

5. DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

En atenció als objectius d'aquest treball, aquest apartat s'ha dividit en dues parts, en les quals es discuteixen els resultats més remarcables obtinguts en l'estudi de les soques d'*E. coli* i de *S. typhimurium*, respectivament.

PART A. *Escherichia coli*

L'estudi de les mutacions associades amb la resistència a quinolones en *E. coli* s'ha realitzat determinant les mutacions presents en la regió QRDR tant del gen *gyrA* com del gen *parC*, els quals codifiquen les dianes primàries d'acció d'aquests antimicrobians (Yoshida *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990a; Vila *et al.*, 1994; Khodursky *et al.*, 1995; Heisig, 1996; Vila *et al.*, 1996; etc.). Per a realitzar aquest estudi s'ha desenvolupat i posat a punt un mètode que parteix de colònies de les soques a analitzar, les quals s'hibriden amb sondes específiques. Les sondes emprades detecten els codons salvatges Ser83 (E.coliSer83) i Asp87 (E.coliAsp87), així com la mutació majoritària Ser83 → Leu (E.coliLeu83) en el gen *gyrA* i els codons salvatges Ser80 (E.ParCSer80 i E.ParCSer80(T)) i Glu84 (E.ParCGlu84) en el gen *parC* d'*E. coli*.

L'elevada especificitat i sensibilitat de les sondes E.coliSer83 i E.coliLeu83 (Taula 4.15) ha permès separar les soques d'*E. coli* en dos grups, salvatges i mutants en el codó 83 del gen *gyrA*, i a més a més identificar els mutants Ser83 → Leu. L'elevada especificitat d'aquestes sondes és deguda a que pràcticament totes les soques de seqüència coneguda hibriden correctament amb les dues sondes. La soca d'origen humà EC-469, aïllada d'una mostra d'orina intrahospitalària l'any 2000, va donar resultats negatius en totes les hibridacions realitzades. Això és degut a que presenta la mutació Ser83 → Ala. Per altra banda, el 88,89% de sensibilitat de la sonda E.coliSer83 es deu a que dues soques, EC-1 i EC-390, no van hibridar segons s'esperava amb aquesta sonda. Així, les dues

són salvatges en el codó 83, però la EC-390, aïllada de porc l'any 1999, hibrida amb la sonda E.coliLeu83, mentre que la EC-1, soca de col·lecció procedent del Laboratori de Sanitat Animal, no hibrida amb cap de les dues sondes. Els resultats obtinguts semblen indicar que una única mutació en el codó 84 (Ala84 → Ser) no impedeix la hibridació correcta de les dues sondes, mentre que una mutació addicional en el codó 85 dóna lloc a una manca d'hibridació. Així, les soques EC-27 i EC-59, aïllades de porc l'any 1997 i de conill el 1996, respectivament, que tenen una mutació en el codó 84 a més de la del 83, hibriden correctament, mentre que la soca EC-1, que conté mutacions silencioses en els codons 84 i 85, com ja s'ha indicat, no hibrida amb cap de les dues sondes. Finalment, cal també assenyalar que tres soques (EC-32, EC-54 i EC-435) que tenen una seqüència salvatge hibriden amb les dues sondes, fet que també contribueix a que l'especificitat de la sonda E.coliLeu83 sigui inferior al 100%.

De la mateixa manera, a partir de la hibridació amb la sonda E.ParCGlu84 s'han pogut identificar les soques salvatges i els mutants en el codó 84 del gen *parC*. Només 5 soques de 30 salvatges en aquesta posició no hibriden amb la sonda E.ParCGlu84, però la majoria d'aquestes han donat també problemes d'hibridació amb altres sondes, que es poden atribuir, probablement, a la llisi cel·lular deficient o bé a una baixa eficiència de la transferència i fixació del DNA al filtre.

Pel contrari, la baixa especificitat i sensibilitat de la sonda E.coliAsp87 (Taula 4.15) no ha permès una acurada separació de les soques mutants i salvatges en el codó 87 del gen *gyrA*, malgrat s'han modificat diferents condicions experimentals, com el temps de llisi de les cèl·lules o el temps i la temperatura d'hibridació. Aquests resultats podrien explicar-se per l'elevada variabilitat que s'ha trobat en la seqüència del codó 87 i també en la dels 84 i 85 del gen *gyrA* (Taula 4.10), la qual sembla afectar a una hibridació correcta de la sonda E.coliAsp87. En aquest sentit, cal indicar que de les 24 soques que són salvatges en el codó 87 i presenten una mutació silenciosa en el codó 85, 17 d'elles hibriden correctament amb la sonda i d'entre els 7 que no hibriden 3 contenen també una mutació en el codó 84. Igualment, dels vuit

mutants que hibriden amb la sonda E.coliAsp87, quatre presenten també una mutació silenciosa en el codó 85.

De la mateixa manera, la hibridació amb les sondes E.ParCSer80 i E.ParCSer80(T), que hibriden amb els codons salvatges AGC i AGT, respectivament, de la Ser80 del gen *parC*, tampoc ha permès una bona identificació de les soques salvatges i mutants en aquesta posició, si bé els resultats han estat força millors que els comentats anteriorment per a la sonda E.coliAsp87. Les dues sondes salvatges per a la posició 80 del gen *parC* presenten un grau d'especificitat molt elevat (Taula 4.15), a diferència del que presenta la sonda E.coliAsp87, el que permet considerar la hibridació positiva amb alguna d'aquestes dues sondes com un resultat amb un alt grau de fiabilitat. Pel contrari, la sensibilitat d'aquestes dues sondes és inferior a la de la sonda E.coliAsp87, però la combinació dels resultats obtinguts a partir de la hibridació amb les dues sondes salvatges per a la posició 80 del gen *parC* ha servit per a determinar la presència o no d'una mutació en aquesta posició amb un cert grau de fiabilitat. Donada la baixa variabilitat detectada en aquesta regió, pot suggerir-se la formació de determinades estructures secundàries en la regió en la que hibriden les sondes E.ParCSer80 i E.ParCSer80(T), que interfereixin amb una hibridació específica d'aquestes sondes.

Malgrat les dificultats comentades, l'utilització d'aquesta metodologia, conjuntament amb l'estudi de la susceptibilitat a les quinolones, ha permès identificar les mutacions presents en 149 soques de les 206 estudiades. De les 57 soques restants, o bé ja es coneixia la seva seqüència pels estudis preliminars de seqüenciació o bé s'han seqüenciat amb posterioritat per a determinar les mutacions que contenen.

Dels diferents estudis que s'han realitzat amb les soques d'*E. coli* destaquen els següents aspectes:

- **Susceptibilitat a quinolones**

Com ja s'ha comentat, la major part de les soques d'*E. coli* que s'aïllen d'humans són resistents a l'àcid nalidíxic, mentre que aquest percentatge és més baix entre els aïllats d'animal. Quan s'analitza la susceptibilitat a quinolones de les soques d'origen animal (Taula 4.3) s'observa que el percentatge de resistents a fluoroquinolones és de tan sols al voltant d'un 30%, i que aquest percentatge augmenta fins a un 40% entre les soques Nal^R (Taula 4.4). Malgrat això, la incidència de resistència a fluoroquinolones en soques Nal^R d'origen animal és inferior a l'obtingut amb les de procedència humana.

També és de senyalar que la resistència a fluoroquinolones sembla ser diferent entre els aïllats d'animals diferents. Així, les soques de boví són amb les que s'ha obtingut un percentatge més alt de resistents, mentre que les de conill són les que el presenten més baix. Igualment, és de destacar que entre els aïllats l'any 1994 es troba el percentatge més alt de resistents a les fluoroquinolones i que aquest percentatge disminueix en els anys posteriors. Això també s'observa, en certa manera, entre les soques aïllades d'humans. Així, els aïllats intrahospitalaris presenten un percentatge de resistents a les fluoroquinolones superior al de les soques extrahospitalàries.

- **Mutacions en les regions QRDR dels gens *gyrA* i *parC***

Els resultats obtinguts al seqüenciar les regions QRDR dels gens *gyrA* (56 soques) i *parC* (32 soques) indiquen que la majoria de soques són mutants en el codó 83 del gen *gyrA* i que moltes d'elles són salvatges pels codons 87 del gen *gyrA* i pel 80 del gen *parC*, sent pràcticament totes salvatges pel codó 84 del gen *parC* (Taulas 4.11, 4.13 i 4.14).

Pel que fa al codó 83 del gen *gyrA*, s'ha determinat que la mutació majoritària és el canvi Ser83 → Leu, ja que més d'un 97% de les soques seqüenciades que contenen una mutació en aquesta posició presenten aquest canvi (Taula 4.10). Això concorda perfectament amb el que hi ha descrit, ja que tan sols en poques ocasions s'ha detectat una mutació diferent en aquesta posició. En aquest sentit, també en el conjunt de soques estudiades en aquest treball només s'ha detectat una mutació diferent, el canvi Ser83 → Ala en la soca EC-469, ja descrit prèviament per altres autors (Hallett i Maxwell, 1991; Tavío *et al.*, 1999).

De la mateixa manera, la majoria de mutacions detectades en el codó 87 del gen *gyrA* (Taula 4.10) són mutacions ja conegudes (Asp87 → Gly, Asp87 → Asn i Asp87 → Tyr), a excepció del canvi Asp87 → Ala de la soca EC-64, aïllada de conill l'any 1997, descrit per primera vegada en aquest treball (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).

A més de les mutacions en aquests dos codons, diferents treballs de selecció *in vitro* de mutants resistents a quinolones havien trobat determinats canvis en els codons 67, 82 i 106 del gen *gyrA* (Yoshida *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990a; Hallett i Maxwell, 1991; Truong *et al.*, 1997). Segons els resultats presentats en aquesta memòria i els obtinguts per altres autors, semblaria que aquests canvis només es donen *in vitro*, ja que en cap dels aïllats *in vivo* estudiats fins al moment s'han detectat mutacions en aquests codons. Per altra banda, i a diferència del descrit en alguns aïllats *in vivo* (Moniot-Ville *et al.*, 1991; Cambau *et al.*, 1993; Truong *et al.*, 1997), no s'han trobat mutants en el codó 81, però sí en el 84, detectant-se un nou canvi, Ala84 → Ser (Taula 4.10), no conegut fins al moment. Aquesta mutació, com ja s'ha comentat, es troba en les soques EC-27 i EC-59, aïllades de porc l'any 1997 i de conill l'any 1996, respectivament.

Pel que fa al codó 80 del gen *parC*, s'ha comprovat també que el residu "salvatge" en aquesta posició (Ser80) pot estar codificat per dos codons diferents, AGC o AGT, però la proporció amb la que es troben és diferent a la descrita. Així, en les soques estudiades en aquest treball el codó majoritari és l'AGC (Taula 4.12), mentre que s'havia reportat que, de 16 soques seqüenciades, 13 presentaven el codó AGT en la posició Ser80 del gen *parC* (Vila *et al.*, 1996). Aquests resultats podrien indicar una possible relació de clonalitat entre els grups de soques analitzades en els dos treballs. Pel que fa a les mutacions en aquesta posició no s'ha detectat cap mutació diferent a les ja conegudes (Ser80 → Ile i Ser80 → Arg). D'entre les soques seqüenciades, només dues són mutants en la posició 84 del gen *parC* (Taula 4.12), presentant la mutació descrita Glu84 → Lys (Heisig, 1996; Vila *et al.*, 1996; Bagel *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 2001). Finalment, indicar que no s'ha detectat, en el conjunt de soques estudiades, cap canvi diferent als coneguts en la seqüència analitzada del gen *parC*.

• **Classificació de les soques segons les mutacions estudiades i el seu origen**

Com s'ha indicat a l'apartat de Resultats d'aquesta memòria, la hibridació de les colònies amb les sondes E.coliSer83, E.coliLeu83 i E.ParCGlu84 ha permès la identificació de les soques salvatges i mutants en els codons 83 del gen *gyrA* i 84 del gen *parC*. Pel contrari, les dificultats trobades amb el mètode d'hibridació amb les sondes E.coliAsp87, E.ParCSer80 i E.ParCSer80(T) ha fet necessari utilitzar altres paràmetres per tal d'aconseguir els objectius proposats i, finalment, aplicant els criteris comentats a l'apartat 4.3.3, s'han classificat les soques en vuit grups mutacionals (Taules 4.16 i 4.17).

