



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

TESIS DOCTORAL

Mecanismos de resistencia a las quinolonas en  
*Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* LC

Nuno Tiago Gião Antunes  
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
2007





**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: Sanidad Animal

**Título de la Tesis**

Mecanismos de resistencia a las quinolonas  
en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC

Tesis Doctoral presentada por D. Nuno Tiago Gião Antunes

Dirigida por el Prof. Dr. José Bismarck Poveda Guerrero

Codirigida por la Dra. Maria del Mar Tavío Pérez

**El Director,**

**La Codirectora,**

**El Doctorando,**

Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de Julio de 2007

**JOSÉ B. POVEDA GUERRERO**, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE SANIDAD ANIMAL Y COORDINADOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

**INFORMA:**

Que D. Nuno Tiago Gião Antunes, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste, firmo el presente, en Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de Julio de 2007.

**MARÍA DEL MAR TAVÍO PÉREZ**, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE MICROBIOLOGÍA EN EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**INFORMA:**

Que D. Nuno Tiago Gião Antunes, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste, firmo el presente, en Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de Julio de 2007.



**ANTONIO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, DIRECTOR DEL INSTITUTO  
UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Instituto en su sesión de fecha 5 de Julio de 2007 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **“Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC”** presentada por el doctorando D. Nuno Tiago Gião Antunes y dirigida por el Dr. José Bismarck Poveda Guerrero y codirigida por la Dra. Maria del Mar Tavío Pérez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de Julio de dos mil siete.

***A mis padres***

## ***Índice***

---

<b>Índice</b> .....	I
<b>Índice de tablas, figuras y gráficos</b> .....	VII
<b>Resumen</b> .....	XXI
<b>Summary</b> .....	XXXIII
<b>Abreviaturas</b> .....	XXV
<b>Capítulo I</b> .....	1
<b>I.1.- Introducción</b> .....	1
<b>I.2.- Revisión bibliográfica</b> .....	3
I.2.1.- Micoplasmas.....	3
I.2.1.1.- Taxonomía y filogenia.....	3
I.2.1.2.- Características generales.....	4
I.2.1.3.- Hábitat.....	6
I.2.1.4.- Antimicrobianos.....	7
I.2.1.4.1.- Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	7
I.2.1.4.1.1- Quinolonas.....	9
I.2.1.4.1.2.- Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B y cetólidos.....	10
I.2.1.4.1.3.- Tetraciclinas.....	10
I.2.1.4.1.4.- Aminoglucósidos.....	11
I.2.1.4.1.5.- Anfenicoles.....	11
I.2.2.- Agalaxia contagiosa.....	12
I.2.2.1.- Agentes etiológicos.....	12
I.2.2.2.- Susceptibilidad.....	13
I.2.2.3.- Infección y transmisión.....	13
I.2.2.4.- Aspectos clínicos.....	14
I.2.2.4.1.- <i>Mycoplasma agalactiae</i> .....	15
I.2.2.4.2.- <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> large colony.....	16
I.2.2.4.3.- <i>Mycoplasma putrefaciens</i> .....	17
I.2.2.4.4.- <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> .....	17

I.2.2.5.- Distribución.....	18
I.2.2.6.- Diagnostico.....	19
I.2.2.6.1.- Detección e identificación.....	19
I.2.2.6.1.1.- Aislamiento.....	19
I.2.2.6.1.1.1.- Pruebas bioquímicas y enzimáticas.....	19
I.2.2.6.1.1.2.- Pruebas serológicas para la identificación.....	21
I.2.2.6.1.1.2.1- Inhibición del crecimiento.....	21
I.2.2.6.1.1.2.2- Inhibición del metabolismo.....	22
I.2.2.6.1.1.2.3- Immunobinding/ Dot Blott.....	22
I.2.2.6.1.3.- Inmunohistoquímica.....	23
I.2.2.6.1.4.- Sondas de ADN.....	23
I.2.2.6.1.5- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
I.2.2.6.2- Pruebas serológicas para el diagnóstico.....	24
I.2.2.6.2.1.- ELISA y reacción de fijación del complemento.....	24
I.2.2.6.2.2.- Western Blott.....	24
I.2.2.7.- Tratamiento.....	25
I.2.2.8.- Profilaxis.....	26
I.2.2.9.- Control.....	27
I.2.3.- Quinolonas.....	27
I.2.3.1- Historia.....	27
I.2.3.2- Estructura química y clasificación.....	30
I.2.3.2.1- Relación estructura-actividad.....	30
I.2.3.2.2.- Generaciones.....	33
I.2.3.3- Mecanismo de acción.....	34
I.2.3.3.1.- Topoisomerasas bacterianas.....	35
I.2.3.3.2- Mecanismo de acción de las quinolonas.....	37
I.2.3.4- Mecanismos de resistencia bacterianos frente a las quinolonas.	41
I.2.3.4.1.- Alteración de diana.....	42

I.2.3.4.2.- Sistemas de expulsión activa como mecanismo de resistencia a quinolonas.....	45
I.2.3.4.3.- Alteraciones de permeabilidad de la membrana externa..	48
I.2.3.4.4.- Plásmidos responsables de resistencia a quinolonas.....	49
I.2.3.4.5.- Fenotipo MAR (Múltiple Resistencia a Antimicrobianos) o MDR (Múltiple Resistencia a Drogas).....	51
I.2.3.4.6- Otros mecanismos.....	52
<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo II.- Factores que interfieren con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio líquido.....</b>	<b>87</b>
<b>II.1.- Introducción.....</b>	<b>87</b>
<b>II.2.- Material y Métodos.....</b>	<b>89</b>
II.2.1.- Cepas utilizadas.....	89
II.2.2.- Antimicrobianos empleados.....	89
II.2.3.- Determinación de CMIs.....	90
II.2.3.1.- Determinación del efecto del inóculo.....	90
II.2.3.2.- Determinación del efecto del pH.....	91
II.2.3.3- Determinación del efecto de la presencia/ausencia de oxígeno.	91
II.2.3.4- Determinación del efecto del periodo de incubación.....	91
II.2.3.5.- Determinación del efecto de la edad del inóculo.....	91
<b>II.3.- Resultados.....</b>	<b>92</b>
II.3.1.- Efecto del inóculo.....	92
II.3.2.- Efecto del pH.....	92
II.3.3.- Efecto de la presencia/ausencia de oxígeno.....	93
II.3.4.- Efecto del periodo de incubación.....	93
II.3.5.- Efecto de la edad del inóculo.....	93
<b>II.4.- Discusión.....</b>	<b>94</b>
<b>Anexo de tablas, gráficos y figuras.....</b>	<b>99</b>

<b>Anexo de material.....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>109</b>
<b>Capítulo III.- Estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de campo de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC (MmmLC).</b>	<b>113</b>
<b>III.1.- Introducción.....</b>	<b>113</b>
<b>III.2.- Material y métodos.....</b>	<b>114</b>
III.2.1.- Cepas utilizadas.....	114
III.2.2.- Antimicrobianos empleados.....	115
III.2.3.- Determinación de las CMIs.....	116
<b>III.3.- Resultados.....</b>	<b>116</b>
<b>III.4.- Discusión.....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo de tablas y figuras.....</b>	<b>120</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>123</b>
<b>Capítulo IV.- Obtención de mutantes y estudio de los mecanismos de resistencia a las quinolonas.....</b>	<b>127</b>
<b>IV.1.- Introducción.....</b>	<b>127</b>
<b>IV.2.- Material y métodos.....</b>	<b>134</b>
IV.2.1.- Cepas utilizadas.....	134
IV.2.2.- Antimicrobianos empleados.....	134
IV.2.3.- Selección <i>in vitro</i> de mutantes resistentes a quinolonas.....	135
IV.2.4.- Estudio del antibiograma de los mutantes.....	135
IV.2.5.- Estudio de la presencia de sistemas de expulsión activa.....	136
IV.2.5.1.- Inhibidores de los sistemas de expulsión activa.....	136
IV.2.5.2.- Estudio de las proteínas de membrana.....	136
IV.2.5.2.1.- Extracción de proteína total.....	136
IV.2.5.2.2.- Partición en fases por Triton X-114.....	137

IV.2.5.2.2.3- Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato.....	138
IV.2.6.- Extracción de ADN.....	139
IV.2.7.- Diseño de los primers.....	139
IV.2.7.1- Primer para la QRDR de <i>gyrA</i> .....	140
IV.2.7.2.- Primer para la QRDR de <i>gyrB</i> .....	140
IV.2.7.3.- Primer para la QRDR de <i>parC</i> .....	141
IV.2.4.4.- Primer para la QRDR de <i>parE</i> .....	141
IV.2.8.- Amplificación de las QRDR.....	142
IV.2.9.- Secuenciación del producto de la amplificación .....	142
<b>IV.3.- Resultados</b> .....	143
IV.3.1.- Evolución de las CMI's a lo largo del proceso de selección.....	143
IV.3.1.2.- Estudio del antibiograma de los mutantes.....	143
IV.3.1.2.1.-Cepa 51 seleccionada con norfloxacin (51-Nor).....	143
IV.3.1.2.2.-Cepa 57 seleccionada con norfloxacin (57-Nor).....	144
IV.3.1.2.3.-Cepa 51 seleccionada con ciprofloxacino (51-Cip).....	145
IV.3.1.2.4.- Cepa 61 seleccionada con ciprofloxacino (61-Cip).....	145
IV.3.1.2.5.- Cepa 57 seleccionada con enrofloxacin (57-Enr).....	146
IV.3.1.2.6.-Cepa 58 seleccionada con enrofloxacin (58-Enr).....	147
IV.3.2.- Inhibidores de los sistemas de expulsión activa.....	147
IV.3.2.1.- Mutantes seleccionados con norfloxacin.....	147
IV.3.2.1.2.- Mutantes seleccionados con ciprofloxacino.....	148
IV.3.2.3.- Mutantes seleccionados con enrofloxacin.....	149
IV.3.3.- Estudio de las proteínas de membrana.....	150
<b>IV.4.- Secuenciación de las QRDR</b> .....	151
<b>IV.5.- Discusión</b> .....	153
1- Susceptibilidad de las cepas mutantes.....	153
2- Sistemas de expulsión activa.....	154
3- Mutaciones en las topoisomerasas.....	157
4- Relación entre sistemas de expulsión activa y mutaciones en las	

topoisomerasas.....	164
<b>Anexo de tablas, gráficos y figuras.....</b>	<b>166</b>
<b>Anexo de material.....</b>	<b>238</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>246</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>253</b>
<b>Anexo de referencias de reactivos.....</b>	<b>255</b>

## ***Índice de tablas, figuras y gráficos***

Índice de tablas

<b>Tabla I.1.</b>	Especies de micoplasmas patogénicas para animales y para el hombre en las que ha sido descrita resistencia a antimicrobianos.....	8
<b>Tabla I.2.</b>	Características bioquímicas de las especies de micoplasmas aislados de pequeños rumiantes. ....	20
<b>Tabla I.3.</b>	Varios ejemplos de quinolonas y generación correspondiente.....	34
<b>Tabla I.4.</b>	Resumen de los mecanismos de resistencia a las quinolonas descritos en microorganismos grampositivos, gramnegativos y micoplasmas.....	42
<b>Tabla II.1.</b>	Efecto del inóculo en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) de varios antimicrobianos.....	99
<b>Tabla II.2.</b>	Efecto del pH en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). ....	101
<b>Tabla II.3.</b>	Efecto de la presencia/ ausencia de oxígeno en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). ....	103
<b>Tabla II.4.</b>	Efecto del período de incubación en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	104
<b>Tabla II.5.</b>	Efecto de la edad del inóculo en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	106
<b>Tabla III.1.</b>	Origen de las cepas utilizadas .....	120
<b>Tabla III.2.</b>	CMI <sub>50</sub> , CMI <sub>90</sub> y rango de CMIs.....	121
<b>Tabla IV.1.</b>	Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de <i>gyrA</i> . ....	140
<b>Tabla IV.2.</b>	Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de <i>gyrB</i> . ....	140
<b>Tabla IV.3.</b>	Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de <i>parC</i> . ....	141

<b>Tabla IV.4.</b>	Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de <i>parE</i> . .....	141
<b>Tabla IV.5.</b>	Evolución de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) del norfloxacinó en cada uno de los escalones selectivos en los cinco procesos de selecci3n obtenidos a partir de las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de MmmLC. ....	166
<b>Tabla IV.6.</b>	Evoluci3n de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) del ciprofloxacino en cada uno de los escalones selectivos en los cinco procesos de selecci3n obtenidos a partir de las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de MmmLC. ....	166
<b>Tabla IV.7.</b>	Evoluci3n de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) del enrofloxacinó en cada uno de los escalones selectivos en los cinco procesos de selecci3n obtenidos a partir de las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de MmmLC. ....	167
<b>Tabla IV.8.</b>	CMI del norfloxacinó (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacinó (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en $\mu\text{g/ml}$ en los dos clones de cada escal3n selectivo obtenidos a partir de la cepa 51 norfloxacinó. ....	168
<b>Tabla IV.9.</b>	CMI del norfloxacinó (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacinó (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en $\mu\text{g/ml}$ en los dos clones de cada escal3n selectivo obtenidos a partir de la cepa 57 con norfloxacinó. ....	170
<b>Tabla IV.10.</b>	CMI del norfloxacinó (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacinó (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en $\mu\text{g/ml}$ en los dos clones de cada escal3n selectivo obtenidos a partir de la cepa 51 con ciprofloxacino. ....	172

<b>Tabla IV.11.</b>	CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en $\mu\text{g/ml}$ en los dos clones de cada escal3n selectivo obtenidos a partir de la cepa 61 con ciprofloxacino. ....	174
<b>Tabla IV.12.</b>	CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en $\mu\text{g/ml}$ en los dos clones de cada escal3n selectivo obtenidos a partir de la cepa 57 con enrofloxacin. ....	176
<b>Tabla IV.13.</b>	CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en $\mu\text{g/ml}$ en los dos clones de cada escal3n selectivo obtenidos a partir de la cepa 58 con enrofloxacin. ....	178
<b>Tabla V.14.</b>	Clones utilizados para los experimentos de este cap3tulo.....	180
<b>Tabla IV.15.</b>	CMI del norfloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expuls3n sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51.....	181
<b>Tabla IV.16.</b>	CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expuls3n sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51.....	182
<b>Tabla IV.17.</b>	CMI del enrofloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expuls3n sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51.....	183
<b>Tabla IV.18.</b>	Variaci3n de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 51 y mutantes seleccionados con norfloxacin.....	184

<b>Tabla IV.19.</b>	CMI del norfloxacinó en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51.....	185
<b>Tabla IV.20.</b>	CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51.....	186
<b>Tabla IV.21.</b>	CMI del enrofloxacinó en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51.....	187
<b>Tabla IV.22.</b>	Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 51 y mutantes seleccionados con ciprofloxacino.....	188
<b>Tabla IV.23.</b>	CMI del norfloxacinó en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61.....	189
<b>Tabla IV.24.</b>	CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61.....	190
<b>Tabla IV.25.</b>	CMI del enrofloxacinó en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61.....	191
<b>Tabla IV.26.</b>	Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 61 y mutantes seleccionados con ciprofloxacino.....	192
<b>Tabla IV.27.</b>	CMI del norfloxacinó en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacinó en la cepa 57.....	193

<b>Tabla IV.28.</b>	CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacino en la cepa 57.....	194
<b>Tabla IV.29.</b>	CMI del enrofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacino en la cepa 57.....	195
<b>Tabla IV.30.</b>	Variación de la CMI del norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 57 y mutantes seleccionados con enrofloxacino.....	196
<b>Tabla IV.31.</b>	CMI del norfloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacino en la cepa 58.....	197
<b>Tabla IV.32.</b>	CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacino en la cepa 58.....	198
<b>Tabla IV.33.</b>	CMI del enrofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacino en la cepa 58.....	199
<b>Tabla IV.34.</b>	Variación de la CMI del norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 58 y mutantes seleccionados con enrofloxacino.....	200
<b>Tabla IV.35.</b>	Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con norfloxacino y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en cada escalón.....	228
<b>Tabla IV.36.</b>	Variación de la CMI del norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de	

	las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con norfloxacin y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas.....	229
<b>Tabla IV.37.</b>	Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en cada escalón.....	230
<b>Tabla IV.38.</b>	Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas.....	231
<b>Tabla IV.39.</b>	Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 61 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en cada escalón.....	232
<b>Tabla IV.40.</b>	Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 61 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas.....	233

<b>Tabla IV.41.</b>	Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 57 seleccionada con enrofloxacin y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en cada escalón.....	234
<b>Tabla IV.42.</b>	Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 57 seleccionada con enrofloxacin y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas.....	235
<b>Tabla IV.43.</b>	Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 58 seleccionada con enrofloxacin y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en cada escalón.....	236
<b>Tabla IV.44.</b>	Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 58 seleccionada con enrofloxacin y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas.....	237

**Índice de gráficos**

---

<b>Gráfico II.1.</b>	Efecto del inóculo en la CMI.....	99
----------------------	-----------------------------------	----

<b>Gráfico II.2.</b>	Efecto del inóculo en la CMI. ....	100
<b>Gráfico II.3.</b>	Efecto del pH en la CMI.....	101
<b>Gráfico II.4.</b>	Efecto de la aerobiosis/ anaerobiosis en la CMI.....	103
<b>Gráfico II.5.</b>	Efecto del período de incubación en la CMI.....	104
<b>Gráfico II.6.</b>	Efecto del período de incubación en la CMI.....	105
<b>Gráfico II.7.</b>	Efecto de la edad del inóculo en la CMI.....	106
<b>Gráfico IV.1.</b>	Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	169
<b>Gráfico IV.2.</b>	Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	169
<b>Gráfico IV.3.</b>	Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	171
<b>Gráfico IV.4.</b>	Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	171
<b>Gráfico IV.5.</b>	Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	173
<b>Gráfico IV.6.</b>	Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	173
<b>Gráfico IV.7.</b>	Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	175
<b>Gráfico IV.8.</b>	Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	175
<b>Gráfico IV.9.</b>	Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	177
<b>Gráfico IV.10.</b>	Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	177

<b>Gráfico IV.11.</b>	Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	179
<b>Gráfico IV.12.</b>	Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos.....	179
<b>Gráfico IV.13.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51.....	181
<b>Gráfico IV.14.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51.....	182
<b>Gráfico IV.15.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51.....	183
<b>Gráfico IV.16.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51.....	185
<b>Gráfico IV.17.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51.....	186
<b>Gráfico IV.18.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51.....	187
<b>Gráfico IV.19.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61.....	189
<b>Gráfico IV.20.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61.....	190

<b>Gráfico IV.21.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61.....	191
<b>Gráfico IV.22.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57.....	193
<b>Gráfico IV.23.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57.....	194
<b>Gráfico IV.24.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57.....	195
<b>Gráfico IV.25.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58.....	197
<b>Gráfico IV.26.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58.....	198
<b>Gráfico IV.26.</b>	Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58.....	199

### Índice de figuras

---

<b>Figura I.1.</b>	Árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA de micoplasmas de varios grupos y subgrupos.....	5
--------------------	---	---

<b>Figura I.2.</b>	Evolución de las quinolonas y marcos importantes.....	29
<b>Figura I.3.</b>	Estructura de la 4-quinolona .....	30
<b>Figura I.4.</b>	Resumen de la actividad de cada radical.....	31
<b>Figura I.5.</b>	Esquema de la acción de las topoisomerasas bacterianas en la replicación del ADN.....	36
<b>Figura I.6.</b>	Representación esquemática de los varios pasos de la acción de las quinolonas.....	39
<b>Figura I.7.</b>	Evolución escalonada de la resistencia a una quinolona a lo largo del tiempo.....	44
<b>Figura I.8.</b>	A la izquierda ejemplo de la evolución de la resistencia cruzada a dos quinolonas (A y B). A la derecha evolución de la resistencia disociada a dos quinolonas (A y B).....	45
<b>Figura I.9.</b>	Ejemplo esquemático de las varias familias de sistemas de expulsión activa.....	47
<b>Figura II.1</b>	Ejemplo del efecto del inóculo en la determinación de la CMI.....	100
<b>Figura II.2.</b>	Ejemplo de la variación de la CMI de la eritromicina a diferentes valores de pH.....	102
<b>Figura III.1.</b>	Ejemplo de un antibiograma.....	122
<b>Figura IV.1.</b>	Electroforesis de las proteínas de membrana de la cepa 51 madre y los escalones selectivos 3, 6 y 9 de la selección con norfloxacinó.....	201
<b>Figura IV.2.</b>	Electroforesis de las proteínas de membrana des las cepas 51 y 61 madre y los escalones selectivos 3, 6 y 9 de la selección con ciprofloxacino.....	202
<b>Figura IV.3.</b>	Electroforesis de las proteínas de membrana de la 57 madre y de los escalones 3, 6 y 9 de la selección con enrofloxacinó.....	203
<b>Figura IV.4.</b>	Parte de la secuencia de <i>gyrA</i> con el punto de inserción de los primers correspondientes.....	204

<b>Figura IV.5.</b>	Parte de la secuencia de <i>gyrB</i> con el punto de inserción de los primers correspondientes.....	205
<b>Figura IV.6.</b>	Parte de la secuencia de <i>parC</i> con el punto de inserción de los primers correspondientes.....	206
<b>Figura IV.7.</b>	Parte de la secuencia de <i>parE</i> con el punto de inserción de los primers correspondientes.....	207
<b>Figura IV.8.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrA</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.....	208
<b>Figura IV.9.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrB</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.....	209
<b>Figura IV.10.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parC</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.....	210
<b>Figura IV.11.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parE</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.....	211
<b>Figura IV.12.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrA</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	212
<b>Figura IV.13.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrB</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	213
<b>Figura IV.14.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parC</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	214
<b>Figura IV.15.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parE</i> de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	215

<b>Figura IV.16.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrA</i> de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	216
<b>Figura IV.17.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrB</i> de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	217
<b>Figura IV.18.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parC</i> de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	218
<b>Figura IV.19.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parE</i> de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.....	219
<b>Figura IV.20.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrA</i> de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	220
<b>Figura IV.21.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrB</i> de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	221
<b>Figura IV.22.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parC</i> de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	222
<b>Figura IV.23.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parE</i> de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	223
<b>Figura IV.24.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrA</i> de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	224
<b>Figura IV.25.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>gyrB</i> de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	225

<b>Figura IV.26.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parC</i> de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	226
<b>Figura IV.27.</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>parE</i> de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.....	227

## ***Resumen***

---

Uno de los micoplasmas asociados al síndrome de la agalaxia contagiosa es *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC). En las Islas Canarias, así como en EEUU y Australia, MmmLC es la especie de micoplasma más frecuentemente asociada a este síndrome. Su control se realiza por medio de vacunación y por antibioterapia, siendo los antimicrobianos más frecuentemente utilizados las quinolonas, macrólidos y tetraciclinas.

Aunque no muy frecuentes, existen casos en los que la terapia con antimicrobianos no es eficaz debido a la adquisición de resistencias.

Para comprender los mecanismos involucrados en la resistencia adquirida a las quinolonas en MmmLC, nos hemos planteado varios experimentos. En el segundo capítulo evaluamos de que modo factores como el inóculo, pH, presencia/ausencia de oxígeno, edad del cultivo y período de incubación pueden interferir con la determinación de la susceptibilidad a diversos antimicrobianos. En micoplasmología no están definidos los protocolos para la determinación de susceptibilidades para la mayoría de las especies de micoplasmas. El estudio de las susceptibilidades bajo diferentes condiciones de incubación también puede ayudar a la comprensión de algunos fallos terapéuticos, puesto que las determinaciones *in vitro* se realizan en condiciones fisiológicas, las cuales se ven alteradas en condiciones patológicas. En el tercer capítulo se determina la susceptibilidad de diversas cepas clínicas de MmmLC a distintos antimicrobianos. Con esto se pretende determinar la prevalencia de resistencias adquiridas en las cepas clínicas. En el cuarto capítulo se seleccionan mutantes resistentes a las quinolonas. En estos mutantes se estudia la presencia de mecanismos de expulsión activa, por medio de inhibidores de los mismos y por estudios de la expresión de las proteínas de membrana. También se secuencian parte de los genes que codifican las topoisomerasas, buscando mutaciones responsables de sustituciones de aminoácidos y relacionándolas con incrementos en la resistencia a las quinolonas.

El estudio de los factores que interfieren con la determinación de susceptibilidades nos permitió observar que el inóculo es el factor responsable de las mayores variaciones

en su determinación. Otros factores que también interfieren con la determinación de susceptibilidades son el pH del medio, la presencia/ausencia de oxígeno y el período de incubación. Sin embargo, la edad del inóculo utilizado no originó variaciones.

No hemos observado evidencia de resistencia adquirida a ninguno de los antimicrobianos estudiados. Las fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, lincomicina y cloranfenicol demostraron una buena actividad frente a MmmLC. El ácido nalidíxico no demostró actividad frente a MmmLC, mientras los aminoglucósidos no fueron muy eficaces.

La selección de mutantes con quinolonas nos permitió observar el incremento de la resistencia a estas. Aunque en otras especies bacterianas la observación de un fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos sea común, no lo hemos observado en MmmLC para los antimicrobianos probados. Hemos encontrado evidencias de un sistema de expulsión ATP-dependiente involucrado en la resistencia a las quinolonas, lo cual era sensible a la reserpina y al ortovanadato; no hemos encontrado evidencias de sistemas de expulsión protón dependientes ni en los mutantes ni en las cepas madre. El análisis de las proteínas de membrana nos ha permitido identificar dos proteínas que podrían representar sistemas de expulsión activa implicados en el aumento de la resistencia a las quinolonas. La secuenciación de parte de los genes *gyrA*, *parC* y *parE* nos permitió relacionar mutaciones en estos con aumentos en la resistencia a las quinolonas.

## ***Summary***

---

## Summary

---

One of the mycoplasmas associated with contagious agalactia (CA) syndrome is *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC). In the Canary Islands, as well as in the United States and Australia, MmmLC is the most frequently isolated mycoplasma in CA clinical cases. Its control is made either by vaccination or by chemotherapy. Quinolones, macrolides and tetracyclines are the most common antimicrobials used in the control of CA.

Although not very common, there are reports on therapeutic failures due to the acquisition of resistances.

To understand the mechanisms involved on acquired resistance to quinolones in MmmLC, we made several experiments. On Chapter II we evaluate how factors such as the inoculum, the pH of the medium, the presence/absence of oxygen, the inoculum age and the period of incubation can interfere with the determination of susceptibilities to several antimicrobials. In mycoplasmaology, there are not established protocols for susceptibilities determination, only some guidelines, and the influence of these factors has only been tested in few species. The study of susceptibilities under different conditions may be helpful to understand the reason for some therapeutic failures; in *in vitro* experiments the conditions are very similar to the ones observed *in vivo*, but in pathological cases they may vary. In Chapter III we determine the susceptibilities of a collection of MmmLC clinical strains to several antimicrobial classes. With this experiment, we pretend to study the prevalence of acquired resistances. In Chapter IV we select quinolone resistant mutants. On these mutants we study the presence of efflux mechanisms with the use of inhibitors and with the study of membrane proteins expression changes. We also sequence the genes that codify the topoisomerases, searching for mutations responsible for amino acids changes and relating them with quinolone resistance increases.

The study of the factors interfering with susceptibilities determination indicates that the inoculum is the responsible for the biggest variations. Other factors such as the medium pH, presence/absence of oxygen and the period of incubation also interfere with

## Summary

---

susceptibilities determination. The inoculum age was not responsible for variations on its determination.

We did not see evidence of acquired resistance to any of the studied antimicrobials. Fluoroquinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin and chloramphenicol demonstrated a good activity against MmmLC strains. Nalidixic acid and aminoglycosides had a poor activity.

Quinolone selected mutants presented an increased resistance to all quinolones. Despite in other bacteria species a multidrug resistance phenotype is commonly seen, we did not see it in MmmLC regarding the tested antimicrobials. We found evidences that a reserpine and orthovanadate sensitive ATP-dependent efflux system was involved in the development of quinolone resistance; nevertheless, evidences of proton dependent active efflux were not found both in mutants and parent strains. The membrane proteins analysis has let us identify two proteins that may represent efflux systems responsible for quinolone resistance. The sequences of the *gyrA*, *parC* and *parE* genes showed mutations that were related with increases in quinolone resistance.

## ***Abreviaturas***

---

- µg**- microgramo  
**µl**- microlitro  
**µM**- micromolar  
**µm**- micrómetro  
**A**- adenina  
**ADN**- ácido desoxirribonucleico  
**ARN**- ácido ribonucleico  
**ATP**- adenosina trifosfato  
**pb**- pares de bases  
**C**- Citosina  
**CCCP**- carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (del inglés Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone)  
**Cf**- cloranfenicol  
**Cip**- ciprofloxacino  
**Clit**- clortetraciclina  
**CMI**- concentración mínima inhibitoria  
**Dox**- doxiciclina  
**ELISA**- enzyme-linked immunosorbent assay  
**Enr**- enrofloxacin  
**Er**- eritromicina  
**ES**- escalón selectivo  
**G**- guanina  
**Gm**- gentamicina  
**kDa**- kilodalton  
**kpb**- kilobases  
**Lin**- lincomicina  
**MAR**- múltiple resistencia a antimicrobianos  
**MDR**- múltiple resistencia a drogas  
**mg**- miligramo  
**ml**- mililitro  
**mm**- milímetro

## Abreviaturas

---

**mM**- milimolar

**MmmLC**- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large colony type

**MmmSC**- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type

**Nal**- ácido nalidíxico

**nm**- nanómetro

**ND**- no determinado

**Nor**- norfloxacino

**NCTC**- National Collection of Type Cultures

**OIE**- Oficina Internacional de Epizootias

**Oxt**- oxitetraciclina

**Otv**- ortovanadato

**PBS**- tampón de fosfato salino (del inglés phosphate buffer saline)

**PM**- peso molecular

**PCR**- reacción en cadena de la polimerasa (del inglés polymerase chain reaction)

**QRDR**- región determinante de resistencia a las quinolonas (del inglés quinolone resistance-determining region)

**Res**- reserpina

**rpm**- revoluciones por minuto

**SC**- sin cambios

**SDS**- sodio dodecil sulfato

**Spi**- espiramicina

**Spt**- espectinomicina

**Str**- estreptomicina

**T**- timina

**Til**- tilosina

**UCC**- unidades cambiadoras de color

<b>Aminoácido</b>	<b>Codificación de una letra</b>	<b>Codificación de 3 letras</b>
<b>Glicina</b>	G	Gly
<b>Alanina</b>	A	Ala
<b>Leucina</b>	L	Leu
<b>Metionina</b>	M	Met
<b>Fenilalanina</b>	F	Phe
<b>Triptofano</b>	W	Trp
<b>Lisina</b>	K	Lys
<b>Glutamina</b>	Q	Gln
<b>Glutamato</b>	E	Glu
<b>Serina</b>	S	Ser
<b>Prolina</b>	P	Pro
<b>Valina</b>	V	Val
<b>Isoleucina</b>	I	Ile
<b>Cisteína</b>	C	Cys
<b>Tirosina</b>	Y	Tyr
<b>Histidina</b>	H	His
<b>Arginina</b>	R	Arg
<b>Asparagina</b>	N	Asn
<b>Aspartato</b>	D	Asp
<b>Treonina</b>	T	Thr

Codificación de una y tres letras de los diversos aminoácidos

## ***Capítulo I***

---

## I.1.- Introducción

La agalaxia contagiosa es un síndrome de distribución mundial que afecta a los pequeños rumiantes. Aunque no se caracteriza por causar una elevada mortalidad su morbilidad es alta y es la responsable de importantes pérdidas económicas. Existen cuatro agentes etiológicos asociados a este síndrome: *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens*, cuya distribución mundial y capacidad patogénica son variables. El control de la agalaxia contagiosa de los pequeños rumiantes se puede realizar por medio de la inmunoprevención o bien mediante el empleo de distintos antimicrobianos. La utilización de vacunas vivas atenuadas no está permitida en todos los países y las vacunas inactivadas no confieren una inmunidad satisfactoria. Comercialmente, y según nuestro conocimiento, solamente existen desarrolladas vacunas frente a *Mycoplasma agalactiae*, aunque a nivel local se utilicen autovacunas frente a los demás micoplasmas. Así, la antibioterapia se asume como una importante alternativa para su control (Bergonier y cols., 1997).

Los micoplasmas son microorganismos que carecen de pared celular, por lo que los antimicrobianos cuya diana sea esta estructura, como las penicilinas, beta-lactámicos y glucopéptidos no tienen actividad frente a ellos. Otros antimicrobianos con distintos mecanismos de acción como las polimixinas, rifampina y sulfonamidas también resultan ineficaces en su control (Bébéar, 1996; Bébéar y Pereyre, 2005). Antimicrobianos como los macrólidos, tetraciclinas y quinolonas son lo más empleados en el tratamiento de la agalaxia contagiosa, aunque se han descrito fenómenos de resistencia (Benkirane y Amghar, 1990; Loria y cols., 2003; Kidanemariam y cols., 2005; Al-Momani y cols., 2006b; Antunes y cols., 2007a; Antunes y cols., 2007b).

La metodología empleada para la determinación de susceptibilidades en micoplasmas es motivo de controversia. No existen líneas definidas, solo orientativas y el estudio de los factores que interfieren con su determinación solamente ha sido realizado en algunas especies. Factores como el inóculo, periodo de incubación y factores del

medio de cultivo como el pH y la presencia o ausencia de oxígeno están reconocidos como responsables de variaciones en la determinación de susceptibilidades (Hannan, 2000).

Uno de los grupos de antimicrobianos utilizados con eficacia frente a los micoplasmas son las quinolonas. Las quinolonas son antimicrobianos de origen sintético muy eficaces frente a micoplasmas. Su mecanismo de acción interfiere con la replicación del ADN actuando sobre las topoisomerasas bacterianas, llevando a la muerte celular. Actualmente las mutaciones en las topoisomerasas bacterianas, el aumento de la expresión de sistemas de expulsión activa, las alteraciones en la permeabilidad celular y los plásmidos, están reconocidos como los responsables de la resistencia adquirida a las quinolonas (Van Bambeke y cols, 2005). En micoplasmas, solamente se han descrito las mutaciones en las topoisomerasas y los sistemas de eflujo como los responsables de la disminución de la susceptibilidad a las quinolonas (Raheison y cols., 2002; Bébéar y Pereyre, 2005).

Con estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos para nuestro trabajo:

1. Evaluación de la importancia del inóculo, pH del medio, presencia/ausencia de oxígeno, período de incubación y edad del inóculo en la determinación de la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos.
2. Determinación de la susceptibilidad de los aislamientos clínicos de MmmLC a diversos antimicrobianos.
3. Selección de mutantes resistentes a las quinolonas con norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino.
4. Evaluación de la importancia de los sistemas de expulsión activa en el desarrollo de resistencia a las quinolonas.
5. Determinación de la importancia de mutaciones en las topoisomerasas bacterianas en la adquisición de resistencia a las quinolonas.

## **I.2.- Revisión bibliográfica**

### **I.2.1.- Micoplasmas**

#### **I.2.1.1.- Taxonomía y filogenia**

Los micoplasmas son los seres con capacidad de autorreplicación más pequeños que se conocen. Se distinguen fenotípicamente de las restantes bacterias por su pequeño tamaño y la ausencia de una pared celular rígida. Esta ausencia de pared celular se refleja en su nomenclatura, donde *Mollicutes*, su clase, se origina del latín *mollis* (fina) + *cutis* (piel). Pertenecen al Orden *Mycoplasmatales*, Familia *Mycoplasmataceae* que engloba dos géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Filogenéticamente su origen se encuentra cercano a las bacterias grampositivas (Woese y cols., 1980; Weisburg y cols., 1989).

Actualmente han sido descritas más de 100 especies aisladas de los más diversos hospedadores. No obstante, este es un número muy dinámico y en constante crecimiento, bien sea por el descubrimiento de nuevas especies, o por la reclasificación de otras ya descritas pero clasificadas erróneamente (Johansson y cols., 1999; Neimark y cols., 2001).

En 1956 se aisló de una cabra con peritonitis fibrinosa un micoplasma, identificado serológicamente como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* y denominado Y-Goat. Esta cepa se diferenciaba de las cepas bovinas de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, representadas por la cepa PG1, por diferencias en el crecimiento, puesto que bajo las mismas condiciones de cultivo presentaban mucho mayor turbidez en medio líquido, además de colonias mucho mayores en medio sólido. En 1978, fue propuesta la subdivisión de las cepas bovinas y caprinas de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* en dos grupos (Cottew y Yeats, 1978). Así surgió el grupo “large colony”, cuya cepa de referencia sería Y-Goat y representaba a organismos mayoritariamente aislados de pequeños rumiantes y el “small colony”, con los organismos causantes de la perineumonía contagiosa bovina y aislados mayoritariamente de bovinos aunque con algunas excepciones (Brandão, 1995). En los últimos años se ha propuesto la

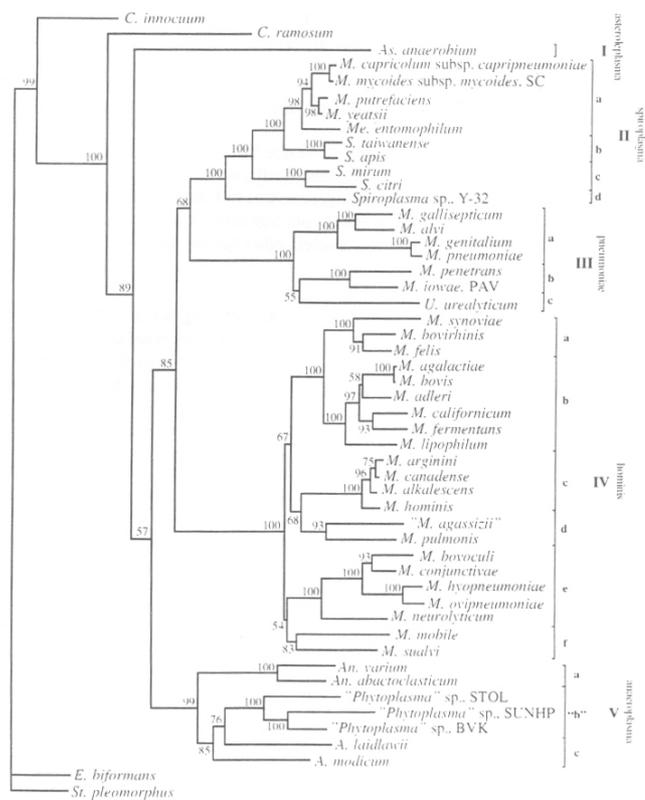
reclasificación de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Leach y cols., 1989; Pettersson y cols., 1996; Thiaucourt y cols., 2000; Vilei y cols., 2006).

*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC pertenece a un grupo de seis especies muy cercanas que se denomina el grupo Mycoides. Este grupo comprende otras cinco especies que son *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC y *Mycoplasma* spp. Grupo 7 bovino. Todas estas especies son altamente patógenas y son responsables de graves enfermedades en los rumiantes (Cottew y cols., 1987). Otros micoplasmas, como *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma yeatsii* y *Mycoplasma cotewii* son a veces descritas como pertenecientes a este grupo basándose en los genes 16S rRNA (Heldtander y cols., 1998). En la Figura I.1. se puede ver el árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA de micoplasmas de varios grupos y subgrupos (Johansson y cols., 1998).

#### **I.2.1.2.- Características generales**

Los micoplasmas descienden de microorganismos gram positivos como *Clostridium* y *Erysipelothrix*, aunque por sus características de tinción (solamente el Giemsa los tiñe) sean gramnegativos (Howard y Gourlay, 1978). Mantienen algunas características de estos, como un contenido G+C muy bajo, que está entre 24-33%, nunca superior a los 40% de *Mycoplasma pneumoniae*. Poseen un diminuto número de genes que limita la cantidad de proteínas que son capaces de sintetizar, además de vías metabólicas y enzimáticas (Razin y cols., 1998)

Aunque no posean pared celular en muchas especies se pueden observar elementos de cito-esqueleto, pudiendo algunos incluso ser móviles. Su célula contiene el mínimo de organelas para su crecimiento y replicación: membrana citoplasmática, ribosomas y una cadena doble de ADN circular (Razin, 1978; Weisburg et al., 1989).



**Figura I.1.-** Árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA de micoplasmas de varios grupos y subgrupos (Johansson y cols., 1998).

La ausencia de la pared celular y de elementos de cito-esqueleto en muchas especies se refleja en un pleomorfismo general, pudiendo las células variar de cocoides a filamentosas, aunque la forma dominante sea la esférica. Son células muy pequeñas con cerca de 300 nm de diámetro, lo que asociado a la ausencia de pared celular permite su paso por filtros de 450 y, en algunos casos, de 200 nm. Aunque sea una excepción, las células de *Mycoplasma neurolyticum* pueden pasar por poros de 100 nm (Razin, 1978; Weisburg et al., 1989; Razin y cols., 1998).

Algunos micoplasmas, incluyendo *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* poseen una estructura semejante a una cápsula compuesta por galactano y coloreada por rojo de rutenio (Razin, 1978).

El metabolismo de estos microorganismos está influido por la ausencia de la pared celular así como por su estilo de vida parasitario/comensal. Sus vías de obtención de energía suelen estar muy conservadas y son una característica que puede ayudar a su identificación, puesto que están más o menos conservadas en cada grupo. Son aerobios o anaerobios facultativos y requieren colesterol y/o otros esteroides para crecimiento, lo que se consigue por medio de la incorporación de suero en el medio de cultivo. Sus colonias en medio sólido crecen en profundidad, presentando la mayoría de las especies las típicas colonias en “huevo frito” (Razin, 1978; Weisburg et al., 1989).

#### **I.2.1.3.- Hábitat**

En general los micoplasmas están diseminados en toda la naturaleza pudiendo habitar en mamíferos, aves, reptiles, peces, artrópodos y plantas ya sea como comensales, patógenos u oportunistas (Razin, 1978; Weisburg et al., 1989).

Dada su estrecha relación con el hospedador, sus propiedades biológicas tienden a reflejar esta afinidad, lo que implica especificidades nutricionales muy selectivas. Sus sitios preferidos son sobre todo las mucosas, ya sea del trato respiratorio, digestivo, urogenital, ocular, de las glándulas mamarias y las articulaciones (Razin, 1978; Weisburg et al., 1989; Razin y cols., 1998).

Aunque se caracterizan por una elevada especificidad de hospedador y tejido, existen bastantes descripciones de micoplasmas aislados fuera de su hospedador y tejidos habituales (Razin y cols., 1998).

#### **I.2.1.4- Antimicrobianos**

Los micoplasmas, por la ausencia de una pared celular, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos que tienen como diana a esta estructura, como las penicilinas, beta-lactámicos y glucopéptidos y a otros como las polimixinas, rifampina y sulfonamidas (Bébéar, 1996; Bébéar y Pereyre, 2005) aunque *Mycoplasma flocculare* y *Mycoplasma hyopneumoniae* sean ligeramente sensibles a la acción de las penicilinas (Friis, 1975). Otros antimicrobianos como los aminoglucósidos y el cloranfenicol poseen poca actividad frente a los micoplasmas (Bébéar, 1996). Esto presupone un problema en el momento de elegir el antimicrobiano adecuado en cada caso. Por motivos desconocidos, son también resistentes al ácido nalidíxico aunque intrínsecamente sensibles a las fluoroquinolonas (Bébéar y Pereyre, 2005).

Hay otro tipo de resistencias intrínsecas en los micoplasmas, generalmente debido a características genéticas propias de cada grupo o subgrupos. Así, muchos de los micoplasmas pertenecientes al grupo *hominis* como *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma hominis*, son intrínsecamente resistentes a los macrólidos de 14 y 15 carbonos, como la eritromicina, pero susceptibles a los de 16 carbonos y a las lincosamidas (Furneri y cols., 2000; Pereyre y cols., 2002). *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma agalactiae* son también resistentes a la estreptomicina, debido a una mutación en el gen 16 sRNA (Königsson y cols., 2002). Es de suponer que cada vez más se conozcan particularidades de estos microorganismos en la medida que se realicen más estudios de susceptibilidades.

##### **I.2.1.4.1.- Mecanismos de resistencia a antimicrobianos**

Aunque existan varios trabajos incidiendo sobre las susceptibilidades de las más diversas especies de micoplasmas a variadas clases de agentes antimicrobianos, son relativamente pocos los estudios que caracterizan los mecanismos de resistencia a los mismos.

La tabla I.1. describe los datos de cepas resistentes de varias especies patógenas de los animales y el hombre.

<b>Especie hospedador</b>	<b>Especie micoplasma</b>	<b>Referencia</b>
<b>Caprinos</b>	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Kidanemariam y cols., 2005
	<i>M. agalactiae</i>	Antunes y cols., 2007a
	<i>M. putrefaciens</i>	Antunes y cols., 2007b
<b>Ovinos</b>	<i>M. ovipneumoniae</i>	Ayling y cols., 2006
<b>Bovinos</b>	<i>M. bovis</i>	Poumarat y Martel, 1989; Ter Laak y cols., 1993; Ball y cols., 1995; Rosenbusch, 1998; Ayling y cols., 2000b; Hirose y cols., 2003; Thomas y cols., 2003; Francoz y cols., 2004; Rosenbusch y cols., 2005
	<i>M. bovirhinis</i>	Hirose y cols., 2003; Hirose y cols., 2004
	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Ayling y cols., 2000a
	<i>M. dispar</i>	Ter Laak y cols., 1993
	<i>M. alkalescens</i>	Hirose y cols., 2003
<b>Suinos</b>	<i>M. hyopneumoniae</i>	Etheridge y cols., 1979; Vicca y cols., 2004
	<i>M. hyorhinis</i>	Kobayashi y cols., 1996b; Wu y cols., 2000
	<i>M. hyosynoviae</i>	Aarestrup y Friis, 1998
<b>Aves</b>	<i>M. gallisepticum</i>	Reinhardt y cols., 2002; Wu y cols., 2005
	<i>M. synoviae</i>	Cerdá y cols., 2002
<b>Humanos</b>	<i>M. hominis</i>	Samra y cols., 2002; Domingues y cols., 2003; Ngan y cols., 2004; Bébéar y Pereyre, 2005
	<i>M. pneumoniae</i>	Matsuoka y cols., 2004

**Tabla I.1.-** Especies de micoplasmas patógenas para animales y para el hombre en las que ha sido descrita resistencia a antimicrobianos.

#### I.2.1.4.1.1- Quinolonas

Actúan por inhibición de las topoisomerasas bacterianas (Van Bambeke y cols., 2005). La resistencia a este grupo de agentes antimicrobianos puede ser debida a alteraciones de la diana (genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*), expulsión activa, disminución de la permeabilidad celular (Van Bambeke y cols., 2005) y al mecanismo más recientemente descrito a través de plásmidos portadores de genes *qnr* (Robicsek y cols., 2006).

La resistencia a uno de los agentes de este grupo suele implicar resistencia cruzada a las demás, aunque en los micoplasmas, naturalmente resistentes al ácido nalidíxico, esta resistencia no suele implicar resistencia a las demás quinolonas (Bébéar y Pereyre., 2005).

La resistencia a quinolonas debido a mutaciones en los genes de las topoisomerasas está descrita en *Mycoplasma bovirhinis* (Hirose y cols., 2004), *Mycoplasma gallisepticum* (Reinhardt y cols., 2002a; Reinhardt y cols., 2002b), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Le Carrou y cols., 2006a.), *Mycoplasma synoviae* (Le Carrou y cols., 2006b), *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 1997; Gruson y cols., 2005) y *Mycoplasma pneumoniae* (Gruson y cols., 2005).

En *Mycoplasma hominis* se ha descrito la implicación de sistemas de expulsión activa del tipo ABC en la resistencia a las quinolonas (Raheison y cols., 2002; Raheison y cols., 2005)

#### **I.2.1.4.1.2.- Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B y cetólidos**

Este grupo de antimicrobianos se denomina MLS<sub>B</sub>K y aunque son estructuralmente distintos, poseen mecanismos de acción similares inhibiendo la síntesis proteica al interferir con la subunidad 50S del ribosoma. El antimicrobiano MLS<sub>B</sub>K prototipo es la eritromicina. La resistencia a la eritromicina implica generalmente resistencia a todos los macrólidos y azálidos, pero no necesariamente a todas las lincosamidas, estreptograminas o cetólidos. Los principales mecanismos de resistencia a este grupo son alteraciones de la diana (el gen 23S rRNA), aumento de la expresión de sistemas de expulsión activa, disminución de la permeabilidad celular e inactivación enzimática. Estos mecanismos de resistencia pueden estar codificados por genes plasmídicos o cromosómicos (Stratton., 2005). A excepción de las estreptograminas y cetólidos, que son bactericidas, los restantes miembros de esta clase tienen una acción bacteriostática (Bébéar y Pereyre, 2005).

En micoplasmas se han descrito alteraciones en el gen 23S rRNA en *Mycoplasma gallisepticum* (Wu y cols., 2005), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Stakenborg y cols., 2005) y *Mycoplasma pneumoniae* (Lucier y cols., 1995; Okazaki y cols., 2001; Pereyre y cols., 2002; Matsuoka y cols., 2004; Morozumi y cols., 2005), *Mycoplasma hyorhinis* (Kobayashi y cols., 2005). Las mutaciones en el gen 23S rRNA están descritas como responsables de resistencia adquirida a macrólidos y lincosamidas. En *Mycoplasma pneumoniae* (Pereyre y cols., 2004) y en *Mycoplasma hominis* (Karamova y cols., 2004) además de mutaciones en el gen 23S rRNA también se ha descrito mutaciones en la proteína ribosomal L4 simultáneamente.

#### **I.2.1.4.1.3.- Tetraciclinas**

Las tetraciclinas actúan por inhibición de la síntesis proteica al unirse a la subunidad ribosomal 30S, poseyendo actividad bacteriostática (Bébéar y Pereyre, 2005). La resistencia a las tetraciclinas puede ser debida a expulsión activa, inactivación

enzimática y alteración de la diana. La resistencia a una tetraciclina suele implicar resistencia cruzada a todas ellas y, aunque haya excepciones, la resistencia suele ser más bien debida a la adquisición de determinantes Tet que a mutaciones en genes (Stratton., 2005).

En micoplasmas la resistencia a las tetraciclinas está descrita en asociación con mutaciones en el gen 16S rRNA (Dégrange y cols., 2004) o a la presencia del determinante *tetM* (Roberts y cols., 1985) que se puede encontrar asociado al transposon conjugativo Tn916 (Bébéar y Pereyre, 2005). Se ha demostrado la transmisión a través de conjugación de este determinante de resistencia entre *Streptococcus faecalis* a *Mycoplasma hominis* (Roberts y Kenny, 1987). La presencia de esta determinante implica resistencia a las tetraciclinas, pero no necesariamente a la doxiciclina (Blanchard y cols., 1992).

#### **I.2.1.4.1.4.- Aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos se ligan a la subunidad 30S inhibiendo la síntesis proteica. Son agentes bactericidas o bacteriostáticos. Existen 3 mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos: alteraciones del ribosoma (proteína S12 de la subunidad 30S o gen 16S rRNA), inactivación enzimática y disminución de la permeabilidad celular al aminoglucósido (Stratton., 2005).

Aunque se hayan descrito resistencias a los aminoglucósidos en micoplasmas, todavía no han sido estudiados los mecanismos de esta resistencia.

