacina de 0,008 a 0,25 µg/ml, en els transconjugants d'*E. coli*. La presència d'aquest plasmidi, anomenat pMG252, facilitava l'aparició de mutants resistents a quinolones amb, fins i tot, nivells més alts de resistència i augmentava el nivell de resistència deguda a mutacions en la DNA girasa, en les porines o en les bombes d'expulsió de 4 a 8 vegades. Degut a que el pMG252 no alterava l'expressió de porines de l'hoste i no reduïa l'acumulació de quinolones, es va suggerir que es tractava d'un nou mecanisme de resistència.

Tran i Jacoby (2002) han estudiat el gen *qnr* del plasmidi pMG252 i han demostrat que la proteïna Qnr purificada és capaç de protegir la DNA girasa d'*E. coli* dels efectes de la ciprofloxacina, però que no té cap activitat de protecció sobre la topoisomerasa IV. Aquesta protecció és proporcional a la concentració de proteïna Qnr, inversament proporcional a la concentració de ciprofloxacina i es perd amb l'ebullició. De la mateixa manera, sembla ser que la proteïna Qnr no estaria involucrada en la inactivació de les quinolones ni tindria una activitat girasa independent, malgrat no estar clar si podria interferir amb la unió de les quinolones a la DNA girasa o bé si desestabilitzaria la formació del complex entre la quinolona, la DNA girasa i la doble cadena de DNA tallada.

La presència del gen *qnr* confereix un baix nivell de resistència, de manera que una soca d'*E. coli* portadora del plasmidi pMG252 podria ser

classificada com a susceptible a ciprofloxacina. La seva importància clínica radica en l'efecte potenciador de la resistència a quinolones que provoca la proteïna Qnr en mutants en el gen *gyrA*. Actualment s'està investigant com de comú és aquest nou mecanisme entre els aïllats clínics.

1.6. DETECCIÓ DE MUTACIONS QUE CONFEREIXEN RESISTÈNCIA A QUINOLONES

A l'hora de detectar mutacions, en la regió QRDR dels gens *gyrA* i *parC*, responsables de conferir un fenotip de resistència bacteriana a quinolones, s'han utilitzat diferents mètodes, cada un amb els seus avantatges i inconvenients. Aquesta detecció de mutacions és important per tal de poder dissenyar estratègies que ajudin a evitar l'aparició de resistències així com nous compostos actius contra les microorganismes resistents. Mètodes com la **seqüenciació**, el "**Restriction Fragments Length Polymorphism**" (RFLP) i el "**Single-Strand Conformation Polymorphism**" (SSCP) han estat àmpliament utilitzats. Recentment s'han descrit nous mètodes ràpids de detecció de mutacions com el "**LightCycler-based PCR-hybridization *gyrA* Mutation Assay**" (GAMA) o el "**Rapid PCR Mismatch Amplification Mutation Assay**" (MAMA PCR).

1.6.1. Seqüenciació

Durant molt de temps, el mètode més utilitzat per diferents autors a l'hora de localitzar mutacions responsables de conferir resistència a quinolones ha sigut el d'amplificar la "regió determinant de resistència a quinolones", tant del gen *gyrA* com del gen *parC*, per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i seqüenciar-la. Mitjançant la comparació de les seqüències obtingudes de soques resistents i salvatges s'han localitzat les mutacions puntuals que provoquen un canvi d'aminoàcid i, per tant, confereixen un fenotip de resistència a les quinolones.

1.6.2. RFLP

En altres treballs s'ha estudiat la presència de mutacions mitjançant el "polimorfisme de la longitud dels fragments de restricció". Es tracta també d'amplificar la regió que es vol estudiar per PCR, tallar els productes de l'amplificació amb un enzim de restricció i carregar la restricció en un gel d'agarosa. S'observa un patró de bandes característic. Si en alguna de les dianes de l'enzim de restricció hi ha una mutació, es perd aquesta diana i, per tant, s'observa un patró de bandes diferent. Aquesta metodologia s'ha aplicat només al gen *gyrA*, basant-se en que el codó Ser-83 forma part del lloc de restricció de l'enzim *Hinfl*. Per tant, amb aquest mètode es pot distingir entre mutants i no mutants en la Ser-83 d'aquest gen, però no se sap quina és la mutació concreta.

1.6.3. SSCP

En aquesta tècnica també es parteix d'una amplificació de la regió a estudiar per PCR. El producte de l'amplificació és desnaturalitzat, obtenint-se ssDNA, el qual es sotmet a una electroforesi en gel de poliacrilamida. El ssDNA mutat presenta una mobilitat diferent a la del ssDNA salvatge, per tant, les mutacions presents en una soca resistent es detecten per l'aparició de bandes en posicions diferents a les que s'observen amb la soca salvatge. Com en el cas anterior, tan sols es determina que hi ha una mutació però no quin codó està mutat ni quina és la mutació concreta.

