

Mutación en el gen *gyrA* de aislamientos hospitalarios de *Acinetobacter baumannii* en Montería, Colombia

Mutation of the *gyrA* Gen in *Acinetobacter Baumannii* Nosocomial Isolates in Monteria, Colombia

Pedro Martínez¹, Salim Máttar¹

Resumen

Objetivo: Determinar las mutaciones del gen *gyrA* asociadas con la resistencia a fluoroquinolonas en *Acinetobacter baumannii*.

Materiales y métodos: Entre agosto de 2005 y febrero de 2007 se recolectaron 23 aislamientos de *A. baumannii* de una clínica privada de tercer nivel de Montería. Se investigaron los genes *gyrA*, *parC* y *adeB*; este último codifica para la bomba de salida. Se realizó secuenciación del ADN y, para el análisis de las secuencias, se usaron la base de datos GenBank y el motor de búsqueda BLASTX.

Resultados: La amplificación del gen *gyrA* en aislamientos de *A. baumannii* generó un fragmento de 343 pb, el cual presentó pérdida del sitio de restricción con la enzima *Hinfl* en 12/23 (52,1%) de los aislamientos resistentes a fluoroquinolonas. La secuenciación del fragmento mostró mutación puntual con

el cambio de Ser-83 a Leu, código de acceso GenBank EU886740. No se encontraron mutaciones en el gen *parC*, ni la presencia de la bomba de salida Ade.

Conclusión: Los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a fluoroquinolonas sugieren que la mutación del gen *gyrA* que codifica el cambio del aminoácido serina a leucina en el codón 83 de estos aislamientos, es responsable o, al menos, contribuye con la resistencia expresada a las fluoroquinolonas.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, fluoroquinolonas, *gyrA*, *parC*, *adeB*, Colombia.

Abstract

Objective: Determine mutations in the *gyrA* gene associated to resistance to fluoroquinolones in *A. baumannii*.

Correspondencia:

Salim Máttar V., Ph.D, Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. Telefax: (574) 756-0710
mattarsalim@hotmail.com
<http://www.unicordoba.edu.co/institutos/iibt/>

Recibido: 06/02/2009; Aceptado: 22/04/2010

¹ Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia

Materials and methods: From August, 2005 to February, 2007, 23 *A. baumannii* isolates were collected in a third level private clinic in Monteria. Research on *gyrA*, *parC* and *AdeB* genes was carried out, and the latter encodes for the efflux pump. DNA sequencing was performed, and the GenBank database and BLASTX search engine were used for sequence analysis.

Results: Amplification of the *gyrA* gene in *A. baumannii* isolates generated a 343pb fragment which presented loss of restriction site with the enzyme *HinfI* in 12/23 (52.1%) of the isolates resistant to fluoroquinolones. The fragment sequencing showed mutation characterized by the change of Ser-83 to Leu GenBank acces code EU886740. None of the isolates showed mutations in the *parC* gene or presence of the *AdeB* efflux pump.

Conclusion: The *A. baumannii* isolates resistant to fluoroquinolones suggest that mutation of the *gyrA* gene encoding the serine amino acid change to leucine at codon 83 of these isolates is responsible or at least contributes to the mentioned resistance to fluoroquinolones.

Keywords: *A. baumannii*, fluoroquinolones, resistance, *gyrA*, *parC*, *AdeB*, Colombia.

Introducción

La incidencia de infecciones hospitalarias causadas por cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a fluoroquinolonas ha aumentando en los últimos años, especialmente, en brotes en las unidades de cuidados intensivos UCI en las que el uso indiscriminado de antibióticos ha conllevado a la diseminación de clones resistentes^(1,2). El uso de las fluoroquinolonas en un comienzo estaba indicado principalmente en infecciones respiratorias; posteriormente,

fue utilizado en infecciones urinarias y otras patologías infecciosas, lo que posiblemente contribuyó al aumento de la resistencia⁽²⁾.