#### **I.2.1.4.1.5.- Anfénicoles**

Los anfénicoles como el cloranfenicol actúan por inhibición de la síntesis proteica al ligarse a la subunidad 50S del ribosoma. El mecanismo de resistencia a esta clase es

principalmente por inactivación enzimática, aunque los sistemas de flujo activo también puedan estar involucrados (Stratton., 2005).

En los micoplasmas no han sido estudiados los mecanismos de resistencia a los anfenicoles.

### **I.2.2.- Agalaxia contagiosa**

Esta enfermedad es conocida desde hace ya mucho tiempo. En 1816 Metaxa realizó la primera descripción clínica y en 1871 Brusasco le dio el nombre por el que hoy se conoce. Solamente en 1923 se aisló su agente etiológico clásico, conocido actualmente como *Mycoplasma agalactiae*. Años más tarde se asociaron a esta enfermedad *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large colony, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens*. Actualmente es conocida como un síndrome de múltiple etiología y está descrita en todo el mundo (Bergonier y cols., 1997; Madanat y cols., 2001).

#### **I.2.2.1.- Agentes etiológicos**

Clásicamente se considera a *Mycoplasma agalactiae* como el agente causal de la agalaxia contagiosa, aunque *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens* también puedan intervenir en el desarrollo de esta enfermedad (Bergonier y cols., 1997). No es rara la coexistencia de dos de estas especies en el mismo grupo de animales (Kinde y cols., 1994), y en el mismo animal (Gonçalves, 1984; Levison y cols., 1991; Gil y cols., 2003) aunque también se puede observar la asociación de micoplasmas y otras especies bacterianas (Atalaia y cols., 1986; Fernández y cols., 1996; Oros y cols., 1997).

La prevalencia de estos agentes parece depender de la localización geográfica. La mayoría de los aislamientos de *Mycoplasma agalactiae* ha sido reportada en Portugal (Atalaya y cols., 1987) y de *Mycoplasma putrefaciens* en Jordania (Al-Momani y cols., 2006a). Sin embargo, en las islas canarias (Assunção y cols., 2004), EEUU y Australia (DaMassa y cols., 1992) la especie predominante es *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC. Aunque, en el Magreb, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* es el agente aislado con mayor frecuencia (Bergonier y cols., 1997).

La especie animal también parece ser un factor del cual depende la prevalencia de las especies implicadas en este síndrome. (Perreau y cols., 1984; Atalaya y cols., 1987).

#### **I.2.2.2.- Susceptibilidad**

Esta enfermedad afecta sobre todo a cabras y ovejas productoras de leche en períodos de lactación, por activación de infecciones latentes, aunque las cabras parecen ser las más susceptibles (Thiaucourt y Bölske, 1996; Nicholas, 2002; Al-Momani y cols., 2006a). Los animales de producción intensiva y extensiva son igualmente afectados (Bergonier y cols., 1997).

#### **I.2.2.3.- Infección y transmisión**

Los animales enfermos son las principales fuentes de micoplasmas, puesto que los excretan por las secreciones de los compartimientos orgánicos afectados, con el agravante que esta excreción empieza antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos (Bergonier y cols., 1997).

Los animales clínicamente curados y los portadores asintomáticos también desarrollan un importante papel en la diseminación de esta enfermedad. Mientras los primeros pueden albergar a los micoplasmas en los nódulos linfoides y tejido mamario

(Bergonier y cols., 1997), los segundos los pueden alojar en el conducto auditivo externo, en el cual se han logrado aislar las cuatro especies de micoplasmas, donde además pueden estar en asociación con ácaros (Cottew y Yeats, 1981, 1982; DaMassa y cols, 1987; DaMassa y Brooks, 1991). Otras especies animales como bovinos, camélidos y rumiantes salvajes pueden actuar como reservorios de estos microorganismos (Bergonier y cols., 1997).

Aunque considerados muy delicados por la ausencia de una pared celular, los micoplasmas aparentan poseer una cierta capacidad de resistencia en el medio por cortos periodos de tiempo (Bergonier y cols., 1997). Más recientemente, fue descrito por primera vez en algunos de los micoplasmas implicados en la agalaxia contagiosa la capacidad de formación de biopelículas, un importante mecanismo de supervivencia y persistencia en el medio ambiente (McAuliffe y cols., 2006).

La transmisión de los micoplasmas puede ser vertical u horizontal. La transmisión vertical de madre a hijo ocurre durante la gravidez, transmisión en el parto o por la leche, esta última es indudablemente la más importante en la agalaxia contagiosa. La transmisión horizontal puede ser de forma directa, por medio del contacto entre animales, o indirecta en la que pueden intervenir vectores, sobre todo parásitos como los ácaros y garrapatas, el medio ambiente, la maquina de ordeño o la ropa durante el esquila (Bergonier y cols., 1997).

#### **I.2.2.4.- Aspectos clínicos**

La enfermedad se manifiesta generalmente en el momento del parto y durante la lactación. Se caracteriza por la tríada clásica afectando al tejido mamario, articulaciones y ojos. La presencia de la tríada clásica en un mismo animal es poco común pero fácilmente observable en los colectivos. Las mamitis llevan a la disminución o al cese de la producción de leche, que presenta un aspecto verdoso que en algunos casos puede ser marrón. Se pueden afectar una o ambas mamas con la presencia de nódulos duros

que posteriormente pueden originar esclerosis y atrofia mamaria; las artritis originan claudicaciones y los ojos se ven afectados por una queratitis. La morbilidad es bastante elevada y en casos muy graves la muerte se puede producir en menos de una semana (Gonçalves, 1984; Atalaia y cols., 1986; Bergonier y cols., 1997).

#### **I.2.2.4.1.- *Mycoplasma agalactiae***

Afecta indistintamente a cabras y ovejas, y aunque pueden enfermar los animales de cualquier raza sexo y edad, son las hembras en lactación las que evidencian los signos clínicos más característicos y es en las ubres donde se observan los primeros síntomas clínicos (Bergonier y cols., 1997).

Existe una fase inicial caracterizada por fiebre de corta duración seguida de una bacteriemia. Posteriormente surge la fase clínica que afecta varios órganos, sobre todo la glándula mamaria, articulaciones y ojos. La gravedad y localización de las afecciones puede ser muy variable. Ocasionalmente puede ocurrir una afección respiratoria, aborto y diarrea (Bergonier y cols., 1997).

La evolución de la enfermedad depende de la forma clínica prevalente (aguda/crónica) y de las medidas higiénicas y terapéuticas empleadas (Bergonier y cols., 1997).

El aislamiento de *Mycoplasma agalactiae* a partir del conducto auditivo externo de pequeños rumiantes sin sintomatología clínica ha llevado a suponer que algunas cepas podrían ser apatógenas (Cottew y Yeats, 1982). No obstante, también podría ser la consecuencia de una cierta fase de equilibrio parásito/hospedador después de superada la enfermedad y desaparecidos los anticuerpos circulantes, pero no así la inmunidad celular que es la que resulta plenamente protectora en esta enfermedad (José B. Poveda Comunicación personal).

#### **I.2.2.4.2.- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large colony**

Aunque afecta principalmente a las cabras, también se ha aislado de ovejas con enfermedad clínica/subclínica y muy raramente de vacuno y cabras salvajes (Perrin y cols., 1994; Bergonier y cols., 1997). Aunque no se hayan aislado, la presencia de anticuerpos frente a esta especie ha sido descrita en camélidos sudamericanos (Hung y cols., 1991). Ocasionalmente se ha podido aislar de abortos espontáneos en bovinos (Kapoor y cols., 1989) además de lavados prepuciales de toros (Sylla y cols., 2005) y semen bovino (Stradaioli y cols., 1999).

La sintomatología es muy semejante a la que origina *Mycoplasma agalactiae* pero de mayor gravedad y diversidad, puesto que ocasiona con mayor frecuencia neumonías, abortos y mayor mortalidad (Atalaia y cols., 1986; Rodríguez y cols., 1995a). Por otra parte, también se ha aislado de abortos espontáneos en caprinos (Rodríguez y cols., 1995b).

Puede surgir de un modo bifásico como en las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* o dominado desde el inicio por una brusca caída en la producción láctea. Es posible la existencia de una septicemia de curso fatal y surgen secuelas con mayor facilidad que en las infecciones por *Mycoplasma agalactiae* (Bergonier y cols., 1997).

En los animales jóvenes la mortalidad suele ser elevada y se observa poliartritis, neumonía y menos frecuentemente diarrea, queratoconjuntivitis y afección del sistema nervioso central (Bergonier y cols., 1997).

En ovejas sudafricanas ha sido asociado a balanopostitis ulcerativa y vulvovaginitis (Trichard y cols., 1993).

#### **I.2.2.4.3.- *Mycoplasma putrefaciens***

El papel de este microorganismo no está todavía bien definido y aparentemente es un patógeno oportunista (Bergonier y cols., 1997; Gil y cols., 2003), aunque los brotes en los que ha sido implicado han demostrado que es realmente una especie patógena (Damassa y cols., 1987a; Rodríguez y cols., 1994) y en una inoculación intramamaria experimental fue capaz de causar enfermedad a pesar de ser inoculado en un número tan bajo de solamente 50 células (Adler y cols., 1980). Afecta principalmente a las cabras, aunque haya sido identificado también en ovejas (Bergonier y cols., 1997).

Es causa de septicemia, mastitis, agalaxia y artritis aguda, además de abortos. Posee tropismo por el tejido mamario y respiratorio, aunque no se haya comprobado su afinidad por los tejidos oculares (Bergonier y cols., 1997).

#### **I.2.2.4.4.- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum***

Esta especie afecta predominantemente a cabras, aunque su aislamiento se haya producido también en ovejas afectadas de manera clínica o subclínica y excepcionalmente en vacuno, cabras salvajes y antílope de Vaal (Bergonier y cols., 1997; Nicholas y cols., 2005). A semejanza de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, se han identificado anticuerpos frente a esta especie en camélidos sudamericanos sin haberse logrado su aislamiento (Hung y cols., 1991).

La sintomatología, morbilidad y mortalidad son muy semejantes a las que presenta *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC y puede ser también responsable de abortos. Aún así, los cuadros clínicos que origina se pueden dividir en dos grandes grupos: la forma aparentemente más generalizada, que cubre todos los síntomas típicos con predominio de la sintomatología articular, y la de sintomatología predominantemente pulmonar, que afecta a algunos países como Marruecos (DaMassa y cols., 1987b; Bergonier y cols., 1997).

Los animales jóvenes son, a semejanza de lo que ocurre con *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, muy sensibles y la muerte surge rápidamente, pudiendo además de la triada clásica afectar al sistema nervioso central (DaMassa y cols., 1987a; Bergonier y cols., 1997).

#### I.2.2.5.- Distribución

Como he mencionado anteriormente, la agalaxia contagiosa posee una distribución mundial. En Europa y norte de África afecta sobre todo a los países mediterráneos, tales como España, Portugal, Francia, Italia o Maruecos, donde es endémica (Bergonier y cols., 1997). Brotes esporádicos han sido descritos en otros países europeos (Bajmócy y cols., 2000; Cokrevski y cols., 2001). Tras algunos brotes de esta enfermedad, el Reino Unido se encuentra hoy libre, así como los países escandinavos, países bálticos, Chipre, Alemania, Luxemburgo, Holanda, Polonia, Ucrania y Bielorrusia (Bergonier y cols., 1997; Ayling y cols., 2004). La agalaxia contagiosa también ha sido comunicada en Asia (Kobayashi y cols., 1996a, Al-Momani, 2006a), África subsahariana (Egwu y cols., 2001; Adehan y cols., 2006), América del sur y del norte (Blikslager y Anderson, 1992) y Oceanía (Bergonier y cols., 1997).

En las islas canarias la agalaxia contagiosa es una enfermedad endémica, habiéndose aislado las cuatro especies participantes del síndrome; *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC y *Mycoplasma agalactiae* se encuentran ampliamente distribuidos, siendo la primera la más aislada e identificada por serología, mientras que *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens* son aparentemente menos frecuentes (Villalba y cols., 1992; Real y cols., 1994; Rodríguez y cols., 1995; Assunção y cols., 2004; de la Fé y cols., 2007a).

### **I.2.2.6.- Diagnostico**

Aunque un brote característico pueda ser fácilmente identificable por sus signos patognomónicos, en localizaciones donde la enfermedad es enzoótica la sintomatología puede ser tan discreta que el diagnóstico se vuelve extremadamente difícil (Bergonier y cols., 1997).

El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento del agente causal a partir de muestras clínicas. La identificación posterior se puede realizar por varios métodos que describiré a continuación.

#### **I.2.2.6.1.- Detección e identificación**

##### **I.2.2.6.1.1.- Aislamiento**

Las pruebas para realizar la identificación convencional suponen el aislamiento del agente en medio específico para micoplasmas. Las muestras más apropiadas incluyen la leche, secreciones mastíticas, fluido articular o torundas oculares (Bergonier y cols., 1997). Curiosamente, el conducto auditivo externo ha demostrado ser también un buen sitio para aislar micoplasmas, incluyendo los patógenos causantes de la agalaxia contagiosa (Cottew y Yeats, 1981, 1982; Gil y cols., 1999; Nicholas, 2002)

##### **I.2.2.6.1.1.1.- Pruebas bioquímicas y enzimáticas**

Requieren la clonación y purificación del cultivo, puesto que a veces hay más de una especie de micoplasma presente y los contaminantes y formas L son comunes. Por el tiempo que requieren en su ejecución y las dificultades de interpretación se tienden a utilizar cada vez menos (Bergonier y cols., 1997).

Se basan en el requerimiento de esteroles, a la capacidad o incapacidad de fermentar o hidrolizar determinados sustratos, y también en las capacidades lipolíticas y proteolíticas de los aislamientos. Los micoplasmas son organismos muy sencillos y no poseen muchas vías metabólicas que evaluar lo que puede suponer un problema al interpretar los resultados. La morfología de las colonias también puede ayudar a la identificación presuntiva, y en el caso de *Mycoplasma putrefaciens*, al olor putrefacto típico de sus cultivos (OIE, 2004).

En la Tabla I.2. se pueden observar algunas características bioquímicas de las especies de micoplasmas aislados de pequeños rumiantes y que pueden ser útiles en su identificación.

Especie	Cepa referencia	G	M	A	T	F	Prot	Lip
<i>M. agalactiae</i>	PG2	-	-	-	+	+	-	+
<i>M. arginini</i>	G230	-	-	+	V	-	-	-
<i>M. bovis</i>	Donetta	-	-	-	+	+	-	V
<i>M. c. capricolum</i>	Calif. Kid.	+	+	+	+	+	+	-
<i>M.c. capripneumoniae</i>	F. 38	+	+	-	+	-	-	-
<i>M.m. capri</i>	PG3	+	+	-	+	+	+	-
<i>M. m. m. LC</i>	Y-Goat	+	+	-	-	+	+	-
<i>M. m. m. SC</i>	PG1	+	+	-	-	+	-	-
<i>M. ovipneumoniae</i>	Y98	+	+	-	+	-	-	-
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	+	+	V	+	+	-	-

**Tabla I.2.-** Características bioquímicas de las especies de micoplasmas aislados de pequeños rumiantes. G- Fermentación de la glucosa, M- fermentación de la Manosa, A- hidrólisis de la arginina, T- reducción del 2,3,5, trifeniltetrazolium F- actividad fosfatásica, Prot- actividad proteolítica, Lip- actividad lipolítica (formación de películas y cristales). (+) positivo, (-) negativo. (V) actividad variable (Adaptado de DaMassa, 1996).

Los resultados obtenidos mediante el estudio bioquímico y enzimático casi nunca proporcionan una identificación definitiva, pero pueden ser orientativos en las pruebas subsecuentes reduciendo el tiempo y trabajo para su identificación final (Poveda, 1998).

Otras técnicas como la hemadsorción, hemaglutinación y hemólisis también pueden ser útiles en la identificación de estos microorganismos, y pueden estar relacionadas con su patogenicidad (Poveda, 1998).

#### **I.2.2.6.1.1.2.- Pruebas serológicas para la identificación**

Estas pruebas se basan en la utilización de sueros hiperinmunes específicos obtenidos en conejos. La identificación serológica de *Mycoplasma putrefaciens* suele ser fácil, pero la de las restantes tres especies suele conllevar problemas. La alta semejanza entre *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma bovis* puede originar reacciones cruzadas entre ambas especies limitando su identificación (Madanat y cols., 2001). *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC y *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* pertenecen al llamado grupo mycoides, caracterizado por grandes semejanzas proteicas, genéticas y antigénicas, pudiendo existir reacciones cruzadas entre las especies de este grupo (Bergonier y cols., 1997; Bashiruddin y cols., 2005). Esto es particularmente crítico en el caso de las reacciones cruzadas entre los biotipos de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, LC y SC, puesto que éste último es el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa bovina, una enfermedad de la antigua Lista A de la OIE y con un enorme impacto sanitario y económico (Thiaucourt y cols., 2000).

#### **I.2.2.6.1.1.2.1- Inhibición del crecimiento**

Se realiza en medio sólido y se basa en una reacción antígeno-anticuerpo específica en la que se produce la lisis del microorganismo sin mediación del complemento. La capacidad del antisuero de inhibir el crecimiento del micoplasma se

observa por medio de la presencia de un halo de inhibición superior a 2 mm alrededor de un disco impregnado con el mismo (Poveda y Nicholas, 1998).

#### **I.2.2.6.1.1.2.2- Inhibición del metabolismo**

Este es un procedimiento alternativo a la inhibición de crecimiento y al poder efectuarse en medio líquido es particularmente útil cuando el aislado no crece bien en medio sólido. El metabolismo de determinados sustratos presentes en el medio implica cambios en el pH del mismo, que pueden ser observados por medio de la incorporación de un indicador de pH. La correspondencia antígeno-anticuerpo produce la lisis de los microorganismos que no utilizan el sustrato en cuestión, previniendo así el cambio de color del medio (Poveda y Nicholas, 1998).

#### **I.2.2.6.1.2.2.3- Immunobinding/ Dot Blott**

La técnica de Dot-Blot en membrana de nitrocelulosa, es otra técnica que se basa en las capacidades antigénicas de los micoplasmas para su identificación. Se basa en el crecimiento de estos microorganismos en el entramado de los poros de la membrana de nitrocelulosa, y su posterior tratamiento con antisueros. Es una técnica bastante práctica, rápida, fácil de estandarizar y ofrece la posibilidad de poder probar simultáneamente muchas muestras con distintos antisueros (Poumarat, 1998) y ha sido utilizada eficazmente en la identificación de los micoplasmas de rumiantes (Poumarat y cols., 1991).

#### **I.2.2.6.1.3.- Inmunohistoquímica**

Estas pruebas permiten la determinación de la localización de los microorganismos en los tejidos afectados y utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales (Rodríguez y cols., 1996b; Rodríguez y cols., 1998).

#### **I.2.2.6.1.4.- Sondas de ADN**

Es posible la utilización de sondas de ADN para la identificación de algunos de los agentes implicados en la agalaxia contagiosa. De esta manera, sondas específicas para *Mycoplasma agalactiae* (Tola y cols., 1994) y *Mycoplasma capricolum* (Dedieu y cols., 1992) han sido desarrolladas y probadas con buenos resultados.

#### **I.2.2.6.1.5- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Los ensayos de PCR son empleados de forma generalizada en muchos laboratorios y son muy sensibles. Cuando son realizados sobre muestras clínicas pueden ser orientativos de que acciones tomar, aunque un resultado negativo nunca deba ser considerado como negativo hasta un aislamiento negativo, especialmente cuando se trabaja con leche, puesto que esta posee sustancias (especialmente proteínas) que pueden inhibir o limitar la PCR. No obstante, cuando se realiza sobre muestras de leche su sensibilidad puede ser superior al aislamiento convencional (Tola y cols., 1997a). Su principal ventaja sobre las técnicas convencionales es la alta sensibilidad y la rapidez, permitiendo establecer un tratamiento más rápidamente (Nicholas, 2002).

Existen varias PCR descritas para las diversas especies implicadas en esta enfermedad (Chávez González y cols., 1995; Dedieu y cols., 1995; Tola y cols., 1996;

Subramaniam y cols., 1998; Monnerat y cols., 1999; Peyraud y cols., 2003; Bashiruddin y cols., 1994; Greco y cols., 2001) y se basan en la secuencia de diversos genes.

#### **I.2.2.6.2- Pruebas serológicas para el diagnóstico**

Las variaciones en la potencia del suero, así como una seroconversión tardía, son algunos de los problemas en el diagnóstico que se presentan al emplear las pruebas serológicas (Buonavoglia y cols., 1999; Greco y cols., 2001).

Las pruebas serológicas son muy útiles en el apoyo de un diagnóstico realizado laboratorialmente y en las investigaciones epidemiológicas; no obstante nunca podrán sustituir el aislamiento e identificación del agente por los métodos convencionales (Madanat y cols., 2001).

##### **I.2.2.6.2.1.- ELISA y reacción de fijación del complemento**

El ELISA (Levihson y cols., 1991; Rodríguez y cols., 1996a) y la reacción de fijación del complemento (Perreau y cols., 1976) se pueden utilizar con éxito en el diagnóstico de la agalaxia contagiosa, siendo el ELISA más ventajoso sobre la reacción de fijación del complemento por su sensibilidad y facilidad en el uso a gran escala (Nicholas, 2002; Kittelberger y cols., 2006).

##### **I.2.2.6.2.2.- Western Blott**

La prueba de western blott (Tola y cols., 1997b) es otra prueba que puede ser utilizada en el diagnóstico de la agalaxia contagiosa. Se trata de una técnica con muchas posibilidades que ya fue aplicada con éxito en el diagnóstico de otras enfermedades por micoplasmas como la perineumonía contagiosa bovina (Gonçalves y cols., 1998), donde

demonstró ser más sensible y específica que el ELISA (Nicholas y cols., 1996), aunque esta situación no ocurre en el diagnóstico de la agalaxia contagiosa (Kittelberger y cols., 2006).

#### **I.2.2.7.- Tratamiento**

Los primeros tratamientos frente a la agalaxia contagiosa estaban basados en compuestos arsenicales, sobre todo las sales de sodio y zinc de acetarsol (Bergonier y cols., 1997). Posteriormente se empezaron a utilizar agentes antimicrobianos más específicos y potentes para el tratamiento de esta enfermedad, y ahora su utilización se ha generalizado. Actualmente, los agentes más empleados para el control de la agalaxia contagiosa son los macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas y lincosamidas (Bergonier y cols., 1997).

Aunque la terapia frente a las micoplasmosis animales con antimicrobianos implique una mejora clínica significativa de los animales, la eliminación del agente causal no suele conseguirse, puesto que frecuentemente sigue siendo posible su aislamiento (Poumarat y cols., 2001; Stipkovits y cols., 2005). Factores como la subdosificación de los animales, las características farmacodinámicas alteradas por la infección y la utilización de antimicrobianos bacteriostáticos pueden ser algunos de los motivos (Bergonier y cols., 1997). Este hecho presenta riesgos, no solo por el surgimiento de los llamados portadores crónicos, animales que en caso de descenso de la inmunidad pueden volver a desarrollar la enfermedad, sino también por permitir la selección de cepas resistentes (Le Carrou y cols., 2006a; Le Carrou y cols., 2006b). No obstante, en algunos casos ha sido posible el aislamiento de micoplasmas que no habían desarrollado mutaciones posteriormente a tratamientos con antimicrobianos (Reinhardt y cols., 2005).

Los trabajos realizados anteriormente en *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC han descrito la existencia de cepas resistentes a algunos

de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica (Loria y cols., 2003; Kidanemariam y cols., 2005; Antunes y cols., 2007a) y está descrita la existencia de fallos terapéuticos en el tratamiento de la agalaxia contagiosa (Kinde y cols., 1994; Bajmócy y cols., 2000).

#### **I.2.2.8.- Profilaxis**

Las vacunas para la prevención de la agalaxia contagiosa son utilizadas en varios países, aunque su eficacia sea muy variable. Ninguna vacuna ha sido adoptada universalmente y no existen métodos estandarizados para su preparación y evaluación (Bergonier y cols., 1997). Su uso ha originado resultados mixtos y con relativo éxito en zonas donde la enfermedad es endémica, pero el mantenimiento del estado de portador sigue siendo un problema (Bar-Moshe y cols., 1984; Nicholas, 2002).

Comercialmente solamente existen vacunas dirigidas frente a *Mycoplasma agalactiae*, aunque experimentalmente se hayan desarrollado algunas frente a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma putrefaciens* y *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. En muchas localizaciones, es común recurrir a la elaboración de vacunas con cepas locales y a pequeña escala (Madanat y cols., 2001).

Las vacunas pueden ser vivas atenuadas o inactivadas. Las primeras están prohibidas en Europa y en otras áreas geográficas, puesto que puede haber una ligera infección y eliminación del agente y las segundas son indudablemente las más utilizadas. Ninguna de ellas ha demostrado ser totalmente eficaz en la profilaxis de la agalaxia contagiosa y la duración de la inmunidad es corta (Tola y cols., 1999; Madanat y cols., 2001; De la Fé y cols., 2007b).

### **I.2.2.9.- Control**

Siempre que posible se debe procurar buscar el estatus de libre de la enfermedad, por la utilización de medidas graduales que disminuyan la prevalencia de la enfermedad. Estas medidas pasan por el control a nivel de grupo, reduciendo las fuentes de micoplasmas y limitando su transmisión, además de a nivel regional, que supone las evaluaciones periódicas del estado sanitario del grupo además de limitar y controlar el movimiento de los animales (Bergonier y cols., 1997).

### **I.2.3.- Quinolonas**

#### **I.2.3.1- Historia**

Las quinolonas constituyen un grupo de antimicrobianos de origen sintético de amplia utilización en medicina humana y veterinaria.

En la década de los sesenta se descubrió el ácido nalidíxico, un subproducto del desarrollo de compuestos anti-malaria (Leshner y cols., 1962; Appelbaum y Hunter, 2000) y en 1967 fue autorizado su uso clínico, empezando así la utilización de las quinolonas como agentes antiinfecciosos. Su corto espectro de acción y los bajos niveles séricos limitaran su utilización en el tratamiento de infecciones del tracto urinario donde alcanzaba elevadas concentraciones, pero muchas de sus particularidades estructurales siguen siendo utilizadas en las quinolonas desarrolladas posteriormente. La facilidad con que se surgen mutantes es también una característica importante de las moléculas de primera generación (Appelbaum y Hunter, 2000; Emmerson y Jones, 2003).

En 1973 fue patentada una nueva molécula, la flumequina. Su principal innovación fue la inclusión de un átomo de flúor en la posición 6 que permaneció constante en la mayoría de las quinolonas posteriores. Su actividad frente a bacterias grampositivas mejoró sustancialmente dando indicios de que la actividad frente a estos microorganismos podría ser mejorada (Appelbaum y Hunter, 2000).

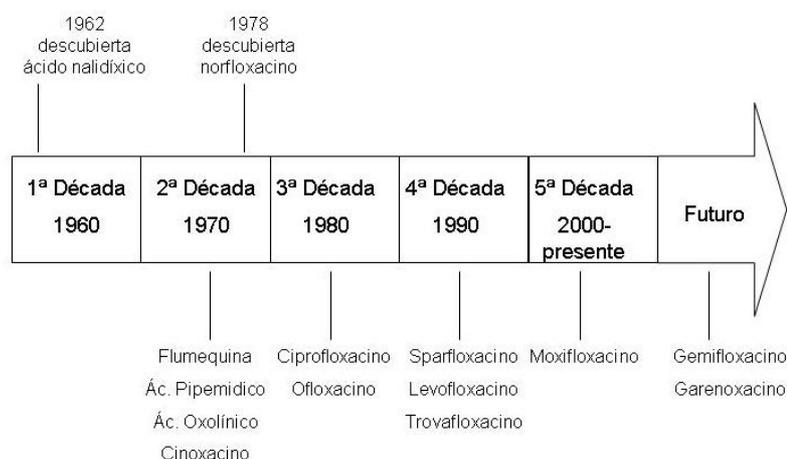
En 1978 se desarrolló el norfloxacin, que combinó el átomo de flúor en la posición 6 con un anillo piperacínico en la posición 7 y marcó el inicio de las fluoroquinolonas de segunda generación. Aunque su espectro de acción cubriera una gran variedad de organismos gramnegativos y algunos grampositivos, sus características no lo hacían todavía apropiado para el uso sistémico. En los 3 años posteriores a su introducción fueron desarrolladas muchas quinolonas cuya utilización sigue siendo común, como son enoxacin (1980), ciprofloxacino (1981) y ofloxacino (1982). Además de su espectro de acción, estas moléculas poseen también una buena absorción en el tracto gastrointestinal y alcanzan buenos niveles séricos, permitiendo su utilización a nivel sistémico (Emmerson y Jones, 2003).

La poca eficacia demostrada por las quinolonas disponibles en el control de infecciones por grampositivos y bacterias anaerobias llevó a nuevas modificaciones y a un aumento en la complejidad estructural. En la década de los noventa, la aparición de muchas resistencias a macrólidos, beta-lactámicos y a la vancomicina, el establecimiento de la relación de micoplasmas y clamidias con enfermedades conocidas y la aparición de patógenos como legionella llevó al desarrollo de las quinolonas de tercera generación, como el esparfloxacino y levofloxacino, cuyo espectro de acción abarca grampositivos, bacterias anaeróbicas, micoplasmas y clamidias. Aunque ligeramente más eficaces frente a estafilococos, siguen siendo poco eficaces frente a cepas resistentes a quinolonas (Appelbaum y Hunter, 2000).

Posteriormente surgieron las fluoroquinolonas de cuarta generación, como el trovafloxacino y gemifloxacino, más potentes y capaces de actuar frente a un mayor número de anaerobios (Van Bambeke y cols., 2005).

Más recientemente surgieron las quinolonas no-fluoradas como el garenoxacin, más eficaces que las fluoroquinolonas frente a patógenos grampositivos resistentes a las fluoroquinolonas (Roychoudhury y Ledoussal, 2002).

En la Figura I.2. se puede observar la evolución de las quinolonas a lo largo del tiempo y algunos de los marcos más importantes en su historia.



**Figura I.2.-** Evolución de las quinolonas y marcos importantes (Emmerson y Jones, 2003).

Las quinolonas son hoy uno de los grupos de antimicrobianos más consolidado y utilizado en el tratamiento de las más diversas afecciones y su importancia en la quimioterapia antimicrobiana es notable, lo que se refleja en la gran cantidad de nuevas moléculas patentadas así como las que esperan permiso para su introducción en el mercado.

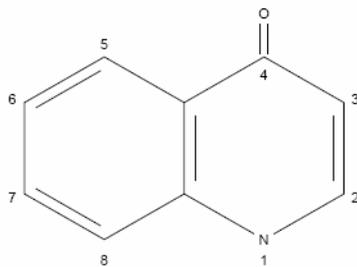
Existen varias quinolonas cuya utilización está permitida en veterinaria, aunque haya bastantes diferencias según la región geográfica en cuestión. En Europa, están permitidas cuatro quinolonas para uso en animales de producción: enrofloxacino, flumequina, marbofloxacino y danofloxacino (WHO, 1998).

Aunque es difícil de cuantificar, la producción y consumo de quinolonas para uso veterinario en 1998 fue de cerca de 120 toneladas a nivel mundial, entre productos de marca y genéricos (WHO, 1998).

### I.2.3.2- Estructura química y clasificación

#### I.2.3.2.1- Relación estructura-actividad

Las quinolonas poseen una estructura básica común a todos los elementos de la clase. Exhiben un núcleo aromático bicíclico que puede contener uno o más átomos de nitrógeno, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3 que completa la estructura básica de una quinolona, el ácido 4-quinolín-3-carboxílico (4-quinolona), siendo también conocidas por 4-quinolonas (Alós, 2003). En la Figura I.3. se puede observar la estructura de la 4-quinolona.



**Figura I.3.-** Estructura de la 4-quinolona (Alós, 2003).

Según el número y la posición de los átomos de nitrógeno en el núcleo, se pueden diferenciar cuatro grupos diferentes que aunque diferentes bioquímicamente son englobados dentro de la clase descriptiva de las quinolonas (Li y cols., 2000):

- Benzopiridinas- también denominadas de verdaderas quinolonas, constituyen el núcleo más utilizado en la síntesis de quinolonas. Poseen un único átomo de nitrógeno en la posición 1 (ciprofloxacino, esparfloxacino, flumequina).

- Naftiridinas- poseen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 8 y a la par de las benzopiridinas constituyen la mayoría de las quinolonas (enoxacino, gemifloxacino, trovafloxacino).
- Piridopirimidinas- poseen átomos de nitrógeno en las posiciones 1, 6 y 8 (ácidos piromídico y pipemídico).
- Cinolinas- poseen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 2 (cinoxacino).

Las modificaciones de la estructura base de estos compuestos pueden ser realizadas con la intención de mejorar el espectro de actividad y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (Appelbaum y Hunter, 2000). Seguidamente se describen algunas de las principales mejoras en la potencia y espectro de actividad, siendo posible combinar varias modificaciones para obtener los efectos más deseados. La Figura I.4. resume esquemáticamente la actividad de cada radical.

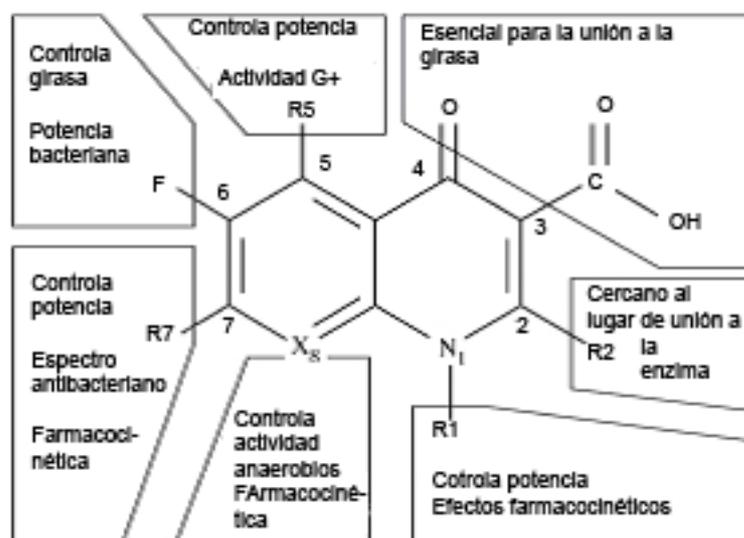


Figura I.4.- Resumen de la actividad de cada radical (Anderson y MacGowan, 2003).

- Posición 1- Controla la potencia del antimicrobiano. Los radicales más eficaces y comunes son el ciclopropilo (ciprofloxacino), el 2,4-difluorofenilo (trovafloxacino), muy eficaz también frente a anaerobios y el t-butilo (Chu y Fernandes, 1989; Appelbaum y Hunter, 2000; Andersson y MacGowan, 2003).

- Posición 5- Controla la potencia. Grupos como NH<sub>2</sub> (esparfloxacino), CH<sub>3</sub> (grefloxacino) y OH mejoran su actividad contra grampositivos (Appelbaum y Hunter, 2000; Andersson y MacGowan, 2003).

- Posición 6- Controla la potencia de un modo muy significativo. La inclusión de un átomo de flúor ha conllevado inmensas mejoras y casi todas las nuevas quinolonas lo poseen (Andersson y MacGowan, 2003). La presencia de un átomo de flúor puede mejorar la capacidad de entrada en la célula (Chu y Fernandes, 1989).

- Posición 7- Es el punto principal donde se controla la potencia, el espectro, la biodisponibilidad y los efectos secundarios. Un grupo piperacínico (norfloxacino, ciprofloxacino) o metil-piperacínico (levofloxacino, esparfloxacino) en esta posición aumenta su actividad frente bacterias gramnegativas. Algunos datos sugieren que este anillo puede tener un papel en la inhibición de sistemas de expulsión, aumentando así la potencia de estos agentes (Andersson y MacGowan, 2003). Un grupo aminopirrolidínico (clinafloxacino) aumenta su potencia frente a grampositivos aunque a veces este incremento se haga a expensas de pérdida de actividad en frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Appelbaum y Hunter, 2000; Andersson y MacGowan, 2003).

- Posición 8- La inclusión de un grupo metoxi (moxifloxacino) o un átomo de flúor (clinafloxacino) puede mejorar su actividad sobretodo frente a organismos anaerobios (Appelbaum y Hunter, 2000).

Las fluoroquinolonas se diferencian de las quinolonas clásicas por la presencia de un átomo de flúor en la posición 7 además de un anillo piperacínico o pirrolidínico en la posición 7 del núcleo.

#### **I.2.3.2.2.- Generaciones**

Como anteriormente se ha mencionado, las quinolonas pueden clasificarse en generaciones, con espectros de actividad y propiedades farmacocinéticas distintas (Ball, 2000).

Las de primera generación, como el ácido nalidíxico, tienen actividad frente a enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., etc.) y algunos grampositivos (flumequina y ácido oxolínico). Poseen como base química la molécula original del ácido nalidíxico. Tienen propiedades farmacocinéticas desfavorables, muchos efectos secundarios y son más propicias que las posteriores a desarrollar resistencias (Appelbaum y Hunter, 2000).

La creación del norfloxacin marca el inicio de las quinolonas de segunda generación. Con la inclusión de un átomo de flúor en la posición 6 cambia drásticamente la actividad y propiedades farmacocinéticas de los antimicrobianos. El átomo de flúor en la posición 6 es lo que distingue a las fluoroquinolonas. Esta modificación sumada a las anteriores características les confiere una mayor actividad frente a gramnegativos (*Pseudomonas* spp.), algunos grampositivos (*Staphylococcus* spp.) y otros géneros bacterianos (*Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp.). Sus propiedades farmacocinéticas son mejoradas y se disminuye la selección de resistencias (Ito y cols., 1980; Wise y cols., 1983; Wise y cols., 1988). Aún así presentaban una baja actividad frente a cocos grampositivos y apenas son eficaces sobre bacterias anaerobias (Taléns-Visconti y cols., 2002).

Las quinolonas de tercera generación como el esparfloxacin, grepafloxacin y levofloxacin tienen mejor actividad frente a gram-positivos (*Streptococcus* spp.), patógenos atípicos (*Chlamydia* spp. y *Mycoplasma* spp.) y frente a algunos anaerobios, además de una mayor semivida y mejor penetración tisular (Kidwai y cols., 1998; Appelbaum, 1999; Jacobs, 1999; Taléns-Visconti y cols., 2002).

Finalmente, las de cuarta generación mejoran la actividad frente a gram-positivos además de su actividad frente a anaerobios (*Prevotella* spp., *Pepstreptococcus* spp.), manteniendo las mejorías farmacocinéticas de las anteriores generaciones (Appelbaum, 1999; Jacobs, 1999; Taléns-Visconti y cols., 2002).

La tabla I.3. muestra varios ejemplos de quinolonas y la generación correspondiente.

Generación	Ejemplos
Primera	Ácido nalidíxico Ácido oxolínico
Segunda	Norfloxacin Ciprofloxacino Lomefloxacino Ofloxacino Enrofloxacin
Tercera	Esparfloxacino Grepafloxacino Levofloxacino
Cuarta	Gemifloxacino Trovafloxacino Gatifloxacino

**Tabla I.3.-** Varios ejemplos de quinolonas y generación correspondiente

### I.2.3.3- Mecanismo de acción

Para ejercer su actividad antimicrobiana, las quinolonas penetran en la célula bacteriana por medio de mecanismos de difusión pasiva a través de las porinas o de la

capa de lipopolisacáridos actuando por inhibición de las topoisomerasas bacterianas II y IV consiguiendo un efecto bactericida.

#### **I.2.3.3.1.- Topoisomerasas bacterianas**

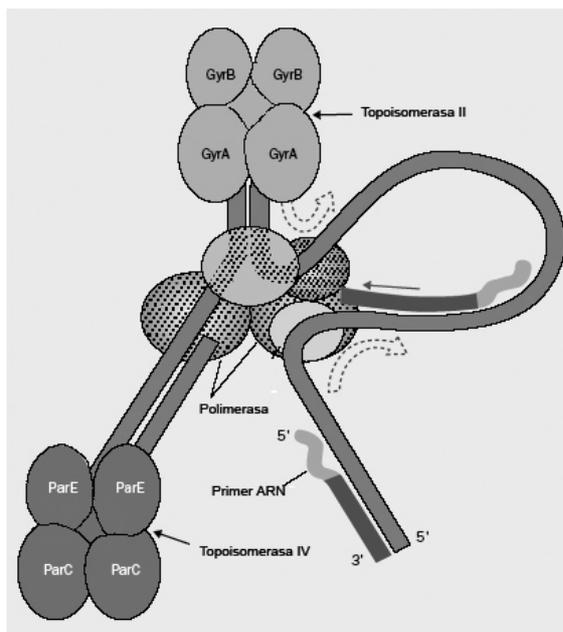
En la mayoría de las bacterias el cromosoma es una cadena de ADN doble, de forma circular que se encuentra en un estadio de superenrollamiento negativo, o sea, contrario al enrollamiento natural de la cadena de ADN. Esta alta condensación del ADN implica que sea totalmente dependiente de las topoisomerasas para que siga funcional. Así, las topoisomerasas son responsables del mantenimiento del estado adecuado de superenrollamiento del ADN, en las regiones del cromosoma en que ocurra, o no, replicación. La transcripción de muchos genes es muy sensible al estadio de superenrollamiento del ADN; además, el proceso de separación de las cadenas que ocurre en el proceso de replicación conlleva cambios en el superenrollamiento de la cadena, delante y detrás del punto de replicación. Las topoisomerasas son enzimas clave para los ajustes necesarios frente a los cambios (Drlica y Zhao, 1997; Hawkey, 2003).

Existen dos tipos de topoisomerasas bacterianas clasificadas con base en su funcionamiento, las de tipo I y las de tipo II. Mientras las de tipo I quiebran transitoriamente una de las cadenas de la hélice de ADN para pasar otra cadena simple por la quiebra, las del tipo II lo hacen sobre las dos cadenas de ADN pasando una cadena doble o un segmento de doble cadena a través de la quiebra. Posteriormente se religan los extremos que fueran separados (Mizzuchi y cols., 1980; Taléns-Visconti y cols., 2002). Mientras las de tipo II son esenciales para el crecimiento bacteriano, las de tipo I no lo son, pudiendo su ausencia ser compensada por otras vías (DiNardo y cols., 1982)

Las bacterias poseen dos tipos distintos de topoisomerasas tipo II, la topoisomerasa II o ADN girasa y la topoisomerasa IV. Estas enzimas son esenciales

para todas las especies bacterianas y poseen funciones fundamentales en la mayoría de los procedimientos en el que el ADN esté implicado representando así una diana bastante apetecible (Drlica y Zhao, 1997; Levine y cols., 1998) ya que no se pueden sustituir con otras vías (Van Bambeke y cols., 2005).

Las topoisomerasas tipo II modulan el estadio topológico del material genético al inducir una quiebra en la cadena doble, pasar una hélice de ADN íntegra a través de ésta y re-ligar las extremidades (Levine y cols., 1998; Anderson y Osheroff, 2001). En general este tipo de topoisomerasas son moléculas que de un modo ATP dependiente catalizan la reacción de relajación del ADN superenrollado, catenación y decatenación de los anillos de ADN y enredo/desenredo del ADN doble (Levine y cols., 1998). La Figura I.5. representa un esquema de la acción de las topoisomerasas bacterianas en la replicación del ADN.



**Figura I.5.-** Esquema de la acción de las topoisomerasas bacterianas en la replicación del ADN (adaptado de Hooper, 2002).

La topoisomerasa II fue descubierta en 1976 (Gellert y cols., 1976). Es un tetrámero  $A_2B_2$  y está codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. Su actividad enzimática es esencial para la regulación del superenrollamiento del ADN, transcripción, iniciación y elongación durante la replicación del ADN (Levine y cols., 1998). Cataliza de un modo eficiente reacciones de enrollamiento o desenrollamiento del ADN pero su acción como decatenasa es pobre. Además, es la única topoisomerasa conocida con la capacidad de generar enrollamientos negativos en ácidos nucleicos. Debido a esta propiedad única, es esencial para el mantenimiento de la densidad cromosomal y responsable por aliviar el estrés torsional que se acumula por delante de la horquilla de replicación y transcripción (Drlica, 1999; Anderson y Osheroff, 2001; Hawkey, 2003).

La topoisomerasa IV fue descrita en 1990 (Kato y cols., 1990). Es un tetrámero  $C_2D_2$  y es codificada por los genes *parC* y *parE* (*griA* y *griB* en *Staphylococcus aureus* respectivamente). Las subunidades C y E son homólogas a las subunidades A y B de la topoisomerasa II respectivamente. Es la principal decatenasa bacteriana. Como resultado de esta propiedad sus funciones fisiológicas son la separación de las cadenas de ADN- hijas posteriores a la replicación, además de separar catenenos y nudos resultantes de procesos de recombinación (Adams y cols., 1992; Levine y cols., 1998).

Basándose en la homología de aminoácidos con los genes de las topoisomerasas de *Escherichia coli*, se han identificado 3 topoisomerasas distintas en *Mycoplasma genitalium* (Hooper, 1998) y en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, están identificadas las topoisomerasas I, II y IV (Westberg y cols., 2004).

#### **I.2.3.3.2- Mecanismo de acción de las quinolonas**

Para alcanzar sus dianas las fluoroquinolonas necesitan cruzar la membrana citoplasmática y, en gramnegativas, la membrana externa (Hooper, 2001). Así, penetran en el interior de la célula por medio de mecanismos de difusión pasiva a través de las porinas o de la capa de lipopolisacáridos en un proceso determinado por su potencial

Donan, pH y tamaño (Nikaido y Thanassi, 1993). Aunque la hidrofobicidad sea igual de importante en grampositivos y gramnegativos, el peso molecular solamente es importante en organismos gramnegativos debido a la presencia de la membrana externa (Bazile y cols., 1992).

Alteraciones mutacionales de la estructura de la membrana de polisacárido afectan de modo significativo la permeabilidad de la membrana a las quinolonas hidrofóbicas como el ácido nalidíxico pero no la permeabilidad de las hidrofílicas (Hirai y cols., 1986), aunque se piense que otros factores tales como diferencias en la estructura basal también puedan interferir con la entrada de las quinolonas en la célula (Mitsuyama y cols., 1992; Takenouchi y cols., 1996).

Las quinolonas interactúan con los complejos que se forman entre el ADN y las topoisomerasas II y IV, creando alteraciones conformacionales que resultan en la inhibición de la actividad enzimática normal. La enzima se queda atrapada en el complejo droga-enzima-ADN, inhibiendo la replicación del ADN puesto que se desarrolla una barrera física que impide el movimiento de la horquilla de replicación, ARN polimerasa y ADN helicasa (Hooper, 2001).

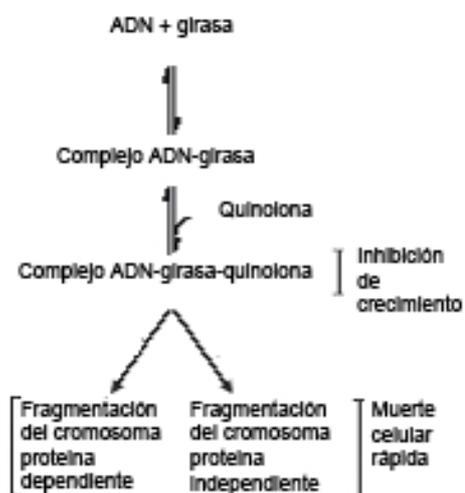
Los análisis de valores de CMI en aislados clínicos resistentes y estudios directos de la acción inhibitoria de las quinolonas sobre las topoisomerasas han demostrado que en especies gramnegativas la diana principal de las quinolonas es la topoisomerasa II mientras que en las grampositivas es esencialmente la IV, aunque haya excepciones (Hoshino y cols., 1994; Khodursky y cols., 1995; Hawkey, 2003). En micoplasmas la diana principal de la mayoría de las quinolonas es la topoisomerasa IV, aunque según la quinolona y la especie pueda ser la topoisomerasa II (Bébéar y cols., 1998; Kenny y cols., 1999; Gruson y cols., 2005).

La inhibición del complejo droga-topoisomerasa II-ADN y consecuente muerte celular es rápida, indicando actividad de la enzima por delante de la horquilla de replicación, mientras la inhibición del complejo droga-topoisomerasa IV-ADN es lenta y

consistente con una posición enzimática por detrás de la horquilla de replicación y una actuación más tardía en el ciclo de replicación (Khodursky y Cozzarelli, 1998; Hawkey, 2003).

La formación de estos complejos inhibe reversiblemente el ADN y el crecimiento celular además de inducir la respuesta SOS y se supone que sea el mecanismo responsable de la acción bacteriostática de las quinolonas. La acción letal necesita por lo menos dos pasos, siendo el primero de ellos la formación de los complejos bacteriostáticos anteriormente mencionados. Para ejercer su actividad bactericida son necesarias concentraciones superiores a las bacteriostáticas y algunas quinolonas inhiben mejor el crecimiento que otras pero son menos eficaces en el efecto bactericida (Zhao y cols., 1997; Hawkey 2003; Higgins y cols., 2003; Malik y cols., 2006).

Se piensa que la muerte celular resulta de la liberación de los extremos de ADN del complejo droga-enzima-ADN con inducción de la apoptosis (Chen y cols., 1996; Drlica, 1999; Hawkey 2003) aunque este mecanismo sea mal comprendido y sean varias las teorías (Malik y cols., 2006). La Figura I.6. representa esquemáticamente varios de los pasos de la acción de las quinolonas.



**Figura I.6.-** Representación esquemática de varios de los pasos de la acción de las quinolonas (Malik y cols., 2006).

Se han sugerido mecanismos de acción bactericida basados en el periodo del ciclo celular de la célula bacteriana y la síntesis de ARN y de proteína o su ausencia (Howard y cols., 1993a):

- Mecanismo A- se cree que es común a todas las quinolonas, requiere la síntesis de ARN/proteína y es activo frente a células en replicación. Es inhibido por agentes inhibidores de la síntesis proteica o de ARN como son el cloranfenicol, la rifampicina o las cumarinas (Howard y cols., 1993b). Algunas quinolonas de primera generación como los ácidos nalidíxico y oxolínico bloquean la síntesis de ADN pero son incapaces de matar las células en ausencia de síntesis proteica. La utilización de cloranfenicol, bloquea la acción letal de estas quinolonas (Chen y cols., 1996; Malik y cols., 2006).
- Mecanismo B- ocurre a altas concentraciones del agente y actúa frente a células que no estén en crecimiento o que no presenten síntesis proteica o de ARN; no es inhibido por agentes que inhiban la síntesis proteica (Howard y cols., 1993a; Howard y cols., 1993b). El cloranfenicol apenas tiene efecto sobre la acción letal del ciprofloxacino. Esto implica que un factor proteico estaría involucrado en la liberación de los extremos libres del ADN de los complejos droga-enzima-ADN y que algunas drogas poseerían un mecanismo de acción adicional refractario al cloranfenicol. Poco se sabe sobre este factor proteico y se ha sugerido que el modo de acción refractario al cloranfenicol puede resultar de la estimulación de la disociación enzimática (Lewin y cols., 1991a; Chen y cols., 1996; Hawkey 2003).
- Mecanismo C- actúa en células que no estén en replicación pero necesita síntesis de proteína o ARN. Es inhibida por inhibidores de la síntesis de proteína/ARN (Howard y cols., 1993b).

Más recientemente, un dímero de quinolonas fue descrito como capaz de bloquear el crecimiento de micobacterias sin matar a las células (Malik y cols., 2005).