Tots aquests mètodes són llargs i laboriosos, ja que parteixen d'una extracció del DNA cromosòmic de la soca a estudiar i de l'amplificació per PCR de la regió on es volen detectar mutacions. A més, no permeten analitzar un gran nombre de soques al mateix temps i, en el dos últims casos, s'ha de finalitzar amb la seqüenciació de la regió QRDR de totes les soques mutants si es vol conèixer la mutació concreta.

1.6.4. “Rapid PCR Mismatch Amplification Mutation Assay”, MAMA PCR

El mètode MAMA PCR s’ha desenvolupat per tal de detectar les mutacions més comuns en els gens *gyrA* i *parC* d’*E. coli* associades amb la resistència a quinolones (Qiang et. al., 2002). És necessari obtenir DNA cromosòmic i procedir a l’amplificació d’un fragment determinat per PCR. La detecció de la presència de mutacions es fa, però, per obtenció o no de producte de PCR.

La base d’aquest mètode és que un sol nucleòtid desaparellat en l’extrem 3’ del “primer” revers fa que la *Taq* polimerasa sigui incapaç de realitzar l’extensió des d’aquest “primer”. Per tant, l’absència del producte específic de PCR, acompanyada d’un control intern de PCR positiu, mostra una diferència amb la seqüència de DNA salvatge. S’han utilitzat quatre “primers” MAMA que detecten les seqüències salvatges en les posicions 83 i 87 del gen *gyrA* i en les posicions 80 i 84 del gen *parC*. Per tal d’augmentar l’efecte del desaparellament en posició 3’ s’ha introduït una altra alteració de nucleòtid a prop de l’extrem 3’ de cada “primer”. A cada reacció de PCR s’incorpora el “primer” directe i un “primer” MAMA per a detectar una possible mutació. Aquests “primers” generen un curt producte de PCR a partir del gen salvatge, però no són capaços de donar lloc a aquest producte a partir d’un gen amb una mutació en la posició concreta. S’afegeix també, en cada reacció, un tercer “primer” que s’utilitza com a control positiu, ja que conjuntament amb el “primer” directe genera un producte de PCR més gran, tant a partir dels gens salvatges com a partir de gens que presentin mutacions.

Cada “primer” MAMA és complementari a la seqüència corresponent del gen salvatge, amb un desaparellament introduït en el tercer nucleòtid de l’extrem 3’ del “primer”; per tant, entre el “primer” MAMA i els gens mutants hi ha dos nucleòtids desaparellats en l’extrem 3’ del “primer”. Un sol desaparellament en el tercer nucleòtid de l’extrem 3’ del “primer” MAMA té poca influència a l’hora d’obtenir el producte de PCR, mentre que un desaparellament addicional en l’extrem 3’ del “primer” inhibeix la PCR.

El disseny d'aquest protocol MAMA es diferencia d'altres en que el "primers" utilitzats hibriden amb la seqüència dels gens salvatges, en lloc d'hibridar amb les seqüències mutants. Per tal d'evitar falsos negatius, s'utilitza un segon "primer" revers que genera un producte que serveix com a control positiu de la PCR. Altres protocols de MAMA PCR, dissenyats per tal d'amplificar les seqüències gèniques mutants, detecten canvis específics de nucleòtid en una posició determinada del gen. Canvis alternatius no són detectats. Mutacions adjacents al nucleòtid particular estudiat també poden donar lloc a un canvi d'aminoàcid que alteraria les CMI_s de les quinolones i sí que són detectades amb aquest nou mètode. Malgrat això, aquest mètode té un seguit de limitacions. Així, no s'identifica la mutació concreta i a més a més també es detecten canvis en la tercera base del codó, els quals no tenen perquè donar lloc necessàriament a un canvi d'aminoàcid en el producte gènic.

1.6.5. "LightCycler-based PCR-hybridization *gyrA* mutation assay", GAMA

També recentment s'ha desenvolupat un mètode basat en l'aplicació de la tècnica de PCR a temps real que permet la detecció de les mutacions al mateix temps que s'amplifica el DNA per PCR (Walker et. al., 2001). Amb aquesta metodologia s'evita el requeriment de la seqüenciació i es redueix considerablement el temps necessari, però cal disposar d'un termociclador a temps real.