En Estados Unidos y Europa, la resistencia a las quinolonas se encuentra alrededor de 20%^(3,4). En Latinoamérica⁽⁵⁾, la resistencia a las quinolonas está entre 50% y 70%, similar a lo que ocurre en Colombia⁽⁶⁾. En el departamento de Córdoba se han encontrado porcentajes de resistencia de 60,5%⁽⁶⁾; aunque estos reportes sólo señalan el perfil fenotípico, han contribuido al conocimiento de la epidemiología de la resistencia a las fluoroquinolonas. A pesar de la alta prevalencia, en Colombia no existen estudios conocidos que analicen, desde la perspectiva molecular, la resistencia a las fluoroquinolonas.

Las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, que codifican para la subunidad A de la ADN girasa y la subunidad C de la topoisomerasa IV, se encuentran en una zona llamada QRDR (*quinolone-resistance-determining region*) específica para cada subunidad, las cuales se han estudiado en *A. baumannii*⁽⁷⁾. En *gyrA*, estas mutaciones afectan con mayor frecuencia la Ser83 y en segundo lugar la Asp87. En *parC*, las mutaciones afectan la Ser80 y, en segundo lugar, el Glu84. Una mutación conlleva a la disminución de la sensibilidad a las fluoroquinolonas y una doble mutación se asocia a elevados niveles de resistencia⁽⁸⁾.

Las mutaciones en la secuencia de aminoácidos del gen *gyrA* y el *parC* se han encontrado con frecuencia en aislamientos clínicos de *A. baumannii* con resistencia a las quinolonas⁽⁹⁾. No obstante, existen también otros factores importantes que conllevan a la resistencia a estos antimicrobianos, como los sistemas de salida *adeB*, *AbeM* y *AdeJJK*^(10,11). Recientemente, se ha descrito un mecanis-

mo tipo plásmido, determinado por el gen *qnr* en los aislamientos de *Escherichia coli*. Sin embargo, en *A. baumannii* este mecanismo aún no se ha descrito^(12,13).

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de mutaciones en *gyrA* asociadas con la resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos de *A. baumannii* de una clínica privada de Montería.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas. Los 23 aislamientos de *A. baumannii* que se utilizaron en este estudio fueron recolectados en una clínica privada de III nivel de atención en Montería, entre agosto de 2005 y febrero de 2007. La identificación de *A. baumannii* se hizo por MicroScan® Neg Combo Panel Type 44 (Dade Behring, CA, USA). Los aislamientos se obtuvieron de diferentes muestras clínicas: secreciones respiratorias (n=13), catéter (n=3), secreciones de heridas (n= 3), secreciones gástricas (n=1), líquido peritoneal (n=2) y orina (n=1). Los aislamientos se mantuvieron a -70°C en leche descremada (*skim milk*), antes del análisis molecular.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima. Se determinaron los patrones de resistencia mediante el método de concentración inhibitoria mínima (CIM), según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute*⁽¹⁴⁾. Los agentes antibacterianos fueron: ciprofloxacina y moxifloxacina. Se usaron como controles *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Amplificación y detección de genes de resistencia *gyrA* y *parC* y *adeB*. El ADN se obtuvo a partir del sobrenadante del cultivo a una concentración de 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, el cual se sometió a ebullición por 15 minutos y se centrifugó a 14.000g por 1 minuto. Los oligonucleótidos usados para amplificar la zona QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, y el gen *adeB* que codifica para una bomba de salida de tipo RND, se muestran en la tabla 1. La detección de productos de ADN se hizo por tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 mg/L) y posterior visualización en un fotodocumentador GE Healthcare (ImageQuant 100, Uppsala, Sweden).

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Veinte microlitros de los productos *gyrA* y *parC* se incubaron por 2,5 horas con 10 U de *HinfI* a 37°C. Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis a 80 V en NuSieve al 1,5% (Lonza, Rockland, ME, USA) más gel agarosa al 1%. Los productos que no mostraron restricción fueron secuenciados.