Otro efecto interesante en el mecanismo de acción de las quinolonas es el llamado “efecto paradójico”. Este es reflejo de una actividad bactericida bifásica; a concentraciones superiores a la CMI la letalidad de las quinolonas sube hasta lo que se llama la concentración óptima bactericida, punto a partir del cual antagonizan su propia acción y la actividad disminuye. (Crumplin y Smith, 1975; Piddock y cols., 1990; Lewin y cols., 1991b).

El oxígeno parece también ser esencial para que las quinolonas ejerzan una actividad bactericida (Lewin y cols., 1991b)

#### **I.2.3.4- Mecanismos de resistencia bacterianos frente a las quinolonas**

Existen varios mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas, pudiendo coexistir varios en una misma cepa e interactuar de forma sinérgica, incrementando significativamente los niveles de resistencia. Las mutaciones en los cromosomas que codifican las topoisomerasas bacterianas II y IV, incremento en la impermeabilidad de la pared bacteriana por alteraciones en la expresión de proteínas de la membrana externa (porinas), excreción activa del antimicrobiano por sobre-expresión de sistemas de expulsión y resistencia mediada por plásmidos están descritos como los principales mecanismos de resistencia.

La tabla I.4. resume los mecanismos de resistencia descritos en microorganismos grampositivos, gramnegativos y en micoplasmas.

	Mutaciones en las topoisomerasas	Alteraciones en la permeabilidad	Mecanismos de expulsión activa	Plásmidos
<b>Grampositivos</b>	+	-	+	-
<b>Gramnegativos</b>	+	+	+	+
<b>Micoplasmas</b>	+	-	+	ND

**Tabla I.4.-** Resumen de los mecanismos de resistencia a las quinolonas descritos en microorganismos grampositivos, gramnegativos y micoplasmas. (+) descrito, (-) no descrito, (ND) no determinado.

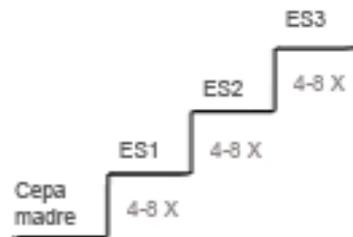
#### I.2.3.4.1.- Alteración de diana

El mecanismo más importante de resistencia a las quinolonas es la alteración de su diana. Este tipo de resistencia es muy estable y se disemina de una forma muy fácil (Van Bambeke y cols., 2005). Las dos topoisomerasas involucradas en la síntesis de ADN, la topoisomerasa II o ADN girasa y la topoisomerasa IV, han sido identificadas como diana principal de las quinolonas (Drlca y cols., 1997; Sanders, 2001).

Las mutaciones en los genes que codifican las topoisomerasas implican cambios en aminoácidos en dominios específicos, las regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDR- quinolone resistance-determining region), aunque ocasionalmente se relacionan mutaciones que salen de estos dominios y están asociadas a incrementos en la resistencia (Friedman y cols, 2001). Estas mutaciones resultan de errores espontáneos en la transcripción durante la replicación del cromosoma y suelen ocurrir con una frecuencia de una en cada  $10^6$ - $10^9$  células (Sanders, 2001). Estos cambios alteran la estructura del punto de ligación de las quinolonas en el complejo girasa-ADN llevando a una disminución de la afinidad de la quinolona por dicho punto (16 seimc, Wilmott y Maxwell, 1993; Hooper, 1999).

La resistencia fenotípica surge bajo forma de escalones como resultado del acumulo de mutaciones espontáneas, con aumentos en la CMI específicos de cada posición (Figura I.7.). La primera mutación, o de primer escalón, suele ocurrir en la diana principal de la quinolona. Aunque en bacterias gramnegativas la diana principal es la topoisomerasa II y las mutaciones en *gyrA* son el mecanismo más común de resistencia (Vila y cols., 1994), en las grampositivas y micoplasmas este mecanismo es más complejo, puesto que depende no solamente de la especie bacteriana sino también del agente antimicrobiano en cuestión. En bacterias grampositivas la diana principal de la mayoría de las quinolonas tales como el ciprofloxacino, norfloxacino, y levofloxacino suele ser la subunidad C y las mutaciones son más frecuentes en *parC*. Quinolonas como el esparfloxacino, gatifloxacino y nadifloxacino tienen como diana principal la subunidad A, sendo las mutaciones en *gyrA* las más frecuentes (Drlica y Zhao, 1997; Pan y Fisher., 1997; Fukuda y Hiramatsu, 1999; Fournier y cols., 2000; Takei y cols., 2001). Quinolonas como el clinafloxacino y moxifloxacino pueden tener afinidades iguales por cualquiera de las topoisomerasas (Pan y Fisher, 1998; Takei y cols, 2001). En micoplasmas la mayoría de las quinolonas como el ciprofloxacino, ofloxacino y pefloxacino actúan sobre la subunidad C (Kenny y cols., 1999; Gushchin y cols., 1999; Gruson y cols., 2005). La subunidad A es la diana principal de quinolonas como el moxifloxacino mientras el gemifloxacino actúa igualmente sobre las dos topoisomerasas (Gruson y cols., 2005). Quinolonas como el enrofloxacino, levofloxacino e esparfloxacino cambian su diana principal según la especie en cuestión (Gushchin y cols., 1999; Reinhardt y cols., 2002a; Hirose y cols., 2004; Gruson y cols., 2005). Las mutaciones de segundo escalón en grampositivos, gramnegativos o micoplasmas pueden ocurrir en las dianas enzimáticas secundarias *gyrB* y *par-E* (*griB* en estafilococos), aunque con menos frecuencia, conllevando un incremento aún mayor en la resistencia bacteriana (Vila y cols., 1996; Sanders, 2001; Gillespie y cols., 2002). Mutaciones posteriores pueden ocurrir en cualquiera de las enzimas (Hooper, 2001).

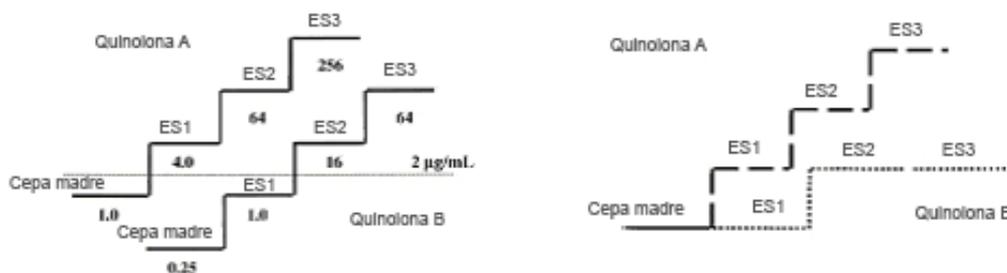
Mutaciones en las dianas secundarias sin que hayan mutaciones en la diana primaria no suele implicar un incremento en la resistencia, aunque estén descritas excepciones (Hooper, 2001).



**Figura I.7.-** Evolución escalonada de la resistencia a una quinolona a lo largo del tiempo. Cada escalón representa una mutación espontánea que disminuye la susceptibilidad a la quinolona (Sanders, 2001).

El efecto particular de cada una de las mutaciones en los genes de las topoisomerasas en el fenotipo de resistencia puede variar con la especie bacteriana (Blanche y cols., 1996) pero también con el gen implicado y la quinolona utilizada (Sanders, 2001; Van Bambeke y cols., 2005). Si bien en algunos casos mutaciones en la diana principal pueda ser suficiente para la adquisición de una resistencia detectable, no siempre es así. Aunque el impacto de las mutaciones de segundo escalón en las dianas secundarias puedan en general tener menos impacto en el fenotipo de resistencia, incrementan más el nivel de resistencia (Van Bambeke y cols., 2005). Estas variaciones no afectan de igual modo el nivel de resistencia a todas las quinolonas, que puede variar. Pueden ocurrir mecanismos de resistencia cruzada o de resistencia disociada (Figura I.8.). La resistencia cruzada significa que la disminución de la sensibilidad a un agente antimicrobiano en una clase implica la disminución en paralelo de la sensibilidad a otros agentes de la misma clase. Se ha evidenciado que no todas las quinolonas son afectadas del mismo modo por las mutaciones responsables por resistencia. Diferencias en las dianas principales pueden afectar la resistencia a una quinolona pero no a otras. Por ejemplo, en *Streptococcus pneumoniae* la diana principal del ciprofloxacino es la topoisomerasa IV, mientras el esparfloxacino afecta sobre todo a la topoisomerasa II; la

resistencia al ciprofloxacino no lleva apareada la resistencia concomitante al esparfloxacino y viceversa. Este patrón de resistencia se denomina de resistencia disociada. (Thomson, 2000; Sanders, 2001).



**Figura I.8.-** A la izquierda ejemplo de la evolución de la resistencia cruzada a dos quinolonas (A y B). A la derecha evolución de la resistencia disociada a dos quinolonas (A y B) (Sanders, 2001).

#### I.2.3.4.2.- Sistemas de expulsión activa como mecanismo de resistencia a quinolonas

Otro mecanismo de resistencia común a especies grampositivas, gramnegativas y micoplasmas son los sistemas de expulsión activa, aunque más complejos en las segundas por las características estructurales de la pared celular (Poole, 2000a; Poole, 2000b; Raheison y cols., 2002; Kumar y Schweizer, 2005).

Los sistemas de expulsión activa son ubicuos, y probablemente esenciales para la fisiología general bacteriana. Estos sistemas de expulsión activa pueden ser codificados por genes cromosomales o por genes asociados a elementos móviles que pueden ser activados por señales medioambientales o por mutaciones en los genes reguladores (Levy, 2002). Cuando esos genes se expresan constitutivamente son probablemente responsables de muchos casos de resistencia intrínseca. La expresión de las bombas de

expulsión activa es responsable de niveles bajos-moderados de resistencia a quinolonas que al combinarse con mutaciones en las topoisomerasas dan lugar a altos niveles de resistencia (Kumar y Schweizer, 2005; Van Bambeke y cols, 2005).

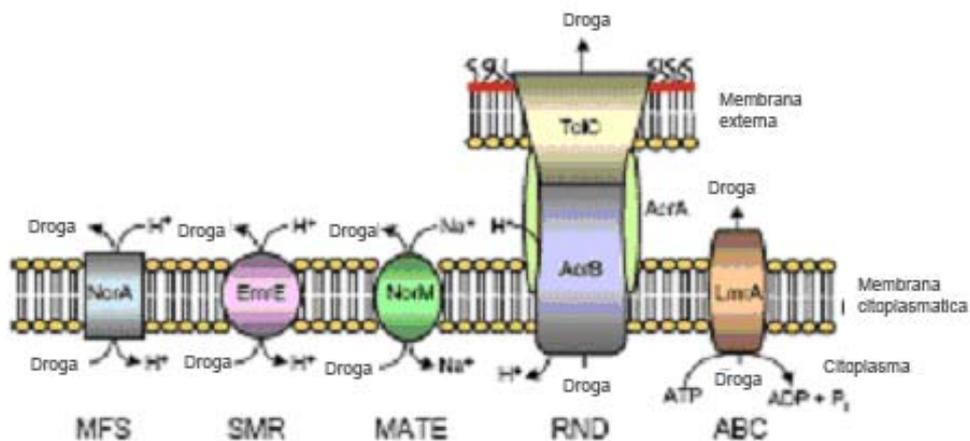
La expulsión activa es responsable de bajos niveles de resistencia, pudiendo actuar como un primer paso en la selección de resistencias; su ausencia puede hacer más difícil la selección de cepas resistentes (Ricci y cols., 2006). En algunos casos los sistemas de expulsión activa pueden por si mismos ser responsables de niveles de resistencia clínicamente relevantes (Van Bambeke y cols, 2005). Un factor importante a tener en cuenta es que estos sistemas de expulsión activa permiten la supervivencia bacteriana en la presencia de concentraciones sub-óptimas de antimicrobianos (Lomovskaya y cols., 1999).

En bacterias gramnegativas los sistemas de expulsión activa responsables de resistencia a las quinolonas poseen una gran variedad de sustratos mientras en grampositivos solamente confieren resistencia a las quinolonas (Poole, 2000a; Poole, 2000b).

Los sistemas de expulsión activa pueden transportar una amplia variedad de sustratos incluyendo antimicrobianos no relacionados estructuralmente, como las quinolonas/fluoroquinolonas, betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, anfenicoles, tetraciclinas, colorantes, detergentes y/o solventes orgánicos. Esta excreción se hace de un modo dependiente de energía pero no implica alteración/degradación del sustrato. (Neifakh y cols., 1993; Alekshun y Levy, 1997; Van Bambeke y cols., 2003).

Los sistemas de expulsión activa se agrupan actualmente en cinco familias cada una con sus características propias (Poole, 2000a; Kumar y Schweizer, 2005):

- MFS (major facilitator superfamily)
- ABC (adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette)
- SMR (small multidrug resistance)
- RND (resistance-nodulation-cell division)
- MATE (multidrug and toxic compound extrusion)



**Figura I.9.-** Ejemplo esquemático de varias familias de sistemas de expulsión activa (Kumar y Schweizer, 2005).

Se pueden agrupar estas familias según el modo de obtención de energía. Las familias MFS, SMR, MATE y RND obtienen su energía por medio de un gradiente protónico ( $\Delta pH$ ), mientras las ABC lo obtienen por hidrólisis del ATP.

Ejemplos de sistemas de expulsión activa responsables de resistencia intrínseca y adquirida a las quinolonas son MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN entre otros en *Pseudomonas aeruginosa*, AcrAB, AcrEF, AcrD, MacAB, EmrAB y MdfA en *Escherichia*

*coli* (Ruiz, 2003; Li, 2005), Blt, BmrA y Bmr3 en *Bacillus subtilis* y NorA y los otros descritos en *Staphylococcus aureus* (Yoshida y cols., 1990; Ruiz, 2003). La inactivación/inhibición de dichos sistemas lleva a un incremento en la susceptibilidad microbiana a las quinolonas y otros antimicrobianos (Lomovskaya y cols., 1999; Ricci y cols., 2004).

No todas las quinolonas se ven afectadas de igual modo por un determinado sistema de expulsión activa, puesto que factores como la hidrofobicidad pueden estar relacionados con la eficiencia del mismo (Yoshida y cols., 1990; Takenouchi y cols., 1996) así como la afinidad por sustrato de la propia bomba.

#### **I.2.3.4.3.- Alteraciones de permeabilidad de la membrana externa**

Un mecanismo de resistencia propio de las bacterias gramnegativas, por sus propiedades estructurales, son las alteraciones de permeabilidad de la membrana externa bacteriana que previenen/ disminuyen la entrada del antimicrobiano en la célula. Este tipo de resistencia es inducible y permite una supervivencia inmediata (Van Bambeke y cols., 2005). Todas las quinolonas pueden cruzar la membrana externa a través de las porinas, pero solamente las más hidrofóbicas pueden atravesar la capa lipídica (Hirai y cols., 1986; Chapman y Georgopapadakou, 1988).

Las alteraciones en la expresión de porinas, sobretodo de OmpF (Mascaretti, refs, 63-64 bambeke Taléns-Visconti y cols., 2002) o mutaciones suponen una disminución en la entrada de la quinolona dentro de la célula, aunque otros antimicrobianos y sustancias puedan ser afectadas (Sanders y cols., 1984; Putman y cols., 2000).

Las porinas son proteínas presentes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y funcionan como cribas moleculares, en base al tamaño de la molécula, carga iónica y hidrofobicidad (Hancock., 1987). La ausencia o disminución de la expresión de OmpF en cepas mutantes de *Escherichia coli* está relacionada con una

disminución de la sensibilidad a algunas quinolonas pero otras como tosufloxacino y esparfloxacino no son afectadas (Hirai y cols., 1986; Mitsuyama y cols., 1992) y puede implicar resistencia cruzada a otros agentes antimicrobianos (Cohen y cols., 1989). La porina OmpC en *Escherichia coli* y las Ompk35 y Ompk36 en *Klebsiella pneumoniae*, homologas de OmpF y OmpC han sido también descritas como implicadas en la resistencia a quinolonas (Chen y Lo, 2003)

Estos mecanismos de resistencia son generalmente de bajo nivel puesto que la entrada del antimicrobiano no es evitada completamente; por ello, la resistencia clínicamente objetivable suele ser el resultado de la combinación de defectos en la permeabilidad sumado a otros mecanismos de resistencia (Van Bambeke y cols., 2005).

#### **I.2.3.4.4.- Plásmidos responsables de resistencia a quinolonas**

Aunque en 1990 ya se sugería que la resistencia a fluoroquinolonas podría estar mediada por plásmidos (Courvalin, 1990) y a pesar de una descripción en 1987 en *Shigella dysenteriae* (Munshi y cols., 1987), no fue hasta 1998 que se produjo la confirmación de la existencia de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos en *Klebsiella pneumoniae* (Martínez-Martínez y cols., 1998) y posteriormente en *Escherichia coli* (Wang y cols., 2003) y otras bacterias gramnegativas (Li, 2005).

El plásmido codifica un determinante de las familias *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*. Estos codifican proteínas que bloquean la acción de las quinolonas sobre la ADN girasa y la topoisomerasa IV al ligarse a topoisomerasas, impidiendo la formación del complejo topoisomerasa-quinolona (Tran y Jacoby, 2002; Nordmann y Poirel, 2005; Tran y cols., 2005a; Tran y cols., 2005b). La variabilidad dentro de los genes *qnr* ha sido descrita, lo que puede ser responsable porque muchos aislados conteniendo plásmidos codificando estos genes puedan pasar desapercibidos (Robicsek y cols., 2006). Otros genes codificados en plásmidos también han sido descritos como capaces de interferir con la susceptibilidad a las quinolonas. El gen *mcbABCDEFGF* asociado a un plásmido ha sido responsable de disminuciones de dos veces en la susceptibilidad al esparfloxacino

(Lomovskaya y cols., 1996). Una proteína descrita en *Mycobacterium smegmatis* fue descrita como responsable de incrementos entre cuatro y ocho veces de la CMI del esparfloxacino (Montero y cols., 2001).

El gen *qnrA* es capaz de producir incrementos de 8 a 32 veces en la CMI de diversas quinolonas (Martínez-Martínez y cols., 1998). Este aumento es insuficiente por si mismo de aumentar las CMIs de las enterobacterias a valores considerados de resistencia (Robicsek y cols., 2005). No obstante este incremento permite la supervivencia de las células a niveles de quinolonas más elevados, facilitando así la selección de mutaciones que puedan aumentar aún más los valores de CMI (Martínez-Martínez y cols., 1998), en un proceso semejante al desarrollado por los mecanismos de expulsión activa. Aparentemente, este gen no es responsable de inducir hipermutabilidad, pero su presencia ha sido asociada a cambios en la tasa de mutación de  $<2,9 \times 10^{-9}$  para  $3,4 \times 10^{-7}$  (Robicsek y cols., 2005). El nivel de resistencia alcanzado es determinado por los niveles de expresión de *qnrA* y no por el número de copias del plásmido presentes en la célula. Los niveles de expresión están correlacionados con la concentración de quinolona en el medio, alcanzando su valor máximo a  $0,4 \times$  la CMI (Rodríguez-Martínez y cols., 2006). El hecho de que los incrementos observados en los valores de CMI de las quinolonas no sean suficientes para clasificarlos como resistentes y que no haya ningún marcador fenotípico para permitir la identificación de estos genes, puede ser responsable por su aparente baja prevalencia (Rodríguez-Martínez y cols., 2003).

Puesto que los incrementos en las CMIs de las quinolonas de los que son responsables no son clínicamente importantes, su relevancia clínica parece derivada de su capacidad de potenciar la resistencia debido a mutaciones en las topoisomerasas o a cambios en la expresión de porinas y sistemas de expulsión activa. Además, permiten la selección de mutaciones cromosomales en concentraciones de quinolonas que en una situación normal serían letales (Tran y Jacoby, 2002; Jacoby y cols., 2003; Martínez-Martínez y cols., 2003; Rodríguez-Martínez y cols., 2006).

La presencia de plásmidos que codifican estos determinantes ha sido asociada a cepas productoras de beta lactamasas de amplio espectro (Rodríguez-Martínez y cols., 2003; Nordmann y Poirel, 2005) y cefalosporinasas (Nordmann y Poirel, 2005). Más recientemente se ha descrito la asociación de *qnrB* a plásmidos que también codificaban betalactamasas (Jacoby y cols., 2006)

#### **I.2.3.4.5.- Fenotipo MAR (Múltiple Resistencia a Antimicrobianos) o MDR (Múltiple Resistencia a Drogas)**

Se podría definir como el resultado de una combinación de mecanismos y reacciones por parte de la célula bacteriana que tiene como consecuencia la disminución de susceptibilidad a múltiples antimicrobianos (Randall y Woodward, 2002), como el cloranfenicol, cefalosporinas, quinolonas, penicilinas, rifampina y tetraciclinas (Cohen y cols., 1989; George y Levy 1983), a desinfectantes como el aceite de pino (Moken y cols., 1997) y triclosan (McMurry y cols., 1998), a solventes orgánicos como el ciclohexano (Asako y cols., 1997) y a agentes que impliquen estrés oxidativo (Greenber y cols., 1991) puede verse disminuida. Este tipo de fenotipo ha sido ampliamente descrito en la especie *Escherichia coli*, en ella algunos loci cromosomales tales como *marRAB*, *soxRS* y *rob* controlan la expresión de múltiples genes, de manera que son capaces de desatar en la célula bacteriana cambios *que* influyen en los niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos (Randall y Woodward, 2002). Los cambios inducidos por tales sistemas implican el incremento de la expulsión activa merced a la expresión de la bomba protón dependiente AcrAB-TolC así como la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana por la represión de la expresión de la porina F (Ariza y cols., 1995).

Los antimicrobianos como el cloranfenicol o las tetraciclinas u otras sustancias como el salicilato, el benzoato de sodio o el diazepam pueden inducir la expresión de MarA, llevando a la disminución de la expresión de la porina OmpF o alterando los niveles de expresión de sistemas de expulsión activa tales como AcrAB (Tavío y cols.,

2004), en una cadena de procesos que puede alterar la expresión de más de 60 genes (Barbosa y Levy, 2000).

Aunque las resistencias adquiridas por la activación de estos sistemas reguladores como *marRAB*, *soxRS* o *rob* no sean suficientes por si mismos para implicar resistencia clínica a la mayoría de los antimicrobianos, pueden servir como un escalón para resistencias más importantes (Aleksun y Levy, 1997; Randall y Woodward, 2000).

#### **I.2.3.4.6- Otros mecanismos**

Otros mecanismos menos comunes y comprendidos han sido descritos. Un gen de reparación, *recG* en *Staphylococcus aureus*, ha demostrado conferir un bajo nivel de resistencia a las quinolonas (Niga y cols., 1997) y más recientemente una disminución en la expresión de la topoisomerasa IV en un mutante de *Staphylococcus aureus* desarrollado *in vitro* ha sido referida como inductora de resistencia de bajo nivel a quinolonas (Ince y Hooper, 2003).

### Bibliografía

**Aarestrup, F.M., Friis, N.F.**, 1998. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyosynoviae* isolated from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. Vet. Microbiol. **61(1-2)**:33-9.

**Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B., Cozzarelli, N.R.**, 1992. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. Cell. **71(2)**:277-88.

**Adehan, R.K., Ajuwape, A.T.P., Adetosoye, A.I., Alaka, O.O.**, 2006. Characterization of Mycoplasmas isolated from pneumonic lungs of sheep and goats. Small Ruminant Research. **63(1-2)**:44-49

**Adler, H.E., DaMassa, A.J., Brooks, D.L.**, 1980. Caprine mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats. Am. J. Vet. Res. **41(10)**:1677-9.

**Al-Momani, W., Halablab, M.A., Abo-Shehada, M.N., Miles, K., McAuliffe, L., Nicholas, R.A.J.**, 2006a. Isolation and molecular identification of small ruminant mycoplasmas in Jordan. Small Rum. Res. **65**:106-12

**Al-Momani, W., Nicholas, R.A.J., Janakat, S., Abu-Basha. E., Ayling, R.D.**, 2006b. The in vitro effect of six antimicrobials against *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* isolated from sheep and goats in Jordan. Trop. Anim. Health Pro. **38(1)**:1-7

**Alekshun, M.N., Levy S.B.**, 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. Antimicrob. Agents Chemother. **41**: 2067-2075.

**Alós, J.I.**, 2003. Quinolonas. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **21(5)**:261-7

**Anderson, V.E., Osheroff, N.**, 2001. Type II topoisomerases as targets for quinolone antibacterials: turning Dr. Jekyll into Mr. Hyde. *Curr Pharm Des.* **7(5)**:337-53.

**Andersson, M.I., MacGowan, A.P.**, 2003. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 1**:1-11.

**Antunes, N.T., Tavío, M.M., Assunção, P., Rosales, R.S., Poveda, C., de la Fé, C., Gil, M.C., Poveda, J.B.**, 2007a. *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. J.* *In prensa*.

**Antunes, N.T., Tavío, M.M., Mercier, P., Ayling, R.D., Al-Momani, W., Assunção, O., Rosales, R.S., Poveda, J.B.**, 2007b. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma putrefaciens* field isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *In prensa*.

**Appelbaum, P.C., Hunter, P.A.**, 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **16(1)**:5-15.

**Appelbaum, P.C.**, 1999. Quinolone activity against anaerobes. *Drugs.* **58 Suppl 2**:60-4.

**Ariza, R.R., Li, Z., Ringstad, N., Demple, B.**, 1995. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. *J. Bacteriol.* **177(7)**:1655-61.

**Asako, H., Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Aono, R.**, 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(4)**:1428-33.

**Assunção, P., De la Fé, C., Ramírez, A.S., Andrada, M., Poveda, J.B.**, 2004. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. *Vet. Rec.* **154(22)**:684-7.

**Atalaia, V., Brandão, E., Machado, M., 1986.** Patologia dos pequenos ruminantes: Agalaxia contagiosa em Portugal. Rep. Trab. LNIV, **18**:11-20

**Ayling, R.D., Al-Momani, W., Bisgaard-Frantzen, S., Lawes, J.R., Bashiruddin, S.E., McAuliffe, L., Nicholas, R.A.J., 2006.** Minimum Inhibition Concentrations of Several Mycoplasma Species Isolated from Ruminant Hosts Indicate Variability in Effectiveness and Resistance to Antimicrobials. 16<sup>th</sup> Congress of the International Organization for Mycoplasma, Cambridge, U.K.

**Ayling, R.D., Bashiruddin, S.E., Nicholas, R.A., 2004.** Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. Vet. Rec. **155(14)**:413-6.

**Ayling, R.D., Baker, S.E., Nicholas, R.A., Peek, M.L., Simon, A.J., 2000a.** Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. Vet Rec. **146(9)**:243-6.

**Ayling, R.D., Baker, S.E., Peek, M.L., Simon, A.J., Nicholas, R.A., 2000b.** Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. Vet Rec. **146(26)**:745-7.

**Bájmoc, E., Turcsányi, I., Bölske, G., Bacsadi, Á., Kiss, I., 2000.** Disease caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* LC in Hungarian goat herds. Acta Vet. Hung. **48(3)**:277-83.

**Ball, P., 2000.** Quinolone generations: natural history or natural selection? J. Antimicrob. Chemother. **46 Suppl T1**:17-24.

**Ball, H.J., Reilly, G.A.C., Bryson, D., 1995.** Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains isolated in Northern Ireland. Ir. Vet. J. **48**:316-8

**Bar-Moshe, B., Rapoport, E., Brenner, J.,** 1984. Vaccination trials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony-type) infection in goats. *Isr. J. Med. Sci.* **20(10)**:972-4.

**Barbosa, T.M., Levy, S.B.,** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J. Bacteriol.* **182(12)**:3467-74.

**Bashiruddin, J.B., Frey, J., Königsson, M.H., Johansson, K.E., Hotzel, H., Diller, R., de Santis, P., Botelho, A., Ayling, R.D., Nicholas, R.A., Thiaucourt, F., Sachse, K.,** 2005. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *Vet. J.* **169(2)**:268-75.

**Bashiruddin, J.B., Taylor, T.K., Gould, A.R.,** 1994. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6(4)**:428-34.

**Bazile, S., Moreau, N., Bouzard, D., Essiz, M.,** 1992. Relationships among antibacterial activity, inhibition of DNA gyrase, and intracellular accumulation of 11 fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(12)**:2622-7.

**Bébéar, C.M., Pereyre, S.,** 2005. Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **5(3)**:263-71.

**Bébéar, C.M., Renaudin, H., Charron, A., Bové, J.M., Bébéar, C., Renaudin, J.,** 1998. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(9)**:2304-11.

**Bébéar, C.M., Bové, J.M., Bébéar, C., Renaudin, J.,** 1997. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(2)**:269-73.

**Bébéar, C.**, 1996. Introductory remarks, p 181-183, vol. II. *In* Tully J.G. & Razin, S (Eds). Molecular diagnostic procedures in mycoplasmaology. Academic Press, Inc., San Diego.

**Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F.**, 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech.* **16(3)**:848-73.

**Blanchard, A., Crabb, D.M., Dybvig, K., Duffy, L.B., Cassell, G.H.**, 1992. Rapid detection of tetM in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: tetM confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. *FEMS Microbiol Lett.* **74(2-3)**:277-81.

**Blanche, F., Cameron, B., Bernard, F.X., Maton, L., Manse, B., Ferrero, L., Ratet, N., Lecoq, C., Goniot, A., Bisch, D., Crouzet, J.**, 1996. Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(12)**:2714-20.

**Blikslager, A.T., Anderson, K.L.**, 1992. *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* as the cause of a subauricular abscess and mastitis in a goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **201(9)**:1404-6.

**Brandão, E.**, 1995. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC strains in sheep and goats. *Vet. Rec.* **136(4)**:98-9.

**Buonavoglia, D., Fasanella, A., Greco, G., Pratelli, A.**, 1999. A study of an experimental infection of sheep with *Mycoplasma agalactiae*. *New Microbiol.* **22(1)**:27-30.

**Cerdá, R.O., Giacoboni, G.I., Xavier, J.A., Sansalone, P.L., Landoni, M.F.**, 2002. In vitro antibiotic susceptibility of field isolates of *Mycoplasma synoviae* in Argentina. *Avian Dis.* **46(1)**:215-8.

**Chapman, J.S., Georgopapadakou, N.H.**, 1998. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32(4)**:438-42.

**Chávez González, Y.R., Ros Bascuñana, C., Bölske, G., Mattsson, J.G., Fernández Molina, C., Johansson, K.E.**, 1995. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.* **47(1-2)**:183-90.

**Chen, F.J., Lo, H.J.**, 2003. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **36(1)**:1-9.

**Chen, C.R., Malik, M., Snyder, M., Drlica, K.**, 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* **258(4)**:627-37.

**Chu, D.T., Fernandes, P.B.**, 1989. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33(2)**:131-5.

**Cohen, S.P., McMurry, L.M., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Levy, S.B.**, 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33(8)**:1318-25.

**Cokrevski, S., Crcev, D., Loria, G.R., Nicholas, R.A.**, 2001. Outbreaks of contagious agalactia in small ruminants in the Republic of Macedonia. *Vet. Rec.* **148(21)**:667.

**Cottew, G.S., Breard, A., DaMassa, A.J., Erno, H., Leach, R.H., Lefevre, P.C., Rodwell, A.W., Smith, G.R.**, 1987. Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr. J. Med. Sci.* **23(6)**:632-5.

**Cottew, G.S., Yeats, F.R.**, 1982. Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. Aust. Vet. J. **59(3)**:77-81.

**Cottew, G.S., Yeats, F.R.**, 1981. Occurrence of mycoplasmas in clinically normal goats. Aust. Vet. J. **57(1)**:52-3.

**Cottew, G.S., Yeats, F.R.**, 1978. Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. Aust. Vet. J. **54(6)**:293-6.

**Courvalin, P.**, 1990. Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? Antimicrob. Agents Chemother. **34(5)**:681-4.

**Crumplin, G.C., Smith, J.T.**, 1975. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. Antimicrob Agents Chemother. **8(3)**:251-61.

**DaMassa, A.J.**, 1996. Mycoplasma infections of goats and sheep, p 265-273, vol. II. In Tully J.G. & Razin, S (Eds). Molecular diagnostic procedures in mycoplasmaology. Academic Press, Inc., San Diego.

**DaMassa, A.J., Wakenell, P.S., Brooks, D.L.**, 1992. Mycoplasmas of goats and sheep. J. Vet. Diagn. Invest. **4(1)**:101-13.

**Da Massa A.J., Brooks, D.L.**, 1991. The external ear canal of goats and other animals as a mycoplasma habitat. Small. Rum. Res. **4**:85-93.

**DaMassa, A.J., Holmberg, C.A., Brooks, D.L.**, 1987b. Comparison of caprine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, and *Mycoplasma putrefaciens*. Isr. J. Med. Sci. **23(6)**:636-40.

**DaMassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., Moe, A.I., 1987a.** Caprine mycoplasmosis: an outbreak of mastitis and arthritis requiring the destruction of 700 goats. *Vet. Rec.* **120**:409-13.

**DaMassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., 1984.** Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Isr. J. Med. Sci.* **20(10)**:975-8.

**Dedieu, L., Mady, V., Lefevre, P.C., 1995.** Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. *FEMS Microbiol. Lett.* **129(2-3)**:243-9.

**Dedieu, L., Breard, A., Lefevre, P.C., 1992.** Development of a species-specific DNA probe for *Mycoplasma capricolum*. *Vet Microbiol.* **32(2)**:189-97.

**de la Fé ,C., Assunção, P., Saavedra, P., Tola, S., Poveda, C., Poveda, J.B., 2007b.** Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. *Vaccine.* **25(12)**:2340-5.

**De la Fé, C., Gutierrez, A., Poveda, J.B., Assunção, P., Ramirez, A.S., Fabelo, F., 2007a.** First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, one of the causal agents of caprine contagious agalactia, on the island of Lanzarote (Spain). *Vet. J.* **173(2)**:440-2.

**De la Fé, C., Assunção, P., Antunes, T., Rosales, R.S., Poveda, J.B., 2005.** Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *Vet. J.* **170(2)**:257-9.

**Dégrange, S., Gonzalez, P., Charron, A., Renaudin, H., Bébéar, C., Bébéar, C.M., 2004.** 16S rRNA mutations associated with tetracycline resistance in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*. 15th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Athens, Georgia, USA.

**DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E., Wright, A.,** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*. **31(1)**:43-51.

**Domingues, D., Távora Tavira, L., Duarte, A., Sanca, A., Prieto, E., Exposto, F.,** 2003. Genital mycoplasmas in women attending a family planning clinic in Guiné-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents. *Acta Trop*. **86(1)**:19-24.

**Drlica, K.,** 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol*. **2(5)**:504-8.

**Drlica, K., Zhao, X.,** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **61(3)**:377-92.

**Egwu, G.O., Ameh, J.A., Aliyu, M.M., Mohammed, F.D.,** 2001. Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. *Small Rumin Res*. **39(1)**:87-91.

**Emmerson, A.M., Jones, A.M.,** 2003. The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother*. **51** Suppl 1:13-20.

**Etheridge, J.R., Lloyd, L.C., Cottew, G.S.,** 1979. Resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to chlortetracycline. *Aust Vet J*. **55(1)**:40.

**Fernandez, A., Oros, J., Rodriguez, J.L., King, J., Poveda, J.B.,** 1996. Morphological evidence of a filamentous cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in goats. *Vet. Pathol*. **33(4)**:445-7.

**Fournier, B., Zhao, X., Lu, T., Drlica, K., Hooper, D.C.,** 2000. Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: different patterns of quinolone-induced inhibition of DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother*. **44(8)**:2160-5.

**Friedman, S.M., Lu, T., Drlica, K.,** 2001. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(8)**:2378-80.

**Friis, N.F.,** 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord. Vet. Med.* **27(6)**:337-9.

**Fukuda, H., Hiramatsu, K.,** 1999. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(2)**:410-2.

**Furneri, P.M., Rappazzo, G., Musumarra, M.P., Tempera, G., Roccasalva, L.S.,** 2000. Genetic basis of natural resistance to erythromycin in *Mycoplasma hominis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45(4)**:547-8.

**Gasparich, G.E., Whitcomb, R.F., Dodge, D., French, F.E., Glass, J., Williamson, D.L.,** 2004. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54(Pt 3)**:893-918.

**Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Nash, H.A.,** 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **73(11)**:3872-6.

**George, A.M., Levy, S.B.,** 1983. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.* **155(2)**:531-40.

**Gil, M.C., Peña, F.J., Hermoso De Mendoza, J., Gomez, L.,** 2003. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **50(10)**:484-7.

**Gil, M.C., Hermoso De Mendoza, M., Rey, J., Alonso, J.M., Poveda, J.B., Hermoso De Mendoza, J.**, 1999. Isolation of mycoplasmas from the external ear canal of goats affected with contagious agalactia. *Vet. J.* **158(2)**:152-4.

**Gillespie., S.H., Voelker, L.L., Dickens, A.**,2002. Evolutionary barriers to quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **8(2)**:79-84.

**Gonçalves, R., Regalla, J., Nicolet, J., Frey, J., Nicholas, R., Bashiruddin, J., de Santis, P., Gonçalves, A.P.**, 1998. Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet. Microbiol.* **63(1)**:13-28.

**Gonçalves, M.R.**, 1984. Mycoplasmoses des caprins au Portugal. In: Les maladies de la chèvre, Les colloques de L'INRA 28, 279-286, Niort (Francia), INRA Publ.

**Greco, G., Corrente, M., Martella, V., Pratelli, A., Buonavoglia, D.**, 2001. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. *Mol. Cell. Probes.* **15(1)**:21-5.

**Greenberg, J.T., Chou, J.H., Monach, P.A., Demple, B.**, 1991. Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173(14)**:4433-9.

**Gruson, D., Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.**, 2005. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(3)**:1190-3.

**Gushchin, A.E., Ladygina, V.G., Govorun, V.M.**, 1999. Role of mutations in *parC* and *gyrA* in forming resistance of *Mycoplasma hominis* to fluoroquinolones. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **4**:19-24.

**Hancock, R.E.**, 1987. Role of porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **169(3)**:929-33.

**Hawkey, P.M.**, 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 1**:29-35.

**Heldtander, M., Pettersson, B., Tully, J.G., Johansson, K.E.**, 1998. Sequences of the 16S rRNA genes and phylogeny of the goat mycoplasmas *Mycoplasma adleri*, *Mycoplasma auris*, *Mycoplasma cottewii* and *Mycoplasma yeatsii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48(1)**:263-8.

**Higgins P.G., Fluit, A.C., Schmitz, F.J.**, 2003. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Curr Drug Targets.* **4(2)**:181-90.

**Hirai, K., Aoyama, H., Irikura, T., Iyobe, S., Mitsuhashi, S.**, 1986. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **29(3)**:535-8.

**Hirose, K., Kawasaki, Y., Kotani, K., Abiko, K., Sato, H.**, 2004. Characterization of a point mutation in the *parC* gene of *Mycoplasma bovirhinis* associated with fluoroquinolone resistance. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **51(4)**:169-75.

**Hirose, K., Kobayashi, H., Ito, N., Kawasaki, Y., Zako, M., Kotani, K., Ogawa, H., Sato, H.**, 2003. Isolation of Mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* **50(7)**:347-51.

**Hooper, D.C.**, 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect. Dis.* **2(9)**:530-8.

**Hooper, D.C.**, 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **7(2)**:337-41.

**Hooper, D.C.**, 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Updat.* **2(1)**:38-55.

**Hooper, D.C.**, 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin. Infect. Dis.* **Suppl 1**:S54-63.

**Hoshino, K., Kitamura, A., Morrissey, I., Sato, K., Kato, J., Ikeda, H.**, 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(11)**:2623-7.

**Howard, B.M., Pinney, R.J., Smith, J.T.**, 1993b. 4-Quinolone bactericidal mechanisms. *Arzneimittelforschung.* **43(10)**:1125-9.

**Howard, B.M., Pinney, R.J., Smith, J.T.**, 1993a. Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* **45(7)**:658-62.

**Howard, C.J., Gourlay, R.N.**, 1978. Mycoplasmas of animals. *Sci Prog.* **65(259)**:313-29.

**Hung, A.L., Alvarado, A., Lopez, T., Perales, R., Li, O., Garcia, E.**, 1991. Detection of antibodies to mycoplasmas in South American camelids. *Res. Vet. Sci.* **51(3)**:250-3.

**Ince, D., Hooper, D.C.**, 2003. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J. Bacteriol.* **185(23)**:6883-92.

**Ito, A., Hirai, K., Inoue, M., Koga, H., Suzue, S., Irikura, T., Mitsunashi, S.**, 1980. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17(2)**:103-8.

**Jacobs, M.R.**, 1999. Activity of quinolones against mycobacteria. *Drugs*. **58 Suppl 2**:19-22.

**Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., Hooper, D.C.**, 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(4)**:1178-82.

**Jacoby, G.A., Chow, N., Waites, K.B.**, 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(2)**:559-62.

**Johansson, K.E., Tully, J. G., Bölske, G., Pettersson, B.**, 1999. *Mycoplasma cavipharyngis* and *Mycoplasma fastidiosum*, the closest relatives to *Eperythrozoon* spp and *Haemobartonella* spp. *FEMS Microbiol. Lett* **174**: 321-326.

**Johansson, K.E., Heldtander, M.U., Pettersson, B.**, 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods Mol. Biol.* **104**:145-65.

**Kapoor, P.K., Garg, D.N., Mahajan, S.K.**, 1989. Isolation of *Mycoplasma* ssp. *mycoides* (LC variant, Y-goat) from naturally aborted bovine fetuses. *Theriogenology* **32**, 683–691.

**Karamova, A.E., Polyakov, A.V., Komarova, N.V.**, 2004. Detection of mutant *Mycoplasma hominis* strains resistant to 16-membered macrolide antibiotic josamycin in clinical samples. *Bull Exp Biol Med.* **137(5)**:483-4.

**Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H.**, 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell.* **63(2)**:393-404.

**Kenny, G.E., Young, P.A., Cartwright, F.D., Sjostrom, K.E., Huang, W.M.**, 1999. Sparfloxacin selects gyrase mutations in first-step *Mycoplasma hominis* mutants,

whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(10)**:2493-6.

**Khodursky, A.B., Cozzarelli, N.R.**, 1998. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* **273(42)**:27668-77.

**Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R.**, 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92(25)**:11801-5.

**Kidanemariam, A., Gouws, J., van Vuuren, M., Gummow, B.**, 2005. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma mycoides mycoides* large colony and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from clinical cases of ulcerative balanitis and vulvitis in Dorper sheep in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **76(4)**:204-8.

**Kidwai, M., Misra, P., Kumar, R.**, 1998. The fluorinated quinolones. *Curr. Pharm. Des.* **4(2)**:101-18.

**Kinde, H., DaMassa, A.J., Wakenell, P.S., Petty, R.**, 1994. Mycoplasma infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). *J. Vet. Diagn. Invest.* **6(4)**:423-7.

**Kittelberger, R., O'Keefe, J.S., Meynell, R., Sewell, M., Rosati, S., Lambert, M., Dufour, P., Pépin, M.**, 2006. Comparison of four diagnostic tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. *N. Z. Vet. J.* **54(1)**:10-5.

**Kobayashi, H., Nakajima, H., Shimizu, Y., Eguchi, M., Hata, E., Yamamoto, K.**, 2005. Macrolides and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA. *J. Vet. Med. Sci.* **67(8)**:795-800.

**Kobayashi, H., Morozumi, T., Munthali, G., Mitani, K., Ito, N., Yamamoto, K.,** 1996b. Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. Antimicrob. Agents Chemother. **40(4)**:1030-2.

**Kobayashi, H., Munthali, G., Kaiga, M., Morozumi, T., Mitani, K., Ito, N., Shiono, H., Yamamoto, K.,** 1996a. Genetic properties of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* LC strains isolated from a goat in Japan in 1991. J. Vet. Med. Sci. **58(6)**:595-8.

**Königsson, M.H., Bölske, G., Johansson, K.E.,** 2002. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. Vet. Microbiol. **85(3)**:209-20.

**Kumar, A., Schweizer, H.P.,** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv. Drug Deliv. Rev.;**57(10)**:1486-513.

**Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V.,** 2006a. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. Antimicrob. Agents Chemother. **50(6)**:1959-66.

**Le Carrou, J., Reinhardt, A.K., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V.,** 2006b. Persistence of *Mycoplasma synoviae* in hens after two enrofloxacin treatments and detection of mutations in the parC gene. Vet Res. **37(1)**:145-54.

**Leach, R.H., Costas, M., Mitchelmore, D.L.,** 1989. Relationship between *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* ('large-colony' strains) and *M. mycoides* subsp. *capri*, as indicated by numerical analysis of one-dimensional SDS-PAGE protein patterns. J. Gen. Microbiol. **135(11)**:2993-3000.

**Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage R.P.,** 1962. 1,8-naphthyridine derivatives. a new class of chemotherapeutic agents. J. Med. Pharm. Chem. **91**:1063-5.

**Levine, C., Hiasa, H., Marians, K.J.,** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochim. Biophys. Acta. **1400(1-3)**:29-43.

**Levisohn, S., Davidson, J., Caro Vergara, M.R., Rapoport, E.,** 1991. Use of an ELISA for differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *M. mycoides* subspecies *mycoides* (LC) in naturally infected goat herds. Res. Vet. Sci. **51(1)**:66-71.

**Levy, S.B.,** 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. **92 Suppl**:65S-71S.

**Lewin, C.S., Morrissey, I., Smith, J.T.,** 1991b. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **10(4)**:240-8.

**Lewin, C.S., Howard, B.M., Smith, J.T.,** 1991a. Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. J. Med. Microbiol. **34(1)**:19-22.

**Li, X.Z.,** 2005. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. Int. J. Antimicrob. Agents. **25(6)**:453-63.

**Li, Q., Mitscher, L.A., Shen, L.L.,** 2000. The 2-pyridone antibacterial agents: bacterial topoisomerase inhibitors. Med. Res. Rev. **20(4)**:231-93.

**Lomovskaya, O., Lee, A., Hoshino, K., Ishida, H., Mistry, A., Warren, M.S., Boyer, E., Chamberland, S., Lee, V.J.,** 1999. Use of a genetic approach to evaluate the

consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **43(6)**:1340-6.

**Lomovskaya, O., Kawai, F., Matin, A.**, 1996. Differential regulation of the mcb and emr operons of *Escherichia coli*: role of mcb in multidrug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **40(4)**:1050-2.

**Loria, G.R., Sammartino, C., Nicholas, R.A., Ayling, R.D.**, 2003. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. Res. Vet. Sci. **75(1)**:3-7.

**Lucier, T.S., Heitzman, K., Liu, S.K., Hu, P.C.**, 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **39(12)**:2770-3.

**Madanat, A., Zendulková, D., Pospíšil, Z.**, 2001. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. Acta Vet. Brno **70**:403-412

**Malik, M., Zhao, X., Drlica, K.**, 2006. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. Mol. Microbiol. **61(3)**:810-25.

**Malik, M., Lu, T., Zhao, X., Singh, A., Hattan, C.M., Domagala, J., Kerns, R., Drlica, K.**, 2005. Lethality of quinolones against *Mycobacterium smegmatis* in the presence or absence of chloramphenicol. Antimicrob. Agents Chemother. **49(5)**:2008-14.

**Martínez-Martínez, L., Pascual, A., García, I., Tran, J., Jacoby, G.A.**, 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. J. Antimicrob. Chemother. **51(4)**:1037-9.

**Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A.**, 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. **351(9105)**:797-9.

**Mascaretti, O.A. (ed.)**, 2003. Bacteria versus antibacterial agents, an integrated approach. 1st ed. ASM press, Washington

**Matsuoka, M., Narita, M., Okazaki, N., Ohya, H., Yamazaki, T., Ouchi, K., Suzuki, I., Andoh, T., Kenri, T., Sasaki, Y., Horino, A., Shintani, M., Arakawa, Y., Sasaki, T.**, 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob. Agents Chemother **48(12)**:4624-30.

**McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.**, 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. Microbiology. **152(Pt 4)**:913-22.

**McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B.**, 1998. Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **166(2)**:305-9.

**Mitsuyama, J., Itoh, Y., Takahata, M., Okamoto, S., Yasuda, T.**, 1992. In vitro antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. Antimicrob Agents Chemother. **36(9)**:2030-6.

**Mizuuchi, K., Fisher, L.M., O'Dea, M.H., Gellert, M.**, 1980. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77(4)**:1847-51.

**Moken, M.C., McMurry, L.M., Levy, S.B.**, 1997. Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. Antimicrob. Agents Chemother. **41(12)**:2770-2.

**Monnerat, M.P., Thiaucourt, F., Poveda, J.B., Nicolet, J., Frey, J.,** 1999. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **6(2)**:224-30.

**Montero, C., Mateu, G., Rodriguez, R., Takiff, H.,** 2001. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. Antimicrob. Agents Chemother. **45(12)**:3387-92.

**Morozumi, M., Hasegawa, K., Kobayashi, R., Inoue, N., Iwata, S., Kuroki, H., Kawamura, N., Nakayama, E., Tajima, T., Shimizu, K., Ubukata, K.,** 2005. Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. Antimicrob. Agents Chemother **49(6)**:2302-6.

**Munshi, M.H., Sack, D.A., Haider, K., Ahmed, Z.U., Rahaman, M.M., Morshed, M.G.,** 1987. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. Lancet. **2(8556)**:419-21.

**Neimark, H., Johansson, K.-E., Rikihisa, Y., Tully, J.G.,** 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with description of *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemomuris*, *Candidatus Mycoplasma haemosuis* and *Candidatus Mycoplasma wenyoni*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 891-899.

**Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., Kaatz, G.W.,** 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. Antimicrob. Agents Chemother. **37(1)**:128-9.

**Ngan, C.C., Lim, T., Choo, C.M., Toh, G.L., Lim, Y.S.,** 2004. Susceptibility testing of Singapore strains of *Mycoplasma hominis* to tetracycline, gatifloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacin, clindamycin, and azithromycin by the Etest method. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **48(3)**:207-10.

**Nicholas, R.A.J.**, 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rum. Res.* **45**:145-9

**Nicholas, R.A., Santini, F.G., Clark, K.M., Palmer, N.M., De Santis, P., Bashiruddin, J.B.**, 1996. A comparison of serological tests and gross lung pathology for detecting contagious bovine pleuropneumonia in two groups of Italian cattle. *Vet Rec.* **139(4)**:89-93.

**Nicolas, M.M., Stalis, I.H., Clippinger, T.L., Busch, M., Nordhausen, R., Maalouf, G., Schrenzel, M.D.**, 2005. Systemic disease in Vaal rhebok (*Pelea capreolus*) caused by mycoplasmas in the mycoides cluster. *J. Clin. Microbiol.* **43(3)**:1330-40.

**Niga, T., Yoshida, H., Hattori, H., Nakamura, S., Ito, H.**, 1997. Cloning and sequencing of a novel gene (*recG*) that affects the quinolone susceptibility of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(8)**:1770-4.

**Nikaido, H., Thanassi, D.G.**, 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(7)**:1393-9.

**Nordmann, P., Poirel, L.**, 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **56(3)**:463-9.

**Office International des Epizooties.** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2004. chpt. 2.4.3.

**Okazaki, N., Narita, M., Yamada, S., Izumikawa, K., Umetsu, M., Kenri, T., Sasaki, Y., Arakawa, Y., Sasaki, T.**, 2001. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol. Immunol.* **45(8)**:617-20.