Estudis amb mutants d'*E. coli* seleccionats *in vitro* suggerien que les mutacions en el gen *gyrA* donen lloc primer a una substitució de la Ser83 i, després, a un canvi a l'Asp87 (Heisig i Tschorny, 1994). Les dades

reportades a la bibliografia amb mutants d'*E. coli* aïllats *in vivo* són consistents amb aquesta successió de mutacions, ja que gairebé tots els mutants simples presenten substitucions en la Ser83, i molts dels aïllats amb canvis a l'Asp87 són també mutants en la Ser83 (Ozeki *et al.*, 1997). Els resultats obtinguts en aquest treball concorden també amb aquesta hipòtesi, ja que tan sols un 8,33% de les soques d'*E. coli* Nal^R d'origen animal presenten una única mutació en l'Asp87, mentre que no n'hi ha cap d'origen humà que pertanyi a aquest grup. La resta de soques Nal^R, a excepció d'una aïllada d'humans que no presenta cap mutació, contenen com a mínim una mutació en la Ser83.

S'ha de destacar també que, tal i com està àmpliament descrit a la bibliografia (Heisig, 1996; Vila *et al.*, 1996; Bagel *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 2001), no s'han detectat mutacions en el gen *parC* sense la presència, a més a més, d'alguna mutació en el gen *gyrA*. Per tant, els resultats obtinguts en aquest treball indiquen també que el primer punt d'adquisició de mutacions, responsables de conferir un fenotip de resistència a les quinolones, estaria a nivell del gen *gyrA*, i concretament del codó que codifica la Ser83, mentre que les mutacions en el gen *parC* serien secundàries i de posterior aparició.

Tal com seria esperable, de les 34 soques d'*E. coli* d'origen animal estudiades que són sensibles o presenten un nivell intermig de susceptibilitat a l'àcid nalidíxic, 31 d'elles no presenten cap mutació ni en el gen *gyrA* ni en el gen *parC* i només 3 presenten una única mutació en el codó 87 del gen *gyrA* (Taula 4.16). Aquestes soques són també sensibles a les tres fluoroquinolones, exceptuant el comentat a l'apartat de Resultats sobre la soca A-033, aïllada d'au l'any 1999, que només és resistent a l'enrofloxacina (Taula 4.21). L'única soca d'origen humà en la que no s'ha detectat tampoc cap mutació és, pel contrari, resistent a l'àcid nalidíxic encara que també és sensible a les tres fluoroquinolones (Taula 4.22). Per tant, és probable que aquesta soca tingui altres mecanismes de resistència diferents que li confereixin aquesta característica.

A més a més, 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* (Taula 4.17). Així, mentre que més d'un 51% de les soques d'humans presenten tres mutacions, dues en el gen *gyrA* i una en el gen *parC*, aquest percentatge és de tan sols d'un 24% aproximadament per a les d'origen animal. Entre aquestes últimes no s'han trobat tampoc soques amb quatre mutacions. Per tant, és important destacar que el percentatge de soques amb tres i quatre mutacions és més elevat entre les d'origen humà que entre les procedents d'animals. El percentatge de mutants simples en el codó 83 del gen *gyrA* és molt similar entre les soques aïllades dels dos orígens, mentre que el de dobles mutants és de més d'un 27% entre les d'origen animal i de només un 5%, aproximadament, entre les d'humans. Un altra diferència observable és, com ja s'ha comentat, 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%. D'aquests resultats es pot deduir que les soques procedents d'humans acumulen un nombre més elevat de mutacions que les d'animals. Això està d'acord amb que el percentatge de resistents a les fluoroquinolones sigui més elevat en els aïllats d'humans que en els d'origen animal.

Mentre que en altres membres de la família *Enterobacteriaceae* una única mutació en el gen *gyrA* pot ser suficient per a donar lloc a elevats nivells de resistència a les quinolones, en *E. coli* s'ha proposat que l'acumulació de mutacions en els gens *gyrA* i *parC* és la causa de la disminució de la susceptibilitat a aquests compostos (Weigel *et al.*, 1998). Així, els mutants simples en el codó Ser83 del gen *gyrA* d'*E. coli* són resistents a l'àcid nalidíxic, però segueixen sent susceptibles a les fluoroquinolones, si bé amb una susceptibilitat reduïda (McDonald *et al.*, 2001) i l'acumulació d'altres mutacions en les gens *gyrA* i *parC* donen lloc a mutants múltiples amb una susceptibilitat a les fluoroquinolones encara més baixa o a resistents a aquests antimicrobians en diferent grau segons siguin les mutacions acumulades (Vila *et al.*, 1996). Els resultats obtinguts en aquest treball estan d'acord amb el proposat per Vila i col·laboradors (1996). Així, 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; dos canvis, un en el gen *gyrA* i un segon en el *parC*, confereixen una menor susceptibilitat a fluoroquinolones; tres substitucions, dues en el gen *gyrA* i una en el *parC*, estan associades amb resistència a aquests compostos; i quatre canvis, dos en el gen *gyrA* i dos en el gen *parC*, donen lloc a alts nivells de resistència.

En aquest treball s'ha comprovat que la presència d'una única mutació en el codó 83 del gen *gyrA* dona lloc a un fenotip de resistència a l'àcid nalidíxic i de susceptibilitat reduïda a les fluoroquinolones. Una gran part de les soques d'aquest grup segueixen sent, però, sensibles a les fluoroquinolones, encara que algunes presentin uns nivells de susceptibilitat intermitjos a algun d'aquests antimicrobians (Taules 4.21 i 4.22). Encara que la immensa majoria dels mutants simples presenten una única mutació en el codó 83 del gen *gyrA*, s'han detectat també 10 mutants simples en el codó 87 del mateix gen, sent la majoria resistents a l'àcid nalidíxic i sensibles a les fluoroquinolones (Taula 4.21). En aquest grup mutacional també hi ha algunes soques sensibles o amb un nivell de susceptibilitat intermig a l'àcid nalidíxic. L'efecte d'una mutació en el codó 87 del gen *gyrA* en la susceptibilitat a quinolones és un tema de controvèrsia. Diferents autors han associat aquest succés mutacional a una disminució de la susceptibilitat a fluoroquinolones en soques que ja presentaven una mutació en el codó 83 del gen *gyrA* (Heisig i Tschorny, 1994; Vila *et al.*, 1996; Ozeki *et al.*, 1997; Weigel *et al.*, 1998), mentre que d'altres han indicat que una substitució en l'Asp87 per Gly o Asn és comparable a la resistència atribuïble a la mutació Ser83 → Leu (Ouabdesselam *et al.*, 1995). Els resultats obtinguts per seqüenciació de la regió QRDR dels gens *gyrA* i *parC* de tres de les soques que presenten una mutació en el codó 87 del gen *gyrA* indiquen que aquestes soques només contenen el canvi Asp87 → Gly, sent resistents a l'àcid nalidíxic encara que amb una CMI inferior a 342,64 µg/ml, que és el màxim detectable amb la metodologia emprada. Probablement les diferències de susceptibilitat trobades en aquest treball i en altres estudis en

els mutants en el codó 87 del gen *gyrA* siguin atribuïbles a altres mecanismes de resistència a aquests antimicrobians.

En aquest treball s'han detectat dos tipus de dobles mutants: els que presenten una doble mutació en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* i els dobles mutants en els codons 83 del gen *gyrA* i 80 del *parC*. És de destacar que aquests grups mutacionals estan molt més representats entre els aïllats d'animal que d'humans i que es caracteritzen per ser resistents a totes les quinolones, presentant diferents nivells de susceptibilitat a les fluorades. A més a més, moltes d'aquestes soques presenten, fins i tot, el més alt nivell de resistència detectable a les fluoroquinolones (Taules 4.21 i 4.22). Aquestes diferències en la susceptibilitat han de poder explicar-se per la presència d'altres mecanismes de resistència. El mateix s'observa amb els triples mutants, amb dues mutacions en el gen *gyrA* (codons 83 i 87) i una mutació en el gen *parC* (codó 80 o 84). És de senyalar que els aïllats d'humans d'aquest grup mutacional són els que presenten el nivell més alt de resistència a les fluoroquinolones i que el triple mutant del grup VI mostra un patró de resistència molt diferent. Així, la soca EC-436, aïllada d'una mostra d'orina extrahospitalària l'any 2000, que conté una mutació en el codó 83 del gen *gyrA* i dues en el *parC*, és resistent a l'àcid nalidíxic però tan sols presenta un nivell intermig de susceptibilitat a les tres fluoroquinolones. Caldria fer estudis posteriors per a determinar si aquesta soca té una permeabilitat reduïda a les fluoroquinolones, fet que podria explicar el patró de resistència observat. La majoria de les soques que presenten quatre mutacions, dues en el gen *gyrA* i dues en el gen *parC*, són altament resistents a les fluoroquinolones, el que concorda amb el descrit prèviament (Vila *et al.*, 1996).

S'ha estudiat també la susceptibilitat de totes les soques a cinc antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones, com són la tetraciclina, el cloranfenicol, dos derivats de penicil·lina com l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina i una cefalosporina com la cefalexina. El més destacable en l'anàlisi dels resultats obtinguts és que la majoria de soques Nal^{R} són resistents a tres o quatre d'aquests antimicrobians (Taula 4.25). A més a

més, entre les soques d'origen humà es troba un percentatge importat de resistents als cinc antimicrobians, així com una major variabilitat en els patrons de resistència que entre les soques d'origen animal. Hi ha també clares diferències entre les soques d'origen animal i humà pel que fa al percentatge de sensibilitat als antimicrobians estudiats. Així, un 29,76% dels aïllats d'animal són sensibles o resistents únicament a tetraciclina, front al 14,77% entre els aïllats d'humans. Per tant, en general, el conjunt de soques d'origen humà estudiades són també multiresistents a altres antimicrobians, a més de ser les que presenten el percentatge més alt de resistents a les fluoroquinolones.

S'han analitzat conjuntament les dades sobre la presència de mutacions, la susceptibilitat a les quinolones i la resistència a antimicrobians diferents, per tal de poder observar si hi ha alguna relació entre tots aquests paràmetres. És destacable d'aquest anàlisi que dins del grup de soques d'origen animal sensibles o amb una susceptibilitat intermèdia a l'àcid nalidíxic i que no presenten cap mutació, més d'un 68% són sensibles o únicament resistents a un dels cinc antimicrobians assajats i que només un 29% presenten resistència a tres o quatre d'aquests antimicrobians (dades no presentades). La soca EC-435 d'origen humà, aïllada d'una mostra d'orina extrahospitalària l'any 2000, que tampoc presenta cap mutació i, pel contrari, és resistent a l'àcid nalidíxic i sensible a les fluoroquinolones, presenta resistència als dos derivats de la penicil·lina. És també interessant comentar que els percentatges de soques multiresistents són més alts en la mesura que les soques acumulen mutacions en els gens *gyrA* i *parC*, amb el consegüent increment de resistència a les quinolones. Aquesta observació és vàlida tant per a les soques Nal^{R} d'origen animal com humà amb tres o quatre mutacions o fins i tot amb dues (Taules 4.28 i 4.29). Un patró diferent és l'observat amb la soca EC-436, abans esmentada. Així, malgrat contenir les tres mutacions indicades anteriorment i ser resistent a l'àcid nalidíxic i presentar una susceptibilitat intermèdia a les fluoroquinolones, és sensible a la resta d'antimicrobians estudiats.

A part de les diferències comentades entre les soques aïllades d'animals i d'humans, un altre fet destacable és que entre les soques Nal^{R} aïllades d'animal hi ha una correlació entre les mutacions que presenten i el tipus d'animal del qual van ser aïllades. Així, les soques de conill presenten majoritàriament una única mutació en el gen *gyrA* mentre que les d'au, boví i porc són tant mutants simples en el gen *gyrA*, com dobles i triples mutants (Taula 4.19). Això coincideix amb el fet que les de conill són les que presenten un percentatge més baix de resistents a les fluoroquinolones (Taula 4.6). Quan es té en compte també la resistència a altres antimicrobians s'observa que aquestes soques, a més a més, són majoritàriament només resistents a la tetraciclina, mentre que les d'au i les de boví i de porc presenten, respectivament, resistència a tres o a quatre d'aquests antimicrobians (Taula 4.26). Aquestes relacions s'observen també amb les soques aïllades d'humans. Així, s'ha trobat un percentatge més alt de soques que presenten tres mutacions, front al de mutants simples en el codó 83 del gen *gyrA*, entre les soques de procedència intrahospitalària, sent aquests percentatges similars per a les soques de procedència extrahospitalària (Taula 4.20). A més a més, les soques de procedència intrahospitalària són, en percentatge, més resistents a les fluoroquinolones que les de procedència extrahospitalària, tot i que els percentatges més alts corresponen a les soques de procedència no determinada (Taula 4.9). Pel contrari, el percentatge de soques resistents a tres, quatre o cinc antimicrobians és més alt entre les de procedència extrahospitalària que entre les intrahospitalàries (Taula 4.27), si bé és en el conjunt de soques de procedència no determinada on s'obté un percentatge més elevat de resistents als cinc antimicrobians no relacionats amb les quinolones. Totes aquestes diferències comentades podrien indicar una elevada clonalitat entre les soques aïllades del mateix tipus d'animal o de col·lectius d'humans determinats. També podrien ser conseqüència d'una determinada pràctica en medicina veterinària, pel que fa a l'ús d'antimicrobians en les diferents explotacions ramaderes, i igualment podrien assenyalar una selecció de determinades resistències, en funció de l'ús d'antimicrobians en l'hospital, diferent al de la pràctica extrahospitalària.