Secuenciación de los productos PCR. Para confirmar los productos amplificados, los fragmentos se purificaron con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron directamente mediante el método dideoxi en un secuenciador automático de ADN MegaBACE 750 (Amersham, Biosciences).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el estudio

Oligonucleótidos	Secuencia (5' → 3')	Referencia
<i>gyrA</i> F	AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT	30 31 32
<i>gyrA</i> R	GCCATACCTACGCGGATACC	
<i>parC</i> F	AAACCTGTTACGCGCCGATT	
<i>parC</i> R	GTGGTGCCGTTAAGCAAA	
<i>adeB</i> F	GT(A/T)GA(T/C)GA(T/C)GC(A/T)AT(A/T)GT(A/T)GT	
<i>adeB</i> R	A(A/G)(A/T)(C/G)(A/T)(A/T)GTCAT(A/T)A(A/G)(A/T)AT(A/T)GG	

El análisis de las secuencias se realizó con la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y el motor de búsqueda BLASTX⁽¹⁵⁾. Las secuencias de genes relacionados y la secuencia de nucleótidos de los genes *gyrA* y *parC* se analizaron mediante el uso de múltiple alineación creada por Clustal W, versión 2.0.8⁽¹⁶⁾.

Resultados

Detección de la mutación en el gen *gyrA* y *parC*. La resistencia a las quinolonas se investigó por la búsqueda de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* de 23 aislamientos de *A. baumannii* con CIM para ciprofloxacina entre 0,5 y >64 µg/ml y CIM para moxifloxacina entre 0,5 y >64 µg/ml. La amplificación del gen *gyrA* en aislamientos de *A. baumannii* sensibles a quinolona generó un fragmento de 343 pb, el cual se sometió a digestión con la enzima *Hinfl*, y se produjeron dos fragmentos de 291 pb y 52 pb.

Sin embargo, no se presentó digestión del fragmento *gyrA* con *Hinfl* en 12/23 (52,1%) aislamientos resistentes a quinolonas con CIM de ciprofloxacina mayor de 4 µg/ml. Los fragmentos sin sitio de restricción fueron purificados y secuenciados; estos mostraron 97% de homología con el gen *gyrA* y se encontró mutación puntual en el codón 83 dada por el cambio del nucleótido C a T, lo que codifica para el recambio del aminoácido serina a leucina (código de acceso, *GenBank* EU886740) (figura 1). Las mutaciones en el gen *gyrA* que condujeron a cambios de aminoácidos en los aislamientos resistentes a quinolonas, se muestran en la tabla 2.

El análisis del fragmento de 191 pb del gen *parC* con *Hinfl* en aislamientos sensibles a las quinolonas y resistentes a ellas, generó dos fragmentos de 123 pb y 68 pb; la secuenciación del fragmento de 191 pb de todos los aislamientos mostró 100% de homología con el gen *parC* sin presencia de mutación (código de acceso, *GenBank* NC010400).

Tabla 2. Mutación en el gen *gyrA* de aislamientos clínicos resistentes a quinolonas en *Acinetobacter baumannii*

Aislamiento	CIM (µg/ml)		Cambio de aminoácido		Sistema de salida tipo RND
	CIP	MOX	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>adeB</i>
CO21	4	2	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO24	8	4	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO25	8	8	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO26	16	16	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO27	32	16	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO28	>64	>64	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO29	>64	32	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO33	16	16	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO35	16	16	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO36	32	32	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO37	8	4	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-
CO42	32	32	Ser(TCA) - Leu(TTA)	Sin mutación	-

CIP: ciprofloxacina; MOX: moxifloxacina; -: negativo.