**Oros, J., Fernandez, A., Rodriguez, J.L., Rodriguez, F., Poveda, J.B.,** 1997. Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats. *Zentralbl Veterinarmed B.* **44(2)**:99-104.

**Pan, X.S., Fisher, L.M.,** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(11)**:2810-6.

**Pan, X.S., Fisher, L.M.,** 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(2)**:471-4.

**Pereyre, S., Guyot, C., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.,** 2004. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(2)**:460-5.

**Pereyre, S., Gonzalez, P., De Barbeyrac, B., Darnige, A., Renaudin, H., Charron, A., Raherison, S., Bébéar, C., Bébéar, C.M.,** 2002. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(10)**:3142-50.

**Perreau, P.,** 1984. Les mycoplasmoses de la chèvre. In: Les maladies de la chèvre, Les colloques de L'INRA 28, 9-11, Niort (Francia), INRA Publ.

**Perreau, P., Le Goff, C., Giauffret, A.,** 1976. Le diagnostic serologique de l'agalactie contagieuse des petits ruminants : un test de fixation du complément. *Bull. Acad. Vet. Fr.* **49**:185-192

**Perrin, J., Muller, M., Zangger, N., Nicolet, J.,** 1994. Infection with *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC (large colony type) in bezoar goat kids (*Capra aegagrus cretica*) in the Bern (Switzerland) Zoo. Schweiz Arch, Tierheilkd. **136(8)**:270-4.

**Peyraud, A., Woubit, S., Poveda, J.B., De la Fé, C., Mercier, P., Thiaucourt, F.,** 2003. A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. Mol. Cell. Probes. **17(6)**:289-94.

**Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M., Johansson, K.E.,** 1996. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. J. Bacteriol. **178(14)**:4131-42.

**Piddock, L.J., Walters, R.N., Diver, J.M.,** 1990. Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **34(12)**:2331-6.

**Poole, K., 2000b.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. **44(10)**:2595-9.

**Poole, K., 2000a.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. **44(9)**:2233-41.

**Poumarat, F., Le Grand, D., Philippe, S., Calavas, D., Schelcher, F., Cabanie, P., Tessier, P., Navetat, H.,** 2001. Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. Vet. Microbiol. **80(1)**:23-35.

**Poumarat, F.,** 1998. Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). Methods Mol. Biol. **104**:113-8.

**Poumarat, F., Perrin, B., Longchambon, D.,** 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.* **29(3-4):**329-38.

**Poumarat, F., Martel, J.L.,** 1989. Antibiosensibilité *in vitro* des souches françaises de *Mycoplasma bovis*. *Ann. Rech. Vet.* **20(2):**145-52.

**Poveda, J.B.,** 1998. Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *Methods Mol. Biol.* 1998; **104:**69-78.

**Poveda, J.B., Nicholas, R.,** 1998. Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests. *Methods Mol. Biol.* **104:**105-11.

**Putman, M., van Veen, H.W., Konings, W.N.,** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64:** 672-693

**Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.,** 2005. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(1):**421-4.

**Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.,** 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(3):**672-9.

**Randall, L.P., Woodward, M.J.,** 2002. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res. Vet. Sci.* **72(2):**87-93.

**Razin, S., Yogev, D., Naot, Y.,** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62(4):**1094-156.

**Razin, S.**, 1978. The mycoplasmas. *Microbiol Rev.* **42(2)**:414-70.

**Real, F., Déniz, S., Acosta, B., Ferrer, O., Poveda, J.B.**, 1994. Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. *Vet. Rec.* **135(1)**:15-6.

**Reinhardt, A.K., Gautier-Bouchardon, A.V., Gicquel-Bruneau, M., Kobisch, M., Kempf, I.**, 2005. Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. *Vet. Microbiol.* **106(1-2)**:129-37.

**Reinhardt, A.K., Kempf, I., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V.**, 2002a. Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. *J. Antimicrob. Chemother.* **50(4)**:589-92.

**Reinhardt, A.K., Bébéar, C.M., Kobisch, M., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V.**, 2002b. Characterization of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV Involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(2)**:590-3.

**Ricci, V., Tzakas, P., Buckley, A., Piddock, L.J.**, 2006. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(1)**:38-42.

**Ricci, V., Peterson, M.L., Rotschafer, J.C., Wexler, H., Piddock, L.J.**, 2004. Role of topoisomerase mutations and efflux in fluoroquinolone resistance of *Bacteroides fragilis* clinical isolates and laboratory mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(4)**:1344-6.

**Roberts, M.C., Kenny, G.E.**, 1987. Conjugal transfer of transposon Tn916 from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* **169(8)**:3836-9.

**Roberts, M.C., Koutsky, L.A., Holmes, K.K., LeBlanc, D.J., Kenny, G.E., 1985.** Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal *tetM* sequences. Antimicrob Agents Chemother. **28(1)**:141-3.

**Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2006.** *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrob. Agents Chemother. **50(8)**:2872-4.

**Robicsek, A., Sahm, D.F., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2005.** Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. **49(7)**:3001-3.

**Rodriguez, F., Fernandez, A., Ball, H.J., 1997.** Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* by growth-inhibition using monoclonal antibodies. Res. Vet. Sci. **63(1)**:91-2.

**Rodriguez, F., Kennedy, S., Bryson, T.D., Fernandez, A., Rodriguez, J.L., Ball, H.J., 1996b.** An immunohistochemical method of detecting *Mycoplasma* species antigens by use of monoclonal antibodies on paraffin sections of pneumonic bovine and caprine lungs. Zentralbl Veterinarmed B. **43(7)**:429-38.

**Rodriguez, F., Ball, H.J., Finlay, D., Campbell, D., Mackie, D.P., 1996a.** Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* by monoclonal antibody-based sandwich ELISA. Vet. Microbiol. **51(1-2)**:69-76.

**Rodriguez, J.L., Gutierrez, C., Brooks, D.L., Damassa, A.J., Oros, J., Fernandez, A., 1998.** A pathological and immunohistochemical study of goat kids undergoing septicaemic disease caused by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type). Zentralbl Veterinarmed B. **45(3)**:141-9.

**Rodríguez, J.L., Poveda, J.B., Oros, J., Herraéz, P., Sierra, M.A., Fernandez, A.,** 1995b. High mortality in goats associated with the isolation of a strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Large Colony type). Zentralbl Veterinarmed B. **42(10)**:587-93.

**Rodríguez, J.L., de Los Monteras, A.E., Herraéz, P., Poveda, J.B., Fernández, A.,** 1995b. Isolation of *Mycoplasma mycoides mycoides* (LC variant), from two naturally aborted caprine fetuses. Theriogenology. **44(7)**:1003-9.

**Rodríguez, J.L., Poveda, J.B., Gutierrez, C., Acosta, B., Fernandez, A.,** 1994. Polyarthrititis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. Vet. Rec. **135(17)**:406-7.

**Rodríguez-Martínez, J.M., Velasco, C., Pascual, A., García, I., Martínez-Martínez, L.,** 2006. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids. Clin. Microbiol. Infect. **12(5)**:440-5.

**Rodríguez-Martínez, J.M., Pascual, A., García, I., Martínez-Martínez, L.,** 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. **52(4)**:703-6.

**Rosenbusch, R.F., Kinyon, J.M., Apley, M., Funk, N.D., Smith, S., Hoffman, L.J.,** 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. J. Vet. Diagn. Invest. **17(5)**:436-41.

**Rosenbusch, R.F.,** 1998. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains recovered from mycoplasmal pneumonia and arthritis in feedlot cattle. Beef Research Report, AS Leaflet R1548, Iowa State University, Ames, IA

**Roychoudhury, S., Ledoussal, B.,** 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2 (1)**:51-65.

**Samra, Z., Rosenberg, S., Soffer, Y.,** 2002. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hominis* clinical isolates to tetracyclines, quinolones and macrolides. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44(4)**:359-61.

**Sanders, C.C.,** 2001. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **32** Suppl 1:S1-8.

**Sanders, C.C., Sanders, W.E. Jr, Goering, R.V., Werner, V.,** 1984. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26(6)**:797-801.

**Stakenborg, T., Vicca, J., Butaye, P., Maes, D., Minion, F.C., Peeters, J., De Kruif, A., Haesebrouck, F.,** 2005. Characterization of In Vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microb. Drug Resist.* **11(3)**:290-4.

**Stipkovits, L., Ripley, P.H., Tenk, M., Glavits, R., Molnar, T., Fodor, L.,** 2005. The efficacy of valnemulin (Econor) in the control of disease caused by experimental infection of calves with *Mycoplasma bovis*. *Res. Vet. Sci.* **78(3)**:207-15.

**Stradaoli, G., Sylla, L., Zelli, R., Mazzarelli, F., Rawadi, G., Monaci, M.,** 1999. *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* SC identification by PCR in sperm of seminal vesiculitis-affected bulls. *Vet. Res.* **30**, 457–466.

**Stratton, C.W.,** 2005. Molecular Mechanisms of Action for Antimicrobial Agents: General Principles and Mechanisms for Selected Classes of Antibiotics, p. 532-563. In V. Lorian

(Ed.) Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Lippincot Williams & Williams, Philadelphia

**Sylla, L., Stradaoli, G., Manuali, E., Rota, A., Zelli, R., Vincenti, L., Monaci, M., 2005.** The effect of *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa and embryo development. Anim. Reprod. Sci. **85(1-2)**:81-93.

**Takei, M., Fukuda, H., Kishii, R., Hosaka, M., 2001.** Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. Antimicrob. Agents Chemother. **45(12)**:3544-7.

**Takenouchi, T., Tabata, F., Iwata, Y., Hanzawa, H., Sugawara, M., Ohya, S., 1996.** Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **40(8)**:1835-42.

**Taléns-Visconti, R., Garrigues, T.M., Cantón, E., 2002.** Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismo de acción y Resistencia. Rev. Esp. Quimioter. **15(4)**:313-24.

**Tavío, M.M., Vila, J., Perilli, M., Casanas, L.T., Macia, L., Amicosante, G., Jimenez, de Anta M.T., 2004.** Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. J. Med. Microbiol. **53(Pt 11)**:1119-22.

**Ter Laak, E.A., Noordergraaf, J. H., Verschure, M. H., 1993.** Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. **37(2)**:317-21.

**Thiaucourt, F., Lorenzon, S., David, A., Breard, A.,** 2000. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.* **72(3-4)**:251-68.

**Thiaucourt, F., Bölske, G.,** 1996. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary micoplasmosis of sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **15(4)**: 1397-1414.

**Thigpen, J.E., Cottew, G.S., Yeats, F., McGhee, C.E., Rose, D.L.,** 1983. Growth characteristics of large- and small-colony types of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* on 5% sheep blood agar. *J. Clin. Microbiol.* **18(4)**:956-60.

**Thomas, A., Nicolas, C., Dizier, I., Mainil, J., Linden, A.,** 2003. Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Vet. Rec.* **153(14)**:428-31.

**Thomson, K.S.,** 2000. Minimizing quinolone resistance: are the new agents more or less likely to cause resistance? *J. Antimicrob. Chemother.* **45(6)**:719-23.

**Tola, S., Manunta, D., Rocca, S., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Angioi, P.P., Leori, G.,** 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine.* **17(22)**:2764-8.

**Tola, S., Manunta, D., Cocco, M., Turrini, F., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Angioi, A., Leori, G.,** 1997b. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **154(2)**:355-62.

**Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Leori, G.,** 1997. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **54(1)**:17-22.

**Tola, S., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Angioi, A., Rocchigiani, A.M., Leori, G.,** 1996. Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **51(1-2):**77-84.

**Tola, S., Rizzu, P., Leori, G.,** 1994. A species-specific DNA probe for the detection of *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Microbiol.* **41(4):**355-61.

**Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C.,** 2005b. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(1):**118-25.

**Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C.,** 2005a. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(7):**3050-2.

**Tran, J.H., Jacoby, G.A.,** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(8):**5638-42.

**Trichard, C.J., Jordaan, P., Prozesky, L., Jacobsz, E.P., Henton, M.M.,** 1993. The identification of *Mycoplasma mycoides mycoides* LC as the aetiological agent of balanoposthitis and vulvovaginitis in sheep in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **60(1):**29-37.

**Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M.,** 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.* **11(4):**256-80.

**Van Bambeke, F., Glupezynski, Y., Plésiat, P., Pechère, J.C., Tulkens, P.M.,** 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **51:** 1055-1065.

**Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F.,** 2004. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(11)**:4470-2.

**Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., De Anta, M.T.,** 1996. Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(2)**:491-3.

**Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., Jimenez de Anta, T.,** 1994. Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(10)**:2477-9.

**Vilei, E.M., Korczak, B.M., Frey, J.,** 2006. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. *Vet. Res.* **37(6)**:779-90.

**Villalba, E.J., Poveda, J.B., Fernandez, A., Rodriguez, J.L., Gutierrez, C., Gomez-Villamandos, J.,** 1992. An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Islands. *Vet. Rec.* **130(15)**:330-1.

**Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., Maniloff, F., Woese, C.R.,** 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171(12)**:6455-67.

**Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K.E., Pettersson, B., Uhlen, M.,** 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.* **14(2)**:221-7.

**Willmott, C.J., Maxwell, A.**, 1993. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(1)**:126-7.

**Wise, R., Andrews, J.M., Edwards, L.J.**, 1983. In vitro activity of Bay 09867, a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23(4)**:559-64.

**Wise, R., Andrews, J.M., Ashby, J.P., Matthews, R.S.**, 1988. In vitro activity of lomefloxacin, a new quinolone antimicrobial agent, in comparison with those of other agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32(5)**:617-22.

**Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B.**, 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77(1)**:494-8.

**World Health Organization**, 1998. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland. WHO/EMC/ZDI/98.10

**Wu, C.M., Wu, H., Ning, Y., Wang, J., Du, X., Shen, J.**, 2005. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **247(2)**:199-205.

**Wu, C.C., Shryock, T.R., Lin, T.L., Faderan, M., Veenhuizen, M.F.**, 2000. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet. Microbiol.* **76(1)**:25-30.

**Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., Konno, M.**, 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* **172(12)**:6942-9.

**Zhao, X., Xu, C., Domagala, J., Drlica, K.,** 1997. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94(25):**13991-6.

## ***Capítulo II***

---

## **II.- Factores que interfieren con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio líquido**

### **II.1.- Introducción**

Existen varios métodos para determinar el resultado de la interacción entre un microorganismo y un antimicrobiano. Estos pueden ser cualitativos, como la difusión en disco en la que los resultados son en base a la susceptibilidad o resistencia, o cuantitativos, como la dilución en agar o en medio líquido, que cuantifican esa relación expresándola en concentración mínima inhibitoria. La obtención de estos valores de susceptibilidad es importante cuando debe decidirse el tratamiento frente a una situación clínica, permitiendo así la elección del mejor tratamiento posible (Amsterdam, 2005).

Aunque para la mayoría de las bacterias estos procedimientos están estandarizados, permitiendo la comparación de resultados con las pequeñas diferencias inherentes a cualquier técnica biológica y con intervención de un operador humano, en los micoplasmas todavía no se han definido exactamente cuales son los procedimientos a seguir, llevando así a diferencias metodológicas que dificultan e imposibilitan la comparación de resultados (Hannan, 2000).

Los micoplasmas son organismos fastidiosos, nutricionalmente muy exigentes y con pocas vías metabólicas disponibles. Sus características de crecimiento en medio líquido, sin provocar una turbidez visible en muchas especies, y en medio sólido con colonias muy pequeñas y muchas veces de difícil crecimiento, ocasionan que los métodos tradicionalmente aplicados a otras bacterias para la determinación de su susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos no sean útiles (Hannan, 2000). Así, el método más frecuente para su determinación es el método de dilución en medio líquido, aunque otras técnicas como la dilución en medio sólido (Hannan y cols., 1989), el E-Test (Waites y cols., 1997) y más recientemente la citometría de flujo (Assunção y cols., 2006) puedan ser aplicadas.

En 1986 un grupo de trabajo adjunto del Programa Internacional de Investigación en Micoplasmología Comparativa determinó que la dilución en medio líquido es el método más útil y reproducible para la determinación de CMI's (Ter Laak y cols., 1993). Debido a las características particulares de cada micoplasma todavía no existen métodos estandarizados para la determinación de CMI's en medio líquido en micoplasmas, utilizando cada autor el que le parezca más conveniente (Hannan, 2000).

La técnica de dilución en medio líquido está basada en la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en las diversas concentraciones probadas. Este crecimiento puede ser observado de forma directa, por la turbidez del medio (Poumarat y Martel, 1989) o por el depósito de un sedimento bacteriano (Loria y cols., 2003) o indirecta, por la incorporación de un sustrato que la bacteria consiga metabolizar y que implique un cambio en el pH del medio observable por medio de la incorporación de un indicador de pH al mismo (Hannan, 2000) o cuyo metabolismo implique cambios visibles en el medio (Devriese y Haesebrouck, 1991).

Varios factores influyen en el resultado y reproducibilidad de las pruebas de susceptibilidad: 1) factores inherentes al microorganismo como sus propiedades estructurales y metabólicas; 2) factores propios del agente antimicrobiano como la solubilidad y estabilidad; 3) factores relacionados con la propia técnica como la cantidad de inóculo utilizada o el pH del medio (Hannan, 2000; Amsterdam, 2005).

Son varios los factores conocidos que interfieren en la determinación de CMI's en medio líquido en micoplasmas. Si bien aunque en algunas especies de micoplasmas ya se conoce el modo en que dichos factores influyen en las CMI's de diversos agentes antimicrobianos, no existen estudios publicados referentes a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC).

Así, en este capítulo nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de la cantidad de inóculo en la determinación de la CMI
2. Determinar el efecto del pH en la determinación de la CMI
3. Determinar el efecto de la presencia/ausencia de oxígeno en la determinación de la CMI
4. Determinar el efecto del periodo de incubación en la determinación de la CMI
5. Determinar el efecto de la edad del inóculo en la determinación de la CMI

## **II.2.- Material y Métodos**

### **II.2.1.- Cepas utilizadas**

Se utilizó la cepa de referencia de MmmLC, Y-Goat (NCTC 11706), obtenida de la NCTC (Nacional Collection of Type Cultures).

### **II.2.2.- Antimicrobianos utilizados**

Se utilizó el enrofloxacino, gentamicina, eritromicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, lincomicina y tilosina. Los antimicrobianos fueron adquiridos como polvo a excepción de la tilosina que venía diluida en una solución de PBS. El enrofloxacino y la lincomicina fueron obtenidos de Sigma (Sigma, St. Louis, EEUU) mientras los restantes se obtuvieron junto de Serva (Serva, Heidelberg, Alemania). Las soluciones stock se prepararon como se ha descrito en la literatura (Amsterdam, 2005) y se almacenaron a

4°C como máximo una semana. Las soluciones stock de oxitetraciclina y cloranfenicol se prepararon cada vez que se utilizaron.

### **II.2.3.- Determinación de CMI**

Las CMI fueron determinadas utilizando una adaptación del método de Tanner y Wu (1992) y teniendo en cuenta la cantidad de principio activo. Resumiendo, en una placa de microdilución se prepararon diluciones dobles de los agentes a probar en medio PH suplementado con 1% de manosa y rojo fenol, para un volumen final de 100 µl por pocillo. Posteriormente se añadió a cada pocillo 100 µl de medio PH modificado en el cual se había diluido un cultivo fresco de la cepa a estudiar según la cantidad de inóculo deseada hasta la cantidad de  $10^3$ - $10^5$  unidades cambiadoras de color (UCC)/ml. Así, se obtuvo un volumen final de 200 µl. Se preparó aparte un pocillo con el control positivo (medio inoculado y sin antibiótico) y el control negativo (medio sin inocular y sin antibiótico), se selló e incubó a 37 °C. Se leyó la CMI en el día que el control positivo cambió de color por el metabolismo de la manosa, generalmente entra las 24-48h post inoculación.

#### **II.2.3.1.- Determinación del efecto del inóculo**

La determinación de las CMI fue determinada en placa de microdilución como se ha descrito anteriormente. Se utilizaron diluciones del cultivo original diluidas en base 10. La lectura de las placas se realizó frecuentemente para que coincidiera con el momento en el que el control positivo cambiara de color. Se repitió dos veces.

### **II.2.3.2.- Determinación del efecto del pH**

Se determinó la CMI de los antimicrobianos anteriormente mencionados a 3 valores de pH diferentes: 7.2, 7.6 y 8.0. Las CMIs fueron determinadas como se ha descrito anteriormente utilizando una cantidad de inóculo final comprendida entre  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  UCC/ml. Se repitió cuatro veces.

### **II.2.3.3- Determinación del efecto de la presencia/ ausencia de oxígeno**

La determinación de las CMIs de los antimicrobianos a probar fue realizada como se ha descrito previamente y utilizando una cantidad de inóculo final comprendida entre  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  UCC/ml. La anaerobiosis fue obtenida añadiendo 100  $\mu$ l de parafina estéril a cada uno de los pocillos. Se repitió cuatro veces.

### **II.2.3.4- Determinación del efecto del periodo de incubación**

Las CMIs de los agentes antimicrobianos a estudiar fueron determinadas según se ha descrito anteriormente y utilizando una cantidad de inóculo final comprendida entre  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  UCC/ml. Las CMIs se leyeron el día que el control cambió de color, 7 y 14 días después. Se repitió cuatro veces.

### **II.2.3.5.- Determinación del efecto de la edad del inóculo**

Las CMIs de los agentes antimicrobianos a estudiar fueron determinadas según se ha descrito anteriormente y utilizando una cantidad de inóculo final comprendida entre  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  UCC/ml. Se utilizaron cultivos en la fase exponencial (fase log de crecimiento), recién descongelados y viejos (fase lag de crecimiento). Se repitió dos veces.

## **II.3.- Resultados**

### **II.3.1.- Efecto del inóculo**

Se observaron cambios en la actividad de todos los agentes antimicrobianos asociados a la variación del inóculo, aunque algunos fueron más afectados que otros (Tabla II.1., Gráficos II.1. y II.2., Figura II.1.) Un incremento en el inóculo fue acompañado de la pérdida de actividad de todos los antimicrobianos probados.

La CMI del enrofloxacino fue la que menos varió (dos veces), mientras se observaron variaciones de cuatro veces en la CMI de la oxitetraciclina, de ocho veces en la CMI de la cloranfenicol, tilosina y gentamicina y de 16 veces en la CMI de la eritromicina. Las mayores variaciones se observaron en la CMI de la lincomicina (64 veces).

### **II.3.2.- Efecto del pH**

Se pudieron apreciar cambios en la actividad de los diversos antimicrobianos según el pH del medio (Tabla II.2., Gráfico II.3.).

Las CMIs medias del enrofloxacino, tilosina, eritromicina, tilosina y lincomicina disminuyeron al aumentar el pH del medio de 7,2 a 8,0. Esta disminución fue más evidente en la eritromicina y lincomicina (cuatro y ocho veces respectivamente). Se observó el aumento de dos veces en la CMI de la oxitetraciclina asociado al aumento del pH del medio. Las CMIs del cloranfenicol y gentamicina no variaron para el rango de pH estudiado.

### **II.3.3.- Efecto de la presencia/ausencia de oxígeno**

No se observaron cambios en la actividad del cloranfenicol y de la lincomicina cuando se probaron en presencia o ausencia de oxígeno (Tabla II.3., Gráfico II.4.).

Los valores medios de CMI del enrofloxacin y oxitetraciclina disminuyeron dos veces cuando fueron determinados en condiciones de anaerobiosis. Las CMIs de la gentamicina, eritromicina y tilosina aumentaron dos veces cuando se probaron bajo condiciones de anaerobiosis. No se observaron variaciones en las CMIs del cloranfenicol y lincomicina.

Se observó también una ligera disminución del pH del medio inespecífica sujeta a condiciones de anaerobiosis.

### **II.3.4.- Efecto del periodo de incubación**

Se observó un aumento en la CMI de todos los antimicrobianos cuando se aumentó el período de incubación (Tabla II.4., Gráficos II.5. y II.6.).

Los mayores aumentos se observaron en las CMIs de la eritromicina y de la oxitetraciclina que aumentaron 16 veces; la CMI del cloranfenicol, tilosina y lincomicina aumentó ocho veces. Las CMIs menos afectadas fueron las del enrofloxacin y gentamicina, que aumentaron cuatro veces.

### **II.3.5.- Efecto de la edad del inóculo**

No se observaron cambios en la CMI de ningún de los antimicrobianos probados asociados a la edad del inóculo (Tabla II.5., Gráfico II.7.). El tiempo necesario para el cambio de color del control positivo fue menor cuando se utilizaron cultivos en la fase

logarítmica de crecimiento (1-2 días) y mayores cuando se emplearon cultivos viejos (2-3 días).

#### II.4.- Discusión

En varios trabajos se describe la influencia del inóculo en la determinación de CMI de diversos antimicrobianos en otras especies de micoplasma entre dos y 500 veces para inóculos comprendidos entre  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^7$  UCC/ml (Braun y cols., 1970; Whithear y cols., 1983), lo que concuerda con los resultados que hemos obtenido para MmmLC. Aunque un dato común entre todos los trabajos realizados es la disminución de la susceptibilidad asociada al incremento del inóculo, esta variación depende de la especie estudiada. Nuestros resultados apuntan a que la lincomicina sea el agente más afectado por cambios en el inóculo mientras el enrofloxacino es el menos afectado. En trabajos previamente realizados con *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma synoviae*, la tetraciclina fue el agente que presentó menor variación (Bygdeman y Mårdh, 1983; Whithear y cols., 1983). Otro dato interesante en un trabajo realizado con *Mycoplasma synoviae* (Whithear y cols., 1983) fue la variación proporcional de la CMI de la tilosina e eritromicina, algo que también se ha observado con respecto a MmmLC. Uno de los motivos para esta aparente pérdida de actividad por parte de los antimicrobianos puede estar relacionado con una baja concentración intracelular del mismo en presencia de un elevado número de células (Whithear y cols., 1983). Otro motivo puede depender de la distribución normal de los micoplasmas en una población; al aumentar el inóculo aumenta el número de células de los extremos, las más sensibles y las más resistentes, estas últimas pueden aumentar el valor de la CMI (Amsterdam, 2005). En micoplasmas se ha determinado que la cantidad de inóculo idónea para la determinación de CMI debe estar comprendida entre  $10^3$ - $10^5$  UCC/ml puesto que en este rango se espera que no haya variaciones de la CMI superiores a una dilución doble (Whithear y cols., 1983; Hannan, 2000). Estos datos coinciden con los obtenidos en este trabajo, confirmando que el inóculo ideal para la determinación de CMI en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC es de  $10^3$ - $10^5$  UCC/ml.

Se sabe que la actividad de los antimicrobianos está influida por el pH inicial del medio, existiendo trabajos realizados sobre diversas especies de micoplasmas que lo describen. Hemos observado un incremento en la actividad de la eritromicina, tilosina, lincomicina y enrofloxacin asociado a un incremento del pH del medio, mientras la oxitetraciclina era más activa a valores de pH más ácidos. Resultados semejantes han sido obtenidos en trabajos previos realizados con *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma synoviae* (Bygdeman y Mårdh, 1983; Whithear y cols., 1983; Kenny y cols., 1989; Kenny y Cartwright, 1991b; Kenny y Cartwright, 1994; Kenny y Cartwright, 2001). La CMI del cloranfenicol y de la gentamicina no fue afectada por los valores de pH dentro del rango estudiado (7,2-8,0); en trabajos anteriores con *Mycoplasma hominis* se ha descrito mayor eficacia de la gentamicina y cloranfenicol a valores de pH más básicos y ácidos respectivamente (Braun y cols., 1970), aunque tal efecto haya sido descrito para un rango de pH diferente del empleado en este trabajo (6,0-7,4). Las variaciones en la CMI según el pH del medio no son iguales dentro del mismo grupo de antimicrobianos: aunque en general las quinolonas sean más activas a valores de pH más básicos, el esparfloxacino y trovafloxacino parecen no ser afectados por cambios en el pH para el rango de 6,2-7,2 mientras la quinolona WIN 57273 es más potente a un pH de 6,2 (Kenny y Cartwright, 1991b; Kenny y Cartwright, 1996). Otros grupos de antimicrobianos afectados por el pH del medio pueden ser las glicilciclinas, derivados de las tetraciclinas que al revés de éstas son más activas a valores de pH más básicos (Kenny y Cartwright, 1994) o los cetólidos, más activos a valores de pH más básicos (Kenny y Cartwright, 2001), mientras las estreptograminas no varían su actividad (Kenny y Cartwright, 2001). El efecto del pH puede ser debido a interferencias en la actividad óptima de la droga o por influencia en el crecimiento de los microorganismos (Bygdeman y Mårdh, 1983). Por ejemplo, se piensa que la menor actividad de la eritromicina a valores de pH más ácidos que su pH óptimo de actividad pueda estar relacionada con un aumento del grado de ionización y disminución de la cantidad de eritromicina no ionizada, que es la forma activa (Waites y cols., 1991). Aunque se recomiende que la determinación de la actividad de un agente se realice a su pH óptimo de actuación, muchas veces esto no es posible dada la imposibilidad de crecimiento a

esos valores. Así, esa determinación se realiza a valores óptimos de crecimiento bacteriano (Hannan, 2000).

Otro factor conocido como interferente en la determinación de CMI de micoplasmas y otras bacterias es la presencia o ausencia de oxígeno. Trabajos anteriores han determinado la disminución de la susceptibilidad a las quinolonas cuando se incuba en condiciones de anaerobiosis (Waites y cols., 1999). Antimicrobianos como los aminoglucósidos son afectados por las condiciones de anaerobiosis; su entrada en la célula se hace por medio de mecanismos de transporte específicos que requieren una fosforilación oxidativa (Verklin y Mandell, 1977; König y cols., 1993). Estos resultados coinciden con los obtenidos, aunque las variaciones de las CMI no fueron superiores a dos veces. Esto puede ser explicado por la capacidad que los micoplasmas tienen de optar por ser anaerobios facultativos; estudios realizados en *Staphylococcus aureus*, otro anaerobio facultativo, revelaron que los mecanismos de entrada de los aminoglucósidos en la célula no eran demasiado afectados por condiciones de anaerobiosis (Suller y Lloyd, 2002). También se ha observado la pérdida de actividad de los macrólidos cuando se valora en condiciones de anaerobiosis y un incremento en la actividad del enrofloxacin y oxitetraciclina; resultados semejantes han sido obtenidos en otros microorganismos (Fuchs y cols., 2001). En condiciones de anaerobiosis se produce una disminución del pH del medio inespecífica (Waites y cols., 1999); hemos observado esta acidificación en el transcurso de nuestro trabajo, aunque el cambio de color no fuera suficiente para inducir en error en el momento de realizar la lectura de los resultados.

El período de incubación es otro factor a tener en cuenta cuando se determinan susceptibilidades a antimicrobianos. El efecto del período de incubación está ampliamente descrito en la literatura (Braun y cols., 1970; Bygdeman y Mårdh, 1983; Whithear y cols., 1983). Nuestros resultados coinciden con los descritos puesto que la CMI de los antimicrobianos probados sufre variaciones cuando en lugar de realizar la lectura el día que el control positivo cambia de color, esta se realiza siete o catorce días después. Trabajos realizados anteriormente con *Mycoplasma pneumoniae* han determinado que las variaciones en la CMI de las quinolonas motivadas por aumentos en

el período de incubación son menores que las observadas en otros antimicrobianos (Kenny y Cartwright, 1991a). Estas descripciones son coincidentes con nuestros resultados, demostrando que el enrofloxacin y la gentamicina son los menos afectados por un incremento en el período de incubación, mientras la oxitetraciclina y eritromicina son los más afectados. Estos resultados parecen estar relacionados con la incapacidad de matar a las células microbianas; mientras las quinolonas y los aminoglucósidos son agentes bactericidas, los demás antimicrobianos probados son esencialmente bacteriostáticos. El crecimiento de subpoblaciones de mutantes, cuya presencia no es observable en una primera lectura debido a su diminuto número puede ser responsable de incrementos en la CMI observada. Otros factores pueden ser la degradación de componentes del medio, con cambios de pH inespecíficos o la pérdida de actividad del agente antimicrobiano en cuestión debido a incubación a altas temperaturas (Whithear y cols., 1983; Loria y cols., 2003).

La edad del inóculo no interfirió con la determinación de la CMI de ninguno de los agentes estudiados, aunque el tiempo necesario para leer su valor fue menor cuando se utilizó un cultivo en su fase exponencial de crecimiento y mayor cuando se utilizó un cultivo con 48 horas o más. Previamente se ha descrito en *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* que la fase de crecimiento del inóculo no es muy importante (Whithear y cols., 1983; Hannan, 2000).

Así, podemos concluir que el inóculo utilizado, el pH del medio, la presencia o ausencia de oxígeno además del período de incubación están relacionados con cambios en los valores de la CMI de los agentes estudiados. Por otro lado, la fase de crecimiento del inóculo utilizado parece no afectar los valores de la CMI. El inóculo se asume así como el punto crítico para la obtención de resultados fiables y reproducibles, puesto que es la más susceptible de sufrir variaciones con mayores repercusiones en la CMI.

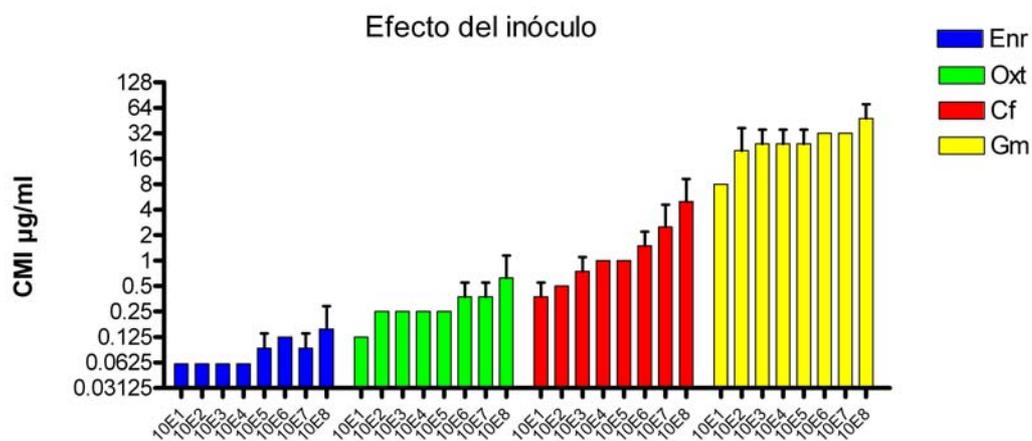
Las condiciones en las que normalmente se determinan las susceptibilidades a los antimicrobianos, pH y tensión de oxígeno, suelen reflejar más bien las de un estado fisiológico normal que patológico. Estas condiciones pueden verse alteradas durante un

proceso patológico. También la cantidad de inóculo que se estudia *in vitro* suele ser inferior a la cantidad real hallada *in vivo*. Esto puede ser la explicación para muchos fracasos terapéuticos, en que una cepa sensible en condiciones laborales no es afectada por un tratamiento con antimicrobianos, puesto que factores como el pH y la tensión de oxígeno cambian entre los diversos sistemas orgánicos y según el tipo de infección. Así, los valores de susceptibilidad obtenidos *in vitro* no tienen necesariamente porque aplicarse a la situación real, pero pueden servir de referencia aplicándose a cada situación.

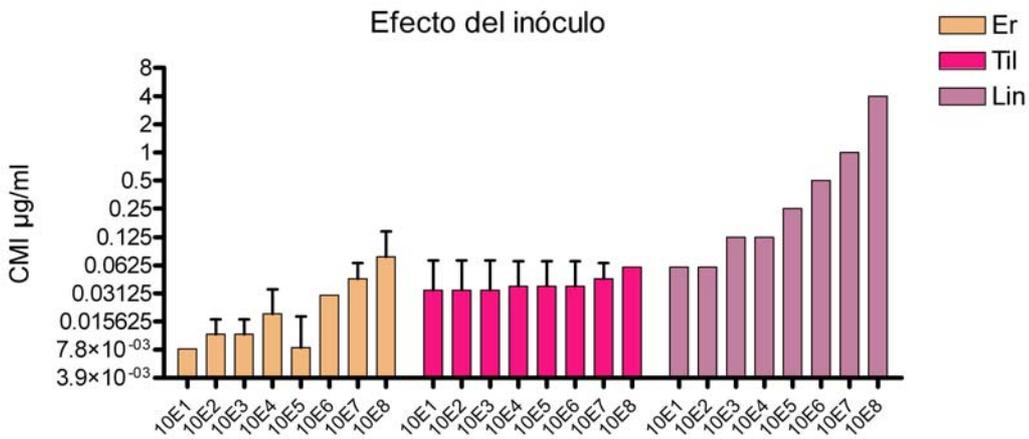
Anexo de tablas, gráficos y figuras

UCC/ml	Enr	Oxt	Cf	Er	Til	Gm	Lin
10 <sup>8</sup>	0,125	0,5	4	0,125	0,06	64	4
10 <sup>7</sup>	0,06	0,250	2	0,06	0,03	32	1
10 <sup>6</sup>	0,125	0,250	2	0,03	0,015	32	0,5
10 <sup>5</sup>	0,06	0,250	1	0,015	0,015	16	0,250
10 <sup>4</sup>	0,06	0,250	1	0,08	0,08	16	0,125
10 <sup>3</sup>	0,06	0,250	1	0,08	0,08	16	0,125
10 <sup>2</sup>	0,06	0,250	0,5	0,08	0,08	16	0,06
10 <sup>1</sup>	0,06	0,125	0,5	0,08	0,08	8	0,06

**Tabla II.1.-** Efecto del inóculo en la CMI (µg/ml) de varios antimicrobianos. Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, TilL- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.



**Gráfico II.1.-** Efecto del inóculo en la CMI. Enr- Enrofloxacino, Oxt- cxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Gm- gentamicina.



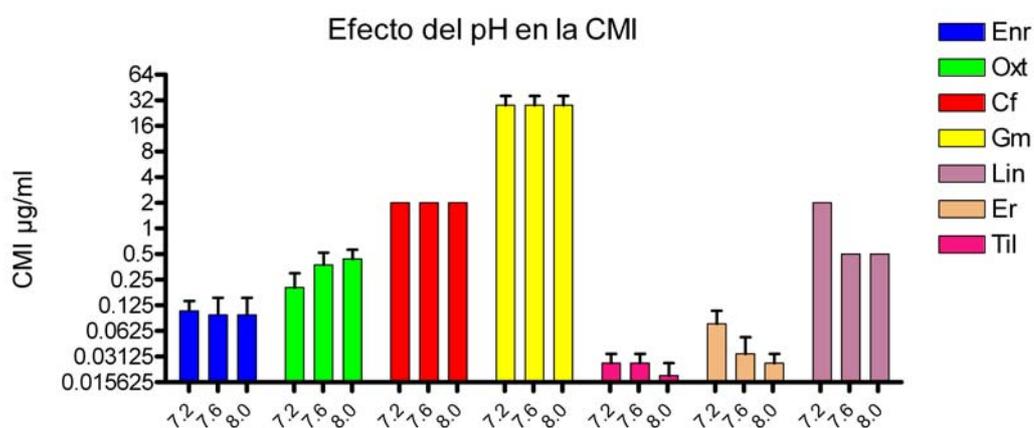
**Gráfico II.2.-** Efecto del inóculo en la CMI. Er- eritromicina, Til- tilosina, Lin- lincomicina.



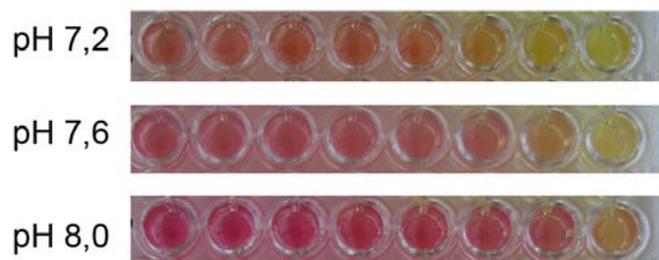
**Figura II.1-** Ejemplo del efecto del inóculo en la determinación de la CMI. Cada columna corresponde a una dilución doble de cloranfenicol y cada línea a una dilución en base 10, decreciendo desde arriba hacia abajo.

	Valor de pH		
	7,2	7,6	8,0
<b>Enr</b>	0,06	0,125	0,125
<b>Oxt</b>	0,125	0,250	0,250
<b>Cf</b>	2	2	2
<b>Er</b>	0,06	0,03	0,015
<b>Til</b>	0,015	0,015	0,015
<b>Gm</b>	32	32	32
<b>Lin</b>	2	0,5	0,5

**Tabla II.2.-** efecto del pH en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.



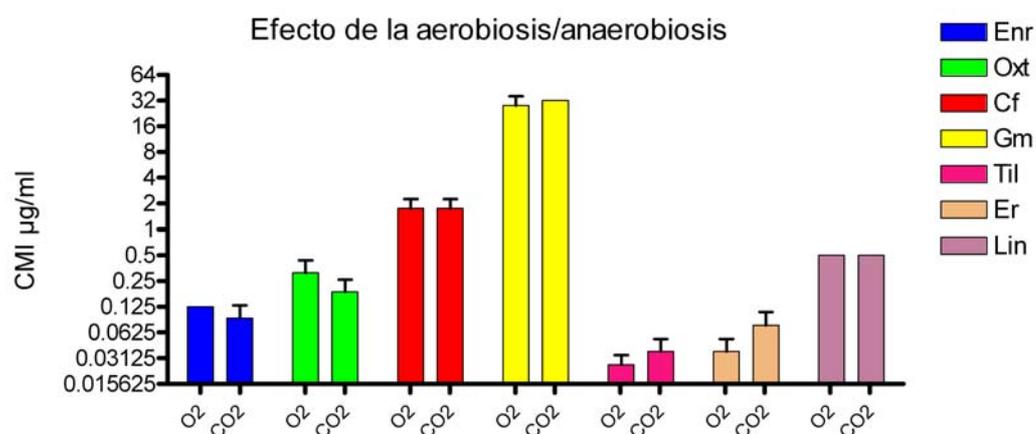
**Gráfico II.3.-** Efecto del pH en la CMI. Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.



**Figura II.2.-** Ejemplo de la variación de la CMI de la eritromicina a diferentes valores de pH.

	Aerobiosis	Anaerobiosis
<b>Enr</b>	0,125	0,06
<b>Oxt</b>	0,250	0,125
<b>Cf</b>	1	1
<b>Er</b>	0,03	0,06
<b>Til</b>	0,015	0,03
<b>Gm</b>	16	32
<b>Lin</b>	0,5	0,5

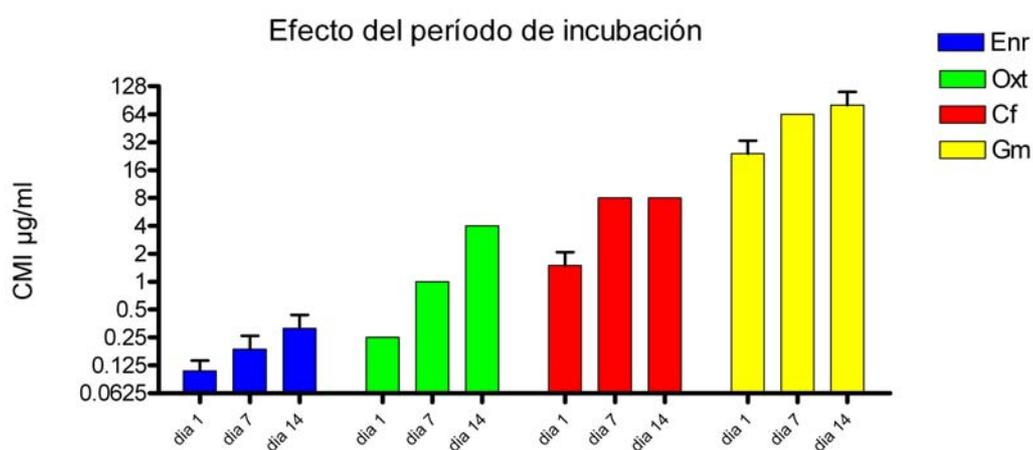
**Tabla II.3.-** Efecto de la presencia/ ausencia de oxígeno en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.



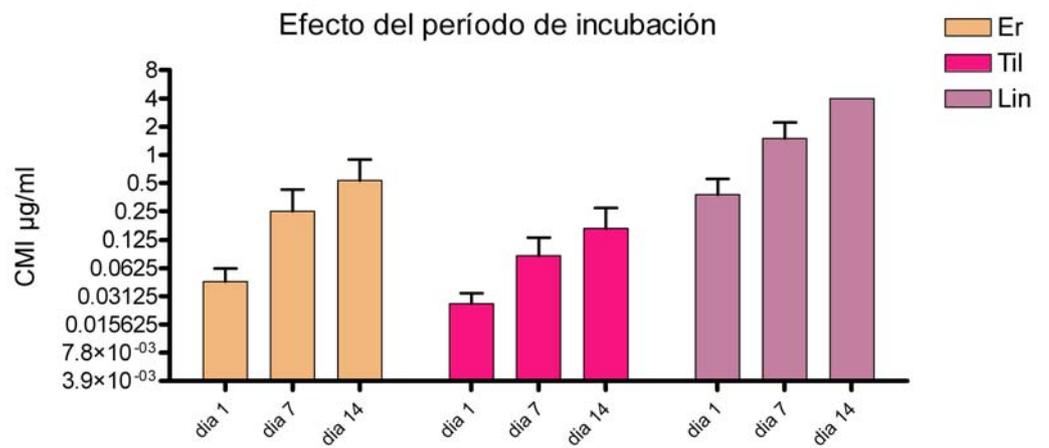
**Gráfico II.4.-** Efecto de la aerobiosis/ anaerobiosis en la CMI. Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.

	Periodo de incubación		
	d0	d7	d14
<b>Enr</b>	0,06	0,125	0,250
<b>Oxt</b>	0,250	1	4
<b>Cf</b>	1	8	8
<b>Er</b>	0,03	0,250	0,5
<b>Til</b>	0,015	0,06	0,125
<b>Gm</b>	16	64	64
<b>Lin</b>	0,5	1	4

**Tabla II.4.-** Efecto del período de incubación en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina. D0- día en el que el control positivo cambió de color, d7- día 7, d14- día 14.



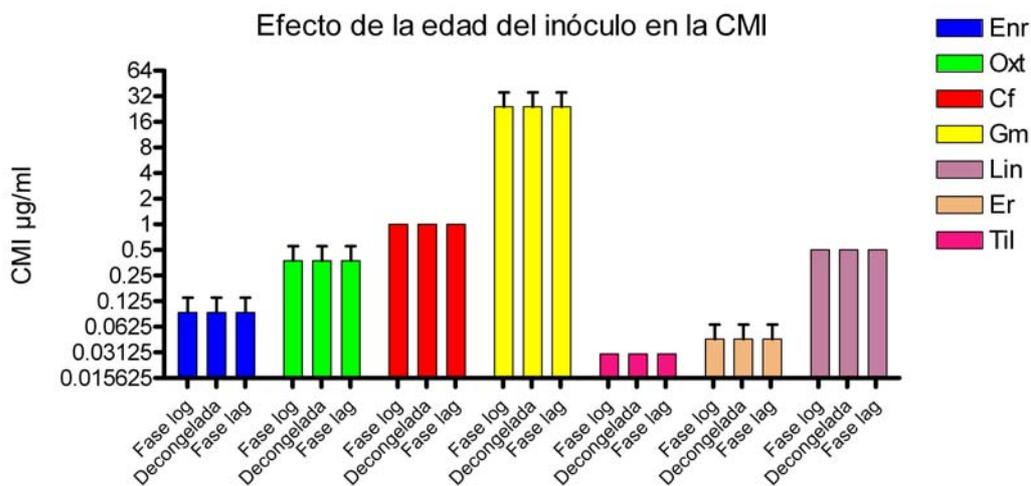
**Gráfico II.5.-** Efecto del período de incubación en la CMI. Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Gm- gentamicina.



**Gráfico II.6.-** Efecto del período de incubación en la CMI. Er- eritromicina, Til- tilosina, Lin- Lincomicina.

	Tipo de cultivo		
	Fase	Recién	Fase
	exponencial (log)	descongelado	estacionaria (lag)
<b>Enr</b>	0,06	0,06	0,06
<b>Oxt</b>	0,250	0,250	0,250
<b>Cf</b>	1	1	1
<b>Er</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Til</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Gm</b>	16	16	16
<b>Lin</b>	0,5	0,5	0,5

**Tabla II.5.-** Efecto de la edad del inóculo en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.



**Gráfico II.7.-** Efecto de la edad del inóculo en la CMI. Enr- enrofloxacino, Oxt- oxitetraciclina, Cf- cloranfenicol, Er- eritromicina, Til- tilosina, Gm- gentamicina, Lin- lincomicina.

### **Anexo del material**

#### **Medio PH**

(Kirchhoff y Rosengarten, 1984)

Este medio consiste en 3 fases, que se mezclan asépticamente:

- Fase A (para 1 litro)
  - Bacto PPLO broth 16,80 g
  - Água bidestilada 700 ml
  
  - Ajustar pH a 7,4 y autoclavar a 121 °C 20 minutos para esterilizar
  
- Fase B (para 1 litro)
  - Extracto fresco de levadura (25% p/v) 18 ml
  - Solución de Penicilina G (100.000 UI/ml) 6 ml
  - Solución de ADN (0.4% p/v) 4,40 ml
  - Agua bidestilada 91 ml
  
  - Ajustar pH a 7,4 y esterilizar por filtración en 0,22 µm
  
- Fase C (para 1 litro)
  - Suero de caballo estéril inactivado 178 ml

**Medio PH modificado (1% manosa)**

Se prepara 978 ml de medio PH normal y se añade (para 1 litro):

- Solución de manosa 10% p/v 20 ml
- Solución de rojo fenol 0,5% p/v 2ml

Ajustar el pH a 7,6 y filtrar por filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### Bibliografía

**Amsterdam, D.**, 2005. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, p. 61-143. In V. Lorian (Ed.) Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Lippincot Williams & Williams, Philadelphia

**Assunção, P., Antunes, N.T., Rosales, R.S., Poveda, C., Poveda, J.B., Davey, H.M.**, 2006. Flow cytometric determination of the effects of antibacterial agents on *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large colony type. Antimicrob. Agents Chemother. **50(8)**:2845-9.

**Braun, P., Klein, J.O., Kass, E.H.**, 1970. Susceptibility of genital mycoplasmas to antimicrobial agents. Appl. Microbiol. **19(1)**:62-70.

**Bygdeman, S.M., Mårdh, P.A.**, 1983. Antimicrobial susceptibility and susceptibility testing of *Mycoplasma hominis*: a review. Sex. Transm. Dis. **10(4 Suppl)**:366-70.

**Devriese, L.A., Haesebrouck, F.**, 1991. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* using Tween 80 hydrolysis as an indicator of growth. Zentralbl. Veterinarmed. B. **38(10)**:781-3.

**Hannan, P.C.**, 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. Vet. Res. **31(4)**:373-95.

**Hannan, P.C., O'Hanlon, P.J., Rogers, N.H.**, 1989. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. Res. Vet. Sci. **46(2)**:202-11.

**Kenny, G.E., Cartwright, F.D.,** 2001. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalbapristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbapristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(9)**:2604-8.

**Kenny, G.E., Cartwright, F.D.,** 1996. Susceptibilities of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* to a new quinolone, trovafloxacin (CP-99,219). *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(4)**:1048-9.