Els resultats obtinguts en aquest treball amb les soques d'*E. coli* Nal^R indiquen que el 55% de les soques d'origen 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 estudiades 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.

Diferents autors han indicat que l'elevat predomini de soques d'*E. coli* resistents a quinolones detectat en la seva àrea en gent sana, fins i tot en nens, pot estar associat a la selecció d'aquestes soques resistents en aus de corral i porcs, i han proposat que per a controlar la disseminació de la resistència a quinolones es requereix un ús prudent d'aquests antimicrobians no només en humans, sinó també en medicina veterinària (Garau *et al.*, 1999). En aquesta mateixa línia, s'ha proposat la necessitat de controlar l'ús de fluoroquinolones en animals, per tal de preservar la utilitat d'aquests compostos per al tractament d'infeccions en els humans (Bazile-Pham-Khan *et al.*, 1996, White *et al.*, 2000). Per altra banda, cada vegada es fa més èmfasi en la necessitat de controlar l'ús de fluoroquinolones a nivell clínic, ja que això pot comportar una important pressió selectiva i desenvolupar alts nivells de resistència a aquests antimicrobians en els patògens d'humans (Lehn *et al.*, 1996, Ozeki *et al.*, 1997, Goettsch *et al.*, 2000, McDonald *et al.*, 2001). Els resultats obtinguts en aquest treball reforcen també totes aquestes propostes ja que indiquen que, si bé ha de restringir-se l'ús d'antimicrobians en els animals, és probablement en la pràctica mèdica on ha de realitzar-se una decidida política sobre l'ús correcte de quinolones i d'altres antimicrobians. En aquest sentit, l'alt percentatge de soques d'origen humà tant intra com extrahospitalàries que deuen presentar canvis a nivell

de permeabilitat de la membrana o de les bombes d'expulsió i que, a més a més, són en general multiresistents a diferents antimicrobians, suggereix que no tan sols l'ús de quinolones pot ser la causa d'aquest fenomen. Així, a més dels successos mutacionals en les gens *gyrA* i *parC*, associats directament a les quinolones, la selecció de soques amb altres mecanismes de resistència deu estar relacionada, probablement, amb l'ús de diferents antimicrobians i aquest fenomen sembla tenir molta major incidència en la pràctica mèdica en humans que en medicina veterinària.

• Agrupació de les soques segons les CB i relació amb les mutacions

Quan s'ha determinat la relació existent entre les soques d'*E. coli* estudiades en aquest treball, a través de la construcció de dendogrames de similituds relatives a partir de les cinètiques bioquímiques obtingudes, s'ha vist que el grau de relació entre les aïllades d'animal és més elevat que entre les d'humans. Encara que algunes de les soques aïllades d'humans estan també altament relacionades entre elles, la majoria presenten uns valors de similitud relativa inferiors al 95%. És de ressaltar que les soques d'animals s'agrupen preferentment segons el tipus d'animal del qual provenen i l'any d'aïllament. 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. De fet, amb les soques d'origen humà s'obtenen diversos grups de procedència intra i extrahospitalària, també amb un grau de similitud relativa més baix que els grups determinats en les soques d'origen animal.

És important destacar que les soques incloses en cada un dels grups es caracteritzen, en general, per presentar el mateix patró mutacional en els gens *gyrA* i *parC* i, en molts casos, la mateixa susceptibilitat a quinolones i

també el mateix patró de resistència a altres antimicrobians. De totes maneres, també s'observen grups que inclouen soques molt semblants, aïllades en anys diferents, amb un patró mutacional diferent, suggerint l'adquisició de mutacions. Així, per exemple, les soques EC-67 i EC-186, aïllades, respectivament, en 1996 i 1998 a partir d'au, tenen una similitud relativa del 97%. La primera soca és un mutant simple en el codó 83 del gen *gyrA*, mentre que la segona conté, a més a més, una segona mutació en el codó 87 del mateix gen. Resultats com l'indicat podrien suggerir una selecció *in vivo* de la soca EC-186 deguda, probablement, al tractament amb quinolones, derivada de la EC-67. En qualsevol cas, la impossibilitat d'accedir a la informació referent als tractaments amb antimicrobians a que van ser sotmesos els animals dels quals s'han aïllat les soques d'*E. coli* estudiades en aquest treball, dificulta obtenir conclusions en aquesta línia i el mateix és aplicable a les soques d'origen humà.

En base als resultats obtinguts amb *E. coli* es proposa, com a disseny experimental en futurs estudis, determinar en primer lloc els grups de relació segons els CB, escollir algunes soques de cada grup i determinar la seva susceptibilitat a les quinolones i a altres antimicrobians, així com les mutacions presents en els gens *gyrA* i *parC*, mitjançant hibridació amb les sondes dissenyades. Finalment comparar tots els resultats obtinguts i, en aquells casos en els que no hi hagi concordància entre els diferents paràmetres analitzats, procedir a seqüenciar les regions QRDR d'aquests gens. Per tal de realitzar aquesta seqüenciació de forma ràpida, s'ha posat a punt un mètode de seqüenciació de les regions QRDR dels gens *gyrA* i *parC* directament des del producte amplificat per PCR. L'aplicació d'aquesta metodologia facilita enormement l'estudi d'una elevada quantitat de soques en un període de temps relativament curt.

PART B. *Salmonella typhimurium*

Per a realitzar aquest treball s'han escollit la major part de les soques resistents a l'àcid nalidíxic aïllades en el Laboratori de Sanitat Animal entre els anys 1992 i 1998. Així, com s'observa a la següent taula, s'han estudiat totes les soques NaI^R aïllades en aquests anys, a excepció de les obtingudes en el 1994. També s'aprecia, en aquesta taula, que el percentatge de soques NaI^R és en general baix, a excepció també de les aïllades l'any 1994. Menys un 12,77% de soques aïllades l'any 1992 i un 10% d'aïllades l'any 1997, que presenten un nivell intermig de susceptibilitat a l'àcid nalidíxic, la resta de soques aïllades en aquests anys són sensibles a aquest antimicrobià.

Any d'aïllament	No. total d'aïllats	No. d'aïllats NaI ^R (%)	No. d'aïllats NaI ^R analitzats
1992	94	1 (1,06)	1
1993	10	1 (10,00)	1
1994	42	31 (73,81)	12
1995	25	3 (12,00)	3
1996	17	1 (5,88)	1
1997	130	38 (29,23)	38
1998	42	5 (11,90)	5

Dades porporcionades per M. Saco.

És important destacar que s'ha observat una notable fluctuació pel que fa a l'evolució de la resistència a l'àcid nalidíxic en les soques de *S. typhimurium* aïllades en el Laboratori de Sanitat Animal, des d'un 0% en 1991 fins a un 73,81% en 1994. A partir d'aquest any, el percentatge de soques NaI^R ha sofert una sèrie de fluctuacions, augmentant i disminuint successivament, encara que amb una lleugera tendència a l'alça (Saco,

1999). Aquest antimicrobià ha estat altament utilitzat per al tractament de la salmonel·losi en els animals. A més a més, també s'ha utilitzat àmpliament un derivat de l'àcid nalidíxic, l'oleaquinodox, com a promotor del creixement en els animals, el que podria proporcionar una possible explicació per a la selecció de soques Nal^R (Medders *et al.*, 1998). El pic d'increment de resistència a l'àcid nalidíxic detectat l'any 1994 és degut a que un 91,67% de les soques aïllades d'au i un 90% de les aïllades de tortuga en aquest any són altament resistents, amb una CMI promig, en ambdós casos, de 342,64 $\mu\text{g/ml}$ (Saco, 1999). Un fenomen similar, amb un pic en el 1994, o a partir d'aquest any, en les soques de *S. enterica* Nal^R i/o resistents a altres quinolones ha sigut també descrit en altres països per alguns autors (Threlfall *et al.*, 1997a; Threlfall *et al.*, 1997b; Malorny *et al.*, 1999), associat, fonamentalment, a soques aïllades d'au i de boví. Aquests autors suggereixen que aquest increment pot ser conseqüència de l'autorització, entre 1990 i 1993 segons el país, de la utilització de l'enrofloxacina en medicina veterinària. El tractament amb aquesta fluoroquinolona no sembla que doni lloc a un increment del nombre de mutants resistents a la mateixa, però sí que s'incrementa considerablement la freqüència d'aparició de mutants Nal^R i resistents també a altres quinolones.

Pel que fa a la susceptibilitat de les soques de *S. typhimurium* estudiades en aquest treball a les fluoroquinolones, gairebé totes són sensibles, si bé algunes mostren una susceptibilitat reduïda (Taules 4.30 i 4.31). D'entre les que presenten una susceptibilitat intermèdia a alguna de les fluoroquinolones, sis són de porc de l'any 1997 i una de tortuga del 1994. Només s'ha trobat una soca resistent a totes les quinolones, aïllada de tortuga l'any 1992. Les soques estudiades s'han aïllat de mostres procedents de diferents punts tant de Catalunya com d'Espanya, sent, per tant, una representació de les soques de *S. typhimurium* Nal^R presents en els animals del país. Aquests resultats estan d'acord amb el descrit a la bibliografia, ja que la majoria d'aïllats de *Salmonella* d'origen animal són susceptibles a les quinolones i les Nal^R presenten, en general, una susceptibilitat reduïda a les fluoroquinolones.

L'estudi de les mutacions associades amb la resistència a quinolones en aquestes soques de *S. typhimurium* s'ha realitzat determinant les mutacions presents en la regió QRDR només del gen *gyrA*, al no haver-se descrit, fins al moment, mutacions a nivell de la regió QRDR del gen *parC* relacionades amb l'adquisició d'un fenotip de resistència a aquests antimicrobians (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). Per això i pel comentat anteriorment, s'ha escollit les soques Nal^R per a determinar, en primer lloc, la seqüència de la regió QRDR del gen *gyrA* de totes les soques estudiades y posar a punt, posteriorment, dues metodologies alternatives que serveixin com a mètodes ràpids de "screening" per a separar les soques de *S. typhimurium* d'origen animal salvatges de les mutants. Aquestes dues metodologies són la hibridació de colònies i la PCR a temps real utilitzant sondes FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), que permeten identificar la presència d'una seqüència salvatge o mutant en la regió analitzada.

El mètode d'hibridació de colònies amb la sonda específica SalSer83 serveix per a detectar, amb una elevada fiabilitat, la presència del codó salvatge en posició 83 del gen *gyrA*. És a dir, permet separar, d'una manera ràpida, les soques de *S. typhimurium* en dos grups, salvatges i mutants en la Ser83. El grau d'especificitat d'aquesta sonda és molt elevat, d'un 90%, ja que tan sols dues soques mutants, que presenten concretament el canvi Ser83 → Tyr, hibriden amb la sonda. El grau de sensibilitat és d'un 77% degut a que 10 soques de 44 no hibriden amb la sonda dissenyada per a detectar la seqüència salvatge en posició 83. Aquesta falta d'hibridació pot ser deguda tant a una llisi deficient de les cèl·lules com a una baixa eficiència de la transferència de les colònies o de la fixació del DNA als filtres.

En base als resultats obtinguts, la detecció de mutacions mitjançant PCR a temps real ha resultat ser un mètode molt bo per a detectar la presència de mutacions concretes en el gen *gyrA*. Utilitzant una sonda

salvatge que cobreix tant la posició 83 com la 87 del gen *gyrA* es diferencien ràpidament les soques salvatges, que no presenten cap mutació, de les mutants en alguna de les dues posicions (Ser83 o Asp87), ja que s'ha observat, a l'analitzar els valors de la temperatura de fusió (T_m) obtinguts amb les sondes FRET, que hi ha diferències significatives entre els de les soques salvatges en els dos codons i els dels diferents mutants.

