



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Prevalencia en España de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas



Jesús Machuca^{a,b,*}, Jesús Agüero^{b,c,d}, Elisenda Miró^{b,e}, María del Carmen Conejo^{b,f}, Jesús Oteo^{b,g}, Germán Bou^{b,h}, Juan José González-López^{b,i}, Antonio Oliver^{b,j}, Ferran Navarro^{b,e}, Álvaro Pascual^{a,b,f} y Luis Martínez-Martínez^{b,c,d}

^a Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Sevilla, España

^b Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD12/0015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, España

^d Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, España

^e Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau-Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, España

^f Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^g Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos e Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, España

^h Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, A Coruña, España

ⁱ Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^j Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 29 de marzo de 2016

Aceptado el 23 de mayo de 2016

On-line el 23 de junio de 2016

Palabras clave:

Mecanismos de resistencia a quinolonas

Carbapenemasas

Betalactamasas de clase C adquiridas

R E S U M E N

Introducción: En los últimos años se ha observado un incremento de la resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias, estando asociado significativamente a la resistencia a betalactámicos. Nuestro objetivo fue conocer la prevalencia de mecanismos cromosómicos y plasmídicos de resistencia a quinolonas en aislados productores de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas.

Métodos: Se evaluó la presencia de mecanismos cromosómicos y plasmídicos de resistencia a quinolonas [mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas de *gyrA* y *parC* y genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*] en 289 aislados de enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas recogidos entre febrero y julio de 2009 en 35 hospitales españoles.

Resultados: Se detectaron determinantes plasmídicos en 92 aislados (31,8%); en 83 aislados (28,7%) se detectó algún gen *qnr*, y en 20 (7%), la variante *aac(6')-Ib-cr*. El gen *qnr* más prevalente fue *qnrB4* (20%), asociado en la mayoría de los casos a DHA-1. El 14,6% de los aislados con una CMI de ciprofloxacino superior a 0,25 mg/l no presentaban mutaciones en *gyrA* ni *parC*, detectándose en el 90% de los mismos algún determinante plasmídico de resistencia a quinolonas.

Conclusión: *qnrB4* fue el determinante plasmídico más prevalente, claramente asociado a DHA-1. Los mecanismos plasmídicos en asociación con mecanismos cromosómicos diferentes a las mutaciones en los genes de las topoisomerasas (sobreexpresión de bombas de expulsión, alteración del lipopolisacárido o disminución de porinas) pueden dar lugar a valores de CMI de ciprofloxacino que superan los puntos de corte establecidos por los principales comités internacionales de definición de puntos de corte para interpretación de datos de sensibilidad.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jesmacbar@hotmail.com (J. Machuca).

Prevalence of quinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* producing acquired AmpC β -lactamases and/or carbapenemases in Spain

A B S T R A C T

Keywords:

Quinolone resistance mechanisms
Carbapenemases
Acquired AmpC β -lactamases

Background: Quinolone resistance in *Enterobacteriaceae* species has increased over the past few years, and is significantly associated to beta-lactam resistance. The aim of this study was to evaluate the prevalence of chromosomal- and plasmid-mediated quinolone resistance in acquired AmpC β -lactamase and/or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates.

Methods: The presence of chromosomal- and plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms [mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) of *gyrA* and *parC* and *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes] was evaluated in 289 isolates of acquired AmpC β -lactamase- and/or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* collected between February and July 2009 in 35 Spanish hospitals.

Results: Plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) genes were detected in 92 isolates (31.8%), *qnr* genes were detected in 83 isolates (28.7%), and the *aac(6')-Ib-cr* gene was detected in 20 isolates (7%). *qnrB4* gene was the most prevalent *qnr* gene detected (20%), associated, in most cases, with DHA-1. Only 14.6% of isolates showed no mutations in *gyrA* or *parC* with a ciprofloxacin MIC of 0.5 mg/L or higher, whereas PMQR genes were detected in 90% of such isolates.