**Kenny, G.E., Cartwright, F.D.,** 1994. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to new glycylicyclines in comparison with those to older tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(11)**:2628-32.

**Kenny, G.E., Cartwright, F.D.,** 1991b. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* to two new quinolones, sparfloxacin and WIN 57273. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(7)**:1515-6.

**Kenny, G.E., Cartwright, F.D.,** 1991a. Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to several new quinolones, tetracycline, and erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(3)**:587-9.

**Kenny, G.E., Hooton, T.M., Roberts, M.C., Cartwright, F.D., Hoyt, J.,** 1989. Susceptibilities of genital mycoplasmas to the newer quinolones as determined by the agar dilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33(1)**:103-7.

**Kirchhoff, H., Rosengarten, R.,** 1984. Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2439-2445.

**König, C., Simmen, H.P., Blaser, J.**, 1993. Effect of pathological changes of pH, pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub> on the activity of antimicrobial agents in vitro. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12(7)**:519-26.

**Loria, G.R., Sammartino, C., Nicholas, R.A., Ayling, R.D.**, 2003. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res. Vet. Sci.* **75(1)**:3-7.

**Poumarat, F., Martel, J.L.**, 1989. Mise au point et évaluation d'une méthode opacimétrique pour la détermination de l'antibiosensibilité de *Mycoplasma bovis* in vitro. *Ann. Rech. Vet.* **20(2)**:135-43.

**Suller, M.T., Lloyd, D.**, 2002. The antibacterial activity of vancomycin towards *Staphylococcus aureus* under aerobic and anaerobic conditions. *J. Appl. Microbiol.* **92(5)**:866-72.

**Tanner, A.C., Wu, C.C.**, 1992. Adaptation of the Sensititre broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* **36(3)**:714-7.

**ter Laak, E.A., Noordergraaf, J.H., Verschure, M.H.**, 1993. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(2)**:317-21.

**Verklin, R.M. Jr, Mandell, G.L.**, 1977 Alteration of effectiveness of antibiotics by anaerobiosis. *J. Lab. Clin. Med.* **89(1)**:65-71.

**Waites, K.B., Canupp, K.C., Kenny, G.E.**, 1999. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hominis* to six fluoroquinolones as determined by E test. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(10)**:2571-3.

**Waites, K.B., Crabb, D.M., Duffy, L.B., Cassell, G.H.**, 1997. Evaluation of the Etest for detection of tetracycline resistance in *Mycoplasma hominis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **27(4)**:117-22.

**Waites, K.B., Duffy, L.B., Schmid, T., Crabb, D., Pate, M.S., Cassell, G.H.**, 1991. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* to sparfloxacin and PD 127391. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(6)**:1181-5.

**Whithear, K.G., Bowtell, D.D., Ghiocas, E., Hughes, K.L.**, 1983. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis.* **27(4)**:937-49.

## ***Capítulo III***

---

### **III.- Estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de campo de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC)**

#### **III.1.- Introducción**

*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC es uno de los agentes etiológicos implicados en el síndrome de la agalaxia contagiosa y la especie más aislada en Canarias, lo que justifica su importancia (Bergonier y cols., 1997; Assunção y cols., 2004). El control de la agalaxia contagiosa se puede conseguir por medio de vacunación o por medio de tratamientos con antimicrobianos, sin embargo actualmente no se elaboran vacunas comerciales frente a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, por lo que las vacunas actuales elaboradas frente a *Mycoplasma agalactiae* no tienen ninguna acción frente a este microorganismo, lo que origina que la antibioterapia sea muchas veces la solución más utilizada (Bergonier y cols., 1997).

A diferencia de lo que ocurre con otras especies animales, en las que a veces se consigue el control y la eliminación de micoplasmas (Evans y cols., 2002; Fiorentin y cols., 2003), la incorporación de antimicrobianos en el pienso como medida profiláctica/terapéutica no es posible debido al típico sistema digestivo de los rumiantes. Así, las vías de elección para la administración de antimicrobianos serán la vía parenteral (intramuscular) e intramamaria, aunque por cuestiones prácticas y económicas la intramamaria se utilice preferentemente cuando hay pocos individuos afectados. Esto implica que los antimicrobianos a utilizar tengan una buena distribución y actuación en los tejidos afectados, una larga vida media, alcancen una concentración óptima en el menor período posible y no sean inactivados por secreciones orgánicas.

La existencia de cuatro posibles agentes etiológicos en la agalaxia contagiosa y la posibilidad de la coexistencia de más uno de ellos en un mismo animal/grupo, es otro factor a tener en cuenta cuando se elige el tratamiento, puesto que algunos presentan patrones de sensibilidad distintos, como la resistencia intrínseca de *Mycoplasma agalactiae* a la eritromicina (Furneri y cols., 2001). Esto implica que el tratamiento que es

eficaz en un caso de agalaxia contagiosa para una especie no tiene necesariamente que serlo en otra.

Existen algunos estudios que describen las susceptibilidades de los agentes involucrados en la agalaxia contagiosa, los cuales demuestran la eficacia de diversos antimicrobianos en su tratamiento, aunque también se ha descrito la existencia de cepas resistentes a algunos de ellos (Benkirane y Amghar, 1990; Loria y cols., 2003; Kidanemariam y cols., 2005; Al-Momani y cols., 2006; Antunes y cols., 2007a; Antunes y cols., 2007b).

Así, con vista a conocer la eficacia de determinados antimicrobianos sobre cepas españolas de MmmLC, y seleccionar cepas para los estudios posteriores a desarrollar en esta tesis, nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Estudio de las sensibilidades a diversos antimicrobianos de 17 cepas de campo de MmmLC
2. Elección de cepas de MmmLC para la selección de mutantes *in vitro*
3. Elección de cepas naturalmente resistentes a fluoroquinolonas para el estudio posterior de los mecanismos de resistencia y comparación con mutantes obtenidos *in vitro*

## **III.2.- Material y métodos**

### **III.2.1.- Cepas utilizadas**

Se utilizaron 17 cepas de campo de MmmLC aisladas de casos clínicos en España y una cedida por la COST ACTION 826, además de la cepa de referencia Y-Goat (NCTC 11706), obtenida de la NCTC. Las características propias de cada cepa se encuentran reflejadas en la tabla III.1. (Anexos).

La identificación fue realizada por medio de pruebas bioquímicas (Poveda, 1998) y por una PCR específica (Hotzel y cols., 1996) y sometidas al menor número posible de países.

### **III.2.2.- Antimicrobianos empleados**

En los estudios de susceptibilidad se emplearon 15 antimicrobianos pertenecientes a diversas familias. El ácido nalidíxico, cloranfenicol, eritromicina, tilosina, gentamicina, estreptomina, oxitetraciclina y clortetraciclina fueron obtenidos de Serva (Serva, Heidelberg, Alemania), mientras el norfloxacin, ciprofloxacino, enrofloxacin, eritromicina, espectinomina, lincomicina, doxiciclina y espiramicina lo fueron de Sigma (Sigma, St. Louis, EEUU).

Todos los antimicrobianos fueron obtenidos en polvo, a excepción de la tilosina que se presentaba en una solución de PBS. Las soluciones madre se prepararon como se ha descrito en el capítulo anterior y se almacenaron a 4°C como máximo una semana. Las soluciones madre de tetraciclinas y cloranfenicol se prepararon frescas cada vez que se utilizaron.

Este panel de antimicrobianos cubre diversas familias distintas, englobando algunos agentes cuya utilización en veterinaria no se utilizan o están prohibidos (como el ácido nalidíxico y el cloranfenicol) y otros de poca utilización para el tratamiento de la agalaxia contagiosa, como los aminoglucósidos. El objetivo de este panel es permitir la realización de una lectura interpretada del antibiograma; la caracterización fenotípica de una resistencia nos permitirá suponer qué mecanismos de resistencia podrían estar presentes sin necesidad de estudios moleculares, aunque para una identificación de los mismos se realizarán otras técnicas (Courvalin, 1996; Moreno, 2002).

### III.2.3.- Determinación de las CMI

Las CMI fueron determinadas en placas de microdilución de 96 pocillos de fondo plano (SARSTEDT) como se describió en el capítulo anterior. Las pruebas se realizaron en duplicado y en días separados con diferentes soluciones madre. El rango utilizado para las fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas fue de 0,015-2 µg/ml, para el cloranfenicol y lincomicina de 0,03-4 µg/ml, para los aminoglucósidos de 1-128 µg/ml y para el ácido nalidíxico de 4-512 µg/ml.

### III.3.- Resultados

Los resultados relativos a la CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y rango de CMI en las cepas de campo y de referencia se encuentran en la tabla III.2. (Anexos). La figura III.1. (Anexos) muestra una placa de microdilución en el día de la lectura.

Los macrólidos tilosina y eritromicina demostraron ser los más eficaces *in vitro*, con CMI<sub>50</sub> de 0,03 µg/ml y rangos de 0,015-0,125 y 0,03-0,06 µg/ml respectivamente. Ligeramente menos eficaces doxiciclina y ciprofloxacino, ambos con una CMI<sub>50</sub> de 0,06 µg/ml y rangos de 0,03-0,06 y 0,06-0,125 µg/ml respectivamente.

Por orden decreciente de potencia enrofloxacino, oxitetraciclina, espiramicina, lincomicina, norfloxacino, clortetraciclina y cloranfenicol también presentaron una buena eficacia frente a MmmLC, con los valores de CMI<sub>50</sub> iguales o inferiores a 2 µg/ml.

La espectinomicina, estreptomina, gentamicina y ácido nalidíxico demostraron ser los menos eficaces, con valores de CMI<sub>50</sub> bastante elevados.

#### III.4.- Discusión

Una de las características más notorias de los micoplasmas es la ausencia de pared celular, y una de las implicaciones de esta particularidad estructural es la ineficacia de agentes antimicrobianos cuya diana sea la pared celular, como los glucopéptidos, beta-lactámicos y penicilinas (Bébéar, 1996; Bébéar y Pereyre, 2005). Su ARN polimerasa es también resistente a la inhibición por parte de la rifampina (Razin y cols., 1998). Así, antimicrobianos como las quinolonas, que interfieren con la replicación del ADN o las tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos o anfenicoles, que interfieren con la síntesis proteica, son los que han sido utilizados con mayor eficacia sobre diversas especies de micoplasma de interés veterinario (Hannan, 2000).

Este estudio valora la eficacia de estos antimicrobianos sobre *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, y concuerda con los resultados obtenidos anteriormente por otros autores (Kidanimariam y cols., 2005; Al-Momani y cols., 2006), los cuales han demostrado la eficacia *in vitro* de antimicrobianos como el cloranfenicol, enrofloxacino, oxitetraciclina, espiramicina, tilosina y eritromicina sobre MmmLC.

La eritromicina y tilosina demostraron poseer el efecto inhibitorio *in vitro* más potente entre todos los antimicrobianos probados. La doxiciclina, ciprofloxacino, enrofloxacino, oxitetraciclina, espiramicina, lincomicina, norfloxacino, clortetraciclina y cloranfenicol también demostraron poseer un buen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células bacterianas.

Se observaron diferencias en las CMI<sub>90</sub> de diversos antimicrobianos en relación a las descripciones realizadas anteriormente en MmmLC por otros autores (Kidanimariam y cols., 2005; Al-Momani y cols., 2006). Hemos observado valores inferiores en relación a los descritos para la espiramicina, cloranfenicol, eritromicina y tilosina. Los valores que hemos obtenido en relación a la oxitetraciclina y enrofloxacino son inferiores a los comunicados en el primer trabajo, pero iguales a los del segundo.

La oxitetraciclina demostró una CMI<sub>90</sub> superior a la previamente descrita en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony (MmmSC), mientras la eritromicina y el cloranfenicol poseían la misma actividad en ambos biotipos coincidiendo con la descripción previa en el trabajo de Ayling y cols., 2005. Sin embargo, el rango en MmmLC era más estrecho, indicando menos variabilidad en los valores de la CMI con respecto a MmmSC.

Por otro lado, el ácido nalidíxico, gentamicina, estreptomicina y espectinomicina presentaron las CMI<sub>90</sub> más elevadas (512, 64, 64 y 16 µg/ml respectivamente), coincidiendo con descripciones anteriores en otras especies (Lee y cols., 1987; Bébéar y cols., 1997; Ayling y cols., 2005).

MmmLC y MmmSC pertenecen al grupo *spiroplasma*, que incluye otras especies como *Mycoplasma putrefaciens* también conocidas por tener una baja susceptibilidad a los aminoglucósidos (Antunes y cols., 2007b). Puesto que otras especies de micoplasmas son susceptibles a los aminoglucósidos (Hannan, 2000; Vicca y cols., 2004) se puede sugerir la presencia de una resistencia intrínseca a los mismos, aunque habría que realizar otros estudios complementarios para confirmar esta hipótesis.

El antibiograma de todas las cepas resultó bastante semejante, demostrando la inexistencia de resistencias adquiridas a cualquier de los antimicrobianos probados. El estrecho rango de las CMIs obtenidas y la semejanza con las CMIs sobre la cepa de referencia son datos que confirman la inexistencia de resistencias adquiridas. Sería de prever la existencia de cepas resistentes a alguno de los agentes, aunque en baja prevalencia, puesto que es común encontrar cepas de otras especies de micoplasmas resistentes en otros trabajos (Benkirane y Amghar, 1990; Ter Laak y cols., 1991; Ter Laak y cols., 1993; Hannan y cols., 1997; Vicca y cols., 2004; Antunes y cols., 2007a; Antunes y cols., 2007b). Esto se puede explicar debido a dos motivos aparentes: las producciones de cerdos, aves o vacuno suelen ser en régimen intensivo en los que la gran utilización de antimicrobianos implica una gran presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, seleccionando con mayor facilidad cepas resistentes, mientras

la producción de pequeños rumiantes en España es más bien en un sistema extensivo o semi-intensivo; el otro factor es que durante muchos años fue frecuente la incorporación de antimicrobianos como promotores de crecimiento en cerdos y aves, mientras en rumiantes esto no es posible por su sistema digestivo.

Actualmente las fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos son los antimicrobianos más comunes en el tratamiento de los casos de agalaxia contagiosa. Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que su utilización en infecciones por MmmLC es factible de tener efectos positivos en el tratamiento de las mismas. Estos resultados pueden servir de referencia para futuros tratamientos, aunque el clínico tenga que tener en consideración que las susceptibilidades obtenidas *in vitro* no tienen porque ser las mismas en situaciones reales, puesto que existen factores que pueden influir en el efecto de los mismos. Aunque no se haya probado un gran número de cepas y puesto que ninguna de las cepas estudiadas presentaba un antibiograma que pudiera sugerir la presencia de cualquier resistencia adquirida, podemos suponer que la prevalencia de cepas salvajes de MmmLC resistentes no será alta en España.

**Anexo de tablas y figuras**

<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>Tejido afectado</b>	<b>Año de aislamiento</b>
<b>Y-Goat</b>	Australia	Exudado peritoneal de cabra	1956
<b>COST B</b>	COST ACTION 826	Desconocido	desconocido
<b>SN3 (51)</b>	San Nicolás de T	Leche	2001
<b>2 / 93</b>	Ciudad Real	Pulmón	1993
<b>153 / 93</b>	Las Palmas de GC	Pulmón	1993
<b>207 / 93</b>	Tejeda	Pulmón	1993
<b>6B</b>	Gran Canaria	Pulmón	1993
<b>EPMY-6-01</b>	Ingenio	Leche	2000
<b>GA1 (57)</b>	Gáldar	Leche	2001
<b>N5 (58)</b>	Gran Canaria	Leche	2002
<b>EPMY -2-02</b>	Gran Canaria	Leche	2002
<b>AG1</b>	Agüimes	Leche	2001
<b>TE2 (61)</b>	Telde	Leche	2002
<b>TE3</b>	Telde	Leche	2002
<b>IN1</b>	Ingenio	Leche	2001
<b>IN3</b>	Ingenio	Leche	2001
<b>EPMY-2-00 (65)</b>	Tenerife	Leche	2000
<b>Mur1</b>	Murcia	Leche	1998

**Tabla III.1.-** Origen de las cepas utilizadas.

Antimicrobiano	Cepas de campo (n= 17)			Y-Goat
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango	CMI
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
<b>Nal</b>	256	512	128-512	256
<b>Nor</b>	0,5	1	0,5-1	0,5
<b>Cip</b>	0,06	0,125	0,06-0,125	0,06
<b>Enr</b>	0,125	0,125	0,06-0,125	0,06
<b>Cf</b>	1	2	1-2	1
<b>Clf</b>	1	1	0,5-1	1
<b>Oxt</b>	0,250	0,250	0,125-0,250	0,250
<b>Dox</b>	0,06	0,06	0,03-0,06	0,06
<b>Er</b>	0,03	0,06	0,015-0,125	0,06
<b>Til</b>	0,03	0,06	0,03-0,06	0,03
<b>Spi</b>	0,125	0,250	0,125-0,250	0,125
<b>Gm</b>	32	64	16-64	32
<b>Str</b>	16	64	8-64	16
<b>Spt</b>	16	16	8-16	8
<b>Lin</b>	0,250	0,5	0,125-0,5	0,5

**Tabla III.2.-** CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y rango de CMIs. Nal- ácido nalidixico, Nor- norfloxacino, Cip- ciprofloxacino, Enr- enrofloxacino, Cf- cloranfenicol, Clf- clortetraciclina, Oxt- oxitetraciclina, Dox- doxiciclina, Er- eritromicina, Til- tilosina, Spi- espiramicina, Spi- espiramicina, Gm- gentamicina, Str- estreptomycinina, Spt- espectinomicina, Lin- lincomicina..



**Figura III.1.-** Ejemplo de un antibiograma. Cada línea corresponde a un antimicrobiano diferente y cada columna a una dilución doble del antimicrobiano, disminuyendo de la izquierda a la derecha. En amarillo los pocillos donde hay crecimiento y en rojo aquellos en los que el crecimiento fue inhibido.

### Bibliografía

**Al-Momani, W., Nicholas, R.A.J., Janakat, S., Abu-Basha. E., Ayling, R.D.**, 2006. The *in vitro* effect of six antimicrobials against *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* isolated from sheep and goats in Jordan. Trop. Anim. Health Pro. **38(1)**:1-7

**Antunes, N.T., Tavío, M.M., Assunção, P., Rosales, R.S., Poveda, C., de la Fé, C., Gil, M.C., Poveda, J.B.**, 2007a. *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. Vet. J. *In prensa*.

**Antunes, N.T., Tavío, M.M., Mercier, P., Ayling, R.D., Al-Momani, W., Assunção, O., Rosales, R.S., Poveda, J.B.**, 2007b. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma putrefaciens* field isolates. Antimicrob. Agents Chemother. *In prensa*.

**Assunção, P., De la Fé, C., Ramírez, A.S., Andrada, M., Poveda, J.B.**, 2004. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. Vet. Rec. **154(22)**:684-7.

**Ayling, R.D., Bisgaard-Frantzen, S., March, J.B., Godinho, K., Nicholas, R.A.J.**, 2005. Assessing the *in vitro* effectiveness of antimicrobials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type to reduce contagious bovine pleuropneumonia infection. Antimicrob. Agents Chemother. **49(12)**:5162-5.

**Bébéar, C.M., Bové, J. M., Bébéar, C., Renaudin, J.**, 1997. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **41(2)**:269-73.

**Bébéar, C.**, 1996. Introductory remarks, p 181-183, vol. II. *In* Tully J.G. & Razin, S (Eds). Molecular diagnostic procedures in mycoplasmaology. Academic Press, Inc., San Diego.

**Benkirane, A., Amghar, S.**, 1990. In vitro antibiosensitivity of different strains of *Mycoplasma capricolum*. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. **43(4)**:453-5.

**Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F.**, 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev. Sci. Tech. **16(3)**:848-73.

**Courvalin, P.**, 1996. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). Clin. Microbiol. Infect. **Suppl 1**:S26-S34.

**Evans, R.D., Trites, J.D., Cochrane, R.L.**, 2002. Field evaluation of tylosin premix in layers previously vaccinated with a live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. Avian Dis. **46(1)**:208-14.

**Fiorentin, L., Soncini, R.A., da Costa, J.L., Mores, M.A., Trevisol, I.M., Toda, M., Vieira, N.D.**, 2003. Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatment directed to control *Escherichia coli*. Avian Pathol. **32(2)**:213-6.

**Furneri, P.M., Rappazzo, G., Musumarra, M.P., Di Pietro, P., Catania, L.S., Roccasalva, L.S.**, 2001. Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis*. Antimicrob. Agents Chemother. **45(10)**:2958-60.

**Hannan, P.C., Windsor, G.D., de Jong, A., Schmeer, N., Stegemann, M.**, 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **41(9)**:2037-40.

**Hannan, P.C.**, 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. Vet. Res. **31(4)**:373-95.

**Hotzel H, Sachse K, Pfutzner H.**, 1996. A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Vet. Microbiol.* **49(1-2)**:31-43.

**Kidanemariam A, Gouws J, van Vuuren M, Gummow B.**, 2005. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma mycoides mycoides* large colony and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from clinical cases of ulcerative balanitis and vulvitis in Dorper sheep in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **76(4)**:204-8.

**Kirchhoff, H., Rosengarten, R.**, 1984. Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2439-2445.

**Lee, D.H., Miles, R.J., Inal, J. R.**, 1987. Antibiotic sensitivity and mutation rates to antibiotic resistance in *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*. *Epidemiol. Infect.* **98(3)**:361-8.

**Loria, G.R., Sammartino, C., Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D.**, 2003. *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res. Vet. Sci.* **75(1)**:3-7.

**Moreno, R. C**, 2002. Lectura interpretada del antibiograma: ¿Ejercicio intelectual o necesidad clínica? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **20(4)**: 176-85

**Poveda, J.B.**, 1998. Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *Methods. Mol. Biol.* **104**: 69-78.

**Razin, S., Yogev, D., Naot, Y.**, 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62(4)**:1094-156.

**ter Laak, E.A., Noordergraaf, J.H., Verschure, M.H.**, 1993. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(2)**:317-21.

**Ter Laak, E.A., Pijpers, A., Noordergraaf, J.H., Schoevers, E.C., Verheijden, J.H.,** 1991 Comparison of methods for in vitro testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(2)**:228-33.

**Vicca J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J. , de Kruif, A., Haesebrouck, F.,** 2004. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(11)**:4470-2.

## ***Capítulo IV***

---

## **IV.- Obtención de mutantes y estudio de los mecanismos de resistencia a las quinolonas**

### **IV.1.- Introducción**

Las quinolonas son moléculas de origen sintético muy potentes sobre los micoplasmas. Aunque naturalmente sensibles a las fluoroquinolonas, los micoplasmas son capaces de desarrollar mecanismos que les permiten la supervivencia cuando entran en contacto con ellas. Las mutaciones en las topoisomerasas bacterianas y el aumento de la expresión de sistemas de expulsión son los mecanismos conocidos en micoplasmas, aunque en otras especies bacterianas las alteraciones en la permeabilidad de la membrana y la resistencia mediada por plásmidos también han sido descritos (Raheison y cols., 2002; Bébéar y Pereyre, 2005; Van Bambeke y cols., 2005).

El estudio de estos mecanismos puede ser realizado sobre aislados clínicos que presenten un fenotipo de resistencia o sobre mutantes obtenidos *in vitro*. La obtención de mutantes *in vitro* presenta algunas ventajas, puesto que no siempre es fácil el aislamiento de cepas resistentes a partir de muestras clínicas. Asimismo el estudio de mutantes obtenidos *in vitro* nos permite inferir datos sobre los mecanismos de resistencia al poder compararlos con sus cepas de origen. Aún así, siempre resulta interesante la comparación de los mecanismos de resistencia en cepas clínicas y obtenidas *in vitro*, puesto que en estudios realizados en otras bacterias hay diferencias a nivel de las mutaciones entre los dos (Ruiz, 2003). Otro factor que resulta muy interesante en la selección de mutantes *in vitro*, es la posibilidad de determinar la importancia de cada mutación en el incremento de la resistencia, puesto que cada aminoácido suele tener un efecto particular (Ruiz, 2003).

Como se ha referido anteriormente uno de los mecanismos de resistencia a las quinolonas son los sistemas de expulsión activa, que se hallan descritos en bacterias gramnegativas, grampositivas, micobacterias y micoplasmas (Poole, 2000a; Poole, 2000b; Raheison y cols., 2002).

Estos sistemas se componen por una o más proteínas, que de una forma dependiente de energía excretan una amplia variedad de sustancias hacia el exterior de la célula sin alterarlos o degradarlos (Kumar y Schweizer, 2005). Dependiendo de su estructura, pueden poseer afinidad solamente por un tipo de molécula o ser capaces de excretar sustancias tan diferentes como diversas clases de antimicrobianos, desinfectantes y metales, también denominados sistemas de expulsión multi-drogas (Levy, 2002; Poole, 2005). Aunque los últimos sean poli-específicos, su eficiencia depende del sustrato en cuestión (Neyfakh, 2002).

Los sistemas de expulsión multi-drogas suelen estar codificados en el cromosoma bacteriano y la resistencia que resulta de la sobre-expresión de los mismos puede ser debida a inducción y/ o mutación, lo que contrasta con los más específicos, que aunque originarios de especies productoras de antimicrobianos se pueden encontrar en plásmidos o transposones (Poole, 2000a; Van Bambeke y cols., 2000; Levy, 2002). Esto está de acuerdo con la teoría de que los sistemas más específicos son resultantes de selección natural mientras los multi-drogas son parte intrínseca de las bacterias y son utilizados en un gran número de funciones fisiológicas bacterianas (Poole, 2005). Estos sistemas multi-drogas son capaces de conferir resistencia a las quinolonas en microorganismos gramnegativos exhibiendo además una gran variedad de sustratos (Poole, 2000a). En los grampositivos, la contribución de los sistemas de expulsión multi-drogas en la resistencia a otros antimicrobianos diferentes de las quinolonas existe pero es bastante limitada, aunque comparten los demás sustratos con los sistemas de los gramnegativos (Poole, 2000b).

En micoplasmas la contribución de los sistemas de expulsión a la múltiple resistencia no está del todo clara. Hasta el momento solamente se ha caracterizado un sistema de expulsión aparentemente del tipo ABC, que además de poseer las quinolonas como sustrato excreta eficazmente bromuro de etidio, colorantes y desinfectantes pero no otros antimicrobianos no relacionados (Raheison y cols., 2002). Este comportamiento es semejante al de los sistemas de expulsión de los microorganismos grampositivos y puede ser resultado de su relación filogenética (Woese y cols., 1980). A semejanza de lo

que sucede en otras especies bacterianas, la eficacia del sistema de expulsión descrito no era igual para todas las quinolonas estudiadas, siendo el ciprofloxacino mucho mejor sustrato que el pefloxacino o el moxifloxacino (Raheison y cols. 2002).

Según donde obtengan su fuente de energía, los sistemas de expulsión se pueden dividir en dos grandes grupos: los que la obtienen por medio del gradiente protónico o los que la obtienen por medio de la hidrólisis del ATP (Van Bambeke y cols., 2005). La utilización de diferentes fuentes de energía e inhibidores puede ayudar a definir cuál es el requerimiento energético para el transporte (Levy, 1992).

La estructura de los sistemas de expulsión puede variar según se trate de un microorganismo grampositivo o gramnegativo. Los sistemas de expulsión en grampositivos están constituidos por un único componente, localizado en la membrana citoplasmática. En gramnegativos, por la presencia de la membrana externa su estructura es algo más compleja, poseyendo en general 3 componentes: una bomba de expulsión en la membrana interna, la cual se conecta por medio de una proteína de ligación/ fusión a otra proteína en la membrana externa, que actúa como un canal (Levy, 2002; Kumar y Schweizer, 2005). Todavía no se ha estudiado la estructura de los sistemas de expulsión de los micoplasmas, pero por sus características estructurales todo apunta a que estén constituidos solamente por un componente, a semejanza de los encontrados en microorganismos grampositivos.

Los sistemas de expulsión activa no son por sí solos capaces de provocar una resistencia clínica. Su importancia reside en el hecho de que se asocian con otros mecanismos de resistencia, potenciándose entre sí. Esto tiene particular importancia en cepas con una resistencia baja-moderada. Al bajar la concentración intracelular del antimicrobiano facilitan la selección de mutaciones que confieran resistencias más elevadas, permitiendo así la aparición de cepas mucho más resistentes (Van Bambeke y cols., 2005). Esto es evidente en cepas que exhiben el fenotipo MAR (Múltiple Resistencia a Antimicrobianos), en el que los sistemas de expulsión activa son

considerados como uno de los primeros pasos para la adquisición de una resistencia importante (Levy, 2002; Randall y Woodward, 2002).

El otro mecanismo de resistencia a las quinolonas conocido en micoplasmas son las mutaciones en las topoisomerasas.

Para que las quinolonas ejerzan su actividad bactericida necesitan la interacción con las topoisomerasas bacterianas. La afinidad entre las quinolonas y las topoisomerasas es variable; mientras en microorganismos gramnegativos existe una mayor afinidad por la topoisomerasa II, en grampositivos es algo más complejo y variable (Sanders, 2001). En micoplasmas, a semejanza de lo que ocurre con los grampositivos, teniendo como base donde ocurre la primera mutación, la diana principal parece depender de la quinolona y de la especie de micoplasma en cuestión.

En *Mycoplasma pneumoniae* el levofloxacin y el moxifloxacin tienen como diana principal la topoisomerasa II, el esparfloxacin y el ciprofloxacin la topoisomerasa IV es la diana principal y el gemifloxacin parece tener la misma afinidad por las dos enzimas (Gruson y cols., 2005). En *Mycoplasma hominis* el levofloxacin, el pefloxacin, el ciprofloxacin, trovafloxacin, ofloxacin y gatifloxacin tienen especial apetencia por la topoisomerasa IV mientras el esparfloxacin la tiene por la topoisomerasa II. A semejanza de *Mycoplasma pneumoniae*, el gemifloxacin parece no tener una diana principal definida (Bébéar y cols., 1998; Gushchin y cols., 1999; Kenny y cols., 1999; Bébéar y cols., 2000b; Gruson y cols., 2005). En *Mycoplasma bovirhinis* el enrofloxacin tiene como diana principal la subunidad C de la topoisomerasa IV mientras en *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* su diana principal es la topoisomerasa II (Reinhardt y cols., 2002b; Hirose y cols. 2004; Le Carrou y cols., 2006a). La topoisomerasa IV es también la diana principal del marbofloxacin en *Mycoplasma hyopneumoniae* (Le Carrou y cols., 2006b).

El conocimiento de la diana principal de una quinolona, así como de las mutaciones que suele implicar, es importante para fines terapéuticos y para retrasar al

máximo la aparición de cepas resistentes. Es sabido que hay mutaciones cuyo efecto en la CMI de determinadas quinolonas es silencioso, mientras en otras se observan aumentos modestos en las CMIs y que la existencia de mutaciones múltiples tiene un efecto todavía más complejo (Thomson, 2000). La importancia de este fenómeno fue descrito en *Staphylococcus aureus*; mutaciones en *gyrA* y *gyrB* no hacían variar la CMI del ciprofloxacino, norfloxacino y esparfloxacino, mientras las mutaciones en *griA* aumentaban la CMI del norfloxacino y del ciprofloxacino 16 y 4 veces respectivamente, sin alterar la del esparfloxacino. No obstante, la combinación de una mutación en *gyrA* o *gyrB* con una en *griA* aumentaba la CMI de esparfloxacino 128 veces, manteniéndose la CMI del norfloxacino y ciprofloxacino en los mismos valores que los alcanzados con solamente la mutación en *griA* (Fournier y Hooper, 1998). La evolución para una resistencia clínica es determinada por la potencia intrínseca de la quinolona frente a la cepa salvaje, por su concentración en el punto de infección y por el número de mutaciones necesarias para que la disminución de susceptibilidad exceda las concentraciones de droga en ese punto. El conocimiento de estos datos puede permitir la selección de la quinolona más efectiva para una infección dada y con menor capacidad de seleccionar resistencias (Sanders, 2001).

Puntualmente ocurren mutaciones en las denominadas regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDR) de las topoisomerasas que implican cambios de aminoácidos. Diferentes aminoácidos en la misma posición suelen resultar en diferentes niveles de susceptibilidad, lo que demuestra que la CMI final es función de mecanismos específicos de sustitución (Ruiz, 2003). En bacterias grampositivas y gramnegativas las mutaciones en las posiciones 80 y 84 de *parC* y 83 y 87 de *gyrA* son las más frecuentes y de mayor importancia; se piensa que las posiciones 83 y 80 interaccionan con el radical en la posición 1 de la quinolona, mientras las 87 y 84 lo hacen con el radical de la posición 7; cambios de aminoácido implicarían cambios en la afinidad por la quinolona. Mutaciones en otros puntos afectarían la estructura de toda la proteína afectando así la interacción con las quinolonas (Ruiz, 2003).

En micoplasmas están descritas y caracterizadas varias mutaciones asociadas a la adquisición de resistencia a las quinolonas:

- *gyrA*: mutaciones en las posiciones 81, 83, 84, 87 y 119 (numeración *Escherichia coli*) están asociadas a incrementos de 2-64 veces de las CMI's quinolonas como el ciprofloxacino, esparfloxacino, norfloxacino, ofloxacino y enrofloxacino. Las posiciones 83 y 87 son las más importantes en el desarrollo de resistencias en *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma gallisepticum* (Bébéar y cols., 1998; Bébéar y cols., 2000b; Reinhardt y cols., 2002b; Gruson y cols., 2005).
- *gyrB*: ocurren en las posiciones 447, 464 y 466 y están asociadas a aumentos de 1-8 veces de las CMI's de enrofloxacino, ciprofloxacino, esparfloxacino y levofloxacino en *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma pneumoniae* (Reinhardt y cols., 2002b; Gruson y cols., 2005).
- *parC*: mutaciones en las posiciones 78, 80, 81, 83 y 84 están asociadas a incrementos de 2-64 veces en las CMI's de las quinolonas enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, esparfloxacino entre otras. Las posiciones 80 y 84 parecen ser particularmente importantes en *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma bovirhinis* y *Mycoplasma gallisepticum* (Bébéar y cols., 1998; Bébéar y cols., 2000a; Bébéar y cols., 2000b; Reinhardt y cols., 2002b; Hirose y cols., 2004; Gruson y cols., 2005).
- *parE*: están descritas mutaciones en las posiciones 426, 439, 440, 458, 460, 463 y 467 que están asociadas a aumentos de 2-32 veces de las CMI's de quinolonas como el enrofloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino en *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* y

*Mycoplasma gallisepticum* (Bébéar y cols., 1998; Bébéar y cols., 2000b; Reinhardt y cols., 2002a; Reinhardt y cols., 2002b; Gruson y cols., 2005).

Estas mutaciones no afectan por igual a todas las quinolonas, pudiendo algunas de ellas incluso no sufrir variaciones en la susceptibilidad (Bébéar y cols., 2000b; Gruson y cols., 2005). Ocasionalmente se hallan mutaciones cuya relación con el incremento en la resistencia a quinolonas no está del todo clara, como en la posición 134 de *parC* de *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 2003) o que llevan a aumentos en la susceptibilidad como las encontradas en las posiciones 69 y 73 de *parC* de *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 1998).

Así, y puesto que no existe ningún tipo de estudio sobre los mecanismos implicados en la resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC), nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Selección *in vitro* de mutantes resistentes a las fluoroquinolonas empleando norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin como agentes selectores, para posteriores estudios de mecanismos de resistencia.
2. Evaluación de cambios en la susceptibilidad de los mutantes seleccionados a antimicrobianos no relacionados.
3. Determinación del efecto de inhibidores de sistemas de expulsión activa en la sensibilidad de los mutantes seleccionados a las fluoroquinolonas.
4. Observación de cambios en la expresión de las proteínas de membrana citoplasmática de los mutantes seleccionados.
5. Diseño de primers específicos para las QRDR de los 4 genes implicados en la resistencia a las quinolonas (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) para posterior amplificación y secuenciación.

6. Observación de la evolución cronológica de las mutaciones a lo largo de los distintos procesos de selección.
7. Relacionar las mutaciones con cambios en la susceptibilidad a las quinolonas.
8. Determinar la diana principal del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin.

## **IV.2.- Material y métodos**

### **IV.2.1.- Cepas utilizadas**

Se utilizaron las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, obtenidas a partir de muestras clínicas, para la selección de mutantes. Estas cepas son sensibles al norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin como previamente determinamos en el capítulo anterior. Para la selección con norfloxacin se utilizó el rango de 0,125-256 µg/ml para todos los escalones, mientras para el ciprofloxacino y enrofloxacin se utilizó el rango 0,03-64 µg/ml para los 3 primeros escalones y posteriormente de 0,125-256 µg/ml.

Para el estudio del efecto de los inhibidores de los sistemas de expulsión activa sobre la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin, análisis de las proteínas de membrana y secuenciación de las QRDR se utilizaron además de las cepas madre un clon por escalón selectivo (Tabla IV.14.).

### **IV.2.2.- Antimicrobianos empleados**

Se emplearon como agentes selectivos el norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino. Para el antibiograma se utilizaron también la oxitetraciclina, la eritromicina y el cloranfenicol.

Las soluciones madre se prepararon como previamente se ha descrito y se almacenaron a 4° C un máximo de una semana. Las soluciones madre de oxitetraciclina y cloranfenicol se prepararon cada vez que se utilizaron.

#### **IV.2.3.- Selección *in vitro* de mutantes resistentes a quinolonas**

Esta selección se realizó por medio de pases sucesivos en concentraciones suprainhedorias del agente selector.

En un primer escalón, las CMI de los agentes selectores sobre las cepas originales (cepas madre), fueron determinadas y registradas. Posteriormente, los 200 µl del último pocillo en el que había crecimiento fueron inoculados en un tubo de medio PH con la misma concentración del antimicrobiano existente en el pocillo, el cual fue incubado durante 24h a 37°C. El cultivo obtenido de este modo constituye un escalón selectivo, en este caso el primero. El proceso se repitió hasta obtener diez escalones selectivos (según el procedimiento adaptado de Bébéar y cols., 1997).

#### **IV.2.4.- Estudio del antibiograma de los mutantes**

Se eligieron al azar dos procesos selectivos por cada cinco realizados con una quinolona. De las selecciones realizadas con norfloxacino se eligieron las cepas 51 (51-Nor) y 57 (57-Nor); con ciprofloxacino la 51 (51-Cip) y 61 (61-Cip) y de las seleccionadas con enrofloxacino la 57 (57-Enr) y 58 (58-Enr).

Para la obtención de los clones se realizó el crecimiento de cada cepa en medio suplementado con el antimicrobiano utilizado para su selección y correspondiente a la mitad de la CMI para cada escalón selectivo. Se sembró en medio PH sólido y se

eligieron dos colonias al azar que fueron cultivadas separadamente en medio PH líquido con la mitad de la CMI de ese escalón, que fueron denominadas clon 1 y clon 2.

Para el estudio del antibiograma se utilizó un cultivo fresco de cada uno de los clones en medio de PH normal. Las CMIs se determinaron como se ha descrito anteriormente.

#### **IV.2.5.- Estudio de la presencia de sistemas de expulsión activa**

##### **IV.2.5.1.- Inhibidores de los sistemas de expulsión activa**

Se determinó las CMIs del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en medio PH normal, así como en presencia de 200  $\mu$ M de CCCP (inhibidor de sistemas expulsión protón-dependientes), 25  $\mu$ g/ml de reserpina y 0,008 mM de ortovanadato (inhibidores de sistemas de expulsión del tipo ATP-dependientes).

Para evaluar el efecto de los diferentes inhibidores en la susceptibilidad de las cepas estudiadas no se siguió la metodología de diluciones dobles. En el norfloxacin, se utilizaron concentraciones de 8, 6, 5, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25  $\mu$ g/ml y 260, 240, 200, 170, 140, 110, 80, 40 y 20  $\mu$ g/ml según el mutante. Para el ciprofloxacino y enrofloxacin se utilizaron diluciones de 0,5, 0,4, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1 y 0,05  $\mu$ g/ml, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 y 2  $\mu$ g/ml y 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20, 10 y 5  $\mu$ g/ml según la CMI de los mutantes a estudiar.

#### **IV.2.5.2.- Estudio de las proteínas de membrana**

##### **IV.2.5.2.1.- Extracción de proteína total**

Se sembró 10 ml de un cultivo con 24h de la cepa estudiar en 250 ml de medio PH con 1/8 de la CMI del antimicrobiano utilizado como agente selector en ese escalón selectivo (en el caso de los mutantes) y se incubó 48h a 37 °C.

Se procedió a la extracción de la proteína total. Se centrifugó el cultivo a 14.000  $\times$ g durante 30 minutos y a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 250 ml de PBS. Se centrifugó bajo las anteriores condiciones de centrifugado y se repitió el procedimiento dos veces más. Se resuspendió el sedimento en 2,5ml de PBS concentrando así la proteína 100 $\times$ .

Se realizó la medida de la concentración proteica con el kit "Total protein kit" según las instrucciones del fabricante.

#### **IV.2.5.2.2.- Partición en fases por Triton X-114**

Este protocolo fue adaptado de Wise y cols., 1996. Se mezcló 10 ml de solución comercial de Triton X-114 con 500 ml de PBS. Se incubó 18 horas a 37 °C. Se recogió la fase inferior de detergente que se había separado de la acuosa y se mezcló otra vez con PBS. Se repitió el proceso hasta 3 veces alcanzando el Triton X-114 una concentración aproximada de 11,4%.

En un vial eppendorf se suspendieron 1-2 mg de la proteína de micoplasma total en 900  $\mu$ l de PBS. Se añadió 100  $\mu$ l de la solución stock de Triton-114. Se mezcló bien evitando la creación de burbujas de aire y se incubó 1-2h a 4°C en un rotor.

Se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 12.000  $\times$ g y a 4°C y se transfirió el sobrenadante para un nuevo vial eppendorf. Se incubó en baño maría a 37°C durante 5 minutos. En este punto la solución se volvió turbia por la condensación de las micelas del detergente. Se centrifugó 3 minutos a 12.000  $\times$ g y a temperatura ambiente, para separar la fase inferior detergente de la superior acuosa.

Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo para su lavado. Se añadió solución de Triton-114 al 10% hasta una concentración final del 1%. Se agitó en vortex e incubó en

hielodurante2-5 minutos. Posteriormente se incubó 5 minutos a 37°C y se centrifugó a temperatura ambiente 3 minutos. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo vial eppendorf y se repitió 3 veces más.

La fase detergente se mantuvo en el vial eppendorf original y se procedió a su lavado. Se añadió PBS hasta el volumen original. Se mezcló vigorosamente en vortex y se incubó en hielo durante 2-5 minutos. Se incubó 5 minutos a 37°C en baño maría. Posteriormente se centrifugó a temperatura ambiente durante 3 minutos y se desechó la fase acuosa superior. Se repitió el lavado 3 veces más. Después del último lavado se desechó la fase superior y se resuspendió la fase detergente a mitad del volumen original.

#### **IV.2.5.2.2.3- Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS)**

Cada una de las fracciones detergente a estudiar fue preparada mezclándola con una solución de lisis a partes iguales y calentándola a 100°C durante 5 minutos, posteriormente fueron colocadas en hielo hasta su distribución en el gel. La cantidad de proteína utilizada por muestra fue de 20 µg por cada 4 mm de pocillo.

La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), con el gel de concentración con 4% de poliacrilamida y el de separación con 10%. Los geles fueron sometidos a una corriente constante de 6,5 mA/gel durante 18 horas en una unidad de electroforesis vertical (Protean II Xi, Bio-Rad), siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970).

La tinción de los geles se realizó con el colorante azul de Coomassie. Se sumergió cada gel en una solución de azul de Coomassie al 0,1% con agitación durante una hora. Posteriormente se decoloró el gel con una solución de decoloración en agitación y hasta que el gel quedara transparente.

La determinación de los pesos moleculares aparentes se realizó en papel logarítmico.

#### IV.2.6.- Extracción de ADN

Se transfirió 100 µl de cada cepa a estudiar a un nuevo vial eppendorf y se añadió 100 µl de solución desnaturalizante. Se mezcló en un vortex y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales se añadió 40 µl de sílica y 800 µl de solución de lisis. Se colocó en un rotor durante 10 minutos en agitación constante (150 rpm). Posteriormente, se agitó en el vortex durante 5 segundos y se centrifugó 15 segundos a 14.000 xg. Se desechó el sobrenadante y se añadió 800 µl de solución de lavado. Se centrifugó y desechó el sobrenadante. Se repitió el lavado otra vez con solución de lavado, dos con etanol al 70% y una con acetona. Se colocó el vial eppendorf con el sedimento durante 10 minutos a 56 °C con la tapa abierta, para eliminar cualquier vestigio de acetona. Se añadió 100 µl de TE y se colocó diez minutos más a 56 °C pero con la tapa cerrada. Se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 xg y se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial eppendorf. El sobrenadante obtenido fue utilizado como ADN molde para las PCR.

#### IV.2.7.- Diseño de los primers

Se diseñó un juego de primers que amplificara cada una de las QRDR utilizando el programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/index.html>) para los emparejamientos y Gene Runner 3.0 (Hastings Software, Inc.) para su elaboración. Se utilizó las secuencias de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small collony type (cepa PG1), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (cepa ATCC 27343), *Mycoplasma gallisepticum* (cepa R), *Mycoplasma hyopneumoniae* (cepa J) y *Escherichia coli* (cepa K12) disponibles en NCBI- Entrez Genome en su diseño.

#### IV.2.7.1- Primer para la QRDR de *gyrA*

Este primer amplifica el gen *gyrA*, entre las posiciones 120 y 374 (Figura IV.4.).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Extensión del primer (pb)
LCGYRA1.1	GAG TGT TAT TGT AAG TCG TGC	21
LCGYRA2.1	GAA CCA AAG TTA CCA TGA CC	20
<b>Extensión fragmento amplificado (pb)</b>		
255		

**Tabla IV.1.-** Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de *gyrA*.

#### IV.2.7.2.- Primer para la QRDR de *gyrB*

Este primer amplifica el gen *gyrB*, entre las posiciones 1210 y 1520 (Figura IV.5.).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Extensión del primer (pb)
LCGYRB1.1	CCA GGT AAG TTA GCA GAT TG	20
LCGYRB2.1	GTT CTA ATG TGA GCA CCA TC	20
<b>Extensión fragmento amplificado (pb)</b>		
311		

**Tabla IV.2.-** Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de *gyrB*.

#### IV.2.7.3.- Primer para la QRDR de *parC*

Este primer amplifica el gen *parC*, entre las posiciones 192 y 367 (Figura IV.6.).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Extensión del primer (pb)
LCPARC1.1	ATC AGC AAG AGT AGT TGG AG	20
LCPARC2.1	CTG TAT AAC GCA TAG CAG C	19
<b>Extensión fragmento amplificado (pb)</b>		
276		

**Tabla IV.3.-** Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de *parC*.

#### IV.2.7.4.- Primer para la QRDR de *parE*

Este primer amplifica el gen *parE*, entre las posiciones 1221-1518 (Figura IV.7.).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Extensión del primer (pb)
LCPARE1.1	GAA ACT AAC ACC AGC TCA AG	20
LCPARE2.1	ATG TGC TCC ATC AGT ATC AG	20
<b>Extensión fragmento amplificado (pb)</b>		
298		

**Tabla IV.4.-** Características del primer utilizado para amplificar la QRDR de *parE*.

#### **IV.2.8.- Amplificación de las QRDR**

Para cada reacción de PCR se mezcló 16,75 µl de agua ultra pura estéril, 1 µl de solución de dNTPs a 10 mM, 1,5 µl de solución de cloruro de magnesio a 50 mM, 2,5 µl de buffer, 0,25 µl de Taq polimerasa 5U/ µl, 1 µl de cada primer en una concentración de 25 mM y 1 µl del ADN a amplificar. Como control positivo se utilizó 1 µl de ADN de la cepa de referencia Y-Goat y como control negativo 1 µl de agua bidestilada estéril.

La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf. Se realizó un ciclo a 95°C para proceder a la activación de la Taq-polimerasa. Posteriormente, un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, un ciclo de hibridación a 50°C durante 45 segundos y otro ciclo de extensión a 72°C durante 45 segundos. Esta combinación se repitió 34 veces más. Para finalizar la PCR se realizó un ciclo a 72°C durante 10 minutos para estabilizar las cadenas de ADN amplificadas.

Para la confirmación de los resultados de la PCR se observó el producto de amplificación en un gel de agarosa al 2 % al cual se añadió una gota de solución de bromuro de etidio. Se utilizó el tampón TBE como constituyente del gel y como tampón para correr la electroforesis. Esta se realizó a un voltaje constante de 80 voltios durante aproximadamente una hora.

#### **IV.2.9.- Secuenciación del producto de la amplificación**

La secuenciación fue realizada en el servicio de genética forense de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria utilizando el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer, procesando las muestras con el software Run 3130xl Data Collection V3.0.

### **IV.3.- Resultados**

#### **IV.3.1.- Evolución de las CMI's a lo largo del proceso de selección**

Se observó el aumento gradual de la CMI del norfloxacinó a lo largo de los diversos escalones selectivos, presentando las 5 cepas una evolución muy semejante. La CMI máxima del norfloxacinó se obtuvo entre los escalones 7 y 9 y fue superior a 256 µg/ml (Tabla IV.5.).

La CMI del ciprofloxacino presentó un incremento gradual en todas las cepas. La CMI máxima obtenida fue superior a 256 µg/ml y se observó entre los escalones selectivos 5 y 9 (Tabla IV.6.), mientras la CMI del enrofloxacinó aumentó a lo largo de los diversos escalones selectivos.

El valor de CMI del enrofloxacinó máximo observado sobre cuatro cepas fue de 64 µg/ml y se observó entre los escalones 5 y 8, mientras se observó un valor de 128 µg/ml sobre la cepa 61 en el séptimo escalón selectivo (Tabla IV.7.).

#### **IV.3.1.2.- Estudio del antibiograma de los mutantes**

##### **IV.3.1.2.1.-Cepa 51 seleccionada con norfloxacinó (51-Nor)**

No se observaron diferencias en la CMI de los clones del mismo escalón superiores a una dilución (Tabla IV.8.).

Se observó el aumento gradual en la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó a lo largo de los distintos escalones selectivos. La CMI del norfloxacinó aumentó por lo menos 128 veces (>256 µg/ml) con respecto a la observada sobre la cepa madre (1 µg/ml). La CMI del ciprofloxacino aumentó 512 veces hasta ES5(32 µg/ml); en el ES6 disminuyó a la mitad (16 µg/ml) en relación al observado en el escalón anterior, volviendo a subir en ES8 (32 µg/ml). La CMI del enrofloxacinó aumentó hasta el ES6, en que su valor en uno de los clones era 256 veces superior (32 µg/ml) en relación

al observado sobre la cepa madre (0,125 µg/ml). En ES7 la CMI disminuyó cuatro veces (8 µg/ml) en relación a la observada en el escalón anterior; en ES9 volvió a subir y a partir de ES9 era 128 veces superior (16 µg/ml) al observado sobre la cepa madre (Tabla IV.8., Gráfico IV.1.).

Las CMIs de la eritromicina y cloranfenicol no sufrieron variaciones con respecto a los valores observados sobre la cepa madre (0,03 y 2 µg/ml respectivamente), aunque se hayan observado algunos clones menos resistentes (0,015 y 1 µg/ml respectivamente). La CMI de la oxitetraciclina disminuyó a la mitad (0,250 µg/ml) comparativamente a lo observado sobre la cepa madre (0,5 µg/ml) a partir del noveno escalón (Tabla IV.8., Gráfico IV.2.).