A més a més, i encara que no era un dels objectius proposats, amb les sondes FRET emprades es diferencien també les mutacions Asp87 → Gly i Ser83 → Tyr. En canvi, els mutants Asp87 → Asn, Asp87 → Tyr i Ser83 → Phe presenten valors de T_m solapats, tot i que, en general, els dels mutants Ser83 → Phe són inferiors als dels altres dos (Taula 4.33, Figura 4.15). A més a més, cal ressaltar la rapidesa d'aquest mètode. Així, malgrat que els primers assaigs es van realitzar amplificant des de DNA cromosòmic, posteriorment es va posar a punt aquesta metodologia directament des de colònia, seguint el protocol descrit per Liebana i col·laboradors (2002). En aquest sentit, i comparant els dos mètodes desenvolupats, el de PCR a temps real és molt més ràpid que el d'hibridació, si es parteix de colònies. Malgrat això, els dos mètodes presenten certs inconvenients, ja que el d'hibridació requereix disposar d'una instal·lació per a radioactivitat i el de PCR a temps real d'un equipament d'elevat cost i, a més a més, el cost de material fungible també és més elevat per PCR a temps real que per hibridació.

Donats els bons resultats obtinguts amb el mètode de PCR a temps real, en aquest treball no s'ha desenvolupat una sonda específica per a detectar les soques salvatges en el codó 87 del gen *gyrA* per hibridació. Malgrat això, i tenint en compte que la variabilitat dels nucleòtids en aquesta regió és baixa (Taula 4.32), sembla possible dissenyar una sonda amb una elevada sensibilitat i especificitat que permeti diferenciar, per hibridació, les soques salvatges de les mutants en l'Asp87 del gen *gyrA*. Per tant, l'aplicació d'una de les dues metodologies desenvolupades en aquest treball, segons l'equipament de cada laboratori, permetrà realitzar un "screening" inicial per a detectar les soques mutants de *S. typhimurium* en els codons 83

i/o 87 del gen *gyrA* i procedir, quan sigui necessari, a la seqüenciació de la regió QRDR del gen *gyrA*, pel que també s'ha posat a punt un mètode de seqüenciació directament des de producte amplificat per PCR.

Molt recentment hi ha hagut un augment en el nombre de treballs sobre l'aplicació de la tècnica de PCR a temps real per a detectar mutacions en el gen *gyrA* en diferents espècies, entre elles *S. typhimurium*. Així, Walker i col·laboradors han desenvolupat el mètode GAMA ("LightCycler-based PCR-hybridization *gyrA* mutation assay"), utilitzant tres sondes específiques per a detectar els canvis Asp87 → Asn, Asp87 → Gly i Ser83 → Phe en el gen *gyrA*, des de DNA cromosòmic de 92 soques de *S. typhimurium* DT104 resistents a l'àcid nalidíxic i amb una susceptibilitat reduïda a la ciprofloxacina (Walker *et al.*, 2001). Així, van determinar que 67 soques eren mutants Asp87 → Asn, 12 Ser83 → Phe i 7 Asp87 → Gly, mentre que amb 6 van obtenir una T_m menor que la dels controls positius. Per seqüenciació van determinar que tres d'aquestes últimes soques eren mutants Asp87 → Tyr, dues Ser83 → Tyr i una era salvatge. Més recentment, s'han utilitzat les sondes descrites per Walker i col·laboradors (2001) per a detectar les diferents mutacions en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* de soques de diferents serotips del gènere *Salmonella*, aïllades d'animal (Liebana *et al.*, 2002). En aquest treball s'utilitza, en primer lloc, la sonda que detecta el canvi Asp87 → Asn per a distingir, segons la T_m obtinguda, quatre grups de soques: i) mutants Ser83 → Phe o Ser83 → Tyr, ii) mutants Asp87 → Gly o Asp87 → Tyr, iii) soques salvatges, i iv) mutants Asp87 → Asn. Seguidament, els mutants Ser83 → Phe o Ser83 → Tyr són sotmesos a un altre assaig amb una segona sonda la qual detecta específicament el canvi Ser83 → Phe. Igualment, la utilització d'una tercera sonda que detecta específicament el canvi Asp87 → Gly permet distingir els mutants Asp87 → Gly dels Asp87 → Tyr. Finalment, els aïllats que no poden identificar-se són, posteriorment, seqüenciats.

El mètode de PCR a temps real per a detectar mutacions desenvolupat en aquest treball és novedós respecte al comentat

anteriorment, ja que s'utilitzen sondes FRET, marcades amb fluoresceïna i el fluorocrom Red-640, sense necessitat d'utilitzar altres fluorocroms com el Sybr Green, etc. Per altra banda, la sonda Sensor cobreix la regió de DNA que inclou els codons 83 i 87 del gen *gyrA* i diferencia clarament tres tipus de seqüències de les sis possibles. Per a distingir les altres tres caldrà, probablement, la utilització d'una única sonda addicional. Actualment s'està dissenyant aquesta sonda per tal de disposar d'un mètode ràpid i fiable que permeti distingir la seqüència salvatge i les mutacions en els codons 83 i 87 del gen *gyrA*.

D'acord amb el descrit a la bibliografia, mitjançant la seqüenciació de la regió QRDR del gen *gyrA* de totes les soques de *S. typhimurium* estudiades s'ha determinat que els principals codons on es localitzen mutacions són la Ser83 i l'Asp87 (Taula 1.4) (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). Igualment, les mutacions presents en les soques estudiades són també els canvis de la Ser83 per Tyr o Phe i de l'Asp87 per Asn o Gly, no havent-se trobat cap mutació nova ni tampoc dobles mutants (Taula 4.32). És de ressaltar que tampoc s'han detectat canvis en altres codons de la regió analitzada. Aquests resultats contrasten clarament amb els obtinguts en *E. coli* i indiquen una menor variabilitat en la seqüència de nucleòtids entre les diferents soques de *S. typhimurium*, almenys pel que fa a aquesta regió. A més a més, aquests resultats podrien suggerir una taxa espontània de mutagènesi més baixa en *S. typhimurium* que en *E. coli*, fet que podria estar relacionat amb les diferències existents entre els dos microorganismes pel que fa a la mutagènesi SOS (Sedgwick i Goodwin, 1985; Smith *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1990; Nohmi *et al.*, 1991; Sedgwick *et al.*, 1991; Kock *et al.*, 1992; Nohmi *et al.*, 1992; Clerch *et al.*, 1996; McLenigan *et al.*, 1998; Smith i Walker, 1998; Benson *et al.*, 2000).

Amb les soques de *S. typhimurium* estudiades s'han distingit tres grups mutacionals, en funció de si són salvatges pels codons 83 i 87 del gen *gyrA* o bé si presenten mutacions en un d'aquests codons (Taula 4.34). És

important destacar que el petit grup de soques amb seqüència salvatge inclou tant les tres soques control (S-5712 i S-5978, aïllades l'any 1997 de porc i de conill, respectivament, i la LT2), com dues soques resistents. La soca S-3286, aïllada de tortuga l'any 1992, és resistent a totes les quinolones, mentre que la S-5827, aïllada de porc en 1997, només és resistent a l'àcid nalidíxic. També és important destacar que entre les soques de *S. typhimurium* estudiades en aquest treball semblen ser més freqüents les mutacions en el codó 87 que en el codó 83, ja que el percentatge de soques amb un canvi en l'Asp87 és pràcticament el doble del de les soques amb una substitució en la Ser83. En diversos treballs s'ha descrit una major freqüència de mutacions a nivell de la Ser83 que de l'Asp87 (Griggs *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 1997b; Liebana *et al.*, 2002). Altres autors, però, troben també un nombre més elevat de soques que presenten mutacions en el codó 87 del gen *gyrA*, concretament el canvi Asp87 → Asn, que en el 83 (Mølbak *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2001).

Una altra observació també destacable és que la presència d'una mutació en un codó o en un altre depèn extraordinàriament del tipus d'animal del que s'ha aïllat la soca i també de l'any d'aïllament (Taula 4.35). Així, exceptuant alguns casos, les soques d'au i de tortuga són mutants en la Ser83, mentre que les de boví, conill i porc ho són en l'Asp87. De la mateixa manera, les soques de l'any 1994 presenten mutacions en la Ser83, mentre que les de l'any 1997 en l'Asp87. Aquests resultats suggereixen una elevada similitud entre les soques en funció de l'animal del que s'han aïllat.

A l'analitzar la susceptibilitat de les soques de *S. typhimurium* estudiades a altres antimicrobians s'ha observat que més d'un 67% són resistents a quatre d'aquests antimicrobians (Taula 4.37). Totes les soques procedents de porc i de tortuga, així com la major part de les d'au presenten aquesta característica. Pel contrari, les de conill són majoritàriament resistents només a tetraciclina (Taula 4.38). S'ha observat també una estreta relació entre la mutació present en el gen *gyrA* i el patró de resistència a altres antimicrobians (Taula 4.39). Així, totes les soques que contenen la mutació Ser83 → Tyr són resistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina i

amoxicil·lina, mentre que un 67% dels mutants Ser83 → Phe són resistents només a dos d'aquests antimicrobians. De la mateixa manera, més d'un 95% de les soques que contenen la mutació Asp87 → Asn són resistents a quatre antimicrobians, mentre que pràcticament un 65% de les que presenten el canvi Asp87 → Gly són resistents només a tetraciclina. A l'igual que el comentat anteriorment, també aquests resultats indiquen un alt grau de relació entre les soques estudiades.

L'anàlisi dels dendogrames de similituds relatives construïts a partir de les cinètiques bioquímiques confirma totalment aquesta suggerència sobre l'alt grau de relació que deuen presentar les soques estudiades. Així, s'han obtingut grups amb valors de similitud relativa superiors al 93% que contenen un gran nombre de soques. En la majoria dels casos, les soques amb un major grau de relació es van aïllar del mateix tipus d'animal i el mateix any. A més a més, aquestes soques solen contenir el mateix tipus de mutació en la regió QRDR del gen *gyrA* i presentar el mateix patró de resistència a altres antimicrobians. Tot aquest conjunt de resultats mostra la poca variabilitat existent entre les soques de *S. typhimurium* aïllades d'un mateix tipus d'animal, ja que, malgrat s'han aïllat de mostres procedents de diferents punts força separats geogràficament, estan molt relacionades entre elles.

Els resultats obtinguts amb tot el conjunt de soques de *S. typhimurium* indiquen que, si bé totes elles es van seleccionar per la seva resistència a l'àcid nalidíxic, més d'un 90% són sensibles a les fluoroquinolones, el que es correspon amb les mutacions detectades en els codons 83 o 87 del gen *gyrA*. És de senyalar que, segons les dades obtingudes, la mutació en el codó 87 sembla ser la més freqüent i ha sigut detectada en soques aïllades de boví, conill i porc. Pel contrari, les soques procedents d'au i tortuga presenten fonamentalment una mutació en el codó 83. Alguns autors han postulat que l'increment en el nombre d'aïllats de *Salmonella* resistents a les quinolones procedents d'animals pot comprometre l'ús d'aquests antimicrobians en teràpia humana, ja que la introducció de les fluoroquinolones en teràpia veterinària pot contribuir a l'emergència de

resistència a fluoroquinolones en bacteris patògens responsables d'infeccions en els humans, tals com *E. coli*, *Campylobacter* spp. o *Salmonella* spp. Argumenten que els animals poden constituir un reservori on les soques resistents a l'àcid nalidíxic amb una primera mutació en el gen *gyrA* podrien persistir i adquirir mecanismes addicionals de resistència per la contínua exposició a fluoroquinolones (Giraud *et al.*, 1999; Heurtin-Le Corre *et al.*, 1999; Mølbak *et al.*; 1999). Altres autors, però, postulen que el risc de malalties en humans per aquestes soques resistents de les que són portadores els animals és mínim, ja que els serotips de *Salmonella* Nal^R descrits en animals no són els més freqüents en infeccions humanes, i que, encara que els aïllats veterinaris siguin altament resistents a l'àcid nalidíxic, les CMI_s que presenten aquestes soques front a les fluoroquinolones són inferiors al punt de tall recomanat per a aquests agents en molts països (Griggs *et al.*, 1996; Piddock *et al.*, 1998). Els resultats presentats en aquest treball indiquen que, encara que els animals són el reservori de *S. typhimurium*, la majoria de soques que s'aïllen en el nostre país són sensibles a les quinolones, no contenint mutacions en el gen *gyrA*, i que el baix percentatge de Nal^R presenten una única mutació en el gen *gyrA* i són gairebé totes sensibles a les fluoroquinolones. Per tant, si bé cal regular l'ús de l'enrofloxacin en medicina veterinària i realitzar estudis com el presentat per tal de vigilar l'evolució de les resistències, actualment els animals no semblen ser un reservori de soques de *S. typhimurium* altament resistents a les fluoroquinolones, ja sigui per mutacions en el gen *gyrA* o per l'adquisició d'altres mecanismes de resistència.