Es tracta d'amplificar una regió del gen *gyrA*, que comprèn els nucleòtids entre els codons 71 i 102, acompanyada de la detecció simultània de la formació de producte pel "LightCycler software", utilitzant el fluoròfor Sybr Green 1 (SG1) que és específic del DNA de doble cadena. El nivell de fluorescència del SG1 augmenta a mesura que la quantitat de producte de PCR es duplica en cada cicle i això es mesura a través del canal 1 (longitud d'ona: 530 nm) del LyghtCycler. El producte de PCR és, posteriorment, desnaturalitzat i es permet la hibridació amb una sonda d'oligonucleòtids

específica d'una mutació puntual en el gen *gyrA* i que està marcada amb el fluoròfor Cy5. La hibridació d'aquesta sonda amb la seva cadena de DNA diana dóna lloc a un augment de la fluorescència del Cy5 com a resultat del fenomen conegut amb el nom de "fluorescence resonance energy transfer" (FRET) entre el SG1 i el Cy5. Això es mesura a través del canal 3 (longitud d'ona: 710 nm). En aquests moments, s'augmenta la temperatura i la sonda i la seva diana es dissocien. L'augment de temperatura fins a 94°C provoca un descens de la fluorescència del Cy5 ja que la sonda i la seva diana es dissocien i el Cy5 i el SG1 no estan suficientment pròxims com per a que tingui lloc el FRET.

Si la mutació puntual que detecta la sonda no està present, el desaparellament de la sonda amb la seva diana desestabilitza l'híbrid, pel que el descens de la fluorescència tindrà lloc a una T_m menor que la d'un híbrid en el que no hi hagin aparellaments incorrectes.

Aquesta metodologia, en teoria, pot ser aplicable a la detecció de qualsevol mutació, només cal dissenyar les diferents sondes específiques per a cada cas i posar a punt les millors condicions d'amplificació i detecció. Fins ara s'ha aplicat a l'estudi de mutacions en el gen *gyrA* de *S. typhimurium* (Walker *et al.*, 2001) i s'ha utilitzat per a comparar la presència de mutacions en aquest gen en diferents serovarietats de l'espècie *S. enterica* (Liebana *et al.*, 2002). Altres autors han aplicat aquest mètode per a detectar mutacions en el gen *gyrA* d'altres espècies bacterianes com per exemple *Campylobacter coli* (Carattoli *et al.*, 2002), *Neisseria gonorrhoeae* (Li *et al.*, 2002) i *Yersinia pestis* (Lindler *et al.*, 2001). Com a exemple d'altres possibles aplicacions, s'ha utilitzat també per a detectar mutacions en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, responsables de conferir resistència a rifampicina (Edwards *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002; García de Viedma *et al.*, 2002).

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

La finalitat principal d'aquest treball ha estat l'estudi de les mutacions relacionades amb la resistència a quinolones, en diferents aïllats d'*E. coli* i de *S. typhimurium*, a través del desenvolupament i l'aplicació de diferents mètodes.

Les soques estudiades s'han obtingut del Laboratori de Sanitat Animal del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya i de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Les dades disponibles al moment de començar aquest treball indicaven que la majoria d'aïllats d'*E. coli* d'origen humà eren resistents a l'àcid nalidíxic, mentre que entre els aïllats d'animals el percentatge de resistents era més baix. Per altra banda, el percentatge d'aïllats de *S. typhimurium* dins del gènere *Salmonella* era molt alt entre les soques d'origen animal i amb menys incidència entre les d'origen humà. A més a més, la majoria de les soques de *S. typhimurium* aïllades d'animals eren sensibles a l'àcid nalidíxic. En funció d'aquests antecedents i del comentat a la Introducció d'aquesta memòria, els objectius concrets de la Tesi que es presenta han sigut els següents:

1. Desenvolupament i aplicació de diferents metodologies per tal de poder identificar determinades mutacions en el gen *gyrA* d'*E. coli* i de *S. typhimurium*, i en el gen *parC* d'*E. coli*.
2. Estudi de les mutacions presents en els gens *gyrA* i *parC* de les soques d'*E. coli* aïllades en el Laboratori de Sanitat Animal des de l'any 1994 fins al 2000, i d'una representació de les soques d'*E. coli* resistents a l'àcid nalidíxic aïllades en l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre els anys 1993 i 2000.
3. Estudi comparatiu dels aïllats d'*E. coli* resistents a l'àcid nalidíxic d'origen animal i humà pel que fa a les mutacions en els gens *gyrA*

i *parC* i a la seva susceptibilitat a les fluoroquinolones i a altres antimicrobians.

4. Estudi de les mutacions el en gen *gyrA* d'aïllats d'origen animal de *S. typhimurium* resistents a l'àcid nalidíxic, aïllats en el Laboratori de Sanitat Animal entre els anys 1992 i 1998, i de la seva susceptibilitat a les fluoroquinolones i a altres antimicrobians.