#### **IV.3.1.2.2.-Cepa 57 seleccionada con norfloxacino (57-Nor)**

No se observaron diferencias en la CMI de los clones del mismo escalón superiores a una dilución (Tabla IV.9.).

La CMI de las tres quinolonas estudiadas aumentó gradualmente y sin variaciones, observándose en el último escalón selectivo, y en relación al observado sobre la cepa madre, un incremento de por lo menos 512 veces en la CMI del norfloxacino (>256 µg/ml), 2048 veces en la del ciprofloxacino (128 µg/ml) y 128 en la del enrofloxacino (16 µg/ml) (Tabla IV.9., Gráfico IV.3.).

Las CMIs de oxitetraciclina y cloranfenicol se mantuvieron igual a lo largo del proceso de selección (0,5 y 2 µg/ml respectivamente), mientras que la CMI de la eritromicina aumentó dos veces (0,06 µg/ml) a partir del séptimo escalón en relación a la observada sobre la cepa madre (0,03 µg/ml) (Tabla IV.9., Gráfico IV.4.).

#### **IV.3.1.2.3.-Cepa 51 seleccionada con ciprofloxacino (51-Cip)**

No se observaron diferencias en la CMI de los clones del mismo escalón superiores a una dilución (Tabla IV.10.).

La CMI del norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino aumentó a lo largo de los diversos escalones selectivos, alcanzando un valor final de por lo menos 256 (>256 µg/ml) y 4096 (>256 µg/ml) veces y 1024 (128 µg/ml) veces superior a la observada en la cepa madre (1, 0,06 y 0,125 µg/ml respectivamente). En ES5 la CMI del enrofloxacino disminuyó 4 veces (64 µg/ml) con respecto a la observada en ES4 (256 µg/ml) (Tabla IV.10., Gráfico IV.5.).

La CMI del cloranfenicol se mantuvo igual a la observada sobre la cepa madre (2 µg/ml), aunque en el sexto escalón selectivo fuera dos veces mayor en los dos clones (4 µg/ml). La CMI de la oxitetraciclina aumentó dos veces (1 µg/ml) con respecto a la original (0,5 µg/ml), observándose ese aumento a partir del séptimo escalón. La CMI de la eritromicina aumentó cuatro veces con respecto a la inicial (0,03 µg/ml), sufriendo el primer aumento en el cuarto escalón (0,06 µg/ml) y posteriormente en el séptimo (0,125 µg/ml) (Tabla IV.10., Gráfico IV.6.).

#### **IV.3.1.2.4.- Cepa 61 seleccionada con ciprofloxacino (61-Cip)**

No se observaron diferencias en la CMI de los clones del mismo escalón superiores a una dilución (Tabla IV.11.).

Se observó un incremento gradual en la CMI de las 3 quinolonas estudiadas a lo largo del proceso de selección. La CMI final de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino fue por lo menos 512 (>256 µg/ml) y 2048 (>256 µg/ml) y 1024 (128 µg/ml) veces superior a la observada sobre la cepa madre (0,5, 0,125 y 0,125 µg/ml respectivamente) (Tabla IV.11., Gráfico IV.7.).

La CMI de la oxitetraciclina y del cloranfenicol aumentó dos veces en relación a la observada sobre la cepa madre (0,250 y 1 µg/ml), alcanzando el valor máximo (0,5 y 2 µg/ml) a partir del cuarto y octavo escalón respectivamente. La CMI de la eritromicina aumentó el doble (0,06 µg/ml) en el quinto escalón, volviendo a duplicarse en el octavo (0,125 µg/ml) en relación al valor obtenido sobre la cepa madre (0,03 µg/ml). En el décimo disminuyó a la mitad (0,06 µg/ml), manteniéndose aún así dos veces superior a la observada inicialmente (Tabla IV.11., Gráfico IV.8.).

#### **IV.3.1.2.5.- Cepa 57 seleccionada con enrofloxacin (57-Enr)**

No se observaron diferencias en la CMI de los clones del mismo escalón superiores a una dilución a excepción del norfloxacin y ciprofloxacino en escalón 10 (Tabla IV.12.).

Las CMIs de ciprofloxacino y enrofloxacin aumentaron hasta el final del proceso de selección, alcanzando valores 512 veces (32 y 64 µg/ml respectivamente) superiores a los observados en la cepa madre (0,06 y 0,125 µg/ml). La CMI de norfloxacin aumentó 256 veces hasta el quinto escalón (128 µg/ml), bajando cuatro veces en el sexto (32 µg/ml) y retomando la subida posteriormente hasta un valor final 256 veces (128 µg/ml) superior al observado sobre la cepa madre (0,5 µg/ml) (Tabla IV.12., Gráfico IV.9.).

La CMI de la eritromicina (0,015 µg/ml) y cloranfenicol (1 µg/ml) disminuyó a la mitad en el cuarto escalón en relación al observado sobre la cepa madre (0,03 y 2 µg/ml respectivamente). Los valores de CMI de la oxitetraciclina disminuyeron a la mitad (0,250 µg/ml) en ES4 en relación al valor original (0,5 µg/ml), y a partir del sexto la CMI sobre un mutante por escalón disminuyó (0,125 µg/ml) a la mitad en relación a ES4 (Tabla IV.12., Gráfico IV.10.).

#### **IV.3.1.2.6.-Cepa 58 seleccionada con enrofloxacin (58-Enr)**

No se observaron diferencias en la CMI de los clones del mismo escalón superiores a una dilución a excepción de norfloxacin y ciprofloxacino en el sexto escalón (Tabla IV.13.).

La CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin alcanzó una CMI final superior en 256 (128 µg/ml), 1024 (64 µg/ml) y 512 (64 µg/ml) veces superior a la original (0,5, 0,06 y 0,125 µg/ml respectivamente). El norfloxacin registró un valor de CMI por lo menos 512 (>256 µg/ml) veces superior al observado sobre la cepa madre en ES6. También en ES6 se observó una CMI del ciprofloxacino 2048 (128) veces superior a la original en el clone 1 (Tabla IV.13., Gráfico IV.11.).

Se observaron algunos clones en los que las CMIs de la oxitetraciclina (0,250 µg/ml) y cloranfenicol (1 µg/ml) eran dos veces inferiores a los observados sobre la cepa madre (0,5 y 2 µg/ml respectivamente), y otros en la que la CMI de la eritromicina era doble (0,03 µg/ml) con respecto a la observada sobre la cepa madre (0,015 µg/ml) (Tabla IV.13., Gráfico IV.12.).

#### **IV.3.2.- Inhibidores de los sistemas de expulsión activa**

##### **IV.3.2.1.- Mutantes seleccionados con norfloxacin**

No se observaron diferencias en las CMIs de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin sobre ninguna de la cepa madre o mutantes derivados cuando eran determinadas en presencia de CCCP en relación con las observadas en medio PH normal no suplementado con el inhibidor de gradiente protónico (Tablas IV.15.-IV.16.)

La determinación de las CMIs de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en presencia de los inhibidores reserpina y ortovanadato nos permitió observar un descenso de su valor entre 1,05 y 2,40 veces en la mayoría de los mutantes; solamente en ES4 no

se observó cualquier variación en el valor de la CMI del norfloxacin. El efecto del ortovanadato sobre la CMI del norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino fue superior entre 0,05 y 1,4 veces al de la reserpina; la utilización de la reserpina no afectó a la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en algunos de los mutantes. No hubo diferencias en el efecto del ortovanadato y de la reserpina sobre la CMI del ciprofloxacino en la cepa madre. La CMI del ciprofloxacino en el mutante de ES10 cuando era determinada en presencia de reserpina fue superior a la determinada en presencia del ortovanadato en 0,17 veces (Tablas IV.15.-IV.16.).

Las mayores variaciones en las CMIs se apreciaron hasta el quinto escalón selectivo y también se observaron en la cepa salvaje (Tabla IV.18.).

#### **IV.3.2.1.2.- Mutantes seleccionados con ciprofloxacino**

Las CMIs de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin no variaron en presencia del CCCP sobre la cepa 51 y mutantes derivados de ella (Tablas IV.19-IV.21) así como sobre la cepa 61 y sus mutantes (Tablas IV.23-IV.25.).

Se observó la disminución de las CMIs del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin cuando eran determinadas en presencia del ortovanadato y/ o reserpina entre 1,07 y 2,5 veces, a excepción de la CMI del norfloxacin en ES4 de 51-Cip y del enrofloxacin en ES10 de 51-Cip y ES2 de 61-Cip, en que ninguno de los inhibidores tuvo efecto. Se observó un efecto más potente del ortovanadato en relación al de la reserpina, con diferencias en la CMI del norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino entre 0,07 y 1,26 veces. El efecto de la reserpina y del ortovanadato en la CMI del ciprofloxacino fue igual en los mutantes de ES4 y 5 de 51-Cip; tampoco se observó diferencias en la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin determinada sobre los mutantes de ES2 y 4, ES1, 3 y 4 y ES1, 3 y 10 respectivamente (Tablas IV.19-IV.21 y Tablas IV.23-IV.25).

Las mayores variaciones en las CMI's del norfloxacin y ciprofloxacino en presencia de reserpina y ortovanadato se observaron hasta el cuarto escalón mientras las del enrofloxacin se observaron hasta el quinto, inclusive (Tablas IV.21. y IV.26).

#### **IV.3.2.3.- Mutantes seleccionados con enrofloxacin**

Los valores de las CMI's de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin no sufrieron variaciones cuando era realizada en presencia de CCCP con respecto a las CMI's observadas sobre las cepas 57, 58 y mutantes derivados de ellas (Tablas IV.27-IV.29 y Tablas IV.31-IV.33).

Se observaron disminuciones entre 1,03 y 4,0 veces en las CMI's de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin cuando la determinación se realizó en presencia del ortovanadato y reserpina. A semejanza de lo observado en los puntos anteriores, el ortovanadato fue el inhibidor más potente, con descensos superiores entre 0,11 y 1,92 veces en relación a los obtenidos en presencia de reserpina, y que afectó a la CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en mayor número de clones. El efecto del ortovanadato y de la reserpina sobre la CMI del norfloxacin fue igual en la cepa 58 y en el mutante de ES1 de 58-Enr; en la del ciprofloxacino sobre el mutante de ES4 de 58-Enr y en la del ciprofloxacino sobre la cepa 57. La reserpina tuvo un efecto superior en 0,14 veces en la determinación de la CMI del norfloxacin en el mutante de ES2 de 58-Enr (Tablas IV.27-IV.29 y Tablas IV.31-IV.33). No se observaron variaciones en la CMI del ciprofloxacino en la cepa madre 57 (Tabla IV.28.), así como en la del enrofloxacin en ES4 y ES5 de 58-Enr (Tabla IV.33.) en presencia de algún inhibidor.

La disminución de las CMIS del norfloxacin y ciprofloxacino determinada en presencia de reserpina y/o ortovanadato se mantuvo siempre superior a 1,24; la CMI del enrofloxacin sufrió descensos superiores a 1,19 veces a excepción de los mutantes de ES4, 5 y 10 de 58-Enr, que variaron entre 1 y 1,11 veces (Tablas IV.30. y IV.34.).

### IV.3.3.- Estudio de las proteínas de membrana

Se apreciaron cambios de intensidad en algunas bandas en las diversas cepas estudiadas.

En los clones de ES3, Es6 y ES9 de 51-Nor, se observó el incremento de expresión de bandas de pesos moleculares de 160, 90, 84, 59 y 39 kDa en relación a lo observado en la cepa madre, mientras la banda de 117 kDa disminuyó su expresión. Las bandas de pesos de 160 y 39 kDa no se observaron en la cepa madre, mientras las demás cuya expresión aumentó se observan en mutantes y en la cepa madre. La banda de 117 kDa, solamente se observó en la cepa madre (Figura IV.1.).

En los clones estudiados de 51-Cip y 61-Cip se observó el aumento de la expresión de bandas de 120, 61, 59, 51, 39 kDa mientras bandas de pesos moleculares en torno a 110, 90, 70, 66, 62, 50 kDa bajaron su expresión con respecto al observado en la cepa madre. Las bandas de peso de 120 y 51 kDa se observaron en todos los mutantes de 51-Cip y 61-Cip, mientras la de 61 kDa se observó en todos los mutantes de 51-Cip y en los mutantes de ES6 y ES9 de 61-Cip. Las bandas de pesos de 59 y 39 kDa se observaron en mutantes y cepas madres. Las bandas de 110, 90 y 62 kDa se observaron en las cepas 51 y 61 y en el mutante de ES de 61-Cip. Las bandas de pesos de 76, 66 y 50 kDa, cuya expresión disminuyó, se observaron en los mutantes y cepas madres. En la cepa 61 y mutantes derivados, además de ES6 de 51-Cip se observa la disminución de expresión de una banda de aproximadamente 37 kDa (Figura IV.2.).

En los clones estudiados de 57-Enr se observó el aumento de expresión de una banda de peso molecular aproximado de 59 kDa, mientras las bandas de 85, 43 y 38 la disminuyen. La banda de peso molecular de 59 kDa se observa en la cepa madre y mutantes derivados, mientras las bandas de 85 y 38 kDa dejan de observarse en ES6 y ES9 respectivamente. La banda de 43 kDa se observa en todas las cepas estudiadas.

Se observó una banda de aproximadamente 44 kDa en el ES6 que no se observó en la cepa madre y en los mutantes de ES3 y ES9 (Figura IV.3.).

El aumento de expresión de la banda de peso molecular de 59 kDa se observó en todos los clones obtenidos por medio de la selección con norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin, mientras el aumento de expresión de la banda de peso molecular de 39 kDa solamente se observó en los mutantes seleccionados con norfloxacin y ciprofloxacino. La banda de peso molecular de 90 kDa presentó un comportamiento diferente en los mutantes seleccionados con norfloxacin y enrofloxacin, mientras en los primeros su expresión aumentó en los últimos disminuyó.

#### IV.4.- Secuenciación de las QRDR

La comparación de las secuencias de ADN y de la codificación de aminoácidos correspondiente de la cepa madre con las de los diversos clones estudiados permitió la observación de algunos cambios. Para el tratamiento y estudio de las secuencias se utilizaron los programas Chromas 1.45, Gene Runner 3.0 y BioEdit 5.0.9..

Se observaron algunas mutaciones silenciosas en varios clones de los diferentes escalones selectivos; no obstante, nos centraremos en las mutaciones que conllevaron cambios de aminoácidos en las QRDR, puesto que son estas las que podrán estar asociadas a alteraciones en la resistencia a las quinolonas. Las tablas IV.35, IV.37., IV.39., IV.41., y IV.43 resumen las mutaciones observadas en los diversos clones estudiados así como la CMI de cada quinolona sobre cada uno de ellos.

En *gyrA* se observaron diversas mutaciones que llevaron a cambios de aminoácidos. En **51-Nor** se observaron las sustituciones Arg-61→Cys en ES10 y Glu-101→Lys a partir de ES3, resultantes de las mutaciones C-181→T y G-301→A respectivamente (Figura IV.8.). En el ES1 de **51-Cip** se observó la mutación G-290→T que fue responsable por la sustitución Ser-97→Ile; en ES3. Ambas sustituciones se

mantuvieron en los escalones siguientes (Figura IV.12.). En el ES3 de **61-Cip** se observó la mutación G-290→T que llevó a la sustitución Ser-97→Ile, mutación esta observada en los mutantes posteriores; también en ES3 la mutación C-293→T fue responsable la sustitución Ala-98→Val, que se observó en los mutantes posteriores a excepción de ES5. En ES5 se observó la sustitución Glu-101→Gln motivada por la mutación G-301→C (Figura IV.16.). En **57-Enr** se observaron las mutaciones G-290→T y C-293→T en ES3, las cuales implicaron las sustituciones Ser-97→Ile y Ala-98→Val. Estas se mantuvieron presentes en los mutantes de escalones posteriores (Figura IV.20.). En **58-Enr** se observaron tres sustituciones diferentes. La sustitución Ser-97→Ile, observada en ES2, ES3 y ES10, Ala-98→Val, observada en ES10 y Glu-101→Lys observada en ES4 y ES5. Estas sustituciones fueron originadas por las mutaciones G-290→T, C-293→T y G-301→A respectivamente (Figura IV.24.).

En ES10 de **57-Enr** se observó la mutación C-1333→T en *gyrB* la cual resultó en la sustitución Pro-445→Ser en ES10 (Figura IV.21.). No se observaron cambios de aminoácidos en los demás procesos de selección (Figuras IV.9, IV.13., IV.17. y IV.25.).

Relativamente en *parC*, solamente se observaron sustituciones en la posición 86, pero con 3 aminoácidos diferentes. En **51-Nor** se observó la mutación G-256→T, responsable por la sustitución Asp-86→Tyr en ES3 y en ES4 la mutación G-256→A resultó en la sustitución Asp-86→Asn, que se observaría en los mutantes posteriores (Figura IV.10.). En el ES1 de **51-Cip** se observó la mutación A-257→G, la cual resultó en la sustitución Asp-86→Gly que se observaría en los escalones posteriores (Figura IV.14.). En **61-Cip** se observó la sustitución Asp-86→Gly en ES3, debido a la mutación A-257→G. esta sustitución se mantendría en los demás escalones (Figura IV.18.). En **57-Enr** se observaron dos sustituciones diferentes; en ES3 y ES4 se observó la sustitución Asp-86→Gly, motivada por la mutación A-257→G y en ES5 y ES10 la mutación G-256→T llevó a la sustitución Asp-86→Tyr (Figura IV.22.). Relativamente a **58-Enr** en ES4 y ES5 se observó la sustitución Asp-86→Tyr, resultado de la mutación G-256→T. En ES10 la mutación A-257→G fue responsable por la sustitución Asp-86→Gly (Figura IV.26.).

En *parE* se observaron varias mutaciones que llevaron a sustituciones de aminoácidos. En **51-Nor** se observó la mutación T-1398→A, la cual fue responsable de la sustitución Asn-466→Lys en ES2, ES5 y ES10 (Figura IV.11.). En el ES1 de **51-Cip** la mutación G-1399→A tuvo como resultado la sustitución Glu-467→Lys, que se mantendría en los mutantes posteriores (Figura IV.15.). La misma sustitución fue observada a partir del ES3 de **61-Cip** (Figura IV.19.) y **57-Enr** (Figura IV.23.), observándose en los escalones posteriores, además de ES10 de **58-Enr** (Figura IV.27.).

#### IV.5.- Discusión

##### 1- Susceptibilidad de las cepas mutantes

En las selecciones de mutantes realizadas con norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin se observó el aumento de la CMI de todas las quinolonas estudiadas. El desarrollo de resistencia cruzada entre quinolonas ha sido previamente descrito en micoplasmas (Reinhardt y cols., 2002a; Gruson y cols., 2005), bacterias grampositivas (REF) y gramnegativas (Tavío y cols., 1999). No obstante, la capacidad de seleccionar resistencias fue diferente según el antimicrobiano utilizado. La selección con ciprofloxacino ha sido asociada a los mayores incrementos en la resistencia a las quinolonas. Los mutantes seleccionados con norfloxacin fueron los que presentaron un menor incremento en la resistencia al enrofloxacin cuando se compararon con los seleccionados con el ciprofloxacino y enrofloxacin. Los mutantes seleccionados con enrofloxacin presentaron los menores incrementos en la resistencia al norfloxacin cuando se compararon con los seleccionados con norfloxacin y ciprofloxacino. Aunque en general las mutaciones en las topoisomerasas confieran resistencia cruzada a las quinolonas, la misma mutación puede implicar cambios diferentes en la susceptibilidad a las quinolonas (Kenny y cols., 1999; Gruson y cols., 2005); el comportamiento observado en nuestros mutantes puede ser reflejo de la selección de diferentes mutaciones.

La variación de la CMI de otros antimicrobianos no relacionados no fue igual en todos los procesos de selección. La CMI del mismo antimicrobiano pudo aumentar, disminuir o mantenerse sin cambios. En micoplasmas la selección de mutantes con quinolonas no suele producir variaciones en la susceptibilidad a otros antimicrobianos no relacionados como las tetraciclinas, macrólidos y cloranfenicol (Raheison y cols., 2002; Reinhardt y cols., 2002a). En otros microorganismos como *Escherichia coli* es común el desarrollo de un fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos debido a la expresión de sistemas de expulsión activa y a variaciones en la expresión de las porinas (Tavío y cols., 1999). Los micoplasmas no poseen pared externa y los sistemas de expulsión activa responsables del desarrollo de resistencia a las quinolonas no poseen como sustrato a otros antimicrobianos no relacionados como el cloranfenicol, macrólidos y tetraciclinas, lo que puede explicar el no se desarrolle un fenotipo de múltiple resistencia a los antimicrobianos.

## 2- Sistemas de expulsión activa

La utilización del alcaloide vegetal reserpina y del ortovanadato, dos inhibidores de sistemas de expulsión activa del tipo ABC y que han sido utilizados con éxito en otras bacterias grampositivas, gramnegativas y micoplasmas (Kaatz y cols., 1993; Poole, 2000b; Raheison y cols., 2002; Ribera y cols., 2002) produjo disminuciones de las CMIs de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin que oscilaron entre 1,03 y 4 veces con respecto a la obtenida en la ausencia de cualquier inhibidor. Estos valores son semejantes a los previamente descritos (Raheison y cols., 2002) que observó disminuciones entre 1,33 y 4 veces en la CMI de norfloxacin y ciprofloxacino cuando se determinó en presencia de la reserpina. El ortovanadato fue de los dos inhibidores de sistemas ATP-dependientes el que mejor funcionó. El CCCP, una sustancia que disipa el gradiente protónico a lo largo de la membrana citoplasmática, impidiendo así a los sistemas de expulsión protón-dependientes (Pagès y cols., 2005), no produjo ningún efecto en la CMI de las quinolonas estudiadas sobre las cepas madres y mutantes de ellas derivados.

Así, los datos obtenidos nos hacen sospechar de la presencia de un sistema de expulsión activa ATP-dependiente sensible al ortovanadato y a la reserpina, responsable de resistencia a las quinolonas. Aunque los datos obtenidos no nos hagan sospechar de la presencia de un sistema de expulsión protón-dependiente, existen casos descritos de la ausencia de efecto del CCCP en otros géneros bacterianos que presentaban la expresión de sistemas secundarios de transporte (Raheison y cols., 2002). Esta hipótesis gana fuerza por lo descrito en *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma hominis*, en los que se han identificado 11 transportadores del tipo ABC pero solamente uno dependiente del gradiente protónico por comparación de secuencias Paulsen y cols., 1998; Gruson y cols., 2002).

La utilización de los inhibidores afectó de igual forma a las CMI's de las tres quinolonas (norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino), indicando que todas ellas son sustrato del sistema inhibido. La excreción de una quinolona por un sistema de expulsión activa depende de su hidrofobicidad. Las quinolonas hidrofílicas son sustrato de sistemas como NorA, mientras quinolonas como el esparfloxacino, más hidrofóbicas, parecen no ser afectadas por este mecanismo de resistencia (Ruiz y cols., 2001). En *Mycoplasma hominis* se caracterizó recientemente un sistema de expulsión del tipo ABC que demostraba mayor afinidad por el ciprofloxacino que por el moxifloxacino o pefloxacino (Raheison y cols., 2002). Las quinolonas utilizadas en este trabajo, norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino, son quinolonas hidrofílicas, un buen sustrato de sistemas de expulsión, lo que confirma los resultados obtenidos.

En seis de las cepas estudiadas no se pudo demostrar la implicación de un sistema de expulsión en la resistencia al norfloxacino (ES4 de 51-Nor, ES4 de 51-Cip), ciprofloxacino (cepa 57) y enrofloxacino (ES2 de 61-Cip, ES4 y ES5 de 58-Enr) dada la aparente ausencia de efecto de la reserpina y del ortovanadato en su CMI; esto puede ser más bien motivado por defectos en la medición de las CMI's que por una real ausencia de actividad de los inhibidores.

Asimismo, se observó la variación de las CMI del norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en todas las cepas madre (de 1,33 a 2, 1,25 a 1,5 y 1,15 a 1,33 veces respectivamente), a excepción del ciprofloxacino sobre la cepa 57, cuya CMI no varió. Todas las cepas madres son aislamientos clínicos, y es posible que en contactos anteriores con antimicrobianos haya ocurrido algún tipo de selección de cepas con sistemas de expulsión hiper-expresados. La variación de la CMI de diversas quinolonas en las cepas madres ha sido descrita en *Mycoplasma hominis*, en el que se observaron variaciones de 1,33 veces en la CMI del norfloxacino y ciprofloxacino sobre la cepa madre cuando eran determinados en presencia de la reserpina (Raheison y cols., 2002). Estos valores son semejantes a los obtenidos en nuestro trabajo y sugieren la presencia de un sistema de expulsión activa confiriendo un bajo nivel basal de resistencia a las quinolonas, a semejanza de lo que ha sido descrito en *Staphylococcus aureus* con respecto a NorA, en el que se observaron variaciones de dos veces en la CMI del norfloxacino cuando era determinado en presencia de la reserpina (Kaatz y cols., 1993). La presencia de este tipo de cepas en la naturaleza puede ser responsable del desarrollo de resistencias clínicas, puesto que la sobre-expresión de sistemas de expulsión activa puede funcionar como el primer paso para favorecer el desarrollo de altos niveles de resistencia a otras mutaciones (Markham y Neyfakh, 2001).

En el análisis de las proteínas de membrana hemos observado la variación de la expresión de diversas proteínas. Una búsqueda en el genoma de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC nos permitió identificar 15 proteínas relacionadas con sistemas de expulsión activa del tipo ABC. La determinación de sus masas moleculares nos permitió identificar una (gi|42560672|ref|NP\_975123.1|) de un peso molecular de 58,47 kDa, que podría ser la proteína cuya expresión hemos observado aumentada y cuyo peso molecular aparente era de 59 kDa. Otra proteína (gi|42560590|ref|NP\_975041.1|) que se sospecha estar relacionada con la expulsión activa de antimicrobianos posee una masa molecular de 38,78 kDa, pudiendo ser alguna de las proteínas de peso molecular semejante (39 kDa) y cuya expresión hemos observada aumentada. En micoplasmas solamente está asociada la acción de un sistema del tipo ABC con la resistencia a antimicrobianos, codificado por los genes *md1* y *md2* en *Mycoplasma hominis*. Estos,

codifican proteínas de un peso molecular de 68 y 70 kDa respectivamente (Raheison y cols., 2005).

Los datos obtenidos con la utilización de los inhibidores de sistemas de expulsión activa sugieren la presencia de un sistema de expulsión activa del tipo ATP-dependiente responsable de aumentos en la resistencia a quinolonas en los diversos escalones selectivos. La variación de la CMI de las diversas quinolonas sobre las cepas madres en presencia de inhibidores de sistemas de expulsión activa, indica que hay sistemas de expulsión activa que se expresan en cepas susceptibles y que podrían ser responsables de favorecer la selección *in vivo* de cepas resistentes a las quinolonas en aislados clínicos. No obstante, la cuantificación de la importancia de estos mecanismos de supervivencia necesita ser confirmada por medio de ensayos de acumulación. La hiperexpresión de algunas proteínas de membrana podrá estar directamente relacionada con el aumento de expresión de sistemas de expulsión activa, aunque para su confirmación será necesaria la caracterización de las mismas.

### 3- Mutaciones en las topoisomerasas

Se encontraron doce mutaciones diferentes responsables de sustituciones de aminoácidos en los cuatro genes que codifican las topoisomerasas bacterianas, aunque no todos ellos en las posiciones clásicamente asociadas a incrementos en la resistencia a las quinolonas. El gen más afectado fue *gyrA*, en el que se observaron cinco sustituciones diferentes, mientras en *parC* y *parE* se observaron tres y en *gyrB* una. La posición en la que se observó mayor variedad de sustituciones fue la 84 de *parC* (tres), seguida de la posición 87 de *gyrA* y 458 de *parE* con dos. Los mutantes más resistentes poseían varias mutaciones en por lo menos tres de los cuatro genes, a semejanza de lo descrito en *Mycoplasma gallisepticum* (Reinhardt y cols., 2002a).

En *gyrA* fueron observadas mutaciones relacionadas con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 61, 97, 98 y 101 (47, 83, 84 y 87 de *Escherichia coli*

respectivamente). Sustituciones en las posiciones 97, 98 y 101 han sido previamente descritas en otras especies de micoplasmas además de en microorganismos grampositivos y gramnegativos y relacionadas con aumentos de resistencia (Tavío y cols., 1999; Reinhardt y cols., 2002a; Ruiz, 2003; Gruson y cols., 2005). Hemos observado aumentos de dos veces en la CMI del norfloxacin y ciprofloxacino asociados a la sustitución Ser-97→Ile; en *Mycoplasma gallisepticum* esta misma sustitución se asoció a un aumento de dos a cuatro veces en la CMI del enrofloxacin (Reinhardt y cols., 2002a; Reinhardt y cols., 2002b), mientras otras sustituciones en esta posición se asociaron a aumentos de cuatro veces en la CMI del ciprofloxacino en *Mycoplasma pneumoniae* (Gruson y cols., 2005), una a dos y cuatro a ocho veces en la CMI del norfloxacin y ciprofloxacino respectivamente en *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 1998). La sustitución Ala-98→Val se asoció a aumentos en la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin de 8, 32 y 16 veces respectivamente. Esta sustitución no ha sido nunca descrita en otros micoplasmas, pero otras sustituciones en esta posición han sido asociadas a aumentos de una a ocho veces y una a dos veces en la CMI del norfloxacin y ciprofloxacino respectivamente en *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 1998) y de dos a cuatro veces en la CMI del enrofloxacin en *Mycoplasma gallisepticum* (Reinhardt y cols., 2002a; Reinhardt y cols., 2002b). No nos fue posible identificar la contribución de las sustituciones en la posición 101 debido a la existencia de otras sustituciones simultáneamente, pero en *Mycoplasma hominis* la sustitución Glu→Lys ha sido relacionada con aumentos de dos veces en la CMI del ciprofloxacino, sin que variara el del norfloxacin en *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 2000). La sustitución Glu→Gln que hemos observado en ES5 de 61-Cip no ha sido nunca descrita en micoplasmas. En ES10 de 51-Nor se observó la sustitución Arg-61→Cys asociada a una disminución de dos veces de la CMI del ciprofloxacino y enrofloxacin; aunque no estén descritas mutaciones en este punto ni en micoplasmas ni en otras especies bacterianas, están descritas mutaciones asociadas a la pérdida de resistencia a las quinolonas en micoplasmas (Bébéar y cols., 1998). No obstante, el verdadero significado de esta mutación necesita ser estudiado.

Solamente se observaron cambios de aminoácidos en la posición 445 (445 en *Escherichia coli*) de *gyrB* en una de las selecciones realizadas con enrofloxacino. Esta sustitución no ha sido previamente descrita en micoplasmas. No obstante su relación no parece tener relación con aumentos de resistencia, una vez que las CMI's no sufrieron variaciones. En otros micoplasmas sustituciones de aminoácidos en *gyrB* surgen frecuentemente asociadas a mutaciones en otros genes, aunque en algunos casos estén directamente relacionadas con aumentos en la resistencia a quinolonas, pudiendo incluso ser la primera mutación (Reinhardt y cols., 2002b; Gruson y cols., 2005).

En *parC* solamente se observó una mutación responsable de sustituciones de aminoácidos, en la posición 86 (84 en *Escherichia coli*), independientemente del agente selector utilizado. En otras especies de micoplasmas están descritas sustituciones en otros puntos, aunque las posiciones 80 y 84 correspondientes a *Escherichia coli* sean aquellas donde más frecuentemente ocurren (Bébéar y cols., 1998; Tavío y cols., 1999; Reinhardt y cols., 2002a; Gruson y cols., 2005). Estas dos posiciones son consideradas las más importantes en este gen, bien sea en microorganismos grampositivos o gramnegativos (Ruiz, 2003). En los mutantes seleccionados con ciprofloxacino, esta sustitución fue siempre de un aspartato por una glicina; en los seleccionados con norfloxacino y enrofloxacino se observaron mutaciones que llevaron a dos sustituciones diferentes. Así, cuando son seleccionados con norfloxacino, se observó la sustitución del aspartato por una tirosina y posteriormente por una asparagina. En la selección con enrofloxacino sobre la cepa 57 se observó en primer lugar una glicina y posteriormente una tirosina mientras en la selección realizada sobre la cepa 58 con enrofloxacino se observaron los mismos aminoácidos pero por orden inverso. Todas estas sustituciones han sido previamente descritas en *Mycoplasma pneumoniae*, con cualquiera de las mutaciones a ser asociada a aumentos de dos a cuatro veces en la CMI del ciprofloxacino (Gruson y cols., 2005). El efecto de cada una de estas mutaciones no pudo ser apreciada en nuestro trabajo, por la presencia de mutaciones simultáneas en otros genes. Otras sustituciones en esta posición han sido descritas en *Mycoplasma hominis*, asociados a aumentos de dos y de una a ocho veces en la CMI del norfloxacino y ciprofloxacino respectivamente (Bébéar y cols., 1998; Bébéar y cols., 2000) y

*Mycoplasma gallisepticum*, con incrementos de dos a cuatro veces en la CMI del enrofloxacin (Reinhardt y cols., 2002b). Aparentemente la diferencia entre la tirosina y la asparagina se asoció a un incremento de 2 veces en la CMI del norfloxacin cuando el cambio es por asparagina; en *Mycoplasma pneumoniae* la asparagina no se observaron diferencias en la CMI del ciprofloxacino pero la del esparfloxacino era dos veces superior cuando estaba presente la asparagina, no habiendo determinado su efecto en la CMI del norfloxacin y enrofloxacin (Gruson y cols., 2005). La diferencia entre la presencia de la glicina o tirosina se asoció a un incremento de dos veces en la CMI del norfloxacin y enrofloxacin y de cuatro veces en la CMI del ciprofloxacino, cuando estaba presente la tirosina; en *Mycoplasma pneumoniae* no se observaron diferencias con respecto a la CMI del ciprofloxacino, presentando el moxifloxacino una CMI dos veces superior cuando estaba presente la tirosina, siendo que la CMI de las demás quinolonas utilizadas en nuestro trabajo no fue determinada (Gruson y cols., 2005). Curiosamente, en ninguno de los trabajos en los que se seleccionaron mutantes en micoplasma con ciprofloxacino se observan mutaciones en la posición 84 (Bébéar y cols., 1998; Gruson y cols., 2005).

En lo relativo a *parE* se observaron dos sustituciones, en las posiciones 466 y 467 (458 y 459 en *Escherichia coli* respectivamente). La sustitución observada en la posición 466 ha sido previamente descrita en *Mycoplasma gallisepticum* pero no ha sido relacionada con incrementos en la CMI del enrofloxacin, la única quinolona estudiada (Reinhardt y cols., 2002b); la 467 nunca ha sido relacionada con la resistencia a quinolonas en micoplasmas. La sustitución en la posición 466 solamente se observó en la selección con norfloxacin y ciprofloxacino (ES1, 5 y 10 de 51-Nor, ES10 de 51-Cip y ES3 de 61-Cip); mientras en la primera la asparagina fue sustituida por una lisina, en la segunda la sustitución fue por una isoleucina. La importancia de sustituciones en esta posición parece depender de la presencia de otras simultáneas; mientras en ES1 de 51-Nor la CMI del ciprofloxacino aumentó cuatro veces y la del norfloxacin y enrofloxacin dos, en ES5, en que ya estaban presentes otras sustituciones, la CMI del norfloxacin y enrofloxacin aumenta cuatro y la del ciprofloxacino ocho veces. En ES10 de 51-Cip las CMIs de las diversas quinolonas sufrieron un aumento de por lo menos dos veces. La presencia de la lisina no aumentó la CMI de ninguna de las quinolonas mientras el efecto

de la presencia de la isoleucina en las CMI's no nos fue posible observar, puesto que se observaron otras mutaciones simultáneamente. La sustitución observada en la posición 467 no se observó en los mutantes seleccionados con norfloxacin, pero sí en los seleccionados con ciprofloxacino y enrofloxacin. En cualquiera de los casos se observó la sustitución de un glutamato por una lisina; la existencia de sustituciones simultáneas no nos permitió determinar el efecto aislado de esta en las CMI's del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin. En microorganismos gramnegativos el papel de mutaciones en *parE* parece ser irrelevante y en grampositivos su relación con el aumento de resistencia a las quinolonas es controvertido y su efecto parece depender de mutaciones simultáneas en otros genes (Ruiz, 2003). En micoplasmas puede ser el punto donde ocurre la primera sustitución y, según la posición donde ocurra, su efecto puede ser mayor o menor (Bébéar y cols., 1998; Bébéar y cols., 2000a; Reinhardt y cols., 2002b). Solamente se ha observado una sustitución de aminoácidos en *parE* que no estuviera asociada a otras sustituciones (posición 466 de ES1 de 51-Nor); en este mutante la expulsión activa parece desarrollar un papel más importante que la contribución de la sustitución para los aumentos en la CMI del norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino. En otros mutantes se observaron sustituciones en las posiciones 466 y 467 asociadas a sustituciones en *gyrA* y *parC* asociadas a altos niveles de resistencia. Aparentemente, sustituciones en la posición 466 de *parE* de MmmLC no están asociadas al aumento de resistencia a norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin, pero sustituciones en las posiciones 466 y 467 simultáneas a sustituciones en otros genes están asociadas a altos niveles de resistencia.

Hemos observado la ocurrencia de sustituciones simultáneas en varios de los genes. Esto puede ser debido a que los micoplasmas poseen una elevada tasa de mutación, superior a la de las demás bacterias, debido a su diminuto genoma y a particularidades de su ADN polimerasa, que no posee actividad exonucleasica en el sentido 3'→5' (Razin y cols., 1998; Bébéar y cols., 1997). Según la quinolona utilizada, se han observado tasas de mutación comprendidas entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  en diversas especies de micoplasma (Gruson y cols., 2005), un valor inferior al observado en otros microorganismos (Evans y Titlow, 1998; Gilbert y cols., 2001). La ocurrencia de

sustituciones en más de un gen en el mismo escalón selectivo ha sido descrita anteriormente (Bébéar y cols., 1998; Reinhardt y cols., 2002b; Gruson y cols., 2005).

La presencia de dos a tres sustituciones simultáneas en la ADN girasa y topoisomerasa IV llevó a aumentos en la resistencia al norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino comprendidos entre 32 y 256 veces. En otros microorganismos, como *Escherichia coli* (Tavío y cols., 1999), *Citrobacter freundii* (Tavío y cols., 2000), no es común la obtención de mutantes con múltiples mutaciones. Esto refuerza la hipótesis de que las mutaciones en las topoisomerasas desarrollan un papel muy importante en la adquisición de elevados niveles de resistencia a las quinolonas, además de concordar con la elevada hipermutabilidad descrita en el género *Mycoplasma*.

Se observó un comportamiento diferente en las sustituciones en las posiciones 83, 84 y 87 de *gyrA* según el agente selector. El norfloxacino solamente seleccionó sustituciones en la posición 87, lo que contrasta con lo descrito en mutantes de *Mycoplasma hominis* seleccionados con norfloxacino en los que la única sustitución observada en *gyrA* fue en la posición 83 (Bébéar y cols., 1997). Esto nos lleva a suponer que el norfloxacino actúa en puntos diferentes de la topoisomerasa II en MmmLC y *Mycoplasma hominis*. Tanto el ciprofloxacino como el enrofloxacino seleccionaron sustituciones en cualquiera de las tres posiciones. En una de las selecciones con ciprofloxacino y en otra con enrofloxacino, la primera sustitución en *gyrA* ocurrió en la posición 83, mientras en las otras ocurrió simultáneamente en las posiciones 83 y 84. También se observaron sustituciones de aminoácidos en la posición 87 en 61-Cip y 58-Enr. Aunque utilizando ciprofloxacino o enrofloxacino se lograra seleccionar sustituciones en la posición 84, cambios de aminoácidos en esta posición parecen no ser muy frecuentes en los micoplasmas ya estudiados; de hecho, solamente ha sido descrito en mutantes seleccionados con enrofloxacino en *Mycoplasma gallisepticum* (Reinhardt y cols., 2002a) y esparfloxacino en *Mycoplasma hominis* (Bébéar y cols., 1998).

Generalmente, se asume como diana principal de una quinolona el gen en el que ocurre la primera mutación cuando se seleccionan mutantes (Gruson y cols., 2005); no

obstante, para afirmar categóricamente cual es en realidad la diana de una quinolona hay que realizar, además de estudios genéticos, estudios de inhibición de la actividad de las topoisomerasas (Takei y cols., 2001). En este trabajo no hemos realizado estudios de inhibición, así que nuestros comentarios se realizarán con respecto a los hallazgos en las secuencias de las topoisomerasas de los mutantes seleccionados.

Con respecto al norfloxacin y ciprofloxacino, la presencia de sustituciones simultáneas en las dos topoisomerasas no nos ha permitido determinar por que topoisomerasa hay más afinidad por parte de estas dos quinolonas. En mutantes de *Mycoplasma hominis* seleccionados con norfloxacin también se ha observado esta situación (Bébéar y cols., 1998). En *Mycoplasma pneumoniae* se determinó que el ciprofloxacino posee mayor afinidad por la topoisomerasa IV, basándose en donde ocurría la primera mutación (Gruson y cols., 2005). Aunque en la selección realizada con enrofloxacin sobre la cepa 57 ocurrieron sustituciones simultáneas en *gyrA*, *parC* y *parE*, en la selección llevada a cabo en la cepa 58 con enrofloxacin, la primera mutación ocurrió en *gyrA*, que codifica la topoisomerasa II en ES2, no observándose sustituciones en otros genes en este escalón. La mayor afinidad del enrofloxacin en micoplasmas por las diferentes topoisomerasas está descrita para dos especies, *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma bovirhinis* con base en donde surge la primera mutación. Mientras en la primera se describió una mayor afinidad por la topoisomerasa II (Reinhardt y cols., 2002b), en la segunda se describió por la topoisomerasa IV (Hirose y cols., 2004). Puesto que MmmLC está más cercano filogenéticamente a *Mycoplasma gallisepticum* que a *Mycoplasma bovirhinis* (Johansson y cols., 1998) y la primera sustitución ocurre en *gyrA*, se puede sugerir que en MmmLC el enrofloxacin posee mayor afinidad por la topoisomerasa II.

La dificultad en identificar la por que topoisomerasa poseen mayor afinidad el norfloxacin y ciprofloxacino, además de la aparente discontinuidad de sustituciones puede ser resultante de la metodología empleada y de la elevada tasa de mutaciones evidenciada por los micoplasmas. En otros trabajos se trabaja con colonias individualizadas, asegurando así una continuidad genética a lo largo del experimento. Al

trabajar en medio líquido se obtiene una mezcla de subpoblaciones, las cuales pueden poseer diferentes sustituciones; al clonar en medio sólido es posible que se seleccione un mutante con una mutación diferente de la presentada en el escalón anterior. En un trabajo anteriormente realizado con *Mycoplasma gallisepticum* utilizando una metodología similar, se observó una gran variedad de sustituciones en diversos mutantes obtenidos en el décimo escalón selectivo (Reinhardt y cols., 2002a).

#### 4- Relación entre sistemas de expulsión activa y mutaciones en las topoisomerasas

La presencia de sistemas de expulsión activa parece desarrollar un importante papel en la selección de mutantes a las quinolonas. Las tablas IV.36., IV.38., IV.40., IV.42., y IV.44. relacionan las variaciones en la CMI del norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino con la utilización del ortovanadato y reserpina. En ES2 de 51-Nor, ES1 y ES2 de 61-Cip, 57-Enr y ES1 de 58-Enr no se observaron sustituciones en ninguna de las topoisomerasas. No obstante, se observaron aumentos de 2 a 64 veces en la CMI de las diversas quinolonas. Estos aumentos en la CMI están asociados a la presencia de sistemas de expulsión activa que hemos descrito anteriormente. La presencia de estos sistemas permite a la célula sobrevivir más tiempo hasta que ocurran sustituciones que les permitan la supervivencia en concentraciones superiores de antimicrobianos (Markham y Neyfakh, 2001). La utilización de inhibidores de sistemas de expulsión activa en los mutantes cuyas secuencias hemos estudiado, nos ha permitido observar que su utilización, sobre todo la del ortovanadato, en los escalones en que no se observaron mutaciones, disminuía la CMI del antimicrobiano hasta valores semejantes a los observados en la cepa madre.

Se observaron mutantes con el mismo genotipo y susceptibilidades diferentes (ES1 y 2 de 51-Cip, ES3, 4 y 5 de 51-Cip, ES4 y 10 de 61-Cip, ES2 y 3 de 58-Enr), lo que puede ser explicado por diferencias en la expresión de sistemas de expulsión activa. Otra explicación posible es la ocurrencia de mutaciones en otras posiciones que no las de las QRDR tradicionalmente descritas y fuera de los segmentos que hemos

amplificado. En un aislado clínico de *Mycoplasma hominis* resistente a quinolonas se ha descrito una sustitución en la posición 134 relativa a *Escherichia coli* de *parC*; no obstante, su contribución para el desarrollo de resistencia no pudo ser clarificada (Bébéar y cols., 2003). En otras bacterias como *Ureaplasma* spp., sustituciones en posiciones semejantes han sido descritas; sin embargo, en estos casos tampoco pudieron ser relacionadas con aumentos en la resistencia a quinolonas (Bébéar y cols., 2003). Otros mutantes (ES3 y 4 de 57-Enr y ES4 y 5 de 58-Enr), compartían genotipo y fenotipo, lo que podría indicar que el papel de los sistemas de expulsión activa y posibles sustituciones fuera de las QRDR es igual.

Así, podemos concluir que los sistemas de expulsión activa y las mutaciones en las topoisomerasas desarrollan un papel importante en la adquisición de resistencia a las quinolonas, potenciándose entre sí. Una primera resistencia de bajo nivel fue conferida por sistemas de expulsión activa, que protegen la célula bacteriana de concentraciones elevadas de quinolonas. Posteriormente, resistencias de alto nivel se obtienen por medio de sustituciones de aminoácidos en las topoisomerasas, cuyo efecto es acumulativo; en estos mutantes también se observa la presencia de sistemas de expulsión. Los mayores niveles de resistencia se observaron en mutantes de *gyrA*, *parC* y *parE*. La expresión de sistemas de expulsión en cepas clínicas y la elevada tasa de mutaciones en micoplasmas pueden ser factores potenciadores de la selección de mutaciones que confieran resistencia a las quinolonas, por lo que se hace importante una utilización racional de las mismas *in vivo*.

Anexo de tablas, gráficos y figuras

CMI (µg/ml) del norfloxacinó											
Cepa	Madre	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6	ES7	ES8	ES9	ES10
51	1	2	2	32	64	256	256	>256	>256	>256	>256
57	0.5	1	4	128	128	128	128	>256	>256	>256	>256
58	0.5	1	2	2	128	128	256	256	256	>256	>256
61	0.5	4	4	16	256	256	256	>256	>256	>256	>256
65	1	2	4	8	64	256	256	>256	>256	>256	>256

**Tabla IV.5.-** Evolución de la CMI (µg/ml) del norfloxacinó en cada uno de los escalones selectivos en los cinco procesos de selección obtenidos a partir de las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de MmmLC. ES- escalón selectivo.

CMI (µg/ml) del ciprofloxacino											
Cepa	Madre	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6	ES7	ES8	ES9	ES10
51	0.06	0.125	1	16	64	64	64	>256	>256	>256	>256
57	0.06	0.125	4	8	32	256	256	>256	>256	>256	>256
58	0.125	0.5	1	1	32	256	256	256	>256	>256	>256
61	0.125	0,25	0,25	32	64	256	256	256	256	>256	>256
65	0.250	0.5	8	16	256	256	>256	>256	>256	>256	0.250

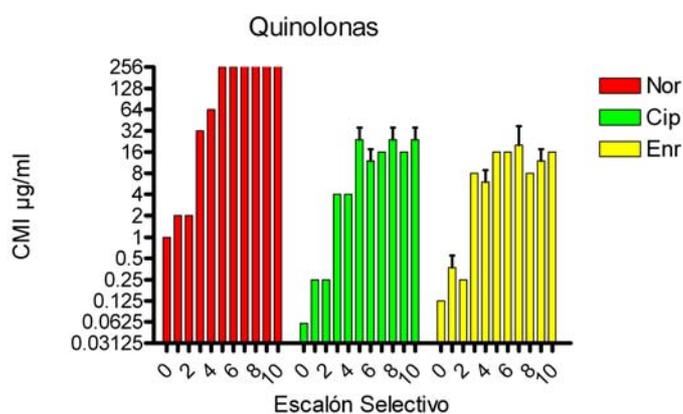
**Tabla IV.6.** Evolución de la CMI (µg/ml) del ciprofloxacino en cada uno de los escalones selectivos en los cinco procesos de selección obtenidos a partir de las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de MmmLC. ES- escalón selectivo.

CMI (µg/ml) del enrofloxacin											
Cepa	Madre	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6	ES7	ES8	ES9	ES10
51	0.125	0,250	4	16	32	64	64	64	64	64	64
57	0.125	2	2	32	32	32	32	32	64	64	64
58	0.125	1	2	32	64	64	64	64	64	64	64
61	0.125	1	2	8	16	32	64	128	128	128	128
65	0.06	0.125	0.250	4	32	32	64	64	64	64	64

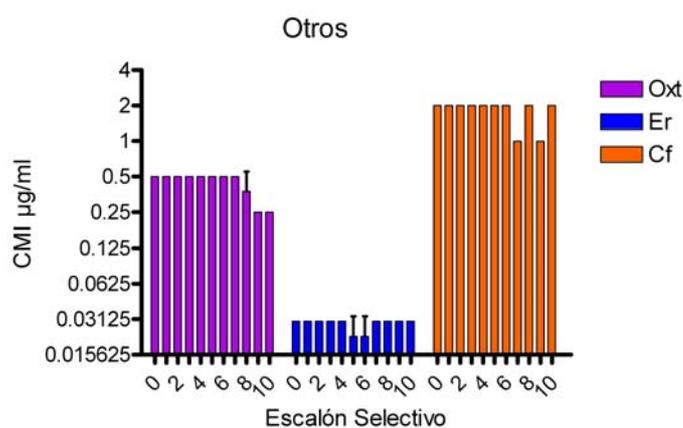
**Tabla IV.7.-** Evolución de la CMI (µg/ml) del enrofloxacin en cada uno de los escalones selectivos en los cinco procesos de selección obtenidos a partir de las cepas 51, 57, 58, 61 y 65 de MmmLC. ES- escalón selectivo.