Conclusion: *qnrB4* gene was the most prevalent PMQR gene detected, and was significantly associated with acquired AmpC β -lactamase DHA-1. PMQR determinants in association with other chromosomal-mediated quinolone resistance mechanisms, different to mutations in *gyrA* and *parC* (increased energy-dependent efflux, altered lipopolysaccharide or porin loss), could lead to ciprofloxacin MIC values that exceed breakpoints established by the main international committees to define clinical antimicrobial susceptibility breakpoints.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos de amplio espectro que se utilizan con elevada frecuencia en clínica. Desde hace años se están observando altas tasas de resistencia a estos antimicrobianos en enterobacterias en todo el mundo¹. Las dianas de estos compuestos son la topoisomerasa II (o ADN girasa) y la topoisomerasa IV. La resistencia a quinolonas en enterobacterias puede deberse a múltiples causas que con frecuencia se expresan en un mismo microorganismo. Tradicionalmente se ha prestado especial atención a las mutaciones que ocurren en los genes *gyrA* y *parC* que codifican la subunidad A de la ADN girasa y la subunidad A de la topoisomerasa IV, respectivamente; menos relevantes en aislamientos clínicos son las mutaciones en los genes *gyrB* y *parE*, que codifican las subunidades B de las citadas enzimas. En estos genes, las mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas se localizan en una región concreta de los mismos denominada «región determinante de la resistencia a quinolonas» (*quinolone resistance determining region* [QRDR]). En las bacterias gramnegativas la diana primaria de las quinolonas es la ADN girasa, apareciendo las mutaciones primero en *gyrA* y posteriormente en *parC*¹. A pesar de ello, se han descrito aislados clínicos resistentes a ciprofloxacino con mutaciones en *parC* que no se acompañan de mutaciones en *gyrA*². Una única mutación en *gyrA* causa resistencia a ácido nalidíxico, pero confiere un bajo nivel de resistencia (sin sobrepasar el punto de corte clínico) a ciprofloxacino y levofloxacino³. Al aumentar el número de mutaciones en *gyrA* y *parC*, lo hace también el nivel de resistencia hasta rebasar el valor que define la resistencia clínica. Aunque en menor medida, la pérdida o la alteración estructural de las porinas, la sobreexpresión de bombas de expulsión activa y las alteraciones del lipopolisacárido también contribuyen a la resistencia a quinolonas⁴.

Hasta la fecha se han descrito 3 tipos de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas (DPRQ): los genes *qnr*, que codifican proteínas de repeticiones pentapeptídicas; la variante de una acetiltransferasa, *AAC(6')-Ib-cr*, que afecta a quinolonas con un grupo piperazinil (por ejemplo, ciprofloxacino y norfloxacino), y las

bombas de expulsión activa OqxAB (muy frecuente en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae*) y QepA⁵. En las 2 últimas décadas se está observando un aumento a nivel global de la prevalencia de los DPRQ⁴.

La resistencia a quinolonas es más frecuente en enterobacterias que presentan resistencia a betalactámicos por producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas de clase C adquiridas o carbapenemasas⁶. De hecho, la primera descripción de un gen *qnr* (*qnrA1*) tuvo lugar en una cepa de *K. pneumoniae* productora de la cafolosporinasa FOX-5⁷. Desde entonces, múltiples estudios han demostrado la frecuente asociación entre genes que codifican las citadas betalactamasas y diversas variantes de genes que codifican DPRQ, por ejemplo el caso de *qnrA* y *qnrB* con BLEE del grupo CTX-M^{4,8}.

En el presente estudio se analiza la presencia de mutaciones cromosómicas (en *gyrA* y *parC*) y de los DPRQ *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* y *aac(6')-Ib-cr* en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas procedentes de muestras clínicas, aisladas en un estudio multicéntrico en el que participaron 35 hospitales españoles que tuvo lugar entre febrero y julio de 2009⁹. El objetivo es estudiar la asociación de mecanismos de resistencia a quinolonas (cromosómicos y plasmídicos) con betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas en enterobacterias, así como conocer la prevalencia de DPRQ en esta población bacteriana.