Segons els nostres resultats, en *S. typhimurium* pot aplicar-se també l'esquema experimental que s'ha indicat anteriorment per a *E. coli*, però en aquest cas és més convenient realitzar un "screening" mitjançant hibridació de colònia o sondes FRET per a detectar les possibles soques mutants en el gen *gyrA*, i posteriorment seqüenciar, quan sigui necessari, la regió QRDR d'aquest gen en els mutants, des del producte de PCR.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en aquest treball han permès obtenir les següents conclusions:

1. El mètode d'hibridació de colònies amb sondes específiques és un mètode ràpid per a detectar la presència de mutacions en una posició concreta en els gens *gyrA* i *parC* d'*E. coli* i en el gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

2. La sensibilitat i especificitat de les sondes utilitzades és diferent. Els millors resultats s'han obtingut amb les sondes que detecten les seqüències salvatges en posició 83 del gen *gyrA* i 84 del *parC* i també amb la que detecta el canvi Ser83 → Leu en *E. coli*, així com amb la utilitzada per a identificar la seqüència salvatge en posició 83 del gen *gyrA* en *S. typhimurium*. La baixa sensibilitat i especificitat de la sonda E.coliAsp87 pot ser deguda a l'elevada variabilitat d'aquesta regió, mentre que la baixa sensibilitat de les sondes E.ParCSer80 i E.ParCSer80(T) podria atribuir-se a una conformació determinada de la regió on es localitza la Ser80 del gen *parC* que dificulti una hibridació específica de les sondes.

3. El mètode de PCR a temps real amb sondes FRET per a *S. typhimurium* és un mètode ràpid, sobretot si s'utilitza a partir de colònia, que, utilitzant una sola sonda, permet diferenciar clarament les seqüències salvatges i determinades mutacions. La incorporació d'una sonda addicional permetrà, en un futur, distingir entre els mutants Asp87 → Asn, Asp87 → Tyr i Ser83 → Phe.

4. S'ha determinat, per seqüenciació de la regió QRDR del gen *gyrA* d'*E. coli*, que els principals codons on es localitzen les mutacions responsables de conferir resistència a quinolones són la Ser83 i l'Asp87. En el primer d'aquests codons, la mutació majoritària és Ser83 → Leu, havent-se identificat, només en una soca, el canvi ja conegut Ser83 → Ala. Pel que fa al codó 87, s'han detectat diverses de les mutacions ja descrites i una nova

mutació no coneguda fins al moment, que correspon al canvi Asp87 → Ala. Moltes de les soques són portadores de mutacions silencioses en els codons 85 i 91, només una soca conté una mutació silenciosa en el 84 i dues són portadores del canvi Ala84 → Ser, no descrit fins al moment.

5. Per seqüenciació de la regió QRDR del gen *parC* d'*E. coli*, s'ha determinat que els principals codons on es localitzen les mutacions són la Ser80 i el Glu84. En les dues posicions s'han trobat mutacions ja conegudes, així com els dos codons codificants de la Ser80 (AGC i AGT).

6. Per hibridació de colònies amb sondes específiques i seqüenciació, s'han classificat les soques d'*E. coli* en vuit grups mutacionals. El percentatge de mutants simples en la Ser83 del gen *gyrA* és molt similar en les soques dels dos orígens, mentre que es troba un percentatge més alt de dobles mutants entre els aïllats d'animal que entre els d'humans. En canvi, l'acumulació de tres o quatre mutacions en una soca és significativament més elevada en els aïllats d'humans que en els d'animal.

7. Les soques amb un nombre més elevat de mutacions i, per tant, altament resistents a quinolones també són, en percentatge, més resistents a altres antimicrobians diferents. Aquest fenomen sembla tenir molta més incidència en els aïllats d'humans que en els d'animal.

8. El 55% dels aïllats d'animal presenten uns valors de CMI₅ front a les quinolones que es poden associar a les mutacions detectades en els gens *gyrA* i *parC*, mentre que el 71% dels aïllats d'humans, a més a més de les mutacions identificades en aquests gens, han de tenir altres mecanismes de resistència a quinolones.

9. Les soques de *S. typhimurium* NaI^R d'origen animal estudiades són majoritàriament sensibles a les fluoroquinolones i presenten una única mutació en la regió QRDR del gen *gyrA*, no havent-se trobat dobles mutants. Aquesta mutació pot localitzar-se en la Ser83 o en l'Asp87, tal com està

descriu. Les quatre mutacions detectades per seqüenciació corresponen a canvis ja coneguts.

10. El nivell de susceptibilitat a les fluoroquinolones que presenten les soques de *S. typhimurium* estudiades es correspon amb el fet que presentin una única mutació en el gen *gyrA*, ja que s'ha descrit que una mutació en aquest gen, tant en la Ser83 com en l'Asp87, confereix un fenotip de resistència a l'àcid nalidíxic i de susceptibilitat reduïda a les quinolones fluorades.

11. És de senyalar que, tant en *E. coli* com en *S. typhimurium*, s'ha trobat alguna soca que no conté cap mutació en els codons estudiats, però és resistent a alguna o a totes les quinolones. Aquestes soques són candidates de futurs estudis per tal de determinar el mecanisme de resistència.

12. Tot i que les soques d'*E. coli* aïllades d'humans semblen estar menys relacionades entre elles que les d'animal, s'ha observat un elevat grau de relació entre les diferents soques estudiades. Tant les d'*E. coli* com les de *S. typhimurium* que pertanyen a un mateix grup, amb un elevat grau de SR, no tan sols solen tenir en comú la procedència i l'any d'aïllament, sinó que també mostren les mateixes característiques pel que fa a la presència de mutacions, susceptibilitat a quinolones i patró de resistència a diferents antimicrobians.

13. Un bon disseny experimental per a futurs estudis en *E. coli* seria determinar, en primer lloc, els grups de relació segons les CB, escollir algunes soques de cada grup i determinar la seva susceptibilitat a quinolones i a altres antimicrobians, així com les mutacions presents en els gens *gyrA* i *parC*, mitjançant hibridació amb les sondes dissenyades. Finalment, comparar tots els resultats obtinguts i, en aquells casos en que no hi hagi concordància clara entre els diferents paràmetres analitzats, procedir a seqüenciar les regions QRDR d'aquests gens. Per a realitzar aquesta seqüenciació de forma ràpida, s'ha posat a punt un mètode de seqüenciació

directa des del producte amplificat per PCR. L'aplicació d'aquesta metodologia facilita enormement l'estudi d'una elevada quantitat de soques.

14. Segons els nostres resultats, en *S. typhimurium* pot aplicar-se també l'esquema experimental indicat per a *E. coli*, però en aquest cas és més convenient realitzar un "cribatge" mitjançant hibridació de colònia o sondes FRET, per a detectar les possibles soques mutants en el gen *gyrA* i, posteriorment seqüenciar, quan sigui necessari, la regió QRDR d'aquest gen en els mutants, des del producte de PCR.

15. Segons les dades obtingudes, 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. Igualment, les soques de *S. typhimurium* Nal^R d'animals no presenten una acumulació de mutacions i són majoritàriament sensibles a les fluoroquinolones.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

-Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., i Struhl, K. 1989. "Current protocols in molecular biology". Massachusetts General Hospital / Harvard Medical School. Wiley Interscience, Greene.

-Alekhun, M.N. i Levy, S.B. 1997. "Regulation of Chromosomally Mediated Multiple Antibiotic Resistance: the *mar* Regulon". Minireview. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **41** (10): 2067-2075.

-Alekhun, M.N. i Levy, S.B. 1999a. "Characterization of MarR Superrepressor Mutants". Journal of Bacteriology **181** (10): 3303-3306.

-Alekhun, M.N. i Levy, S.B. 1999b. "Alteration of the Repressor Activity of MarR, the Negative Regulator of the *Escherichia coli marRAB* Locus, by Multiple Chemicals In Vitro". Journal of Bacteriology **181** (15): 4669-4672.

-Anderson, V.E., Zaniewski, R.P., Kaczmarek, F.S., Gootz, T.D., i Osheroff, N. 2000. "Action of Quinolones against *Staphylococcus aureus* Topoisomerase IV: Basis for DNA Cleavage Enhancement". Biochemistry **39** (10): 2726-2732.

-Ariza, R.R., Cohen, S.P., Bachhawat, N., Levy, S.B., i Demple, B. 1994. "Repressor Mutations in the *marRAB* Operon That Activate Oxidative Stress Genes and Multiple Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*". Journal of Bacteriology **176** (1): 143-148.

-Ariza, R.R., Li, Z., Ringstad, N., i Demple, B. 1995. "Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein". Journal of Bacteriology **177** (7): 1655-1661.

- Badiola, J.I.** 2000. “Diferenciació de cepas de *Pasteurella multocida* mediante el estudio comparado de sus cinéticas bioquímicas”. Memòria presentada pel llicenciat en Medicina D. José Ignacio Badiola Sainz per optar al grau de Doctor. UNIVERSISTAT AUTÒNOMA DE BARCELONA. Departament de Genètica i Microbiologia.
- Bagel, S., Hüllen, V., Wiedemann, B., i Heisig, P.** 1999. “Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (4): 868-875.
- Barnard, F.M. i Maxwell A.** 2001. “Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser⁸³ and Asp⁸⁷”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (7): 1994-2000.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., i Turck, M.** 1966. “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method”. *American Journal of Clinical Pathology* **45** (4):493-496.
- Bazile-Pham-Khac, S., Truong, Q.C., Lafont, J-P., Gutmann, L., Zhou, X.Y., Osman, M., i Moreau N.J.** 1996. “Resistance to Fluoroquinolones in *Escherichia coli* Isolated from Poultry”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (6): 1504-1507.
- Benson, N.R., Wong, R. M.-Y., and McClelland, M.** 2000. “Analysis of the SOS Response in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Using RNA Fingerprinting by Arbitrarily Primed PCR”. *Journal of Bacteriology* **182** (12): 3490-3497.
- Berlanga, M. i Viñas, M.** 2000. “Salicylate induction of phenotypic resistance to quinolones in *Serratia marcescens*”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46** (2): 279-282.

- Birnboim, H.C. i Doly, J. 1979. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Research* **7** (6): 1513-1523.
- Björkman, J., Hughes, D., i Andersson, D.I. 1998. "Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95** (7): 3949-3953. *Microbiology*.
- Breines, D.M., Ouabdesselam, S., Ng, E.Y., Tankovic, J., Shan, S., Soussy, C.J., i Hooper, D.C. 1997. "Quinolone Resistance Locus *nfxD* of *Escherichia coli* Is a Mutant Allele of the *parE* Gene Encoding a Subunit of Topoisomerase IV". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (1): 175-179.
- Cairns, J. 1963. "The chromosome of *Escherichia coli*". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**: 43-46.
- Cambau, E., Bordon, F., Collatz, E., i Gutmann, L. 1993. "Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37** (6): 1247-1252.
- Carattoli, A., Dionisi, A., i Luzzi I. 2002. "Use of a LighCycler *gyrA* Mutation Assay for Identification of Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter coli*". *FEMS Microbiology Letters* **214** (1): 87.
- Chapman, J.S. i Georgopapadakou, N.H. 1988. "Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32** (4): 438-442.
- Charvalos, E., Tselentis, Y., Hamzehpour, M.M., Köhler, T., i Pechere, J-C. 1995. "Evidence for an Efflux Pump in Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39** (9): 2019-2022.

-**Chu, D.T.W. i Fernandes, P.B.** 1989. "Structure-activity relationship of the fluoroquinolones". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33** (2): 131-135.

-**Čížman, M., Oražem, A., Križan-Hergouth, V., i Kolman, J.** 2001. "Correlation between increased consumption of fluoroquinolones in outpatients and resistance of *Escherichia coli* from urinary tract infections". Correspondence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47** (4): 502.