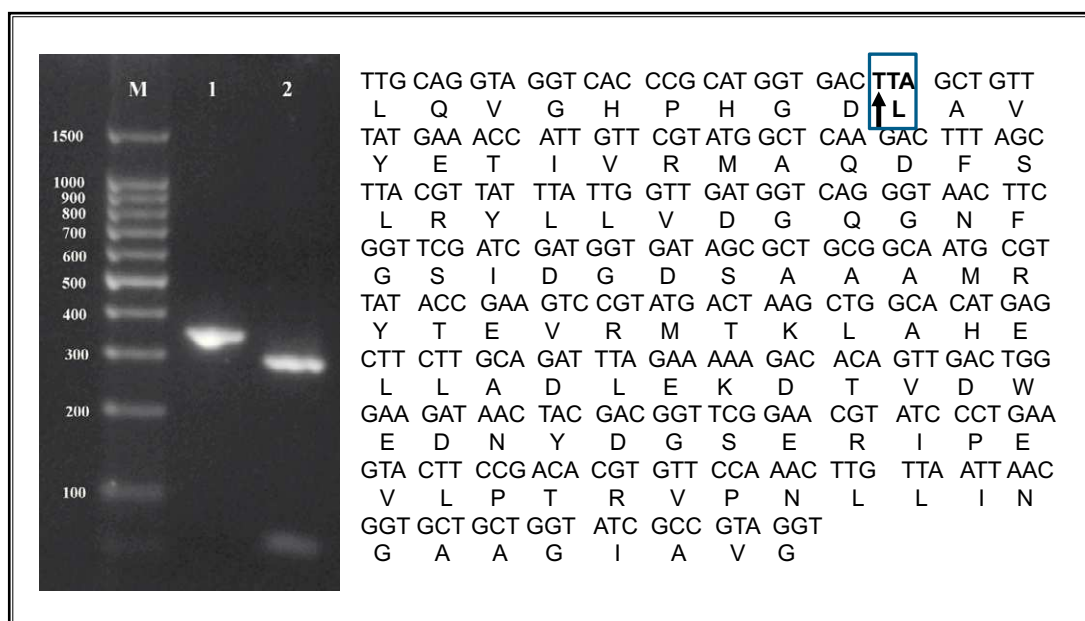


Figura 1. Análisis RFLP del gen *gyrA* de *A. baumannii* resistentes y sensibles a quinolonas digerido con *HinfI*. Izquierda. Secuencia de nucleótidos de la región QRDR del gen *gyrA* de *A. baumannii*. Derecha. La ubicación de la mutación aparece marcada con una flecha. La deducción de aminoácidos está dada debajo de la secuencia de ADN.

Detección de la bomba de salida *adeB*. No se produjo amplificación del gen *adeB* en los aislamientos (tabla 2).

Análisis bioinformático del gen *gyrA*.

Se realizó un alineamiento de la secuencia del gen *gyrA* de tres aislamientos de *A. baumannii* resistentes a las quinolonas de este estudio (CO-21, CO-24, CO-25), con la secuencia sin mutación del gen *gyrA* de *A. baumannii* (código de acceso *GenBank* X82165), y la secuencia con mutación (código de acceso, *GenBank* YP001712820), donde se demuestra que la mutación en la posición de la Ser-83 a Leu, estuvo dada por el cambio de C a T en la segunda posición del codón (tabla 3).

Discusión

La resistencia a las fluoroquinolonas en *A. baumannii* se ha asociado con mutaciones en el gen *gyrA* ⁽¹⁷⁾. Sin embargo, estas mutaciones en *gyrA* no explican por qué algunas

cepas con la misma mutación presentan diferentes CIM a ciprofloxacina u otras fluoroquinolonas, lo que es posible por la presencia de mutaciones en la topoisomerasa IV como otro objetivo de las quinolonas. La determinación de la variación en la CIM para aislamientos de *A. baumannii* que muestran el mismo cambio de aminoácidos en la proteína GyrA podría derivarse de mutaciones en el gen *parC*, región equivalente a la QRDR de *gyrA*, o a la participación de bombas de salida.

En este estudio la secuenciación del gen *gyrA* en los aislamientos clínicos para los

Tabla 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región QRDR de *gyrA* y de las secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos *GenBank*

CLUSTAL W (2.0.8) multiple sequence alignment	
	83
GeneBank X82165	G D S AVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQ
Gene Bank YP001712820	G D L AVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQ
<i>A. baumannii</i> 21	G D L AVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQ
<i>A. baumannii</i> 24	G D L AVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQ
<i>A. baumannii</i> 25	G D L AVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQ

que la CIM de ciprofloxacina fue de 1 µg/ml o menor, no mostró mutación puntual en el codón 83. Sin embargo, en los 12 aislamientos para los que la CIM de ciprofloxacina fue de 4 µg/ml o mayor, se presentó mutación en el codón 83 del gen *gyrA*, que resultó en el cambio del aminoácido serina a leucina, lo cual sugiere que este es el principal mecanismo implicado en la resistencia de estas bacterias a las fluoroquinolonas, debido a la ausencia de mutaciones en el gen *parC* y a la ausencia del sistema de salida *adeB* involucrado en la disminución de la sensibilidad a las fluoroquinolonas que puedan explicar las diferentes CIM expresadas a ciprofloxacina y moxifloxacina en los aislamientos de *A. baumannii* ^(10,18).