Métodos

Aislados bacterianos

Se analizó una colección de 289 aislados de enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas, incluyendo *Escherichia coli* (n = 163), *K. pneumoniae* (n = 57), *Proteus mirabilis* (n = 45), *Klebsiella oxytoca* (n = 10), *Enterobacter cloacae* (n = 9), *Citrobacter koseri* (n = 3), *Proteus penneri* (n = 1) y *Salmonella* sp. (n = 1). Solo se incluyó un aislado por paciente. Los datos clínicos y epidemiológicos de esta colección han sido descritos previamente^{9,10}.

Tabla 1

Determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas detectados en función de la especie bacteriana

	<i>E. coli</i> (163)	<i>K. pneumoniae</i> (57)	<i>P. mirabilis</i> (45)	<i>K. oxytoca</i> (10)	<i>E. cloacae</i> (9)	<i>C. koseri</i> (3)	<i>Salmonella</i> sp. (1)	<i>P. penneri</i> (1)
<i>qnrA1</i>	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>qnrB4</i>	21 ^a	26 ^a	3	3 ^a	2	2	1	0
<i>qnrB19</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>qnrD</i>	0	0	10	0	0	0	0	0
<i>qnrS1</i>	3 ^a	4 ^a	0	0	1	0	0	0
<i>qnrS2</i>	2 ^a	1 ^a	0	4 ^a	1 ^a	0	0	0
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	9 ^a	7 ^a	0	3 ^a	1 ^a	0	0	0

^a Incluye aislados en los que se detectaron 2 DPRQ diferentes (*E. coli*: 1 *qnrB4* + *qnrS1* y 2 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*; *K. pneumoniae*: 2 *qnrB4* + *qnrS1*, 5 *qnrB4* + *aac(6')-Ib-cr* y 1 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*; *K. oxytoca*: 1 *qnrB4* + *qnrS2* y 2 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*; *E. cloacae*: 1 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*).

Sensibilidad antimicrobiana y estudio de mecanismos de resistencia a quinolonas

La sensibilidad a ácido nalidíxico y ciprofloxacino se determinó mediante los métodos estandarizados de difusión con discos y microdilución en caldo, respectivamente¹¹. En las cepas resistentes a ácido nalidíxico (diámetro del halo de inhibición ≤ 13 mm)¹¹ o con una CMI de ciprofloxacino $\geq 0,25$ mg/l se analizaron las mutaciones en la región QRDR de *gyrA* empleando la metodología descrita previamente¹². En las cepas en que no se detectaron mutaciones en *gyrA* se estudió de forma adicional la presencia de mutaciones en *parC*¹².

Se analizó la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* y *aac(6')-Ib* en todas las cepas mediante PCR utilizando cebadores descritos previamente¹³. Los productos de amplificación se secuenciaron posteriormente.

Resultados

Se detectaron DPRQ en 92 (31,8%) de los 289 aislados de enterobacterias analizados mediante PCR y secuenciación. Los genes de resistencia plasmídica a quinolonas detectados incluyeron 2 *qnrA1*, 59 *qnrB* (58 *qnrB4*, 1 *qnrB19*), 10 *qnrD*, 16 *qnrS* (8 *qnrS1*, 8 *qnrS2*) y 20 *aac(6')-Ib-cr*. No se detectaron en ningún aislado los determinantes *qnrC* ni *qepA*. Setenta y siete aislados (83,7%) presentaron un solo DPRQ. Los 15 aislados restantes (16,3%) presentaron 2 DPRQ: 6 *aac(6')-Ib-cr* + *qnrS2*, 5 *aac(6')-Ib-cr* + *qnrB4*, 3 *qnrB4* + *qnrS1* y 1 *qnrB4* + *qnrS2*.