Cepa		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		NOR	CIP	ENR	OXT	ER	CF
51		1	0.06	0,125	0,5	0,03	2
ES1	CL1	2	0,250	0,5	0,5	0,03	2
	CL2	2	0,250	0,250	0,5	0,03	2
ES2	CL1	2	0,250	0,250	0,5	0,03	2
	CL2	2	0,250	0,250	0,5	0,03	2
ES3	CL1	32	4	8	0,5	0,03	2
	CL2	32	4	8	0,5	0,03	2
ES4	CL1	64	4	8	0,5	0,03	2
	CL2	64	4	4	0,5	0,03	2
ES5	CL1	256	32	16	0,5	0,03	2
	CL2	256	16	16	0,5	0,015	2
ES6	CL1	256	16	32	0,5	0,015	2
	CL2	256	8	8	0,5	0,03	2
ES7	CL1	256	16	8	0,5	0,03	1
	CL2	>256	16	8	0,5	0,03	1
ES8	CL1	256	16	8	0,250	0,03	2
	CL2	>256	32	8	0,5	0,03	2
ES9	CL1	>256	16	16	0,250	0,03	1
	CL2	256	16	8	0,250	0,03	1
ES10	CL1	>256	32	16	0,250	0,03	2
	CL2	256	16	16	0,250	0,03	2

**Tabla IV.8.-** CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en  $\mu\text{g/ml}$  en los dos clones de cada escalón selectivo obtenidos a partir de la cepa 51 norfloxacin. ES- escalón selectivo, CL- clone.



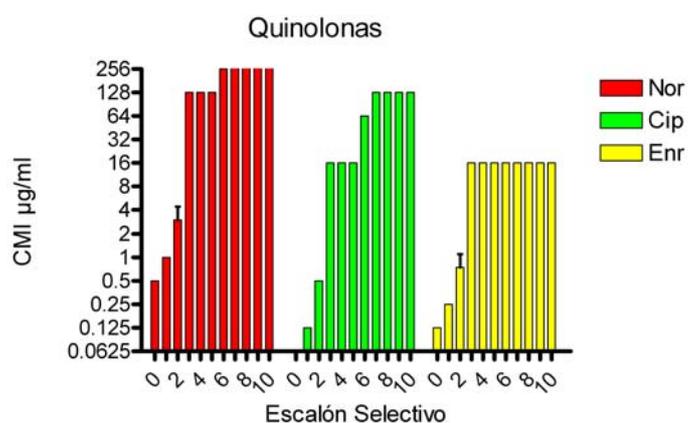
**Gráfico IV.1.-** Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Nor- norfloxacin, Cip- ciprofloxacin, Enr- enrofloxacin. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (51).



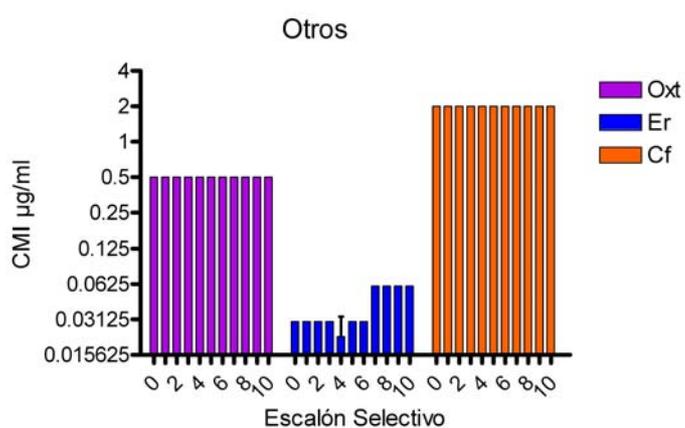
**Gráfico IV.2.-** Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Oxt- oxitetraciclina, Er- eritromicina, Cf- cloranfenicol. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (51).

Cepa		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		NOR	CIP	ENR	OXT	ER	CF
57		0,5	0,06	0,125	0,5	0,03	2
ES1	CL1	1	0,125	0,250	0,5	0,03	2
	CL2	1	0,125	0,250	0,5	0,03	2
ES2	CL1	4	0,5	1	0,5	0,03	2
	CL2	2	0,5	0,5	0,5	0,03	2
ES3	CL1	128	16	16	0,5	0,03	2
	CL2	128	16	16	0,5	0,03	2
ES4	CL1	128	16	16	0,5	0,015	2
	CL2	128	16	16	0,5	0,03	2
ES5	CL1	128	16	16	0,5	0,03	2
	CL2	128	16	16	0,5	0,03	2
ES6	CL1	256	64	16	0,5	0,03	2
	CL2	256	64	16	0,5	0,03	2
ES7	CL1	>256	128	16	0,5	0,06	2
	CL2	>256	128	16	0,5	0,06	2
ES8	CL1	>256	128	16	0,5	0,06	2
	CL2	>256	128	16	0,5	0,06	2
ES9	CL1	>256	128	16	0,5	0,06	2
	CL2	>256	128	16	0,5	0,06	2
ES10	CL1	>256	128	16	0,5	0,06	2
	CL2	>256	128	16	0,5	0,06	2

**Tabla IV.9.-** CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en  $\mu\text{g/ml}$  en los dos clones de cada escalón selectivo obtenidos a partir de la cepa 57 con norfloxacin. ES- escalón selectivo, CL- clone.



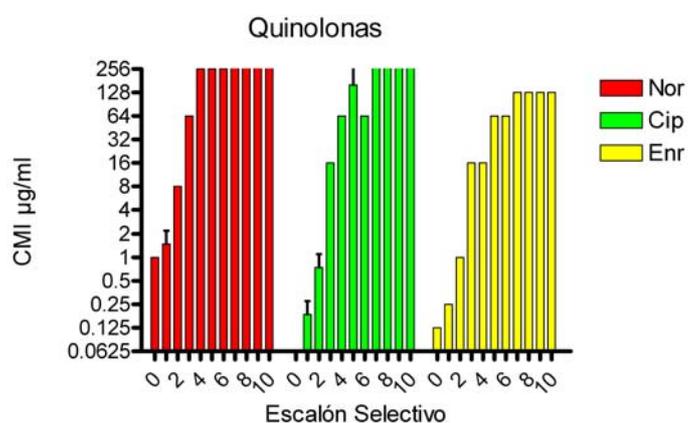
**Gráfico IV.3.-** Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Nor- norfloxacino, Cip- ciprofloxacino, Enr- enrofloxacino. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (57).



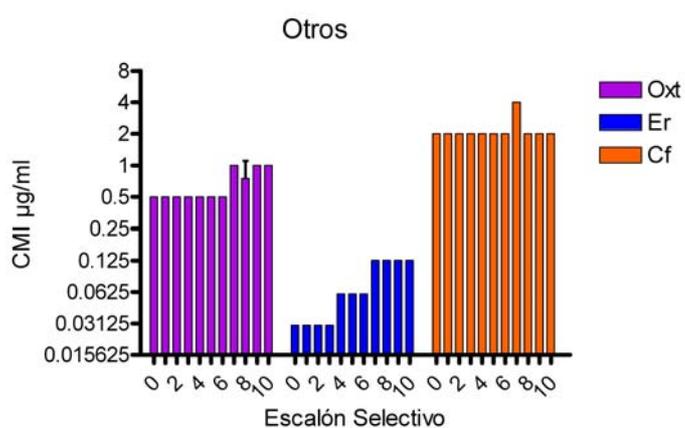
**Gráfico IV.4.-** Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Oxt- oxitetraciclina, Er- eritromicina, Cf- cloranfenicol. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (57).

Cepa		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		NOR	CIP	ENR	OXT	ER	CF
51		1	0,06	0,125	0,5	0,03	2
ES1	CL1	1	0,125	0,250	0,5	0,03	2
	CL2	2	0,250	0,250	0,5	0,03	2
ES2	CL1	8	0,5	1	0,5	0,03	2
	CL2	8	1	1	0,5	0,03	2
ES3	CL1	64	16	16	0,5	0,03	2
	CL2	64	16	16	0,5	0,03	2
ES4	CL1	256	64	16	0,5	0,06	2
	CL2	256	64	16	0,5	0,06	2
ES5	CL1	256	256	64	0,5	0,06	2
	CL2	256	256	64	0,5	0,06	2
ES6	CL1	256	64	64	0,5	0,06	2
	CL2	256	64	64	0,5	0,06	2
ES7	CL1	>256	256	128	1	0,125	4
	CL2	>256	>256	128	1	0,125	4
ES8	CL1	>256	>256	128	1	0,125	2
	CL2	>256	>256	128	0,5	0,125	2
ES9	CL1	>256	>256	128	1	0,125	2
	CL2	>256	>256	128	1	0,125	2
ES10	CL1	>256	>256	128	1	0,125	2
	CL2	>256	>256	128	1	0,125	2

**Tabla IV.10.-** CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en  $\mu\text{g/ml}$  en los dos clones de cada escalón selectivo obtenidos a partir de la cepa 51 con ciprofloxacino. ES- escalón selectivo, CL- clone.



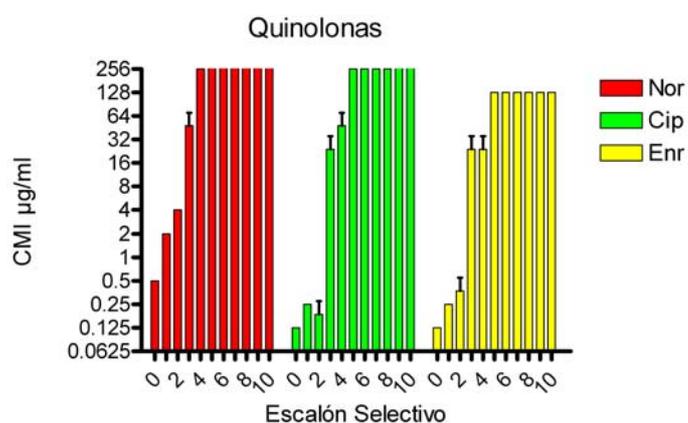
**Gráfico IV.5.-** Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Nor- norfloxacino, Cip- ciprofloxacino, Enr- enrofloxacino. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (51).



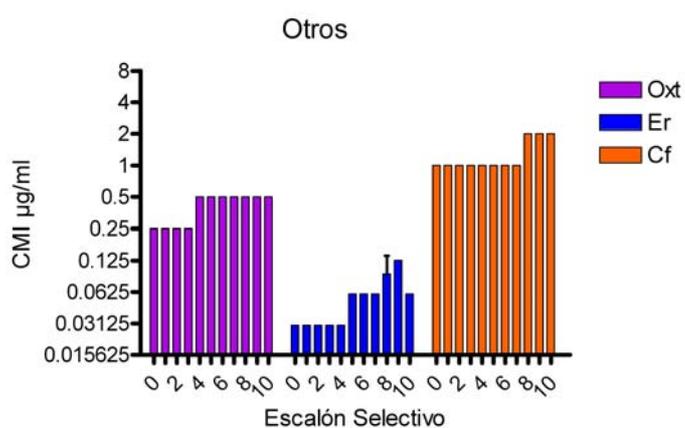
**Gráfico IV.6.-** Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Oxt- oxitetraciclina, Er- eritromicina, Cf- cloranfenicol. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (51).

Cepa		CMI (µg/ml)					
		NOR	CIP	ENR	OXT	ER	CF
61		0,5	0,125	0,125	0,250	0,03	1
ES1	CL1	2	0,250	0,250	0,250	0,03	1
	CL2	2	0,250	0,250	0,250	0,03	1
ES2	CL1	4	0,125	0,5	0,250	0,03	1
	CL2	4	0,250	0,250	0,250	0,03	1
ES3	CL1	64	32	32	0,250	0,03	1
	CL2	32	16	16	0,250	0,03	1
ES4	CL1	256	64	32	0,5	0,03	1
	CL2	256	32	16	0,5	0,03	1
ES5	CL1	>256	256	128	0,5	0,06	1
	CL2	>256	256	128	0,5	0,06	1
ES6	CL1	>256	256	128	0,5	0,06	1
	CL2	>256	256	128	0,5	0,06	1
ES7	CL1	>256	256	128	0,5	0,06	1
	CL2	>256	256	128	0,5	0,06	1
ES8	CL1	>256	256	128	0,5	0,125	2
	CL2	>256	256	128	0,5	0,06	2
ES9	CL1	>256	>256	128	0,5	0,125	2
	CL2	>256	256	128	0,5	0,125	2
ES10	CL1	>256	>256	128	0,5	0,06	2
	CL2	>256	256	128	0,5	0,06	2

**Tabla IV.11.-** CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en µg/ml en los dos clones de cada escalón selectivo obtenidos a partir de la cepa 61 con ciprofloxacino. ES- escalón selectivo, CL- clone.



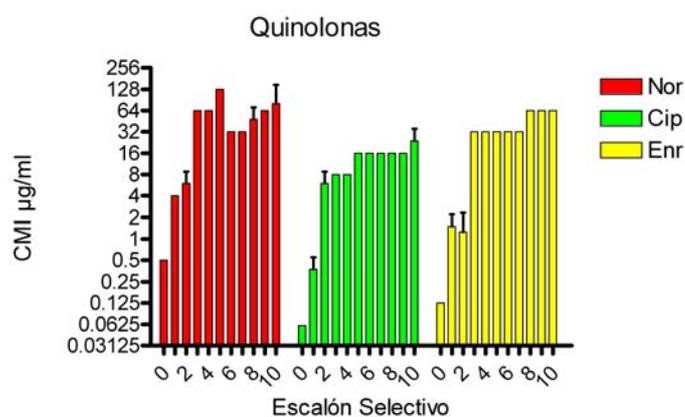
**Gráfico IV.7.-** Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Nor- norfloxacino, Cip- ciprofloxacino, Enr- enrofloxacino. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (61).



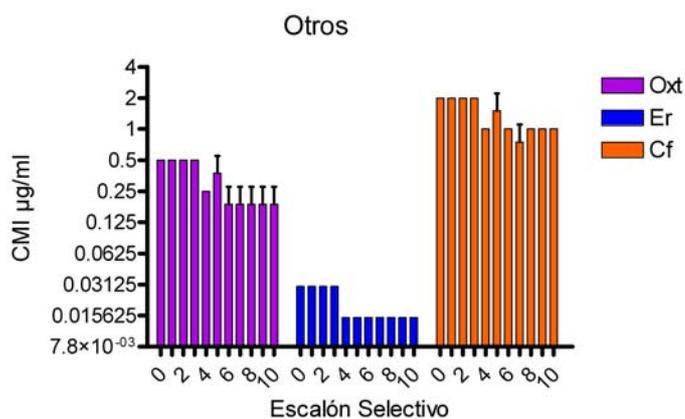
**Gráfico IV.8.-** Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Oxt- oxitetraciclina, Er- eritromicina, Cf- cloranfenicol. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (61).

Cepa		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		NOR	CIP	ENR	OXT	ER	CF
57		0,5	0,06	0,125	0,5	0,03	2
ES1	CL1	4	0,250	2	0,5	0,03	2
	CL2	4	0,5	1	0,5	0,03	2
ES2	CL1	4	8	0,5	0,5	0,03	2
	CL2	8	4	2	0,5	0,03	2
ES3	CL1	64	8	32	0,5	0,03	2
	CL2	64	8	32	0,5	0,03	2
ES4	CL1	64	8	32	0,250	0,015	1
	CL2	64	8	32	0,250	0,015	1
ES5	CL1	128	16	32	0,250	0,015	1
	CL2	128	16	32	0,5	0,015	2
ES6	CL1	32	16	32	0,125	0,015	1
	CL2	32	16	32	0,250	0,015	1
ES7	CL1	32	16	32	0,250	0,015	1
	CL2	32	16	32	0,125	0,015	0,5
ES8	CL1	32	16	64	0,125	0,015	1
	CL2	64	16	64	0,250	0,015	1
ES9	CL1	64	16	64	0,250	0,015	1
	CL2	64	16	64	0,125	0,015	1
ES10	CL1	128	32	64	0,250	0,015	1
	CL2	32	16	64	0,125	0,015	1

**Tabla IV.12.-** CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en  $\mu\text{g/ml}$  en los dos clones de cada escalón selectivo obtenidos a partir de la cepa 57 con enrofloxacin. ES- escalón selectivo, CL- clone.



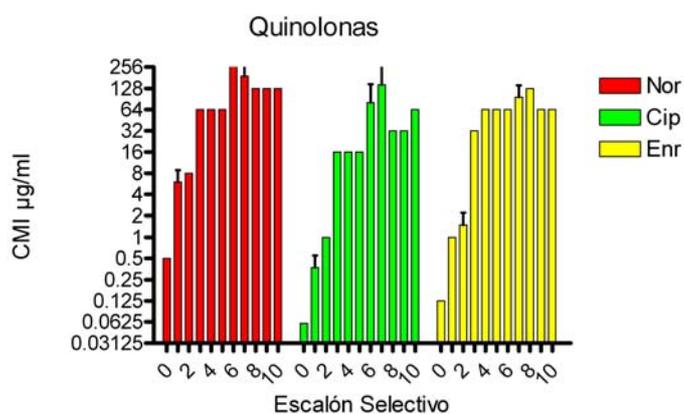
**Gráfico IV.9.-** Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Nor- norfloxacin, Cip- ciprofloxacin, Enr- enrofloxacin. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (57).



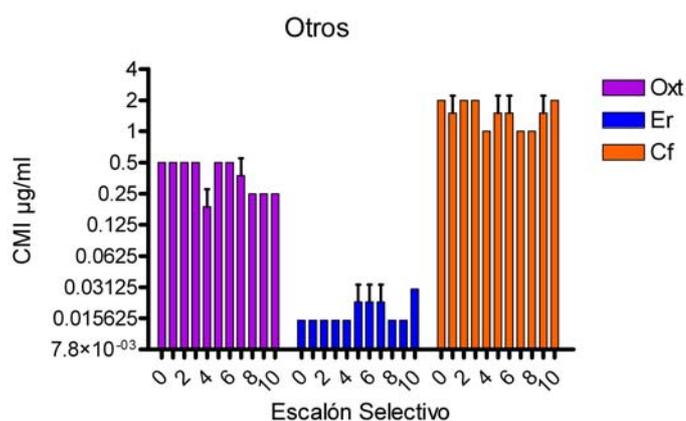
**Gráfico IV.10.-** Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Oxt- oxitetraciclina, Er- eritromicina, Cf- cloranfenicol. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (57).

Cepa		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		NOR	CIP	ENR	OXT	ER	CF
58		0,5	0,06	0,125	0,5	0,015	2
ES1	CL1	8	0,250	1	0,5	0,015	2
	CL2	4	0,5	1	0,5	0,015	1
ES2	CL1	8	1	2	0,5	0,015	2
	CL2	8	1	1	0,5	0,015	2
ES3	CL1	64	16	32	0,5	0,015	2
	CL2	64	16	32	0,5	0,015	2
ES4	CL1	64	16	64	0,125	0,015	1
	CL2	64	16	64	0,250	0,015	1
ES5	CL1	64	16	64	0,5	0,03	2
	CL2	64	16	64	0,5	0,015	1
ES6	CL1	>256	128	64	0,5	0,03	2
	CL2	128	32	64	0,5	0,015	1
ES7	CL1	128	32	64	0,250	0,015	1
	CL2	128	32	64	0,250	0,015	1
ES8	CL1	128	32	64	0,250	0,015	1
	CL2	128	32	64	0,250	0,015	1
ES9	CL1	128	32	64	0,250	0,015	2
	CL2	128	32	64	0,250	0,015	1
ES10	CL1	128	64	64	0,250	0,03	2
	CL2	128	64	64	0,250	0,03	2

**Tabla IV.13.-** CMI del norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), enrofloxacin (ENR), oxitetraciclina (OXT), eritromicina (ER) y cloranfenicol (CF) en  $\mu\text{g/ml}$  en los dos clones de cada escalón selectivo obtenidos a partir de la cepa 58 con enrofloxacin. ES- escalón selectivo, CL- clone.



**Gráfico IV.11.-** Valor medio de la CMI de las quinolonas de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Nor- norfloxacin, Cip- ciprofloxacin, Enr- enrofloxacin. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (58).



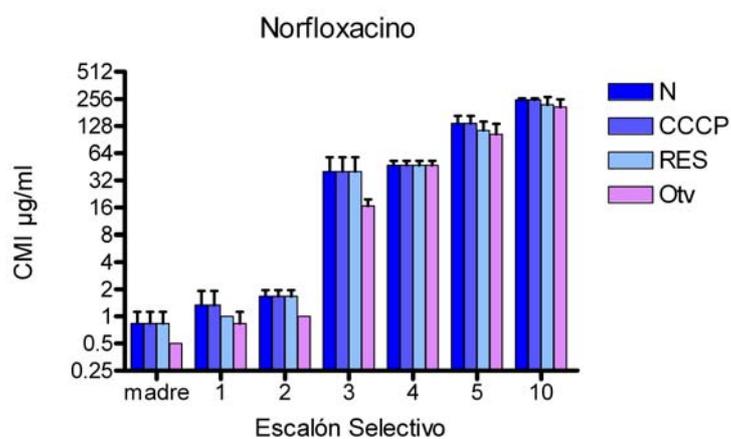
**Gráfico IV.12.-** Valor medio de la CMI de antimicrobianos no relacionados de los dos clones a lo largo de los distintos escalones selectivos. Oxt- oxitetraciclina, Er- eritromicina, Cf- cloranfenicol. El escalón 0 corresponde a la cepa madre (58).

	Norfloxacinó		Ciprofloxacino		Enrofloxacinó	
	51		51	61	57	
ES 1	2		1	2	2	
ES 2	2		1	2	2	
ES 3	1		2	1	2	
ES 4	1		1	1	1	
ES 5	1		1	2	1	
ES 6	1		1	1	1	
ES 7	2		1	1	1	
ES 8	2		1	1	1	
ES 9	2		1	1	1	
ES10	2		1	1	1	

**Tabla V.14.-** Clones utilizados para los experimentos de este capítulo.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,83 $\pm$ 0,29	0,83 $\pm$ 0,29	0,83 $\pm$ 0,29	0,50 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	1,33 $\pm$ 0,58	1,33 $\pm$ 0,58	1,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,29
<b>ES2</b>	1,67 $\pm$ 0,29	1,67 $\pm$ 0,29	1,67 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 0,00
<b>ES3</b>	40,0 $\pm$ 17,32	40,0 $\pm$ 17,32	40,00 $\pm$ 17,32	16,67 $\pm$ 2,89
<b>ES4</b>	46,67 $\pm$ 5,77	46,67 $\pm$ 5,77	46,67 $\pm$ 5,77	46,67 $\pm$ 5,77
<b>ES5</b>	136,67 $\pm$ 28,87	136,67 $\pm$ 28,87	115,00 $\pm$ 27,84	103,33 $\pm$ 31,75
<b>ES10</b>	250,67 $\pm$ 9,24	250,67 $\pm$ 9,24	220,00 $\pm$ 49,15	206,67 $\pm$ 46,36

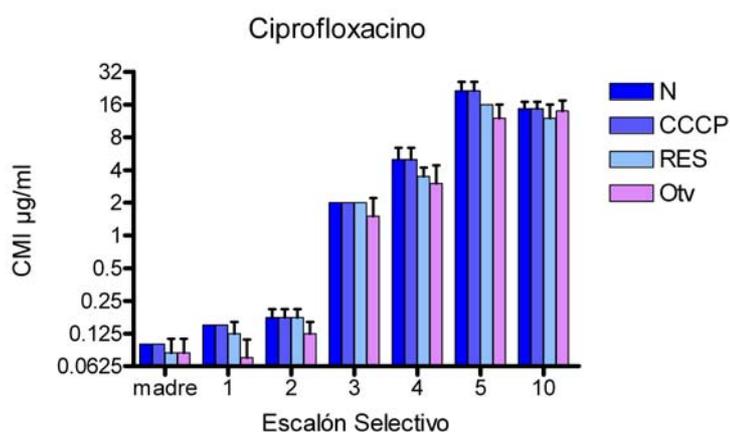
**Tabla IV.15.-** CMI del norfloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.13.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03
<b>ES1</b>	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,04
<b>ES2</b>	0,17 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,04
<b>ES3</b>	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,71
<b>ES4</b>	5,00 $\pm$ 1,41	5,00 $\pm$ 1,41	3,50 $\pm$ 0,71	3,00 $\pm$ 1,41
<b>ES5</b>	21,33 $\pm$ 4,62	21,33 $\pm$ 4,62	16,00 $\pm$ 0,00	12,00 $\pm$ 4,00
<b>ES10</b>	14,67 $\pm$ 2,31	14,67 $\pm$ 2,31	12,00 $\pm$ 4,00	14,00 $\pm$ 3,46

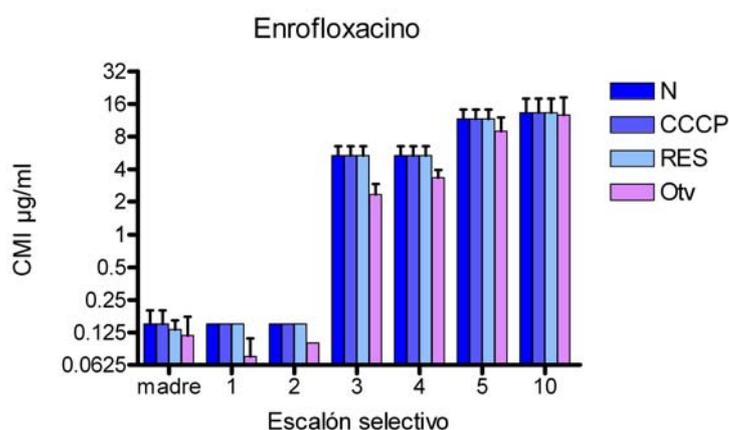
**Tabla IV.16.-** CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacino en la cepa 51. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.14.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacino en la cepa 51. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,06
<b>ES1</b>	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,033
<b>ES2</b>	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00
<b>ES3</b>	5,33 $\pm$ 1,15	5,33 $\pm$ 1,15	5,33 $\pm$ 1,15	2,33 $\pm$ 0,58
<b>ES4</b>	5,33 $\pm$ 1,15	5,33 $\pm$ 1,15	5,33 $\pm$ 1,15	3,33 $\pm$ 0,58
<b>ES5</b>	11,67 $\pm$ 2,52	11,67 $\pm$ 2,52	11,67 $\pm$ 2,52	9,00 $\pm$ 3,00
<b>ES10</b>	13,33 $\pm$ 4,62	13,33 $\pm$ 4,62	13,33 $\pm$ 4,62	12,67 $\pm$ 5,77

**Tabla IV.17.-** CMI del enrofloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51. El resultado es la media con su desviación estándar.



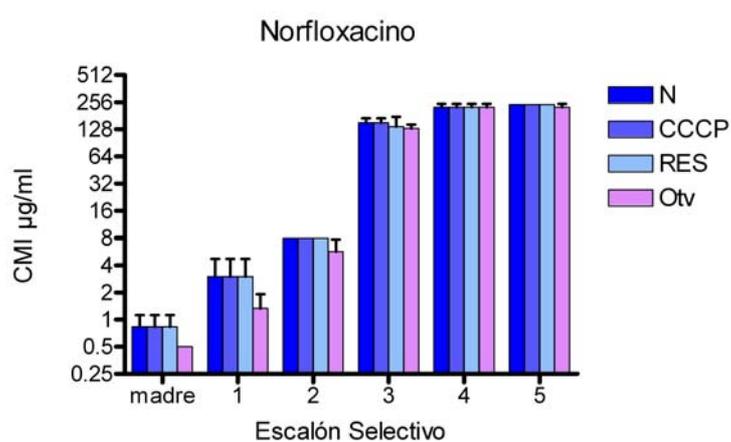
**Gráfico IV.15.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con norfloxacin en la cepa 51. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Norfloxacinó		Ciprofloxacino		Enrofloxacinó	
	Res	Otv	Res	Otv	Res	Otv
<b>Madre</b>	1,00	1,67	1,25	1,25	1,15	1,25
<b>ES1</b>	1,33	1,60	1,15	1,88	1,00	1,88
<b>ES2</b>	1,00	1,67	1,00	1,31	1,00	1,50
<b>ES3</b>	1,00	2,40	1,00	1,33	1,00	2,29
<b>ES4</b>	1,00	1,00	1,43	1,67	1,00	1,60
<b>ES5</b>	1,19	1,32	1,33	1,78	1,00	1,30
<b>ES10</b>	1,14	1,21	1,22	1,05	1,00	1,05

**Tabla IV.18.-** Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 51 y mutantes seleccionados con norfloxacinó. Res- reserpina, Otv- ortovanadato, ND- no determinado.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,83 $\pm$ 0,29	0,83 $\pm$ 0,29	0,83 $\pm$ 0,29	0,50 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	3,00 $\pm$ 1,73	3,00 $\pm$ 1,73	3,00 $\pm$ 1,73	1,33 $\pm$ 0,58
<b>ES2</b>	8,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 0,00	5,67 $\pm$ 2,08
<b>ES3</b>	152,00 $\pm$ 16,97	152,00 $\pm$ 16,97	137,00 $\pm$ 38,18	131,00 $\pm$ 12,73
<b>ES4</b>	225,00 $\pm$ 21,21	225,00 $\pm$ 21,21	225,00 $\pm$ 21,21	225,00 $\pm$ 21,2
<b>ES5</b>	240,00 $\pm$ 0,00	240,00 $\pm$ 0,00	240,00 $\pm$ 0,00	225,00 $\pm$ 21,2

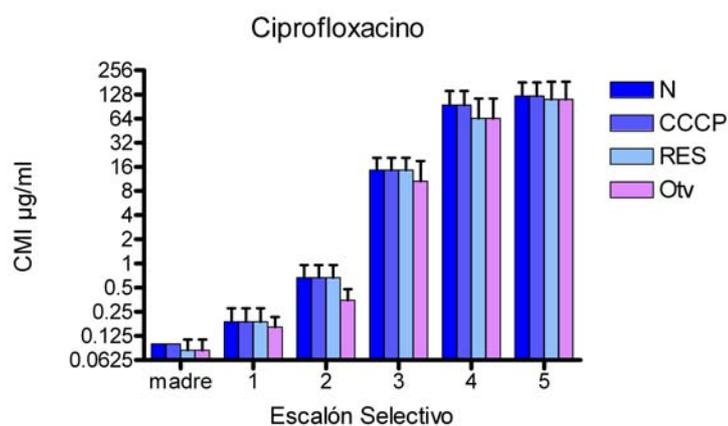
**Tabla IV.19.-** CMI del norfloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.16.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03
<b>ES1</b>	0,19 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,09	0,16 $\pm$ 0,05
<b>ES2</b>	0,67 $\pm$ 0,29	0,67 $\pm$ 0,29	0,67 $\pm$ 0,29	0,35 $\pm$ 0,13
<b>ES3</b>	14,67 $\pm$ 6,11	14,67 $\pm$ 6,11	14,67 $\pm$ 6,11	10,67 $\pm$ 8,33
<b>ES4</b>	94,67 $\pm$ 47,34	94,67 $\pm$ 47,34	64,67 $\pm$ 49,81	64,67 $\pm$ 49,81
<b>ES5</b>	122,00 $\pm$ 59,40	122,00 $\pm$ 59,40	112,00 $\pm$ 73,54	112,00 $\pm$ 73,54

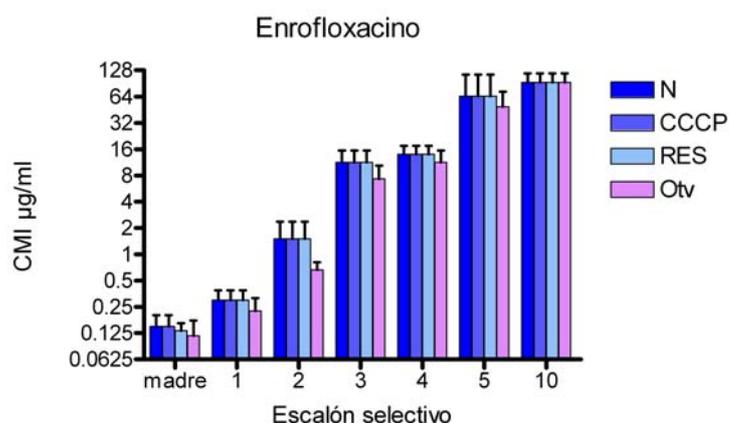
**Tabla IV.20.-** CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.17.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,06
<b>ES1</b>	0,30 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,09	0,23 $\pm$ 0,09
<b>ES2</b>	1,50 $\pm$ 0,87	1,50 $\pm$ 0,87	1,50 $\pm$ 0,87	0,67 $\pm$ 0,14
<b>ES3</b>	11,33 $\pm$ 4,16	11,33 $\pm$ 4,16	11,33 $\pm$ 4,16	7,33 $\pm$ 3,06
<b>ES4</b>	14,00 $\pm$ 3,46	14,00 $\pm$ 3,46	14,00 $\pm$ 3,46	11,33 $\pm$ 4,16
<b>ES5</b>	64,67 $\pm$ 49,81	64,67 $\pm$ 49,81	64,67 $\pm$ 49,81	49,33 $\pm$ 23,44
<b>ES10</b>	92,67 $\pm$ 25,48	92,67 $\pm$ 25,48	92,67 $\pm$ 25,48	92,67 $\pm$ 25,48

**Tabla IV.21.-** CMI del enrofloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51. El resultado es la media con su desviación estándar.



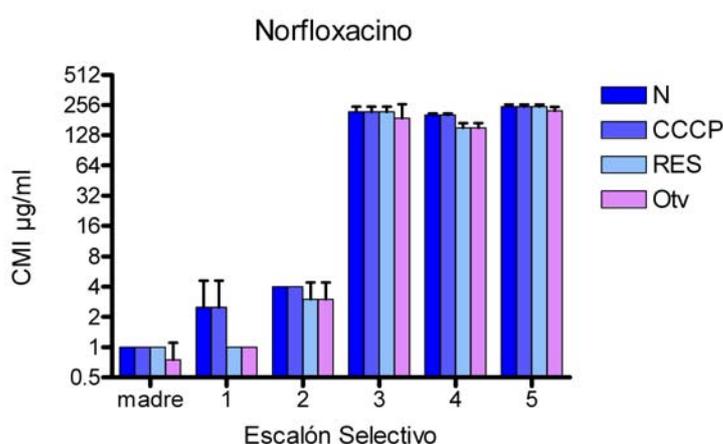
**Gráfico IV.18.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 51. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Norfloxacinó		Ciprofloxacino		Enrofloxacinó	
	Res	Otv	Res	Otv	Res	Otv
<b>Madre</b>	1,00	1,66	1,25	1,25	1,15	1,25
<b>ES1</b>	1,00	2,26	1,00	1,19	1,00	1,30
<b>ES2</b>	1,00	1,41	1,00	1,91	1,00	2,24
<b>ES3</b>	1,11	1,11-1,16	1,00	1,37	1,00	1,55
<b>ES4</b>	1,00	1,00	1,46	1,46	1,00	1,23
<b>ES5</b>	1,00	1,07	1,09	1,09	1,00	1,31
<b>ES10</b>	ND	ND	ND	ND	1,00	1,00

**Tabla IV.22.-** Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 51 y mutantes seleccionados con ciprofloxacino. Res- reserpina, Otv- ortovanadato, ND- no determinado.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 0,35
<b>ES1</b>	2,50 $\pm$ 2,12	2,50 $\pm$ 2,12	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
<b>ES2</b>	4,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 1,41	3,00 $\pm$ 1,41
<b>ES3</b>	220,00 $\pm$ 28,28	220,00 $\pm$ 28,28	220,00 $\pm$ 28,28	190,00 $\pm$ 70,71
<b>ES4</b>	205,00 $\pm$ 7,07	205,00 $\pm$ 7,07	152,00 $\pm$ 16,97	152,00 $\pm$ 16,97
<b>ES5</b>	248,00 $\pm$ 11,31	248,00 $\pm$ 11,31	248,00 $\pm$ 11,31	225,00 $\pm$ 21,21

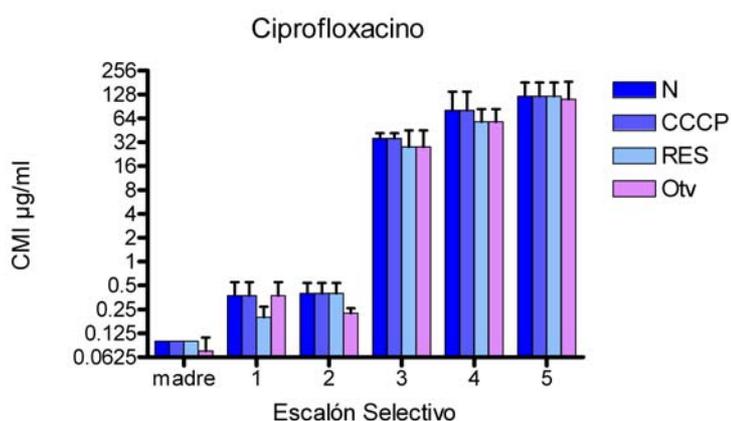
**Tabla IV.23.-** CMI del norfloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.19.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,04
<b>ES1</b>	0,37 $\pm$ 0,18	0,37 $\pm$ 0,18	0,20 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,18
<b>ES2</b>	0,40 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,14	0,23 $\pm$ 0,04
<b>ES3</b>	36,00 $\pm$ 5,66	36,00 $\pm$ 5,66	28,00 $\pm$ 16,97	28,00 $\pm$ 16,97
<b>ES4</b>	81,00 $\pm$ 57,98	81,00 $\pm$ 57,98	58,00 $\pm$ 25,46	58,00 $\pm$ 25,46
<b>ES5</b>	122,00 $\pm$ 59,40	122,00 $\pm$ 59,40	122,00 $\pm$ 59,40	112,00 $\pm$ 73,54

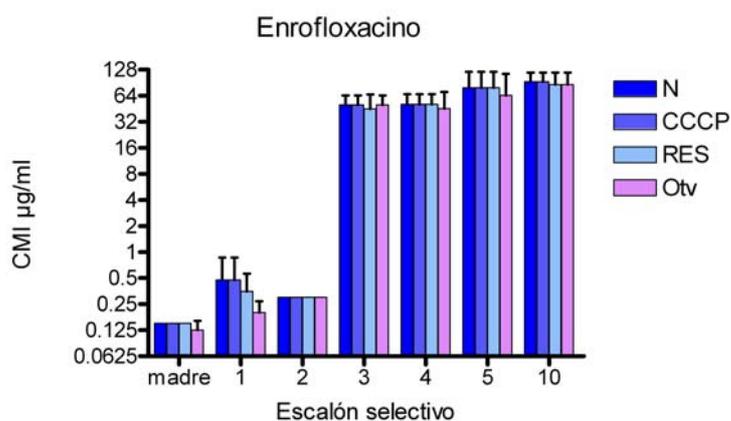
**Tabla IV.24.-** CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.20.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ ,000	0,13 $\pm$ 0,04
<b>ES1</b>	0,48 $\pm$ 0,39	0,48 $\pm$ 0,39	0,35 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,07
<b>ES2</b>	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00
<b>ES3</b>	50,00 $\pm$ 14,14	50,00 $\pm$ 14,14	45,00 $\pm$ 21,21	50,00 $\pm$ 14,14
<b>ES4</b>	50,67 $\pm$ 14,17	50,67 $\pm$ 14,17	50,67 $\pm$ 14,17	45,33 $\pm$ 25,40
<b>ES5</b>	79,33 $\pm$ 41,10	79,33 $\pm$ 41,10	79,33 $\pm$ 41,10	64,67 $\pm$ 49,81
<b>ES10</b>	92,67 $\pm$ 25,48	92,67 $\pm$ 25,48	86,00 $\pm$ 32,19	86,00 $\pm$ 32,19

**Tabla IV.25.-** CMI del enrofloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61. El resultado es la media con su desviación estándar.



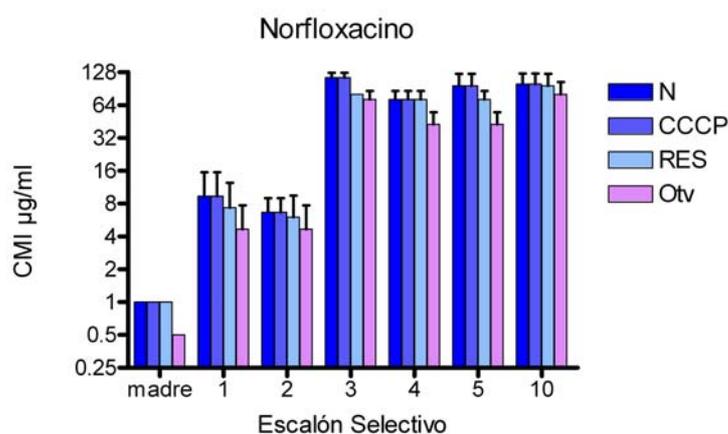
**Gráfico IV.21.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con ciprofloxacino en la cepa 61. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Norfloxacinó		Ciprofloxacino		Enrofloxacinó	
	Res	Otv	Res	Otv	Res	Otv
<b>Madre</b>	1,00	1,33	1,00	1,25	1,00	1,15
<b>ES1</b>	2,50	2,50	1,85	1,85	2,40	2,40
<b>ES2</b>	1,33	1,33	1,00	1,74	1,00	1,00
<b>ES3</b>	1,00	1,16	1,28	1,28	1,11	1,11
<b>ES4</b>	1,35	1,35	1,40	1,40	1,00	1,11
<b>ES5</b>	1,00	1,10	1,00	1,09	1,00	1,23
<b>ES10</b>	ND	ND	ND	ND	1,08	1,08

**Tabla IV.26.-** Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 61 y mutantes seleccionados con ciprofloxacino. Res- reserpina, Otv- ortovanadato, ND- no determinado.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	9,33 $\pm$ 6,11	9,33 $\pm$ 6,11	7,33 $\pm$ 5,03	4,67 $\pm$ 3,06
<b>ES2</b>	6,67 $\pm$ 2,31	6,67 $\pm$ 2,31	6,00 $\pm$ 3,46	4,67 $\pm$ 3,06
<b>ES3</b>	114,00 $\pm$ 12,49	114,00 $\pm$ 12,49	80,00 $\pm$ 0,00	72,00 $\pm$ 13,86
<b>ES4</b>	72,00 $\pm$ 13,86	72,00 $\pm$ 13,86	72,00 $\pm$ 13,86	42,67 $\pm$ 12,22
<b>ES5</b>	96,00 $\pm$ 27,71	96,00 $\pm$ 27,71	72,00 $\pm$ 13,86	42,67 $\pm$ 12,22
<b>ES10</b>	99,33 $\pm$ 25,32	99,33 $\pm$ 25,32	96,00 $\pm$ 27,71	80,00 $\pm$ 24,00

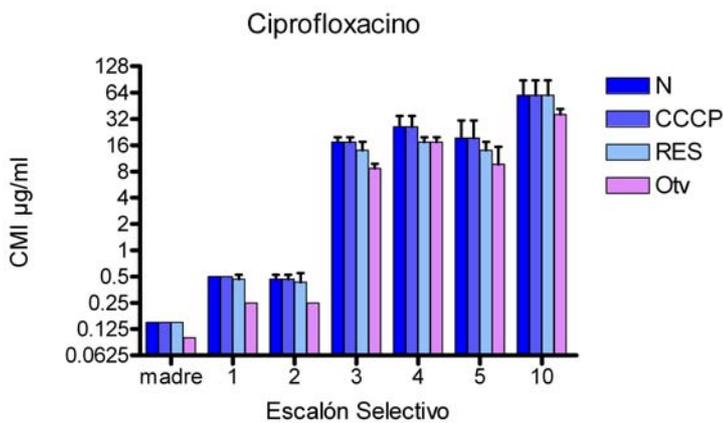
**Tabla IV.27.-** CMI del norfloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.22.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	0,40 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,14	0,38 $\pm$ 0,18	0,23 $\pm$ 0,04
<b>ES2</b>	1,00 $\pm$ 0,87	1,00 $\pm$ 0,87	0,48 $\pm$ 0,23	0,25 $\pm$ 0,00
<b>ES3</b>	17,33 $\pm$ 2,31	17,33 $\pm$ 2,31	14,00 $\pm$ 3,46	7,33 $\pm$ 3,06
<b>ES4</b>	14,00 $\pm$ 3,46	14,00 $\pm$ 3,46	11,33 $\pm$ 4,16	5,67 $\pm$ 2,08
<b>ES5</b>	17,33 $\pm$ 2,31	17,33 $\pm$ 2,31	17,33 $\pm$ 2,31	10,00 $\pm$ 6,00
<b>ES10</b>	42,67 $\pm$ 12,22	42,67 $\pm$ 12,22	42,67 $\pm$ 12,22	17,33 $\pm$ 2,31

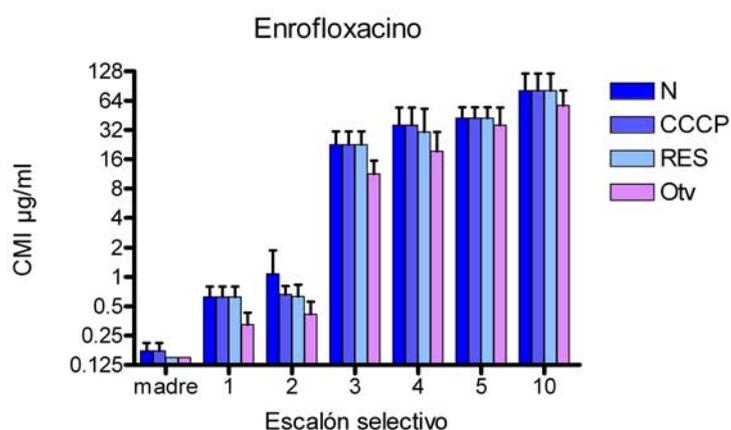
**Tabla IV.28.-** CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.23.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,18 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	0,63 $\pm$ 0,18	0,63 $\pm$ 0,18	0,63 $\pm$ 0,18	0,33 $\pm$ 0,11
<b>ES2</b>	1,08 $\pm$ 0,80	1,08 $\pm$ 0,80	0,63 $\pm$ 0,20	0,42 $\pm$ 0,14
<b>ES3</b>	22,67 $\pm$ 8,33	22,67 $\pm$ 8,33	22,67 $\pm$ 8,33	11,33 $\pm$ 4,16
<b>ES4</b>	36,00 $\pm$ 18,33	36,00 $\pm$ 18,33	30,67 $\pm$ 22,03	19,33 $\pm$ 11,37
<b>ES5</b>	42,67 $\pm$ 12,22	42,67 $\pm$ 12,22	42,67 $\pm$ 12,22	36,00 $\pm$ 18,33
<b>ES10</b>	81,33 $\pm$ 40,46	81,33 $\pm$ 40,46	81,33 $\pm$ 40,46	57,33 $\pm$ 24,11

**Tabla IV.29.-** CMI del enrofloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57. El resultado es la media con su desviación estándar.



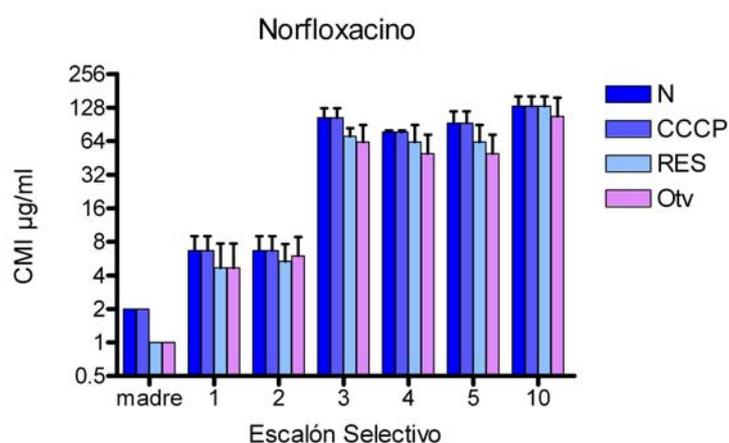
**Gráfico IV.24.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 57. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Norfloxacinó		Ciprofloxacino		Enrofloxacinó	
	Res	Otv	Res	Otv	Res	Otv
<b>Madre</b>	1,00	2,00	1,00	1,00	1,20	1,20
<b>ES1</b>	1,27	2,00	1,05	1,74	1,00	1,91
<b>ES2</b>	1,11	1,43	2,08	4,00	1,71	2,57
<b>ES3</b>	1,43	1,58	1,24	2,36	1,00	2,00
<b>ES4</b>	1,00	1,69	1,23	2,47	1,17	1,86
<b>ES5</b>	1,33	2,25	1,00	1,73	1,00	1,19
<b>ES10</b>	1,03	1,24	1,00	2,46	1,00	1,42

**Tabla IV.30.-** Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 57 y mutantes seleccionados con enrofloxacinó. Res- reserpina, Otv- ortovanadato, ND- no determinado.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	6,67 $\pm$ 2,31	6,67 $\pm$ 2,31	4,67 $\pm$ 3,06	4,67 $\pm$ 3,06
<b>ES2</b>	6,67 $\pm$ 2,31	6,67 $\pm$ 2,31	5,33 $\pm$ 2,31	6,00 $\pm$ 2,83
<b>ES3</b>	104,00 $\pm$ 21,63	104,00 $\pm$ 21,63	70,67 $\pm$ 12,86	62,67 $\pm$ 26,63
<b>ES4</b>	77,33 $\pm$ 2,31	77,33 $\pm$ 2,31	62,67 $\pm$ 26,63	49,33 $\pm$ 23,44
<b>ES5</b>	92,67 $\pm$ 25,48	92,67 $\pm$ 25,48	62,67 $\pm$ 26,63	49,33 $\pm$ 23,44
<b>ES10</b>	132,00 $\pm$ 28,35	132,00 $\pm$ 28,35	132,00 $\pm$ 28,35	106,67 $\pm$ 49,69

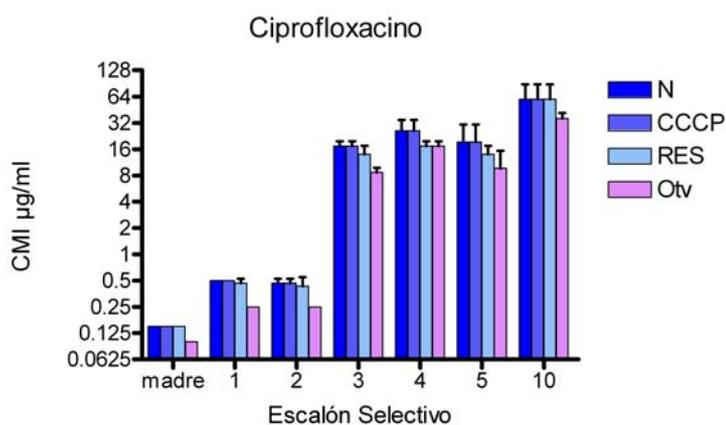
**Tabla IV.31.-** CMI del norfloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.25.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del norfloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	0,50 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,00
<b>ES2</b>	0,47 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,00
<b>ES3</b>	17,33 $\pm$ 2,31	17,33 $\pm$ 2,31	14,00 $\pm$ 3,46	8,67 $\pm$ 1,15
<b>ES4</b>	26,00 $\pm$ 8,72	26,00 $\pm$ 8,72	17,33 $\pm$ 2,31	17,33 $\pm$ 2,31
<b>ES5</b>	19,33 $\pm$ 11,37	19,33 $\pm$ 11,37	14,00 $\pm$ 3,46	9,67 $\pm$ 5,69
<b>ES10</b>	60,00 $\pm$ 28,28	60,00 $\pm$ 28,28	60,00 $\pm$ 28,28	36,00 $\pm$ 5,66

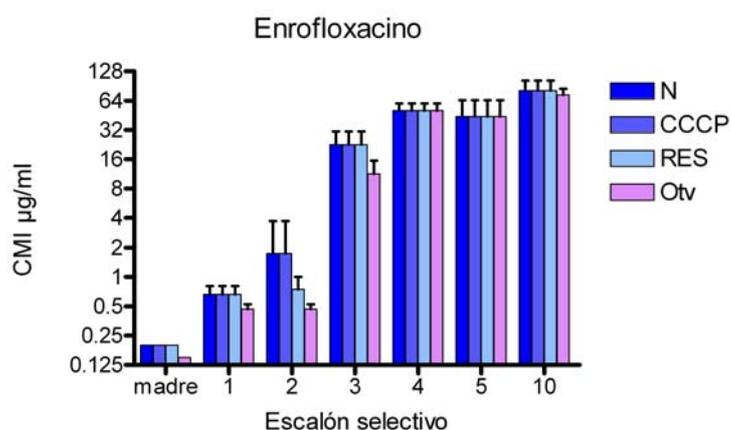
**Tabla IV.32.-** CMI del ciprofloxacino en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58. El resultado es la media con su desviación estándar.