-**Clerch, B.** 1995. "Estudio de la mutagénesis inducida por quinolonas en *Salmonella typhimurium* y de los mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* a estos antimicrobianos". Memoria presentada por Berta Clerch Juan para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA. Departament de Genètica i Microbiologia.

-**Clerch, B., Garriga, X., Torrents, E., Rosales, C.M., and Llagostera, M.** 1996. "Construction and Characterization of Two *lexA* Mutants of *Salmonella typhimurium* with Different UV Sensitivities and UV Mutabilities". *Journal of Bacteriology* **178** (10): 2890-2896.

-**Clerch, B. i Llagostera, LI.** "Quinolonas: Mecanismos de Acción y de Resistencia Bacteriana". Universitat Autònoma de Barcelona.

-**Cockerill, F.R.** 1999. "Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance". Minireview. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (2): 199-212.

-**Cohen, S.P., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., McMurry, L.M., i Levy, S.B.** 1988. "Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32** (8): 1187-1191.

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

accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33** (8): 1318-1325.

-Cohen, S.P., Levy, S.B., Foulds, J., i Rosner, J.L. 1993. "Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway". *Journal of Bacteriology* **175** (24): 7856-7862.

-Conrad, S., Oethinger, M., Kaifel, K., Klotz, G., Marre, R., i Kern, W.V. 1996. "*gyrA* mutations in high-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **38** (3): 443-455.

-Cook, T.M., Deitz, W.H., i Goss, W.A. 1966. "Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. IV. Effects on stability of cellular constituents". *Journal of Bacteriology* **91** (2): 774-779.

-Crumplin, G.C. i Smith, J.T. 1975. "Nalidixic acid: an antibacterial paradox". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **8** (3): 251-261.

-Crumplin, G.C., Kenwright, M., i Hirst, T. 1984. "Investigations into the mechanism of action of the antibacterial agent norfloxacin". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **13** (Suppl. B): 9-23.

-Davies, T.A. i Goldschmidt, R. 2002. "Screening of large numbers of *Streptococcus pneumoniae* isolates for mutations associated with fluoroquinolone resistance using an oligonucleotide probe assay". *FEMS Microbiology Letters* **217**: 219-224.

-Deguchi, T., Yasuda, M., Asano, M., Tada, K., Iwata, H., Komeda, H., Ezaki, T., Saito, I., i Kawada, Y. 1995. "DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39** (2): 561-563.

-Deguchi, T., Fukuoka, A., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., Ban, Y., i Kawada, Y. 1997. "Alterations in the GyrA Subunit of DNA Gyrase and the ParC Subunit of Topoisomerase IV in Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (3): 699-701.

-Deitz, W.H., Cook, T.M., i Goss, W.A. 1966. "Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. III. Conditions required for lethality". *Journal of Bacteriology* **91** (2): 768-773.

-Domagala, J.M. 1994. "Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials". Review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **33** (4): 685-706.

-Drlica, K. i Zhao, X. 1997. "DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-quinolones". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61** (3): 377-392.

-Edwards, K.J., Metherell, L.A., Yates, M., i Saunders, N.A. 2001. "Detection of *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by biprobe analysis". *Journal of Clinical Microbiology* **39** (9): 3350-3352.

-Eliopoulos, G.M. i Eliopoulos, C.T. 1993. "Activity In Vitro of the Quinolones". A Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. (eds.), "Quinolone Antimicrobial Agents", Second Edition, pp. 161-193. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Lagneaux, D., Crouzet, J., Famechon, A., i Blanche, F. 1994. "Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones". *Molecular Microbiology* **13** (4): 641-653.

-Garau, J., Xercavins, M., Rodríguez-Carballeira, M., Gómez-Vera, J.R., Coll, I., Vidal, D., Llovet, T., i Ruíz-Bremón, A. 1999. "Emergence and

Dissemination of Quinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Community". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (11): 2736-2741.

-**García de Viedma, D., Díaz Infantes, M.S., Lasala, F., Chaves, F., Alcalá, L., i Bouza, E.** 2002. "New Real-Time PCR Able To Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations and High-Level Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Clinical Microbiology* **40** (3): 988-995.

-**Gaudu, P., Dubrac, S., i Touati, D.** 2000. "Activation of SoxR by Overproduction of Desulfoferrodoxin: Multiple Ways to Induce the *soxRS* Regulon". *Journal of Bacteriology* **182** (6): 1761-1763.

-**Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., i Nash, H.A.** 1976a. "DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (11): 3872-3876. *Biochemistry*.

-**Gellert, M., O'Dea, Itoh, T., i Tomizawa J-I.** 1976b. "Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (12): 4474-4478. *Biochemistry*.

-**Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T., i Tomizawa J-I.** 1977. "Nalidixic Acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (11): 4772-4776. *Biochemistry*.

-**Georgiou, M., Muñoz, R., Román, F., Cantón, R., Gómez-Lus, R., Campos, J., i De la Campa, A.G.** 1996. "Ciprofloxacin-Resistant *Haemophilus influenzae* Strains Possess Mutations in Analogous Positions of GyrA and ParC". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (7): 1741-1744.

-**Gibreel, A., Sjögren, E., Kaijser, B., Wretling, B., i Sköld, O.** 1998. "Rapid Emergence of High-Level Resistance to Quinolones in *Campylobacter jejuni*

Associated with Mutational Changes in *gyrA* and *parC*". Notes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **42** (12): 3276-3278.

-Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J-L., i Chaslus-Dancla, E. 1999. "Comparative Studies of Mutations in Animal Isolates and Experimental In Vitro- and In Vivo-Selected Mutants of *Salmonella* spp. Suggest a Counterselection of Highly Fluoroquinolone-Resistant Strains in the Field". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43** (9): 2131-2137.

-Giraud, E., Cloeckart, A., Kerboeuf, D., i Chaslus-Dancla, E. 2000. "Evidence for Active Efflux as the Primary Mechanism of Resistance to Ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44** (5): 1223-1228.

-Giraud, E., Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Cloeckart, A., Dho-Moulin, M., i Chaslus-Dancla, E. 2001. "Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys". Journal of Antimicrobial Chemotherapy **47** (3): 341-343.

-Goettsch, W., van Pelt, W., Nagelkerke, N., Hendrix, M.G.R., Buiting, A.G.M., Petit, P.L., Sabbe, L.J.M., van Griethuysen, A.J.A., i de Neeling, A.J. 2000. "Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in The Netherlands". Journal of Antimicrobial Chemotherapy **46** (2): 223-228.

-Goldman, J.D., White, D.G., i Levy, S.B. 1996. "Multiple Antibiotic Resistance (*mar*) Locus Protects *Escherichia coli* from Rapid Cell Killing by Fluoroquinolones". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **40** (5): 1266-1269.

-Gootz, T.D. i Osheroff, N. 1993. "Quinolones and Eukaryotic topoisomerases". A Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. (eds.), "Quinolone Antimicrobial Agents", Second Edition, pp. 139-160. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Gootz, T.D. i Brighty K.E.** 1996. "Fluoroquinolone Antibacterials: SAR, Mechanism of Action, Resistance, and Clinical Aspects". *Medical Research Reviews*, **16 (5)**: 433-486.
- Goss, W.A., Deitz, W.H., i Cook, T.M.** 1964. "Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology* **88**: 1112-1118.
- Goss, W.A., Deitz, W.H., i Cook, T.M.** 1965. "Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis". *Journal of Bacteriology* **89**: 1068-1074.
- Griggs, D.J., Gensberg, K., i Piddock, L.J.V.** 1996. "Mutations in *gyrA* Gene of Quinolone-Resistant Salmonella Serotypes Isolated from Humans and Animals". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40 (4)**: 1009-1013.
- Gustafson, J.E., Candelaria, P.V., Fisher, S.A., Goodridge, J.P., Lichocik, T.M., McWilliams, T.M., Price, C.T.D., O'Brien, F.G., i Grubb, W.B.** 1999. "Growth in the Presence of Salicylate Increases Fluoroquinolone Resistance in *Staphylococcus aureus*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43 (4)**: 990-992.
- Hallett, P. i Maxwell, A.** 1991. "Novel quinolone-resistant mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35 (2)**: 335-340.
- Hane, M.W. i Wood, T.H.** 1969. "*Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies". *Journal of Bacteriology* **99 (1)**: 238-241.
- Heisig, P. i Tschorny, R.** 1994. "Characterization of fluoroquinolone-resistance mutants of *Escherichia coli* selected in vitro". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38 (6)**: 1284-1291.

-Heisig, P. 1996. "Genetic Evidence for a Role of *parC* Mutations in Development of High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (4): 879-885.

-Heurtin-Le Corre, C., Donnio, P-Y., Perrin, M., Travert, M-F., i Avril, J-L. 1999. "Increasing Incidence and Comparison of Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype Typhimurium Isolates from Humans and Animals". *Journal of Clinical Microbiology* **37** (1): 266-269.

-Hidalgo, E., Leautaud, V., i Demple, B. 1998. "The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator". *The EMBO Journal* **17** (9): 2629-2636.

-Higgins, N.P., Peebles, C.L., Sugino, A., i Cozzarelli N.R. 1978. "Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **75** (4): 1773-1777. *Biochemistry*.

-Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. 1993a. "Mechanisms of Quinolone Action and Bacterial Killing". A Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. (eds.), "Quinolone Antimicrobial Agents", Second Edition, pp. 53-75. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. 1993b. "Mechanisms of Bacterial Resistance to Quinolones". A Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. (eds.), "Quinolone Antimicrobial Agents", Second Edition, pp. 97-118. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Horcajada, J.P., Vila, J., Moreno-Martínez, A., Ruiz, J., Martínez, J.A., Sánchez, M., Soriano, E., i Mensa, J. 2002. "Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinolones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49** (1): 55-59.

- Hoshino, K., Kitamura, A., Morrissey, I., Sato, K., Kato, J.I., i Keda, H.I.** 1994. "Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38 (11)**: 2623-2627.
- Howard, B.M.A., Pinney, R.J., i Smith, J.T.** 1993. "Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones". *J. Pharm. Pharmacol.* **45 (7)**: 658-662.
- Hussy, P., Maass, G., Tümmler, B., Grosse, F., i Schomburg, U.** 1986. "Effects of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase α primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29 (6)**: 1073-1078.
- Ingraham, J.L. i Ingraham, C.A.** "Introducción a la Microbiología". Vol. 1 i 2. Editorial Reverté, S.A. 1998.
- IS 2002** "SALMONELLA AND SALMONELLOSIS". MAY 29-31, 2002. Saint-Brieuc – France.
- Jellen-Ritter, A.S. i Kern, W.V.** 2001. "Enhanced Expression of the Multidrug Efflux Pumps AcrAB and AcrEF Associated with Insertion Element Transposition in *Escherichia coli* Mutants Selected with a Fluoroquinolone". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45 (5)**: 1467-1472.
- Kato, J.I., Suzuki, H., i Ikeda, H.** 1992. "Purification and Characterization of DNA Topoisomerase IV in *Escherichia coli*". *Journal of Biological Chemistry* **267 (36)**: 25676-25684.
- Kern, W.V., Oethinger, M., Jellen-Ritter, A.S., i Levy, S.B.** 2000. "Non-Target Gene Mutations in the Development of Fluoroquinolones Resistance in *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44 (4)**: 814-820.

-Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., i Cozzarelli, N.R. 1995. "Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **92 (25)**: 11801-11805. Biochemistry.

-King, D.E., Malone, R., i Lilley, S.H. 2000. "New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics". American Family Physician. May 1, 2000.

-Koch, W.H., Cebula, T.A., Foster, P.L., and Eisenstadt, E. 1992. "UV Mutagenesis in *Salmonella typhimurium* Is *umuDC* Dependent Despite the Presence of *samAB*". Journal of Bacteriology **174 (9)**: 2809-2815.

-Koutsolioutsou, A., Martins, E.A., White, D.G., Levy, S.B., i Demple, B. 2001. "A *soxRS*-Constitutive Mutation Contributing to Antibiotic Resistance in a Clinical Isolate of *Salmonella enterica* (Serovar Typhimurium)". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45 (1)**: 38-43.

-Le Minor, L. 2002. "The Genus *Salmonella*". The Prokaryotes, cap. 146 (<http://rizzo.springer-ny.com:6336/dynaweb/verlagprok/prokbook/IDMATC...P2NDED,146>).