Se observaron importantes diferencias en el tipo de DPRQ acorde a las especies de enterobacterias (tabla 1). De los 163 aislados de *E. coli*, se detectó al menos un determinante plasmídico en 32 aislados (19,6%). Los determinantes detectados fueron: 21 *qnrB4*, 5 *qnrS* y 9 *aac(6')-Ib-cr*, portando 3 aislados 2 DPRQ (2 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr* y 1 *qnrB4* + *qnrS1*). Entre los aislados de *K. pneumoniae* se detectaron mecanismos plasmídicos en 32 (56,1%). En 24 se detectó un solo mecanismo plasmídico y en 8 se detectaron 2 (2 *qnrB4* + *qnrS1*, 5 *qnrB4* + *aac(6')-Ib-cr* y 1 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*). La prevalencia de DPRQ en el resto de especies fue: *P. mirabilis* 28,9%, *K. oxytoca* 70%, *E. cloacae* 55,6%, *C. koseri* 66,7%, *Salmonella* sp. 100% y *P. penneri* 0%.

Tabla 2

Determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas detectados en función de la betalactamasa de clase C adquirida y carbapenemasa producida

	DHA-1 (62)	DHA-7 (1)	CMY-2 (175)	CMY-7 (1)	CMY-27 (2)	AAC-1 (8)	FOX-3 (2)	VIM-1 (25)
<i>qnrA1</i>	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>qnrB4</i>	57 ^a	0	1 ^a	0	0	0	0	2 ^a
<i>qnrB19</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>qnrD</i>	0	0	10	0	0	0	0	1
<i>qnrS1</i>	3 ^a	0	0	0	1	3	0	1
<i>qnrS2</i>	2 ^a	0	0	0	0	1 ^a	1 ^a	5 ^a
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	6 ^a	0	7 ^a	1	0	2 ^a	1 ^a	5 ^a

No se incluyen aislados productores de las betalactamasas de clase C adquiridas DHA-6, FOX-8, CMY-4, CMY-48, CMY-55, CMY-57, CMY-59 y CMY-60 y las carbapenemasas IMP-22 e IMP-28 porque en ninguno de ellos se detectaron DPRQ.

^a Incluye aislados en los que se detectaron 2 DPRQ diferentes (DHA-1: 3 *qnrB4* + *qnrS1*, 1 *qnrB4* + *qnrS1*, 5 *qnrB4* + *aac(6')-Ib-cr* y 1 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*; CMY-2: 1 *qnrB4* + *aac(6')-Ib-cr*; AAC-1: 1 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*; FOX-3: 1 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*; VIM-1: 1 *qnrB4* + *aac(6')-Ib-cr* y 4 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*).

Los diferentes DPRQ detectados en estas especies se recogen en la tabla 1. El gen *qnrD* solo se detectó en *P. mirabilis*. El determinante *qnrS2* fue detectado en presencia de otro gen plasmídico en 7 de los 8 aislados que lo portaban (87,5%).

Entre los aislados productores de carbapenemasas (2 productores de IMP-22, un productor de IMP-28 y 25 productores de VIM-1) la prevalencia de DPRQ fue del 39%, detectándose algún DPRQ en 11 aislados productores de VIM-1: 2 *qnrA1*, 1 *qnrB19*, 1 *qnrD*, 1 *qnrS1*, 1 *qnrS2*, 1 *qnrB4* + *aac(6')-Ib-cr* y 4 *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr*.

La prevalencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas entre los 264 aislados productores de betalactamasas de clase C adquiridas fue del 31,4% (83 aislados). No se detectaron determinantes plasmídicos en los aislados que producían las betalactamasas de clase C adquiridas DHA-6, FOX-8, CMY-4, CMY-48, CMY-55, CMY-57, CMY-59 y CMY-60. Los genes *qnrA1* y *qnrB19* no se detectaron en aislados productores de betalactamasas de clase C adquiridas. La asociación entre DPRQ y betalactamasas de clase C adquiridas se recoge en la tabla 2. La betalactamasa de clase C mayoritaria de la colección fue CMY-2 (175 aislados), detectándose en el 9,7% de los aislados portadores de esta enzima algún DPRQ. Los 10 genes *qnrD* se detectaron en cepas de *P. mirabilis* productoras de CMY-2. Entre las enterobacterias productoras de CMY-2 se detectaron 7 con *aac(6')-Ib-cr*.