No obstante, a pesar de que los hallazgos muestran a la mutación en el gen *gyrA* como el único mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas, es posible que existan en estos aislamientos otros mecanismos de resistencia no contemplados en este estudio, como la bomba de salida de tipo MATE AbeM o el sistema de tipo RND AdeI-JK ^(11,12,19). Aunque los genes de resistencia mediados por plásmidos, como el gen *qnr*, no se ha identificado en aislamientos de *A. baumannii*, podría considerarse su presencia como mecanismo de resistencia en este microorganismo ⁽¹²⁾.

De otra parte, las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la secuenciación de los productos PCR de *gyrA* que no presentaron restricción con *Hinfl*, se compararon mediante el uso de múltiple alineación creada por el uso de Clustal W, versión 2.0.8, con una secuencia sin mutación y otra con mutación obtenidas de la base de datos *GenBank* ⁽¹⁶⁾. De esta manera, se estableció que las secuencias de los productos amplificados presentaron el cambio de Ser-83 a Leu, como se

han descrito otros autores ^(22,18,20). Este cambio se ha asociado anteriormente con niveles de resistencia a ciprofloxacina intermedios a altos (CIM 4 a 128 µg/ml) ⁽²⁴⁾, que corresponden con los niveles de resistencia a ciprofloxacina de las cepas de *A. baumannii* analizadas en el presente estudio.

Estos hallazgos sugieren que la resistencia a las quinolonas en *A. baumannii* multirresistentes depende de la modificación del destino conferida por sustituciones en la región QRDR del gen *gyrA*. Sin embargo, es importante mencionar que la presencia de la mutación Ser-83 incrementa la posibilidad de otras mutaciones en *gyrA* y *parC* ⁽²¹⁾. Aunque, Akasaka *et al.* ⁽²²⁾ han informado que las mutaciones en el gen *gyrB* pueden jugar un papel importante en la resistencia a las fluoroquinolonas, debido a un posible aumento en la afinidad de estos antibióticos por esta subunidad a causa de una mutación en el codón 447 de la zona QRDR del gen *gyrB* ⁽²³⁾.

Aunque los diferentes niveles de resistencia presentados en este estudio por los aislamientos de *A. baumannii* a la ciprofloxacina y a la moxifloxacina sugieren la presencia de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas distintos de *gyrA*, es importante mencionar que los estudios realizados en esta misma ciudad en 2002 mostraron porcentajes de resistencia de este microorganismo a las fluoroquinolonas del 50% ⁽²⁴⁾.

Esto no es diferente de los resultados de este estudio donde se encontró un incremento de sólo 2,1% en la resistencia, lo cual es suficientemente significativo debido a que esta resistencia aparece como consecuencia de un proceso gradual de mutación en los genes *gyrA* y *parC*, como también ocurre para los sistemas de salida. Así lo demuestra un estudio con *P. aeruginosa* en pacientes

con fibrosis quística tratados con ciprofloxacina, realizado por Jalal *et al.* ⁽²⁵⁾, en el cual el desarrollo de mutaciones de salida por MexCD-OprJ y MexEF-OprN como principal mecanismo de resistencia a las quinolonas, tomó cerca de tres años.

Por el contrario, con la resistencia mediada por la adquisición o transferencia horizontal de plásmidos de resistencia, transposones o integrones, el incremento en la CIM puede ocurrir de forma brusca en un tiempo corto como se presenta con la resistencia a antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos ^(26,27). En este estudio la resistencia expresada a las fluoroquinolonas fue más baja en relación con la resistencia mostrada a otras familias de antibióticos, como los aminoglucósidos, con 87,5% de resistencia y 68,7% de resistencia a los carbapenems (no se presentan los datos).