-Lehn, N., Stöwer-Hoffmann, J., Kott, T., Strassner, C., Wagner, H., Krönke, M., i Schneider-Brachert, W. 1996. "Characterization of Clinical Isolates of *Escherichia coli* Showing High Levels of Fluoroquinolone Resistance". Journal of Clinical Microbiology **34 (3)**: 597-602.

-Lehninger, A.L., Nelson, D.L., i Cox, M.M. "Principios de Bioquímica". Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A. 1993.

-Leshner, G.Y., Forelich, E.D., Gruett, M.D., Bailey, J.D., i Brundage, R.P. 1962. "1,8-Naphthyridine derivatives, a new class of chemotherapeutic agents". J. Med. Pharm. Chem. **5**: 1063-1065.

-Lewin, C.S. i Smith, J.T. 1986. "Detection of a third bactericidal mechanism in ciprofloxacin and ofloxacin". J. Pharm. Pharmacol. **38 (Suppl.)**: 44P.

- Lewin, C.S., Howard, B.M.A., Ratcliffe, N.T., i Smith, J.T. 1989. "4-quinolones and the SOS response". *Journal of Medical Microbiology* **29** (2): 139-144.
- Li, Z., Yokoi, S., Kawamura, Y., Maeda, S., Ezaki, T., i Deguchi, T. 2002. "Rapid Detection of Quinolone Resistance-Associated *gyrA* Mutations in *Neisseria gonorrhoeae* with a LighCycler". *Journal of Infection and Chemotherapy* **8** (2): 145-150.
- Liebana, E., Clouting, C., Cassar, C.A., Randall, L.P., Walker, R.A., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Ridley, A.M., i Davies, R.H. 2002. "Comparison of *gyrA* Mutations, Cyclohexane Resistance, and the Presence of Class I Integrons in *Salmonella enterica* from Farm Animals in England and Wales". *Journal of Clinical Microbiology* **40** (4): 1481-1486.
- Lindler, L.E., Fan, W., i Jahan, N. 2001. "Detection of Ciprofloxacin-Resistant *Yersinia pestis* by Fluorogenic PCR using the LightCycler". *Journal of Clinical Microbiology* **39** (10): 3649-3655.
- Lindquist, J. 2001. "*Salmonella* – General Aspects and Nomenclature". *Bacteriology* 102 (<http://www.splammo.net/bact102/102xsal.html>).
- Madigan M.T., Martinko, J.M., i Parcker, J. "*Brock. Biology of Microorganisms*". Ninth Edition. PRENTICE HALL INC. 2000.
- Maira-Litrán, T., Allison, D.G., i Gilbert, P. 2000. "An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multiple efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45** (6): 789-795.
- Malorny, B., Schroeter, A., i Helmuth, R. 1999. "Incidence of Quinolone Resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (9): 2278-2282.

-Manchado, M., Michán, C., i Pueyo, C. 2000. "Hydrogen Peroxide Activates the SoxRS Regulon In Vivo". *Journal of Bacteriology* **182 (23)**: 6842-6844.

-Maneewannakul, K. i Levy, S.B. 1996. "Identification of *mar* Mutants among Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40 (7)**: 1695-1698.

-Martínez-Martínez, L., Pascual, A., i Jacoby, G.A. 1998. "Quinolone resistance from a transferable plasmid". *Lancet* **351 (9105)**: 797-799.

-Maxwell, A. 1992. "The molecular basis of quinolone action". Review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **30 (4)**: 409-414.

-McDonald, L.C., Chen, F-J., Lo, H-J., Yin, H-C., Lu, P-L., Huang, C-H., Chen, P., Lauderdale, T-L., i Ho, M. 2001. "Emergence of Reduced Susceptibility and Resistance to Fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and Contributions of Distinct Selective Pressures". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45 (11)**: 3084-3091.

-McLenigan, M., Peat, T.S., Frank, E.G., McDonald, J.P., Gonzalez, M., Levine, A.S., Hendrickson, W.A., and Woodgate, R. 1998. "Novel *Escherichia coli umuD'* Mutants: Structure-Function Insights into SOS Mutagenesis". *Journal of Bacteriology* **180 (1)**: 4658-4666.

-Medders, W.M., Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Shotts, E.B., i Brown, J. 1998. "Mutation rate of avian intestinal coliform bacteria when pressured with fluoroquinolones". *Avian Diseases* **42 (1)**: 146-153.

-Miller, J.M. 1992. "A short course in bacterial genetics". Hadnbook. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

-Miller, P.F., Gambino, L.F., Sulavik, M.C., i Gracheck, S.J. 1994. "Genetic Relationship between *soxRS* and *mar* Loci in Promoting Multiple Antibiotic

Resistance in *Escherichia coli*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **38** (8): 1773-1779.

-**Miller, P. i Sulavik, M.C.** 1996. "Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*". Review. Molecular Microbiology **21** (3): 441-448.

-**Mirelis, B., Miró, E., Navarro, F., Ogalla, C.A., Bonal, J., i Prats, G.** 1993. "Increased Resistance to Quinolone in Catalonia, Spain". Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **16** (2): 137-139.

-**Mitscher, L.A., Devasthale, P. i Zavod, R.** 1993. "Structure-Activity Relationships". A Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. (eds.), "Quinolone Antimicrobial Agents", Second Edition, pp. 3-51. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-**Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., i Gellert, M.** 1978. "DNA gyrase: Subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **75** (12): 5960-5963. Biochemistry.

- **Mølbak, K., Baggesen, D.L., Aarestrup, F.M., Ebbesen, J.M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A.M., i Wegener, H.C.** 1999. "An Outbreak of Multidrug-Resistant, Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104". The New England Journal of Medicine **341** (19): 1420-1425.

-**Moniot-Ville, N., Guibert, J., Moreau, N., Acar, J.F., Collatz, E., i Gutmann, L.** 1991. "Mechanisms of Quinolone Resistance in a Clinical Isolate of *Escherichia coli* Highly Resistant to Fluoroquinolones but Susceptible to Nalidixic Acid". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35** (3): 519-523.

-**Mouneimné, H., Robert, J., Jarlier, V., i Cambau, E.** 1999. "Type II Topoisomerase Mutations in Ciprofloxacin-Resistant Strains of

Pseudomonas aeruginosa". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43** (1): 62-66.

-**Nikaido, H.** 1996. "Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria". Journal of Bacteriology **178** (20): 5853-5859.

-**Nohmi, T., Hakura, A., Nakai, Y., Watanabe, M., Murayama, S.Y., and Sofuni, T.** 1991. "*Salmonella typhimurium* Has Two Homologous but Different *umuDC* Operons: Cloning of a New *umuDC*-Like Operon (*samAB*) Present in a 60-Megadalton Cryptic Plasmid of *S. typhimurium*". Journal of Bacteriology **173** (3): 1051-1063.

-**Nohmi, T., Yamada, M., Watanabe, M., Murayama, S.Y., and Sofuni, T.** 1992. "Roles of *Salmonella typhimurium umuDC* and *samAB* in UV Mutagenesis and UV Sensitivity". Journal of Bacteriology **174** (21): 6948-6955.

-**Oethinger, M., Podglajen, I., Kern, W.V., i Levy, S.B.** 1998. "Overexpression of the *marA* or *soxS* Regulatory Gene in Clinical Topoisomerase Mutants of *Escherichia coli*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **42** (8): 2089-2094.

-**Oethinger, M., Kern, W.V., Jellen-Ritter, A.S., McMurry, L.M., i Levy, S.B.** 2000. "Ineffectiveness of Topoisomerase Mutations in Mediating Clinically Significant Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* in the Absence of the ArcAB Efflux Pump". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44** (1): 10-13.

-**Okusu, H., Ma, D., i Nikaido, H.** 1996. "AcrAB Efflux Pump Plays a Major Role in the Antibiotic Resistance Phenotype of *Escherichia coli* Multiple-Antibiotic-Resistance (Mar) Mutants". Journal of Bacteriology **178** (1): 306-308.

-**Oliphant, C.M. i Green, G.M.** 2002. "Quinolones: A Comprehensive Review". American Family Physician. February 1, 2002.

-**Oram, M. i Fisher, L.M.** 1991. "4-Quinolone Resistance Mutations in the DNA Gyrase of *Escherichia coli* Clinical Isolates Identified by Using the Polymerase Chain Reaction". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35** (2): 387-389.

-**Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, S., Cid, D., i De la Fuente, R.** 1999. "In Vitro Activities of Cephalosporins and Quinolones against *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheic Dairy Calves". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43** (3): 510-513.

-**Otero, J.L., Mestorino, N., i Errecalde, J.O.** 2001a. "Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, Mecanismo de Acción, Actividad Antimicrobiana y Resistencia Bacteriana". Analecta Veterinaria **21** (1): 31-41.

-**Otero, J.L., Mestorino, N., i Errecalde, J.O.** 2001b. "Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II: Farmacocinética y Toxicidad". Analecta Veterinaria **21** (1): 42-49.

-**Ouabdesselam, S., Hooper, D.C., Tankovic, J., i Soussy, C.J.** 1995. "Detection of *gyrA* and *gyrB* Mutations in Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* by Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis and Determination of Levels of Resistance Conferred by Two Different Single *gyrA* Mutations". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39** (8): 1667-1670.

-**Ozeki, S., Deguchi, T., Yasuda, M., Nakano, M., Kawamura, T., Nishino, Y., i Kawada, Y.** 1997. "Development of a Rapid Assay for Detecting *gyrA* Mutations in *Escherichia coli* and Determination of Incidence of *gyrA* Mutations in Clinical Strains Isolated from Patients with Complicated Urinary Tract Infections". Journal of Clinical Microbiology **35** (9): 2315-2319.

- Palù, G., Valisena, S., Ciarrocchi, G., Gatto, B., i Palumbo, M. 1992. "Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **89** (20): 9671-9675. Biochemistry.
- Palumbo, M., Gatto, B., Zagotto, G., i Palù, G. 1993. "On the mechanism of action of quinolone drugs". Trends in Microbiology **1** (6): 232-235.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H., i Skurray, R.A. 1996. "Proton-dependent multidrug efflux systems". Review. Microbiological Reviews **60** (4): 575-608.
- Peng, H. i Mariani, K.J. 1993. "*Escherichia coli* Topoisomerase IV. Purification, Characterization, Subunit Structure, and Subunit Interactions". Journal of Biological Chemistry **268** (32): 24481-24490.
- Peng, H. i Mariani, K.J. 1995. "The Interaction of the *Escherichia coli* Topoisomerase IV with DNA". Journal of Biological Chemistry **270** (42): 25286-25290.
- Perea, S., Hidalgo, M., Arcediano, A., Ramos, M.J., Gómez, C., Hornedo, J., Lumberras, C., Folgueira, D., Cortés-Funes, H., i Rodríguez-Noriega, A. 1999. "Incidence and clinical impact of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the faecal flora of cancer patients treated with high dose chemotherapy and ciprofloxacin prophylaxis". Journal of Antimicrobial Chemotherapy **44** (1): 117-120.
- Perichon, B., Tankovic, J., i Courvalin, P. 1997. "Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **41** (5): 1166-1167.
- Piddock, L.J.V., Griggs, D.J., Hall, M.C., i Jin, Y.F. 1993. "Ciprofloxacin Resistance in Clinical Isolates of *Salmonella typhimurium* Obtained from Two Patients". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **37** (4): 662-666.

- Piddock, L.J.V., Ricci, V., McLaren, I., i Griggs, D.J.** 1998. "Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41 (6)**: 635-641.
- **Piddock, L.J.V.** 2002. "Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals". *FEMS Microbiology Reviews* **26 (1)**: 3-16.
- Pomposiello, P.J. i Demple, B.** 2000. "Identification of SoxS-Regulated Gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium". *Journal of Bacteriology* **182 (1)**: 23-29.
- Poole, K.** 2000. "Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria". Minireview. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44 (9)**: 2233-2241.
- Qiang, Y.Z., Qin, T., Fu, W., Cheng, W.P., Li, Y.S., i Yi, G.** 2002. "Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Escherichia coli*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49 (3)**: 549-552.
- Quillardet, P., de Bellecombe, C., i Hofnung, M.** 1985. "The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds". *Mutation Research* **147 (3)**: 79-95.
- Randall, L.P. i Woodward, M.J.** 2001. "Multiple Antibiotic Resistance (*mar*) Locus in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104". *Applied and Environmental Microbiology* **67 (3)**: 1190-1197.
- Ratcliffe, N.T. i Smith, J.T.** 1985. "Norfloxacin has a novel bactericidal mechanism unrelated to that of other 4-quinolones". *J. Pharm. Pharmacol.* **37 (Suppl.)**: 92P.