Entre los 62 aislados productores de DHA-1 se detectaron DPRQ en 58 (93,5%), siendo *qnrB4* el más frecuentemente encontrado, presente en 57 de dichos aislados (en 9 aislados también se detectó un segundo determinante plasmídico). La asociación entre *qnrB4* y DHA-1 fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Con respecto a los mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas, se analizó la región QRDR de *gyrA* de los aislados resistentes a ácido nalidíxico¹¹ o que presentaban una CMI de ciprofloxacino igual o superior a 0,25 mg/l. No se encontró ningún aislado con mutaciones en *parC* sin presentarla en *gyrA*. En *E. coli* se comprobó que todos los aislados resistentes a ácido nalidíxico presentaban mutaciones en la región analizada (tabla 3). En esta especie bacteriana hubo 4 aislados con CMI de ciprofloxacino de 0,25 mg/l que no presentaron mutaciones en *gyrA* ni en *parC*; 3 de ellos presentaron un DPRQ. Además, en esta enterobacteria se encontraron aislados con mutaciones en *gyrA* y DPRQ

Tabla 3

Características de los aislados de la colección en función de la CMI de ciprofloxacino

		CMI de ciprofloxacino (mg/l)					
		≤ 0,12	0,25	0,5	1	2	> 2
<i>E. coli</i> (163)							
Total	28	22	8	3	2	100	
Nal R	0	18	8	3	2	100	
DPRQ	1	3	0	3	1	24	
GyrA	ND	18	8	3	2	100	
<i>K. pneumoniae</i> (57)							
Total	9	3	8	9	5	23	
Nal R	0	0	4	1	3	21	
DPRQ	1	1	4	8	3	15	
GyrA	ND	0	2	0	2	20	
<i>P. mirabilis</i> (45)							
Total	11	0	1	3	10	20	
Nal R	0	0	0	3	10	20	
DPRQ	1	0	1	0	0	11	
GyrA	ND	0	0	3	1	20	
<i>K. oxytoca</i> (10)							
Total	1	0	0	4	2	3	
Nal R	0	0	0	0	1	3	
DPRQ	0	0	0	4	1	2	
GyrA	ND	0	0	0	1	3	
<i>E. cloacae</i> (9)							
Total	0	1	0	3	2	3	
Nal R	0	1	0	1	2	1	
DPRQ	0	0	0	2	0	3	
GyrA	ND	1	0	1	2	1	
<i>C. koseri</i> (3)							
Total	1	2	0	0	0	0	
Nal R	0	1	0	0	0	0	
DPRQ	0	2	0	0	0	0	
GyrA	ND	0	0	0	0	0	
<i>Salmonella</i> spp. (1)							
Total	0	1	0	0	0	0	
Nal R	0	1	0	0	0	0	
DPRQ	0	1	0	0	0	0	
GyrA	ND	0	0	0	0	0	
<i>P. pemmeri</i> (1)							
Total	0	0	1	0	0	0	
Nal R	0	0	1	0	0	0	
DPRQ	0	0	0	0	0	0	
GyrA	ND	0	NA	0	0	0	

DPRQ: número de aislados portadores de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas; GyrA: número de aislados con mutaciones en la QRDR de *gyrA*. No se encontró ningún aislado sin mutaciones en *gyrA* que presentara alguna mutación en *parC*; NA: no amplificó la región QRDR de *gyrA*; Nal R: número de aislados resistentes a ácido nalidíxico (diámetro del halo ≤ 13 mm); ND: no se determinó la presencia de mutaciones en *gyrA* en los aislados sensibles a ácido nalidíxico (diámetro del halo de inhibición > 13 mm)¹¹ o con una CMI de ciprofloxacino ≤ 0,12 mg/l; Total: número total de aislados de cada especie.

independientemente del valor de su CMI de ciprofloxacino, algo no observado en los aislados de otras especies, en las cuales solo se detectó la combinación de DPRQ y mutaciones en *gyrA* en aislados con CMI de ciprofloxacino superior a 2 mg/l.