Las quinolonas ciprofloxacina y moxifloxacina son antimicrobianos de uso clínico importante en neumonías ^(28,29). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el uso de estos antibióticos para tratar neumonías causadas por *A. baumannii* resultaría complicado, teniendo en cuenta que el gen *gyrA* presenta mutación que confiere resistencia a estos antibióticos en uno de cada dos aislamientos obtenidos. Esto podría conllevar al fracaso terapéutico, si estos antibióticos se utilizan para tratar las infecciones causadas por este microorganismo.

En conclusión, éste es el primer estudio que se lleva a cabo en Colombia sobre la detección molecular de la resistencia a fluoroquinolonas en *A. baumannii*. Los resultados permiten demostrar que los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a las fluoroquinolonas son particularmente preocupantes, debido a que la resistencia a estos antibió-

ticos, como fue encontrada en este estudio, está dada por mutación cromosómica del gen *gyrA*.

Esto implica que, una vez adquirida, la resistencia es irreversible, lo que podría resultar en no usar estos antibióticos para tratar infecciones causadas por este microorganismo. Sin embargo, es posible que puedan existir mutaciones en el gen *gyrB*, o estar presentes otros sistemas de salida diferentes a los investigados en este estudio, que puedan contribuir a incrementar la CIM de las fluoroquinolonas. Los resultados también sugieren que la mutación del gen *gyrA* responsable de codificar el cambio del aminoácido serina a leucina en el codón 83 en aislamientos de *A. baumannii*, es responsable o, al menos, contribuye, con la resistencia expresada a las fluoroquinolonas.

Agradecimientos

A la Universidad de Córdoba por la financiación de este trabajo [código FMV 04-06; numeral: 1120223]. A Carlos Muskus por su valiosa ayuda en el análisis de las secuencias. Los resultados de este trabajo hacen parte de la tesis de maestría en Microbiología Tropical de Pedro Martínez R.

Referencias

1. Adams-Haduch J, Paterson D, Sidjabat H, Pasculle A, Potoski B, Muto C, *et al.* Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3837-43.
2. Munoz-Price, Weinstein R. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med.* 2008;358:1271-81.
3. Karlowsky J, Draghi D, Jones M, Thornsberry C, Friedland I, Sahm D. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1681-8.

4. Alós J. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21: 261-8.
5. Diomedis A. Infecciones por *A. baumannii* pan-resistentes. Consideraciones epidemiológicas y manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil Infect*. 2005;22:298-320.
6. Martínez P, Mercado M, Máttar S. Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb Med*. 2003;34:196-205.
7. Hujer K, Hujer A, Endimiani A, Thomson J, Adams M, Goglin K, et al. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1436-42.
8. Mak J, Kim M, Pham J, Tapsall J, White P. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:47-54.
9. Hamouda A, Amyes S. Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:695-6.
10. Higgins P, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of AdeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:821-3.
11. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:557-62.
12. Tran J, Jacoby G, Hooper D. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49: 118-25.
13. Peleg A, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:538-82.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
15. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403-10.
16. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-80.
17. Lin Y, Hsia K, Chen Y, Sheng W, Chang S, Liao M, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter* clinical isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:2078-84.
18. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jiménez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 1997;39:757-62.
19. Jacoby G. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41:S120-6.
20. Kyu J, Seon Y, Keun Y, Su B. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol Immunol*. 2005;49:647-53.
21. Oteo J, Campos J. Uso de quinolonas y resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:201-3.
22. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2263-8.
23. Heddle J, Maxwell A. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of *gyrB*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1805-15.
24. Martínez P, Mercado M, Máttar S. Actividad *in vitro* de moxifloxacina comparada con otros antibióticos frente a aislamientos nosocomiales de dos hospitales de Colombia. *Universitas Médica*. 2004; 45:101-109.
25. Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 710-712.
26. Moubareck C, Brémont S, Conroy M, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53: 3579-81.
27. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*. 2004;53:1233-40.
28. Lim T, Ledesma K, Chang K, Hou J, Kwa A, Nikolaou M, et al. Quantitative assessment of combination antimicrobial therapy against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2898-904.
29. Drusano G, Preston S, Fowler C, Corrado M, Weisinger B, Kahn J. Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *J Infect Dis*. 2004;189: 1590-7.
30. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jiménez De Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemother*. 1995;39:1201-3.
31. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jiménez de Anta M. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40: 491-3.
32. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:3375-80.