**Gráfico IV.26.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del ciprofloxacino sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Normal	CCCP	Reserpina	Ortovanadato
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Madre</b>	0,20 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00
<b>ES1</b>	0,67 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,14	0,47 $\pm$ 0,06
<b>ES2</b>	1,75 $\pm$ 1,95	1,75 $\pm$ 1,95	0,75 $\pm$ 0,25	0,47 $\pm$ 0,06
<b>ES3</b>	22,67 $\pm$ 8,33	22,67 $\pm$ 8,33	22,67 $\pm$ 8,33	11,33 $\pm$ 4,16
<b>ES4</b>	50,67 $\pm$ 9,24	50,67 $\pm$ 9,24	50,67 $\pm$ 9,24	50,67 $\pm$ 9,24
<b>ES5</b>	44,00 $\pm$ 20,78	44,00 $\pm$ 20,78	44,00 $\pm$ 20,78	44,00 $\pm$ 20,78
<b>ES10</b>	81,33 $\pm$ 22,03	81,33 $\pm$ 22,03	81,33 $\pm$ 22,03	73,33 $\pm$ 11,55

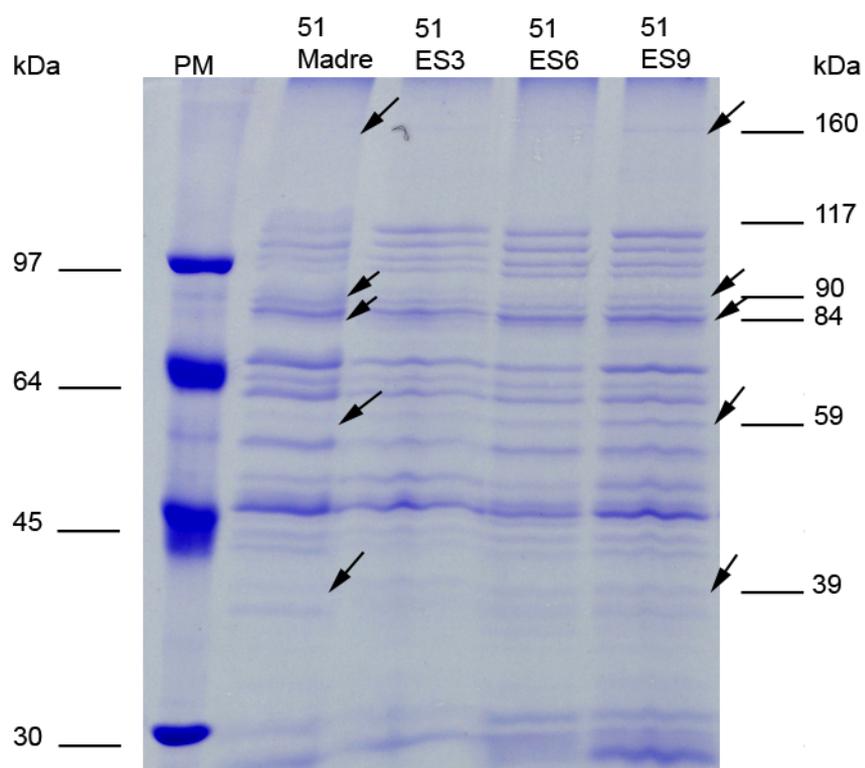
**Tabla IV.33.-** CMI del enrofloxacin en medio normal y con inhibidores de sistemas de expulsión sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58. El resultado es la media con su desviación estándar.



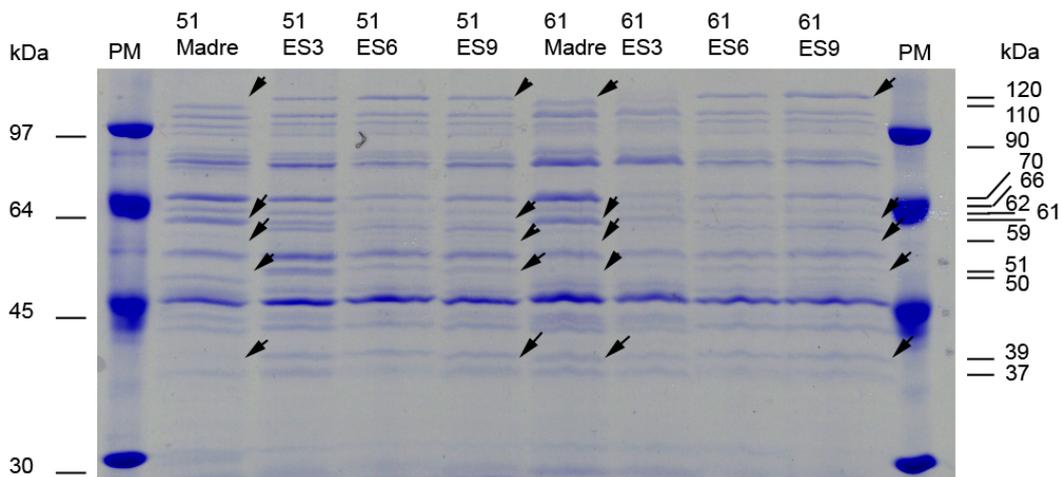
**Gráfico IV.27.-** Efecto de los inhibidores de sistemas de expulsión en la CMI del enrofloxacin sobre diversos mutantes seleccionados con enrofloxacin en la cepa 58. N- medio PH normal, CCCP- con CCCP, Res- con reserpina, Otv- con ortovanadato.

	Norfloxacinó		Ciprofloxacino		Enrofloxacinó	
	Res	Otv	Res	Otv	Res	Otv
<b>Madre</b>	2,00	2,00	1,00	1,50	1,00	1,33
<b>ES1</b>	1,43	1,43	1,06	2,00	1,00	1,43
<b>ES2</b>	1,25	1,11	1,09	1,88	2,33	3,7
<b>ES3</b>	1,47	1,66	1,24	2,00	1,00	2,00
<b>ES4</b>	1,23	1,57	1,50	1,50	1,00	1,00
<b>ES5</b>	1,48	1,88	1,38	2,00	1,00	1,00
<b>ES10</b>	1,00	1,24	1,00	1,67	1,00	1,11

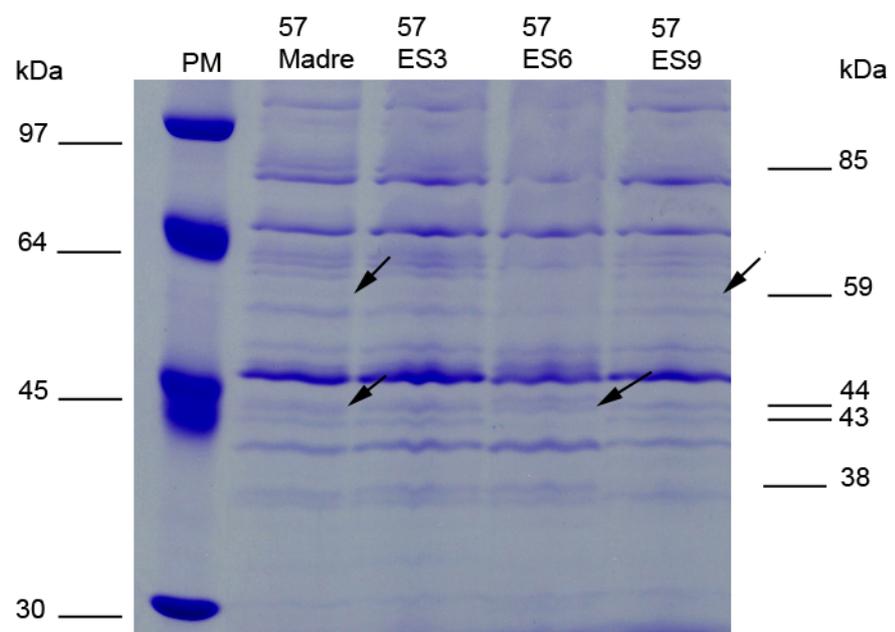
**Tabla IV.34.-** Variación de la CMI del norfloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en presencia de los inhibidores con respecto a la determinada en su ausencia sobre la cepa 58 y mutantes seleccionados con enrofloxacinó. Res- reserpina, Otv- ortovanadato, ND- no determinado.



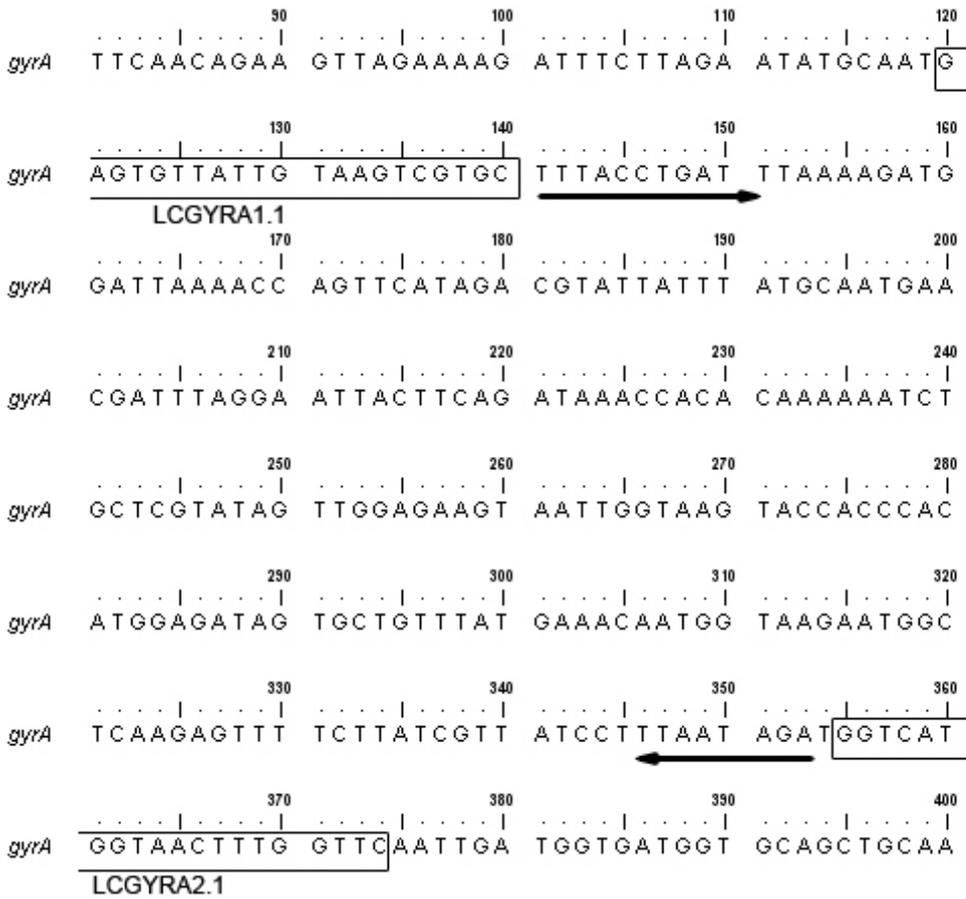
**Figura IV.1.-** Electroforesis de las proteínas de membrana de la cepa 51 madre y los escalones selectivos 3, 6 y 9 de la selección con norfloxacino. Las flechas indican las bandas cuya expresión se ha visto aumentada; por una cuestión de facilidad de interpretación solamente se marcaron en la cepa madre y en el mutante del último escalón. PM- marcador de peso molecular.



**Figura IV.2.-** Electroforesis de las proteínas de membrana des las cepas 51 y 61 madre y los escalones selectivos 3, 6 y 9 de la selección con ciprofloxacino. Las flechas indican las bandas cuya expresión se ha visto aumentada; por una cuestión de facilidad de interpretación solamente se marcaron en la cepa madre y en el mutante del último escalón. PM- marcador de peso molecular.



**Figura IV.3.-** Electroforesis de las proteínas de membrana de la 57 madre y de los escalones 3, 6 y 9 de la selección con enrofloxacino. Las flechas indican las bandas cuya expresión se ha visto aumentada; por una cuestión de facilidad de interpretación solamente se marcaron en la cepa madre y en el mutante del último escalón. PM-marcador de peso molecular.



**Figura IV.4.-** Parte de la secuencia de *gyrA* con el punto de inserción de los primers correspondientes.







	50	60	70	80	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .
	SRALPD	LKDGLKPVHR	R I I Y A M N D L G	I T S D K P H K K S	A R I V
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .	C . . . . .	. . . . .	. . . . .
	90	100	110	120	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .
	GEVIGK	YHPHGDSAVY	ETMVRMAQEF	SYRYPLIDGH	
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .

**Figura IV.8.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrA* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.



**Figura IV.9.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrB* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.

	70	80	90	100
	..	.....	.....	.....
<i>madre</i>	VVG	EVIGKYHPHG	DSSIYDAMVR	MSQWWKVNIP
<i>ES1</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....Y	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....N	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....N	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....N	.....

	110	120
	..	.....
<i>madre</i>	NGS	IDGDSAAAMR
<i>ES1</i>	...	.....
<i>ES2</i>	...	.....
<i>ES3</i>	...	.....
<i>ES4</i>	...	.....
<i>ES5</i>	...	.....
<i>ES10</i>	...	.....

**Figura IV.10.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parC* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacino.

	410	420	430	440
<i>madre</i>	KLT	PAQGKKRELN	ELYLVEGDSA	GGSAKSGRDR
<i>ES1</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....	.....

	450	460	470	480
<i>madre</i>	LRG	KVINSEKAKL	VDLLKNEEIQ	SIINAIGAGV
<i>ES1</i>	...	.....	.....K.....	.....
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....K.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....K.....	.....

	490	500
<i>madre</i>	DIN	YGKIIIMTDA
<i>ES1</i>	...	.....
<i>ES2</i>	...	.....
<i>ES3</i>	...	.....
<i>ES4</i>	...	.....
<i>ES5</i>	...	.....
<i>ES10</i>	...	.....

**Figura IV.11.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parE* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con norfloxacin.

	50	60	70	80	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .
	SRALPD	LKDGLKPVHR	R I I Y A M N D L G	I T S D K P H K K S	A R I V
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES4</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .

	90	100	110	120	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .	. . . .
	GEVIGK	YHPHGDSAVY	ETMVRMAQEF	SYRYPLIDGH	
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES4</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .

**Figura IV.12.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrA* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.



	70	80	90	100	
<i>madre</i>	VVG	EVIGKYHPHG	DSSIYDAMVR	MSQWWKVNIP	LVDMQGN
<i>ES1</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....
<i>ES2</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....

	110	120
<i>madre</i>	NGS	IDGDSAAAMR
<i>ES1</i>	...	.....
<i>ES2</i>	...	.....
<i>ES3</i>	...	.....
<i>ES5</i>	...	.....
<i>ES10</i>	...	.....

**Figura IV.14.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parC* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.

	410		420		430		440	
<i>madre</i>	K L T	P A Q G K K R E L N	E L Y L V E G D S A	G G S A K S G R D R	N F Q A I L P			
<i>ES1</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES2</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES3</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES4</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES5</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES10</i>	...	...	...	...	...	...	...	...

	450		460		470		480	
<i>madre</i>	L R G	K V I N S E K A K L	V D L L K N E E I Q	S I I N A I G A G V	G K D F D I S			
<i>ES1</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES2</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES3</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES4</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES5</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES10</i>	...	...	...	...	...	...	...	...

	490		500	
<i>madre</i>	D I N	Y G K I I I M T D A	D T	
<i>ES1</i>	...	...	...	...
<i>ES2</i>	...	...	...	...
<i>ES3</i>	...	...	...	...
<i>ES4</i>	...	...	...	...
<i>ES5</i>	...	...	...	...
<i>ES10</i>	...	...	...	...

**Figura IV.15.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parE* de la cepa 51 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.

	50	60	70	80	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .
	SRALPD	LKDGLKPVHR	R I I Y A M N D L G	I T S D K P H K K S	A R I V
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES4</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .

	90	100	110	120	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .
	GEVIGK	YHPHGDSAVY	ETMVRMAQEF	SYRYPLIDGH	
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .   V . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES4</i>	. . . . .	. . . . .   V . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .   . . .	Q . . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .   V . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .

**Figura IV.16.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrA* de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.



	70	80	90	100	
	..	..... .....	..... .....	..... .....	
<i>madre</i>	VVG	EVIGKYHPHG	DSSIYDAMVR	MSQWWKVNIP	LVDMQGN
<i>ES1</i>	...	.....	.....	.....	.....
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....G.....	.....	.....

	110	120
	..	..... .....
<i>madre</i>	NGS	IDGDSAAAMR
<i>ES1</i>	...	.....
<i>ES2</i>	...	.....
<i>ES3</i>	...	.....
<i>ES5</i>	...	.....
<i>ES10</i>	...	.....

**Figura IV.18.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parC* de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.

	410		420		430		440	
<i>madre</i>	K L T	P A Q G K K R E L N	E L Y L V E G D S A	G G S A K S G R D R	N F Q A I L P			
<i>ES2</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES3</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES4</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES10</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
	450		460		470		480	
<i>madre</i>	L R G	K V I N S E K A K L	V D L L K N E E I Q	S I I N A I G A G V	G K D F D I S			
<i>ES2</i>	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>ES3</i>	...	...	...	...	... I K ...	...	...	...
<i>ES4</i>	...	...	...	...	... K ...	...	...	...
<i>ES10</i>	...	...	...	...	... K ...	...	...	...
	490		500					
<i>madre</i>	D I N	Y G K I I I M T D A	D T					
<i>ES2</i>	...	...	...	...				
<i>ES3</i>	...	...	...	...				
<i>ES4</i>	...	...	...	...				
<i>ES10</i>	...	...	...	...				

**Figura IV.19.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parE* de la cepa 61 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con ciprofloxacino.

		50		60		70		80	
		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>madre</i>		SRALPD	LKDGLKPVHR	R I I YAMNDLG	ITSDKPHKKS	ARIV			
<i>ES1</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES2</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES3</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES4</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES5</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

		90		100		110		120	
		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>madre</i>		GEVIGK	YHPHGDSAVY	ETMVRMAQEF	SYRYPLIDGH				
<i>ES1</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES2</i>		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES3</i>		.....	.....IV	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES4</i>		.....	.....IV	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES5</i>		.....	.....IV	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>		.....	.....IV	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Figura IV.20.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrA* de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

		420		430		440		450
		..... .....		..... .....		..... .....		..... .....
<i>madre</i>		ETKDSSIAEL		YLVEGDSAGG		SAKTGRNRKF		QAILPLRGKV
<i>ES3</i>		.....		.....		.....		.....
<i>ES4</i>		.....		.....		.....		.....
<i>ES10</i>		.....		.....		.....		.....S.....

		460		470		480		490
		..... .....		..... .....		..... .....		..... .....
<i>madre</i>		LNVERVTEAR		AFSNNEIKSI		ITAVGTGIKE		ELDLSKLRVK
<i>ES3</i>		.....		.....		.....		.....
<i>ES4</i>		.....		.....		.....		.....
<i>ES10</i>		.....		.....		.....		.....

		500
		..... .....
<i>madre</i>		KIVIMTDADV
<i>ES3</i>		.....
<i>ES4</i>		.....
<i>ES10</i>		.....

**Figura IV.21.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrB* de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

	70	80	90	100
	..	..... .....	..... .....	..... .....
<i>madre</i>	VVG	EVIGKYHPHG	DSSIYDAMVR	MSQWWKVNIP
<i>ES1</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....G.....	.....
<i>ES4</i>	---	-----	.....G.....	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....Y.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....Y.....	.....

	110	120
	..	..... .....
<i>madre</i>	NGS	IDGDSAAAMR
<i>ES1</i>	...	.....
<i>ES2</i>	...	.....
<i>ES3</i>	...	.....
<i>ES4</i>	...	.....
<i>ES5</i>	...	.....
<i>ES10</i>	...	.....

**Figura IV.22.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parC* de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

	410		420		430		440	
<i>madre</i>	KLT	PAQGGKKRELN	ELYLVEGDSA	GGSAKSGRDR	NFQA	ILP		
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	450		460		470		480	
<i>madre</i>	LRG	KVINSEKAKL	VDLLKNEEIQ	SIINAIGAGV	GKDFDIS			
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....	K	.....	.....	.....	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....	K	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....	K	.....	.....	.....	.....

	490		500	
<i>madre</i>	DIN	YGKIIIMTDA	DT	
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....	.....

**Figura IV.23.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parE* de la cepa 57 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacin.

	50	60	70	80	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .
	SRALPD	LKDGLKPVHR	R I I Y A M N D L G	I T S D K P H K K S	A R I V
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES4</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .

	90	100	110	120	
<i>madre</i>	. . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .   . . . .	. . . .
	GEVIGK	YHPHGDSAVY	ETMVRMAQEF	SYRYPLIDGH	
<i>ES1</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES2</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES3</i>	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES4</i>	. . . . .	. . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES5</i>	. . . . .	. . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .
<i>ES10</i>	. . . . .	. . . . .   V . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .

**Figura IV.24.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrA* de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

```

                                420          430          440          450
madre  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
ES5    ETKDSSIAEL YLVEGDSAGG SAKTGRNRKF QAILPLRGKV
ES10   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

                                460          470          480          490
madre  . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
ES5    LNVERVTEAR AFSNNEIKSI ITAVGTGIKE ELDLSKLRYK
ES10   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

                                500
madre  . . . . | . . . . |
ES5    KIVIMTDADV
ES10   . . . . . . . . . .

```

**Figura IV.25.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *gyrB* de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

	70	80	90	100
	..	..... .....	..... .....	..... .....
<i>madre</i>	VVG	EVIGKYHPHG	DSSIYDAMVR	MSQWWWKVNIP
<i>ES2</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES3</i>	...	.....	.....	.....
<i>ES4</i>	...	.....	.....Y.....	.....
<i>ES5</i>	...	.....	.....Y.....	.....
<i>ES10</i>	...	.....	.....G.....	.....

	110	120
	..	..... .....
<i>madre</i>	NGS	IDGDSAAAMR
<i>ES2</i>	...	.....
<i>ES3</i>	...	.....
<i>ES4</i>	---	-----
<i>ES5</i>	...	.....
<i>ES10</i>	...	.....

**Figura IV.26.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parC* de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

	410		420		430		440	
<i>madre</i>	KLT	PAQGKKRELN	ELYLVEGDSA	GGSAKSGRDR	NFQAILP			
<i>ES3</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES5</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	450		460		470		480	
<i>madre</i>	LRG	KVINSEKAKL	VDLLKNEEIQ	SIINAIGAGV	GKDFDIS			
<i>ES3</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES5</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	.....	.....	.....K.....	.....	.....	.....	.....	.....

	490		500	
<i>madre</i>	DIN	YGKIIIMTDA	DT	
<i>ES3</i>	.....	.....	.....	.....
<i>ES5</i>	.....	.....	.....	.....
<i>ES10</i>	.....	.....	.....	.....

**Figura IV.27.-** Comparación de la secuencia de aminoácidos de *parE* de la cepa 58 con la de diversos escalones selectivos seleccionados con enrofloxacino.

	CMI (µg/ml)			Mutaciones				
	Nor	Cip	Enr	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
				61 (47)	101 (87)		86 (84)	466 (458)
<b>Madre</b>	1	0,06	0,125	Arg	Glu		Asp	Asn
<b>ES 1</b>	2	0,250	0,250	Arg	Glu	ND	Asp	Lys
<b>ES2</b>	2	0,250	0,250	Arg	Glu	ND	Asp	Asn
<b>ES3</b>	32	4	8	Arg	Lys	ND	Tyr	Asn
<b>ES4</b>	64	4	8	ND	ND	ND	Asn	Asn
<b>ES5</b>	256	32	32	Arg	Lys	SC	Asn	Lys
<b>ES10</b>	256	16	16	Cys	Lys	SC	Asn	Lys

**Tabla IV.35.-** Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con norfloxacino y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en cada escalón. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	Variación de las CMI's en presencia de <b>reserpina u ortovanadato</b>			Mutaciones				
	Nor	Cip	Enr	gyrA		gyrB	parC	parE
				61 (47)	101 (87)		86 (84)	466 (458)
<b>Madre</b>	1,67	1,25	1,15-1,25	Arg	Glu		Asp	Asn
<b>ES 1</b>	1,33-1,60	1,15-1,88	1,88	Arg	Glu	ND	Asp	Lys
<b>ES2</b>	1,67	1,31	1,50	Arg	Glu	ND	Asp	Asn
<b>ES3</b>	2,40	1,33	2,29	Arg	Lys	ND	Tyr	Asn
<b>ES4</b>	1,00	1,43-1,67	1,60	Arg	Lys	ND	Asn	Asn
<b>ES5</b>	1,19-1,32	1,33-1,78	1,30	Arg	Lys	SC	Asn	Lys
<b>ES10</b>	1,14-1,21	1,05-1,22	1,05	Cys	Lys	SC	Asn	Lys

**Tabla IV.36.-** Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con norfloxacin y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. En rojo la variación atribuida a la reserpina, en verde la atribuida al ortovanadato y en azul la variación que fue igual. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	CMI (µg/ml)			Mutaciones					
				gyrA		gyrB	parC	parE	
	Nor	Cip	Enr	97 (83)	98 (84)		86 (84)	466 (458)	467 (459)
<b>Madre</b>	1	0,06	0,125	Ser	Ala		Asp	Asn	Glu
<b>ES 1</b>	1	0,125	0,250	Ile	Ala	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES2</b>	8	0,5	1	Ile	Ala	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES3</b>	64	16	16	Ile	Val	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES4</b>	256	64	16	Ile	Val	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES5</b>	256	256	64	Ile	Val	SC	Gly	Asn	Lys
<b>ES10</b>	>256	>256	128	Ile	Val	SC	Gly	Ile	Lys

**Tabla IV.37.-** Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos y CMIs de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en cada escalón. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	Variación de las CMI's en presencia de <b>reserpina</b> u <b>ortovanadato</b>			Mutaciones					
	Nor	Cip	Enr	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	
				97 (83)	98 (84)		86 (84)	466 (458)	467 (459)
<b>Madre</b>	1,66	1,25	1,15-1,25	Ser	Ala		Asp	Asn	Glu
<b>ES 1</b>	2,26	1,19	1,30	Ile	Ala	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES2</b>	1,41	1,91	2,24	Ile	Ala	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES3</b>	1,11-1,16	1,37	1,55	Ile	Val	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES4</b>	1,00	1,46	1,23	Ile	Val	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES5</b>	1,07	1,09	1,31	Ile	Val	SC	Gly	Asn	Lys
<b>ES10</b>	ND	ND	1,00	Ile	Val	SC	Gly	Ile	Lys

**Tabla IV.38.-** Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 51 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. En rojo la variación atribuida a la reserpina, en verde la atribuida al ortovanadato y en azul la variación que fue igual. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	CMI (µg/ml)			Mutaciones						
				gyrA			gyrB	parC	parE	
	Nor	Cip	Enr	97 (83)	98 (84)	101 (87)		86 (84)	466 (458)	467 (459)
<b>Madre</b>	0,5	0,125	0,125	Ser	Ala	Glu		Asp	Asn	Glu
<b>ES 1</b>	2	0,250	0,250	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Asn	Glu
<b>ES2</b>	4	0,250	0,250	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Asn	Glu
<b>ES3</b>	64	32	32	Ile	Val	Glu	SC	Gly	Ile	Lys
<b>ES4</b>	256	64	32	Ile	Val	Glu	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES5</b>	>256	256	128	Ile	Ala	Gln	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES10</b>	>256	>256	128	Ile	Val	Glu	SC	Gly	Asn	Lys

**Tabla IV.39.-** Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 61 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos y CMIs de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en cada escalón. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	Variación de las CMI's en presencia de <b>reserpina</b> u <b>ortovanadato</b>			Mutaciones						
				<i>gyrA</i>			<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	
	Nor	Cip	Enr	97 (83)	98 (84)	101 (87)		86 (84)	466 (458)	467 (459)
<b>Madre</b>	1,33	1,25	1,15	Ser	Ala	Glu		Asp	Asn	Glu
<b>ES 1</b>	2,50	1,85	2,40	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	ND	Glu
<b>ES2</b>	1,33	1,74	1,00	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Asn	Glu
<b>ES3</b>	1,16	1,28	1,11	Ile	Val	Glu	SC	Gly	Ile	Lys
<b>ES4</b>	1,35	1,40	1,11	Ile	Val	Glu	ND	Gly	Asn	Lys
<b>ES5</b>	1,10	1,09	1,23	Ile	Ala	Gln	ND	Gly	ND	Lys
<b>ES10</b>	ND	ND	1,08	Ile	Val	Glu	SC	Gly	Asn	Lys

**Tabla IV.40.-** Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 61 seleccionada con ciprofloxacino y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. En rojo la variación atribuida a la reserpina, en verde la atribuida al ortovanadato y en azul la variación que fue igual. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	CMI (µg/ml)			Mutaciones				
	Nor	Cip	Enr	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
				97 (83)	98 (84)	445 (445)	86 (84)	467 (459)
<b>Madre</b>	0,5	0,06	0,125	Ser	Ala	Pro	Asp	Glu
<b>ES 1</b>	4	0,5	1	Ser	Ala	Pro	Asp	Glu
<b>ES2</b>	8	4	2	Ser	Ala	Pro	Asp	Glu
<b>ES3</b>	64	8	32	Ile	Val	Pro	Gly	Lys
<b>ES4</b>	64	8	32	Ile	Val	Pro	Gly	Lys
<b>ES5</b>	128	32	64	Ile	Val	Pro	Tyr	Lys
<b>ES10</b>	128	32	64	Ile	Val	Ser	Tyr	Lys

**Tabla IV.41.-** Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 57 seleccionada con enrofloxacino y de diversos escalones selectivos y CMIs de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en cada escalón. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	Variación de las CMI's en presencia de <b>reserpina</b> u <b>ortovanadato</b>			Mutaciones				
	Nor	Cip	Enr	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	
				97 (83)	98 (84)	445 (445)	86 (84)	467 (459)
<b>Madre</b>	2,00	1,00	1,20	Ser	Ala	Pro	Asp	Glu
<b>ES 1</b>	1,27-2,00	1,05-1,74	1,91	Ser	Ala	Pro	Asp	Glu
<b>ES2</b>	1,11-1,43	2,08-4,00	1,71-2,57	Ser	Ala	Pro	Asp	Glu
<b>ES3</b>	1,43-1,58	1,24-2,36	2,00	Ile	Val	Pro	Gly	Lys
<b>ES4</b>	1,69	1,23-2,47	1,17-1,86	Ile	Val	Pro	Gly	Lys
<b>ES5</b>	1,33-2,25	1,73	1,19	Ile	Val	Pro	Tyr	Lys
<b>ES10</b>	1,03-1,24	2,46	1,42	Ile	Val	Ser	Tyr	Lys

**Tabla IV.42.-** Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 57 seleccionada con enrofloxacin y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. En rojo la variación atribuida a la reserpina, en verde la atribuida al ortovanadato y en azul la variación que fue igual. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	CMI (µg/ml)			Mutaciones					
	Nor	Cip	Enr	gyrA			gyrB	parC	parE
				97 (83)	98 (84)	101 (87)		86 (84)	467 (459)
<b>Madre</b>	0,5	0,06	0,125	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES 1</b>	4	0,5	1	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES2</b>	8	1	1	Ile	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES3</b>	64	16	32	Ile	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES4</b>	64	16	64	Ser	Ala	Lys	ND	Tyr	Glu
<b>ES5</b>	64	16	64	Ser	Ala	Lys	SC	Tyr	Glu
<b>ES10</b>	128	64	64	Ile	Val	Glu	SC	Gly	Lys

**Tabla IV.43.-** Alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 58 seleccionada con enrofloxacino y de diversos escalones selectivos y CMI de norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino en cada escalón. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. ND- no determinado, SC- sin cambios.

	Variación de las CMI en presencia de <b>reserpina</b> u <b>ortovanadato</b>			Mutaciones					
	Nor	Cip	Enr	gyrA			gyrB	parC	parE
				97 (83)	98 (84)	101 (87)		86 (84)	467 (459)
<b>Madre</b>	2,00	1,50	1,33	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES 1</b>	1,43	1,06-2,00	1,43	Ser	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES2</b>	1,11-1,25	1,09-1,88	2,33-3,7	Ile	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES3</b>	1,47-1,66	1,24-2,00	2,00	Ile	Ala	Glu	ND	Asp	Glu
<b>ES4</b>	1,23-1,57	1,50	1,00	Ser	Ala	Lys	ND	Tyr	Glu
<b>ES5</b>	1,48-1,88	1,38-2,00	1,00	Ser	Ala	Lys	SC	Tyr	Glu
<b>ES10</b>	1,24	1,67	1,11	Ile	Val	Glu	SC	Gly	Lys

**Tabla IV.44.-** Variación de la CMI del norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin y alteraciones de aminoácidos en la QRDR de las topoisomerasas de la cepa 58 seleccionada con enrofloxacin y de diversos escalones selectivos en presencia de reserpina u ortovanadato y relación con las mutaciones en las topoisomerasas. Entre paréntesis la numeración correspondiente en *Escherichia coli*. En rojo la variación atribuida a la reserpina, en verde la atribuida al ortovanadato y en azul la variación que fue igual. ND- no determinado, SC- sin cambios.

### **Anexo del material**

#### **Medio PH sólido**

(Kirchhoff y Rosengarten, 1984)

Este medio consiste en 3 fases, que se mezclan asépticamente:

- Fase A (para 1 litro)
  - Bacto PPLO agar 28 g
  - Agua bidestilada 700 ml
  
  - Ajustar pH a 7,4 y autoclavar a 121 °C 20 minutos para esterilizar
  
- Fase B (para 1 litro)
  - Extracto fresco de levadura (25% p/v) 18 ml
  - Solución de Penicilina G (100.000 UI/ml) 6 ml
  - Solución de ADN (0.4% p/v) 4,40 ml
  - Agua bidestilada 91 ml
  
  - Ajustar pH a 7,4 y esterilizar por filtración en 0,22 µm
  
- Fase C (para 1 litro)
  - Suero de caballo estéril inactivado 178 ml

### Material para SDS-PAGE

- S Buffer (Buffer del gel de separación): (3M Tris-HCl, pH 8,8)

Tris 36,3 gr

Ajustar pH a 8,8 con HCl 1M ± 48,0 ml

Agua destilada hasta 100,0 ml

Preparar en bote autoclavado y guardar en nevera

- C Buffer (Buffer del gel de concentración): (0,5M Tris-HCl pH 6,8)

Tris 6,0 gr

Agua destilada 40,0 ml

Ajustar pH a 6,8 con HCl 1M ± 48,0 ml

Agua destilada hasta 100,0 ml

Preparar en bote autoclavado y guardar en nevera

- Solución de SDS al 10 %

SDS 5,0 gr

Agua destilada hasta 50,0 ml

Guardar a temperatura ambiente

- Solución de APS al 1,5%

Ammonium Persulfato 0,15 gr

Agua destilada hasta 10,0 ml

Guardar en nevera (estabilidad de 1 semana)

- Solución al 0,2 % de Azul de Coomassie (solución madre)

Phast Gel Blue R350 1 pastilla

Agua destilada 80 ml

Agitar 5-10 minutos

Metanol 120 ml

Filtrar y guardar en nevera protegido de la luz (estabilidad de 1-3 semanas)

- Solución al 0,1 % de Azul de Coomassie (para tinción)

Solución madre de Azul de Coomassie al 0,2 % 100 ml

Ácido acético glacial al 20% en agua destilada 100 ml

Guardar en nevera protegido de la luz (estabilidad de 1 semana)

- Solución decolorante

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Guardar protegido de la luz a temperatura ambiente

- Gel de separación al 10 % (para 1 gel en Protean XL)

Solución de acrilamida 11732  $\mu$ l

S Buffer 4400  $\mu$ l

Solución de SDS al 10% 352  $\mu$ l

Solución de APS al 1,5% 1760  $\mu$ l

Agua destilada 16956  $\mu$ l

TEMED 10  $\mu$ l (solo se junta al final)

Agitar manualmente y servir

- Gel de concentración al 4 % (para 1 gel en Protean XL)

Solución de archilamida 938  $\mu$ l

C Buffer 1875  $\mu$ l

Solución de SDS al 10% 75  $\mu$ l

Solución de APS al 1,5% 375  $\mu$ l

Agua destilada 4238  $\mu$ l

TEMED 5  $\mu$ l (juntar solo al final)

Mezclar y servir

- Tampón electrolito (0,25M Tris, 1,92M Glicina, 1% SDS) pH 8,3

Tris 60,6 g

Glicina 288,2 g

Añadir 1 litro de agua y mezclar bien

SDS 20 g

Agua destilada hasta 2 litros

Guardar a temperatura ambiente

- Tampón de electroforesis (24mM Tris, 192mM Glicina, 0,1% SDS)

Tampón electrolito 500 ml

Agua destilada 4500 ml

Agitar suavemente para no crear espuma y guardar a temperatura ambiente

- Tampón de secado de geles

Metanol al 40% 200 ml

Ácido Acético al 10% 50 ml

Glicina al 3% 15ml

Agua destilada 235 ml

### Material para Extracción de ADN

- Solución desnaturizante

Hidróxido de sodio 2 g

Cloruro de sodio 8,8 g

Agua destilada 100 ml

- Solución de lisis

tiocianato guanidina 120 g

0,1 M Tris HCl pH 6,4 100 ml

EDTA 0,2 M pH 8,0 22 ml

Triton X-100 2,6 g

- Sílica

Sílica 60 g

Agua destilada 500 ml

Mezclar bien y decantar al menos 24 horas. Eliminar el sobrenadante.

Agua destilada 500 ml

Mezclar bien y decantar 5 horas. Eliminar parte del sobrenadante. Ajustar pH a 2,0 con HCl concentrado. Distribuir en alícuotas y autoclavar.

- Tampón de lavado

tiocianato de guanidina 120 g  
Tris HCl pH 6,4 100 ml

- Solución de TAE 50x

Tris 24,2 g  
Ácido Acético Glacial 15,71 ml  
0,5 M EDTA pH 8,0 10 ml

- Solución de TAE 1x

TAE 50x 2 ml  
Agua bidestilada 98 ml

- Solución de TE pH 8,0

EDTA 50x 200 µl  
Tris HCl 1M pH 8,0 1 ml  
Agua bidestilada hasta 100 ml

Autoclavar 15 minutos a 121 °C

- Tampón TBE 10x

Tris 108g  
Ácido bórico 55g  
EDTA 9,3g

Agua bidestilada para 1 litro

Autoclavar 20 minutos

- Tampón TBE 1x

TBE 10x 10 ml  
Agua bidestilada 90 ml

### Bibliografía

**Bébéar, C.M., Pereyre, S.,** 2005. Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **5(3)**:263-71.

**Bébéar, C.M., Renaudin, H., Charron, A., Clerc, M., Pereyre, S., Bébéar, C.,** 2003. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(10)**:3323-5.

**Bébéar, C.M., Grau, O., Charron, A., Renaudin, H., Gruson, D., Bébéar, C.,** 2000b. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (*gyrA*) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(10)**:2719-27.

**Bébéar, C.M., Renaudin, H., Charron, A., Gruson, D., Lefrancois, M., Bébéar, C.,** 2000a. *In vitro* activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(9)**:2557-60.

**Bébéar, C.M., Renaudin, H., Charron, A., Bové, J.M., Bébéar, C., Renaudin, J.,** 1998. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(9)**:2304-11.

**Bébéar, C.M., Bové, J.M., Bébéar, C., Renaudin, J.,** 1997. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(2)**:269-73.

**Evans, M.E., Titlow, W.B.**, 1998. Selection of fluoroquinolone-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with ciprofloxacin and Trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 727

**Fournier, B., Hooper, D.C.**, 1998. Mutations in topoisomerase IV and DNA gyrase of *Staphylococcus aureus* novel peliotropic effects on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**, 121-8

**Gilbert, D.N., Kohlhepp, S.J., Slama, K.A., Grunkemeier, G., Lewis, G., Dworkin, R.J., Slaughter, S.E., Legget, J.E.**, 2001. Phenotypic Resistance of *Staphylococcus aureus*, Selected *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas aeruginosa* after Single and Multiple In Vitro Exposures to Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 883-892.

**Gruson, D., Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.**, 2005. *In vitro* development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(3)**:1190-3.

**Gushchin, A.E., Ladygina, V.G., Govorun, V.M.**, 1999. Role of mutations in *parC* and *gyrA* in forming resistance of *Mycoplasma hominis* to fluoroquinolones. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **(4)**:19-24.

**Hirose, K., Kawasaki, Y., Kotani, K., Abiko, K., Sato, H.**, 2004. Characterization of a point mutation in the *parC* gene of *Mycoplasma bovirhinis* associated with fluoroquinolone resistance. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **51(4)**:169-75.

**Johansson, K.E., Heldtander, M.U., Pettersson, B.**, 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods Mol. Biol.* **104**:145-65.

**Kaatz, G.W., Seo, S.M., Ruble, C.A.**, 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(5)**:1086-94.

**Kenny, G.E., Young, P.A., Cartwright, F.D., Sjostrom, K.E., Huang, W.M.**, 1999. Sparfloxacin selects gyrase mutations in first-step *Mycoplasma hominis* mutants, whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(10)**:2493-6.

**Kumar, A., Schweizer, H.P.**, 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **57(10)**:1486-513.

**Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-885

**Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V.**, 2006b. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(6)**:1959-66.

**Le Carrou, J., Reinhardt, A.K., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V.**, 2006a. Persistence of *Mycoplasma synoviae* in hens after two enrofloxacin treatments and detection of mutations in the *parC* gene. *Vet. Res.* **37(1)**:145-54.

**Levy, S.B.**, 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **92 Suppl**:65S-71S.

**Levy, S.B.**, 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(4)**:695-703.

**Markham, P.N., Neyfakh, A.A.**, 2001. Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4(5)**:509-14.

**Neyfakh, A.A.**, 2002. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol.* **44(5)**:1123-30.

**Pagès, J.M., Masi, M., Barbe, J.**, 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends. Mol. Med.* **11(8)**:382-9.

**Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier, M.H., Jr.**, 1998. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* 1998 Apr **277(3)**:573-92.

**Poole, K.**, 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56(1)**:20-51.

**Poole, K.**, 2000b. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(10)**:2595-9.

**Poole, K.**, 2000a. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(9)**:2233-41.

**Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.**, 2005. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(1)**:421-4.

**Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M.**, 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(3)**:672-9.

**Randall, L.P., Woodward, M.J.**, 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res. Vet. Sci.* **72(2)**:87-93.

**Razin, S., Yogev, D., Naot, Y.,** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62(4)**:1094-156.

**Reinhardt, A.K., Kempf, I., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V.,** 2002b. Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. *J. Antimicrob. Chemother.* **50(4)**:589-92.

**Reinhardt, A.K., Bébéar, C.M., Kobisch, M., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V.,** 2002a. Characterization of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV Involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(2)**:590-3.

**Ribera, A., Jurado, A., Ruiz, J., Marco, F., Del Valle, O., Mensa, J., Chaves, J., Hernandez, G., Jimenez de Anta, M.T., Vila, J.,** 2002. In vitro activity of clinafloxacin in comparison with other quinolones against *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates in the presence and absence of reserpine. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42(2)**:123-8.

**Ruiz, J.,** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* **51(5)**:1109-17.

**Ruiz, J., Sierra, J.M., De Anta, M.T., Vila, J.,** 2001. Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18(2)**:107-12.

**Sanders, C.C.,** 2001. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **32** Suppl 1:S1-8.

**Takei, M., Fukuda, H., Kishii, R., Hosaka, M.**, 2001. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(12)**:3544-7.

**Tavío, M.M., Vila, J., Ruiz, J., Amicosante, G., Franceschini, N., Martín-Sánchez, A.M., Jiménez de Anta, M.T.**, 2000. In vitro selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Citrobacter freundii*: analysis of the quinolone resistance acquisition. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 521-524

**Tavío, M.M., Vila, J., Ruiz, J., Ruiz, J., Martín-Sánchez, A.M., Jiménez de Anta, M.T.**, 1999. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **44(6)**:735-42.

**Thomson, K.S.**, 2000. Minimizing quinolone resistance: are the new agents more or less likely to cause resistance? *J. Antimicrob. Chemother.* **45(6)**:719-23.

**Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M.**, 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.* **11(4)**:256-80.

**Van Bambeke, F., Balzi, E., Tulkens, P.M.**, 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* **60(4)**:457-70.

**Wise, K., Kim, M.F., Watson-McKown, R.**, 1996. Variant membrane proteins, p.227-241, vol. I. *In* Tully J.G. & Razin, S (Eds). *Molecular diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Academic Press, Inc., San Diego.

**Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B.**, 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77(1)**:494-8.

## ***Conclusiones***

---

1. Factores como el inóculo empleado, el pH del medio, la presencia o ausencia de oxígeno además del período de incubación, influyen en la determinación de las CMI<sub>s</sub> del enrofloxacino, oxitetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, tilosina, gentamicina y lincomicina sobre MmmLC, mientras la edad del inóculo no interfiere con su determinación.
2. Los macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas y lincomicina poseen un buen efecto in vitro sobre las cepas clínicas de MmmLC probadas. El tratamiento de las infecciones por MmmLC con cualquiera de estos antimicrobianos es factible de tener resultados positivos.
3. La prevalencia de resistencias en cepas clínicas de MmmLC en las Islas Canarias no es importante.
4. El desarrollo de resistencia a una quinolona en MmmLC implica resistencia cruzada al norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino.
5. En la selección de mutantes resistentes a las quinolonas el ciprofloxacino seleccionó los mutantes con mayores incrementos en la resistencia al norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino.
6. Las cepas clínicas de MmmLC expresan un sistema de expulsión del tipo ATP-dependiente, el cual puede facilitar la selección de mutantes.
7. Existe un sistema de expulsión del tipo ABC responsable de aumentos en la resistencia a las quinolonas en mutantes seleccionados con norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino.
8. Las variaciones en las CMI<sub>s</sub> observadas en presencia del ortovanadato fueron superiores a las observadas en presencia de la reserpina.

## Conclusiones

---

9. Se observó el aumento de la expresión de una banda de peso molecular aparente de 59 kDa en los mutantes seleccionados con norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino, y de otra de peso molecular aparente de 39 kDa en los mutantes seleccionados con norfloxacin y ciprofloxacino.
10. Las sustituciones de aminoácidos en las topoisomerasas contribuyen a aumentar la resistencia a las quinolonas. Los genes *gyrA*, *parC* y *parE* son los más importantes en el desarrollo de resistencias al norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en MmmLC.
11. La existencia de más de dos sustituciones simultáneas en el ADN girasa y topoisomerasa IV llevan a incrementos de 32 a 256 veces en las CMI de norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin, a diferencia de lo que ocurre en otros géneros y especies, lo que refuerza la hipótesis de un mayor papel de las topoisomerasas como responsables y esenciales para la adquisición de altos niveles de resistencia a las quinolonas, además de concordar con la hipermutabilidad de las especies del género *Mycoplasma*.
12. La obtención de mutantes con altos niveles de resistencia a las quinolonas es rápida en condiciones *in vitro*. Aunque *in vivo* las condiciones sean diferentes, es evidente que la utilización de quinolonas en clínica debe de ser ponderada y cuidadosa.
13. Los sistemas de expulsión contribuyeron con aumentos de bajo nivel en la resistencia a las quinolonas y las mutaciones en las topoisomerasas fueron imprescindibles para alcanzar altos niveles de resistencia.

## ***Anexo de Referencias de Reactivos***

---

*Anexo de referencias de reactivos*

Aceite de vaselina	Panreac: 141003.1211
Acetona	Panreac: 131007.1611
Ácido acético glacial	Panreac: 131008.1611
Ácido Bórico	Panreac: 131015.1211
Ácido clorhídrico 37%	Panreac: 211020.1611
Ácido nalidíxico (Nalidixic Acid)	Fluka: 70162
Acrilamida	BIO-RAD: 161-0158
Agarose D-1 low EEO	Pronadisa: 8014
Amonio persulfato	BIO-RAD: 161-0700
Azul de Coomassie Phast Gel <sup>TM</sup> Blue	Amersham Pharmacia Biotech AB: 17-0518-01
Bacto PPLO Agar	DIFCO: 0412-17-3
Bacto PPLO Broth	DIFCO: 255420
Bromuro de Etidio	Mercury: 5450
CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)	Sigma: C-2759
Ciprofloxacino (Ciprofloxacin)	Fluka: 17850
Cloranfenicol (Chloramphenicol)	Serva: 16785
Clortetraciclina (Chlortetracycline.HCl)	Serva: 14200
Cloruro de magnesio	Bioline: BIO-21040
Dodecil sulfato de sodio	USB: US 75819
Doxiciclina (Doxycycline hyclate)	Fluka: 44577
EDTA	Aldrich: S:26-36
Enrofloxacin (Enrofloxacin)	Fluka: 17849
Eritromicina (Erythromycin base)	Serva: 21208
Espectinomicina (Spectinomycin.2HCl)	Serva: 35293
Espiramicina (Spiramycin)	Sigma: S-9132
Estreptomicina (Streptomycin sulfate)	Serva: 35500
Etanol absoluto	Panreac: 121086.1211
Gentamicina (Gentamicin sulfate)	Serva: 22185

*Anexo de referencias de reactivos*

---

Glicina	USB: US 16407
Hidróxido de sodio	AlliedSignal: 30620
Inositol	Sigma: I5125
Kit de determinación de proteínas	Sigma: TP0400
Lincomicina (Lincomycin hydrochloryde)	Fluka: 62143
Manosa	Sigma: M2069
Marcador de pesos moleculares (SDS-PAGE)	GR Healthcare: 17-0446-01
Marcador de pesos moleculares (PCR) 50-2000 bp ladder	BIO-RAD: 170-8200
Mercaptoetanol	BIO-RAD: 161-0710
Metanol	Merck: 1.06009.2511
Norfloxacino (Norfloxacin)	Sigma: N9890
Nucleótidos para PCR	Applied Biosystems: N808-0260
Ortovanadato	Sigma: S6508
Oxitetraciclina (Oxytetracycline.HCl)	Serva: 31357
Placas de microtitulación	Nunc: 268152
Reserpina	Sigma: R0875
Rojo fenol	Panreac: 131615.1607
Silica (Silicon Dioxide)	Sigma: S-5631
Suero de caballo estéril	Cambrex: 14-403F
Tampón de carga (agarosa)	Sigma: G-2526
Tampón fosfato salino	Sigma: P-4417-50
Tampón PCR	Bioline: BIO-21040
Taq DNA polimerasa	Bioline: BIO-21040
TEMED	Sigma: S-37/23 439
Tiocianato de guanidina	Fluka: 50990
Tris base	USB: US 75825
Triton X-114	Fluka: 93421