Entre los aislados de especies diferentes a *E. coli*, se encontró un 9,5% que eran resistentes a ácido nalidíxico y no presentaban mutaciones en el QRDR de *gyrA* ni de *parC* (tabla 3); el 66,7% de los aislados con una CMI de ciprofloxacino igual o superior a 0,25 mg/l presentaban alguna mutación en *gyrA* y el 52,8% portaba algún DPRQ.

Discusión

El desarrollo y la expansión de la resistencia a los betalactámicos, unidos al amplio espectro antimicrobiano de las fluoroquinolonas, condujo al uso de estos últimos fármacos como terapia empírica

para una gran variedad de infecciones de origen comunitario y nosocomial. El uso masivo de las quinolonas ha provocado un incremento de los niveles de resistencia a fluoroquinolonas a nivel mundial. En España, la tasa de aislados de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas ha aumentado en los últimos años más del 16%, pasando del 17,3% en 2001 al 34% en 2014¹⁴. La situación en *K. pneumoniae* es similar, siendo el aumento de los niveles de resistencia algo inferior. En el presente estudio, el 59% (170) de los aislados portadores de carbapenemasas o betalactamasas de clase C adquiridas analizados fueron no sensibles a ciprofloxacino, dato preocupante que pone de manifiesto el reducido número de opciones terapéuticas que presentan los aislados de enterobacterias multirresistentes.

La resistencia a fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones en los genes de las topoisomerasas tipo II y se trata de un proceso secuencial, de modo que la aparición de una primera mutación en *gyrA* favorece la aparición de nuevas mutaciones en *parC* y *gyrA* que conllevan a un incremento de la CMI de ciprofloxacino por encima de 2 mg/l¹⁵. El resto de mecanismos de resistencia conocidos, tanto mecanismos cromosómicos como plasmídicos, confieren por sí solos un bajo nivel de resistencia que no llega a superar los puntos de corte establecidos por las agencias internacionales⁵. En la colección analizada en este estudio se han encontrado 24 aislados (15 *K. pneumoniae*, 5 *K. oxytoca* y 4 *E. cloacae*) con una CMI de ciprofloxacino igual o superior a 1 mg/l que no presentan mutaciones en la región QRDR de *gyrA* ni *parC*; 23 de estos aislados presentan al menos un DPRQ. Los genes *qnr* presentes en estos aislados fueron *qnrB4* y/o *qnrS* (algunos aislados también portaban el gen *aac(6')-Ib-cr*), los cuales se asocian a mayor incremento de la CMI de fluoroquinolonas^{3,16}. Acorde con nuestros datos, la presencia de aislados con una CMI de fluoroquinolonas elevada en ausencia de mutaciones en *gyrA* y *parC* y portadores de DPRQ ha sido descrita recientemente en Polonia².