-**Reece, R.J. i Maxwell, A.** 1991. "DNA gyrase: structure and function". Review. Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology **26 (3-4)**: 335-375.

-**Reyna, F., Huesca, M., González, V., i Fuchs, L.Y.** 1995. "*Salmonella typhimurium gyrA* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39 (7)**: 1621-1623.

-**Rivera, A.** 2000. "Mecanismes moleculars de resistència a quinolones en aïllaments clínics de *Citrobacter freundii*". Memòria presentada per Anna Rivera i Llovera per a optar al Premi de la Societat Catalana de Biologia.

-**Ruiz, J., Marco, F., Goñi, P., Gallardo, F., Mensa, J., Trilla, A., Jiménez de Anta, M.T., i Vila J.** 1995. "High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*". Journal of Antimicrobial Chemotherapy **36 (4)**: 737-738.

-**Ruiz, J., Goñi, P., Marco, F., Jiménez de Anta, M.T., i Vila, J.** 1996. "Detección de la resistencia a las quinolonas producida por mutaciones en la Ser-83 de la DNA-girasa mediante PCR y RFLP con *Hinfi* en *Escherichia coli*". Revista Española de Quimioterapia **9**: 206-210.

-**Ruiz, J., Casellas, S., Jiménez de Anta, M.T., i Vila, J.** 1997a. "The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates". Journal of Antimicrobial Chemotherapy **39 (6)**: 839-840.

-**Ruiz, J., Castro, D., Goñi, P., Santamaria, J.A., Borrego, J.J., i Vila, J.** 1997b. "Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium". Journal of Medical Microbiology **46 (7)**: 623-628.

- Ruiz, J., Goñi, P., Marco, F., Gallardo, F., Mirelis, B., Jiménez de Anta, M.T., i Vila, J.** 1998. "Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: A genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates". *Microbiology and Immunology* **42** (3): 223-226.
- Saco, M.M.** 1999. "Evolució de la resistència a diversos antibiòtics de 444 cepes de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium aïslades entre els anys 1991 a 1998". Memòria presentada per M^a Montserrat Saco Galvany com a Treball d'investigació del programa de Tercer Cicle de Microbiologia del Departament de Genètica i Microbiologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., i Maniatis, T.** 1989. "Molecular Cloning: A laboratory manual". 2on ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Schmitz, F.J., Jones, M.E., Hofmann, B., Hansen, B., Scheuring, S., Luckerfahr, M., Fluit, A., Verhoef, J., Hadding, U., Heinz, H.P., i Kohrer, K.** 1998. "Characterization of *griA*, *griB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42** (5): 1249-1252.
- Sedgwick, S.G. and Goodwin, P.A.** 1985. "Differences in mutagenic and recombinational DNA repair in enterobacteria". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82** (12): 4172-4176.
- Sedgwick, S.G., Ho, C., and Woodgate, R.** 1991. "Mutagenic DNA Repair in Enterobacteria". *Journal of Bacteriology* **173** (18): 5604-5611.
- Seoane, A.S. i Levy, S.B.** 1995. "Characterization of MarR, the Repressor of the Multiple Antibiotic Resistance (*mar*) Operon in *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology* **177** (12): 3414-3419.

-**Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N., O'Donnell, T.J., Chu, D.W.T., Cooper, C.S., Rosen, T., i Pernet, A.G.** 1989. "Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model". *Biochemistry* **28** (9): 3886-3894.

-**Shen, L.L.** 1993. "Quinolone-DNA Interaction". A Hooper, D.C. i Wolfson, J.S. (eds.), "Quinolone Antimicrobial Agents", Second Edition, pp. 77-95. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-**Shigekawa, K. i Dower, W.J.** 1988. "Electroporation of Eukaryotes and Prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells". *Biotechniques* **6** (8): 742-751.

-**Smith, J.T.** 1984. "Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials". *Pharm. J.* **233**: 299-305.

-**Smith, C.M., Koch, W.H., Franklin, S.B., Foster, P.L., Cebula, T.A., and Eisenstadt, E.** 1990. "Sequence Analysis and Mapping of the *Salmonella typhimurium* LT2 *umuDC* Operon". *Journal of Bacteriology* **172** (9): 4964-4978.

-**Smith, B.T. and Walker, G.C.** 1998. "Mutagenesis and More: *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS Response". *Genetics* **148**: 1599-1610.

-**Sotto, A., De Boever, C.M., Fabbro-Peray, P., Gouby, A., Sirot, D., i Jourdan, J.** 2001. "Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Hospitalized Patients with Urinary Tract Infections: a Prospective Study". *Journal of Clinical Microbiology* **39** (2): 438-444.

-**Soussy, C.J., Wolfson, J.S., NG, E.Y., i Hooper, D.C.** 1993. "Limitations of Plasmid Complementation Test for Determination of Quinolone Resistance Due to Changes in the Gyrase A Protein and Identification of Conditional Quinolone Resistance Locus". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37** (12): 2588-2592.

- Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Kokkinakis, E., Gikas, A., i Tselentis, Y.** 2002. "Mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Coxiella burnetii*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49 (2)**: 379-382.
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., i Poole, K.** 1998. "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a Multidrug-Sensitive *Escherichia coli* Strain". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42 (1)**: 65-71.
- Strumberg, D., Nitiss, J.L., Rose, A., Nicklaus, M.C., i Pommier, Y.** 1999. "Mutation of a Conserved Serine Residue in a Quinolone-resistant Type II Topoisomerase Alters the Enzyme-DNA and Drug Interactions". *The Journal of Biological Chemistry* **274 (11)**: 7292-7301.
- Sugino, A., Peebles, C.L., Kreuzer, K.N., i Cozzarelli, N.R.** 1977. "Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74 (11)**: 4767-4771.
- Sulavik, M.C., Dazer, M., i Miller, P.F.** 1997. "The *Salmonella typhimurium* mar Locus: Molecular and Genetic Analyses and Assessment of Its Role in Virulence". *Journal of Bacteriology* **179 (6)**: 1857-1866.
- Tankovic, J., Perichon, B., Duval, J., i Courvalin, P.** 1996. "Contribution of Mutations in *gyrA* and *parC* Genes to Fluoroquinolone Resistance of Mutants of *Streptococcus pneumoniae* Obtained In Vivo and In Vitro". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40 (11)**: 2505-2510.
- Tartof, K.D. i Hobbs, C.A.** 1987. "Improved media for growing plasmid and cosmid clones" *Bethesda Res. Lab Focus*. **9**: 12.
- Tavío, M.M., Vila, J., Ruiz, J., Ruiz, J., Martín-Sánchez, A.M., i Jiménez de Anta, M.T.** 1999. "Mechanisms involved in the development of resistance

to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates". Journal of Antimicrobial Chemotherapy **44** (6): 735-742.

-**Taylor, D.E. i Chau, A.S-S.** 1997. "Cloning and Nucleotide Sequence of the *gyrA* Gene from *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 and Characterization of Ciprofloxacin-Resistant Laboratory and Clinical Isolates". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **41** (3): 665-671.

-**Thomas, S.M., Crowne, H.M., Pidsley, S.C., and Sedgwick, S.G.** 1990. "Structural Characterization of the *Salmonella typhimurium* LT2 *umu* Operon". Journal of Bacteriology **172** (9): 4979-4987.

-**Threlfall, E.J., Ward, L.R., Skinner, J.A., i Rowe, B.** 1997a. "Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996". Microbial Drug Resistance **3** (3): 263-266.

-**Threlfall, E.J., Ward, L.R., i Rowe, B.** 1997b. "Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales". Eurosurveillance **2** (11).

-**Todar, K.** 2002. "Pathogenic *E. coli*". Bacterial Diseases of Humans. Textbook of Bacteriology (<http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>).

-**Torres, M.J., Criado, A., Palomares, J.C., i Aznar, J.** 2002. "Detection of *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* with LightCycler Technology". Journal of Clinical Microbiology **40** (2): 735.

-**Tran, J.H. i Jacoby G.A.** 2002. "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **99** (8): 5638-5642.

-**Truong, Q.C., Nguyen Van, J-C., Shlaes, D., Gutmann, L., i Moreau, N.J.** 1997. "A Novel, Double Mutation in DNA Gyrase A of *Escherichia coli*

Conferring Resistance to Quinolone Antibiotics". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (1): 85-90.

-**Urios, A., Herrera, G., Aleixandre, V., i Blanco, M.** 1991. "Influence of *recA* mutations on *gyrA* dependent quinolone resistance". *Biochimie* **73** (4): 519-521.

-**Valdezate, S., Vindel, A., Baquero, F., i Cantón, R.** 1999. "Comparative In Vitro Activity of Quinolones Against *Stenotrophomonas maltophilia*". *Note. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18** (12): 908-911.

-**van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., i Stobberingh, E.E.** 2001. "Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47** (6): 763-771.

-**Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barceló, A., Goñi, P., Giralt, E., i Jiménez de Anta, T.** 1994. "Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MIC_s". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38** (10): 2477-2479.

-**Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., Marco, A., i Jiménez de Anta, M.T.** 1995. "Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39** (5): 1201-1203.

-**Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., i Jiménez de Anta, M.T.** 1996. "Detection of Mutations in *parC* in Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (2): 491-493.

-**Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., i Jiménez de Anta, M.T.** 1997. "Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39** (6): 757-762.

-Vila, J., Rivera, A., Marco, F., Ruiz, J., Mensa, J., Chaves, J., Hernández, G., i Jiménez de Anta, M.T. 2002. "Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49** (3): 471-477

-Walker, R.A., Saunders, N., Lawson, A.J., Lindsay, E.A., Dassama, M., Ward, L.R., Woodward, M.J., Davies, R.H., Liebana, E., i Threlfall, E.J. 2001. "Use of a LightCycler *gyrA* Mutation Assay for Rapid Identification of Mutations Conferring Decreased Susceptibility to Ciprofloxacin in Multiresistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 Isolates". *Journal of Clinical Microbiology* **39** (4): 1443-1448.

-Wang, H., Dzink-Fox, J.L., Chen, M., i Levy, S.B. 2001. "Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical *Escherichia coli* Strains from China: Role of *acrR* Mutations". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (5): 1515-1521.

-Webber, M.A. i Piddock, L.J.V. 2001. "Absence of Mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-Overexpressing Fluoroquinolone-Resistant Clinical and Veterinary Isolates of *Escherichia coli*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (5): 1550-1552.

-Weigel L.M., Steward, C.D., i Tenover F.C. 1998. "*gyrA* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Eight Species of *Enterobacteriaceae*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42** (10): 2661-2667

-Wetmur, J.G. 1991. "DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization". *Clinical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **26** (3/4): 227-259.

- White, D.G., Goldman, J.D., Demple, B., i Levy, S.B. 1997. "Role of the *acrAB* Locus in Organic Solvent Tolerance Mediated by Expression of *marA*,

soxS, or *robA* in *Escherichia coli*". Journal of Bacteriology **179** (19): 6122-6126.

-White, D.G., Piddock, L.J.V., Maurer, J.J., Zhao, S., Ricci, V., i Thayer, S.G. 2000. "Characterization of Fluoroquinolone Resistance among Veterinary Isolates of Avian *Escherichia coli*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44** (10): 2897-2899.

-Willmott, C.J.R. i Maxwell, A. 1993. "A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **37** (1): 126-127.

-Willmott, C.J.R., Critchlow, S.E., Eperon, I.C., i Maxwell, A. 1994. "The complex of the DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase". Journal of Molecular Biology **242** (4): 351-363.

-Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J.L., i Nakamura, S. 1988. "Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*". Molecular and General Genetics **211** (1): 1-7.

-Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., i Nakamura, S. 1990a. "Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *gyrA* Gene of *Escherichia coli*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **34** (6): 1271-1272.

-Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M., i Nakamura, S. 1990b. "Proportion of DNA Gyrase Mutants among Quinolone-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **34** (6): 1273-1275.

-Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., i Nakamura, S. 1991. "Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *gyrB* Gene of *Escherichia coli*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35** (8): 1647-1650.

-Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M., Ito, H., Kojima, T., Hattori, H., i Nakamura, S. 1993. "Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37 (4)**: 839-845.

-Zhao, X., Xu, C., Domagala, J., i Drlica, K. 1997. "DNA Topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94 (25)**: 13991-13996. *Microbiology*.

-Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., i Storz, G. 2001. "DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide". *Journal of Bacteriology* **183 (15)**: 4562-4570.