La presencia de genes *qnr* favorece la aparición de mutaciones cromosómicas que reducen la permeabilidad a las fluoroquinolonas o incrementan su expulsión del interior celular (mediante la reducción del número de porinas, las alteraciones en el lipopolisacárido o el incremento de la expresión de bombas de expulsión), lo que determina un incremento de la CMI de ciprofloxacino^{17,18}. Además, las mutaciones que afectan la entrada y la salida de quinolonas aparecen antes que las mutaciones en las regiones QRDR¹⁹, algo que concuerda con los datos obtenidos en este estudio, donde se observa que en la mayoría de los aislados con CMI de ciprofloxacino entre 0,5 y 2 mg/l no se da la combinación de DPRQ y mutaciones cromosómicas en las regiones QRDR. Por otro lado, la combinación de ambos mecanismos sí se observa en cepas con CMI superior a 2 mg/l. Por tanto, la elevada CMI en estos aislados podría deberse a una combinación sinérgica de los DPRQ y mutaciones cromosómicas que reducen la concentración intracelular de quinolonas, de modo que en pasos posteriores estos aislados pudieran adquirir mutaciones en la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, incrementándose el nivel de resistencia a fluoroquinolonas.

Una de las principales limitaciones existentes cuando se estudia la prevalencia de los DPRQ es la ausencia de marcadores fenotípicos de los mismos¹³, lo que condiciona que la mayoría de los datos de prevalencia de estos genes de resistencia se lleve a cabo en poblaciones concretas: aislados resistentes a fluoroquinolonas o productores de BLEE²⁰⁻²², lo que dificulta la comparación entre estudios.

En el presente estudio la prevalencia de DPRQ en cepas productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas ha sido del 32%, valor similar a los hallados en colecciones parecidas²³. Los datos referentes a las cepas productoras de carbapenemasas indican una prevalencia de DPRQ del 39%, valor inferior a los encontrados en otras regiones del mundo, como China, en cepas resistentes a carbapenémicos²⁴. La información obtenida de los aislados productores de carbapenemasas hay que tomarla con

cautela debido al bajo número de cepas productoras de estas betalactamasas incluidas en este estudio (28). Además, desde el año 2010 se ha producido una expansión de las carbapenemasas en España, principalmente debido a la dispersión de OXA-48, convirtiéndose esta enzima en la más prevalente en nuestro país²⁵, por lo que sería interesante conocer la prevalencia de DPRQ de los aislados productores de esta betalactamasa en España. A este respecto, se ha descrito recientemente la coexistencia de OXA-48 y AAC(6′)-Ib-cr en *K. pneumoniae* en Turquía²⁶.

En nuestra colección el DPRQ más prevalente fue *qnrB4* (20%), seguido del gen *aac(6′)-Ib-cr* (7%). Estos datos difieren de lo publicado en multitud de estudios donde el DPRQ más prevalente es *aac(6′)-Ib-cr*, seguido de *qnrB*^{21,24,27}. Esta discordancia se debe a la naturaleza de la colección objeto de este estudio, donde la alta prevalencia de *qnrB4* se debe a su asociación con DHA-1^{28,29}, habiéndose detectado *qnrB4* en el 92% de los aislados productores de esta betalactamasa de clase C plasmídica. Un análisis previo en 22 de las cepas que se han considerado para este estudio ya había permitido comprobar que en la gran mayoría de los casos *qnrB4* estaba presente en el entorno genético del gen *bla*_{DHA-1}³⁰. Dadas las diferentes poblaciones analizadas en los distintos estudios sobre prevalencia de DPRQ llevados a cabo a nivel mundial resulta difícil la comparación entre ellos. Sería interesante la realización de estudios de prevalencia utilizando poblaciones bacterianas sin sesgos, de modo que podamos obtener datos de prevalencia sin sobre ni subestimaciones. A este respecto, recientemente se ha publicado un algoritmo que permite la detección fenotípica de DPRQ en cepas carentes de modificaciones en QRDR³¹, lo que facilitaría realizar un estudio de prevalencia de estos mecanismos de resistencia.

Los resultados obtenidos apoyan lo expuesto por otros autores^{3,16,32}, que aunque los DPRQ a quinolonas por sí solos ocasionan un moderado nivel de resistencia a quinolonas, su asociación con mecanismos cromosómicos puede llevar los valores de CMI de las quinolonas por encima de los puntos de corte establecidos, por lo que sería conveniente conocer la epidemiología de estos mecanismos plasmídicos y poder controlar su dispersión, hecho que podría ayudar a reducir o evitar el incremento de la resistencia a quinolonas.

Financiación

Este estudio fue parcialmente financiado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008), por subvenciones del Fondo de Investigación Sanitaria (PS09/00125 y PI11/01117) y por ayudas de AstraZeneca Farmacéutica España y Wyeth (actualmente Pfizer).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A los miembros de los grupos GEMARA y GEIH de la SEIMC.

Bibliografía

- Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: Action and resistance updated. *Curr Top Med Chem*. 2009;9:981–98.
- Piekarska K, Wołkowicz T, Zacharczuk K, Rzeckowska M, Chróst A, Bareja E, et al. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:238–43.
- Machuca J, Briales A, Labrador G, Díaz-de-Alba P, López-Rojas R, Docobo-Pérez F, et al. Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:3203–15.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:664–89.
- Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*. 2014;2(5).
- Tolun V, Küçükbasmaci O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Anğ-Küçüker M, Anğ O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:72–5.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998;351:797–9.
- Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:1115–7.
- Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:253–9.
- Rodríguez-Baño J, Miró E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, et al. Colonisation and infection due to *Enterobacteriaceae* producing plasmid-mediated AmpC β-lactamases. *J Infect*. 2012;64:176–83.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement M100-S25. Wayne, PA, USA: CLSI; 2015.
- Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:440–5.
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *J Infect Chemother*. 2011;17:149–82.
- European Centre for Disease Prevention and Control. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). [consultado 16 May 2016]. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu>
- Bansal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37:253–5.
- Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Díaz de Alba P, Domínguez-Herrera J, Pachón J, et al. In vitro effect of *qnrA1*, *qnrB1*, and *qnrS1* genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1266–9.
- Cesaro A, Bettini RRD, Lascols C, Mérens A, Soussy CJ, Cambau E. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1007–15.
- Vinué L, Corcoran MA, Hooper DC, Jacoby GA. Mutations that enhance the ciprofloxacin resistance of *Escherichia coli* with *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60:1537–45.
- Singh R, Swick MC, Ledesma KR, Yang Z, Hu M, Zechiedrich L, et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1680–5.
- Yang HY, Nam YS, Lee HJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2014;25:163–9.
- Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:431–4.
- Shams E, Firoozeh F, Moniri R, Zibaei M. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* human isolates in Iran. *J Pathog*. 2015;2015:434391.
- Alonso N, Miró E, Pascual V, Rivera A, Simó M, García MC, et al. Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal *bla*_{AmpC} in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47:62–8.
- Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1003–6.
- Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 Hospitals in Spain reveals high *in vitro* susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3406–12.
- Nazik H, Öngen B, Mete B, Aydın S, Yemişen M, Keleşoğlu FM, et al. Coexistence of *bla*_{OXA-48} and *aac(6′)-Ib-cr* genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Istanbul, Turkey. *J Int Med Res*. 2011;39:1932–40.
- Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66:425–31.
- Mata C, Miró E, Toleman M, Rivera MA, Walsh TR, Navarro F. Association of *bla*_{DHA-1} and *qnrB* genes carried by broad-host-range plasmids among isolates of *Enterobacteriaceae* at a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1514–7.

29. Pai H, Seo M-R, Choi TY. Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum beta-lactamases or plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:366–8.
30. Zamorano L, Miró E, Juan C, Gómez L, Bou G, González-López JJ, et al. Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from *Enterobacteriaceae*: Findings from a multicenter study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:5260–6.
31. Rodríguez-Martínez J-M, López-Cerero L, Díaz-de-Alba P, Chamizo-López FJ, Polo-Padillo J, Pascual A. Assessment of a phenotypic algorithm to detect plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:845–7.
32. Machuca J, Briales A, Díaz-de-Alba P, Martínez-Martínez L, Pascual A, Rodríguez-Martínez J-M. Effect of the efflux pump QepA2 combined with chromosomally mediated mechanisms on quinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:2524–7.