

Mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* en cepas de bacilos Gram negativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas

Mery De la Fuente C^{1a}, Priscila Dauros S^{1b}, Helia Bello T^{1c}, Mariana Domínguez Y^{1d}, Sergio Mella M², Marcela Sepúlveda A^{2,3d}, Raúl Zemelman Z^{3e}, Gerardo González R^{1f}.

*Mutations in *gyrA* and *gyrB* genes among strains of Gram-negative bacilli isolated from Chilean hospitals and their relation with resistance to fluoroquinolones*

Background: A progressive frequency of resistance to fluorquinolones is observed among Gram-negative bacilli. **Aim:** To investigate the mechanism of resistance to fluoroquinolones mediated by mutations affecting *gyrA* and *gyrB* genes in strains of Gram negative bacilli isolated from Chilean hospitals. **Material and method:** Minimal inhibitory concentration of fluoroquinolones was determined in 91 randomly selected nalidixic acid-resistant strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from hospitals of 12 Chilean cities. Quinolone resistance determining region (QRDR) was amplified by PCR and mutations were determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and DNA sequencing. **Results:** Strains with mutation in codon 83 of *gyrA* showed decreased susceptibility to ciprofloxacin with MICs ranging from 0.25 to 1024 µg/ml. The sequencing of PCR products for *gyrA* indicated amino acid changes in the QRDR region. One strain of *E. coli* presented a double mutation, in codon 83 Ser to Leu as well as in codon 87 Asp to Asn. In strains of *K. pneumoniae*, however, the change of codon 83 was Ser to Tyr, in *A. baumannii* was Ser to Leu and in *P. aeruginosa* was Thr to Ile. No strains with mutations affecting *gyrB* were found. **Conclusions:** Mutations in codon 83 of *gyrA* is a frequent genetic event involved in the mechanism leading to decreased susceptibility to fluoroquinolone in strains of Gram-negative bacilli (Rev Méd Chile 2007; 135: 1103-10).

(Key words: DNA Gyrase, Fluoroquinolones; *gyrA* gene product; *gyrB* gene product)

Recibido el 26 de septiembre, 2006. Aceptado el 27 de marzo, 2007.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1040482.

¹Laboratorio de Antibióticos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas; ²Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción y ³Universidad San Sebastián, Concepción, Chile.

^aBioquímico. MSc Microbiología

^bBiólogo

^cBioquímico. DSc Ciencias Biológicas

^dBioquímico. MSc Microbiología. Dipl. Micología Médica

^eQuímico Farmacéutico. Dipl. Bacteriology. MSc Public Health

^fLic. Biología. MSc Microbiología. DSc Ciencias Biológicas

Correspondencia a: Gerardo González R. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Tel: 41-2203237. Fax: 41-2245975. Casilla 160-C. Concepción, Chile. E mail: ggonzal@udec.cl

Las fluoroquinolonas ejercen una favorable actividad sobre bacilos Gram negativos aeróbicos, sin embargo, se ha descrito en forma progresiva un aumento de la resistencia a estos antibióticos. Entre los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas se encuentran alteraciones en las enzimas blanco por mutaciones puntuales en los genes que codifican para subunidades de estas enzimas y, por otra parte, la disminución en la acumulación del compuesto dentro de la bacteria. Además, recientemente se ha descrito un mecanismo de tipo plasmídico, determinado por el gen *qnr*^{1,2}.

En *E. coli*, las mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, que codifican para la subunidad A y B de la ADN girasa, respectivamente, se encuentran en una zona llamada QRDR (región determinante de resistencia a quinolonas) específica para cada subunidad^{3,4}. En *gyrA*, estas mutaciones afectan con mayor frecuencia al codón 83 y en segundo lugar al codón 87. Una mutación provoca una susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas y una doble mutación estaría asociada a elevados niveles de resistencia¹. El mecanismo de resistencia determinado por mutaciones en el gen *gyrA* ha sido descrito en *K. pneumoniae*⁵, *A. baumannii*⁶ y *P. aeruginosa*⁷, especies de creciente importancia en el ambiente hospitalario. En *gyrB*, las mutaciones más frecuentes ocurren en los codones 426 y 447, siendo de menor importancia clínica que las que ocurren en *gyrA*⁸; a pesar de su descripción en aislados de *E. coli*⁹ y *P. aeruginosa*¹⁰.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de estas mutaciones y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas en cepas de bacilos Gram negativos aislados en hospitales de Chile.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas bacterianas. Se seleccionaron al azar 91 cepas de bacilos Gram negativos, las que cumplieran con la condición de ser resistentes a ácido nalidíxico y distintas en cuanto a sus características de aislamiento (fecha, hospital y tipo de muestra). Se incluyeron 18 cepas de *K. pneumoniae*, 24 de *E. coli*, 24 de *A. baumannii* y 25 de *P. aeruginosa*. Las cepas fueron aisladas desde diversas muestras clínicas en hospitales de las ciudades de Iquique (4 cepas), Valparaíso (6 cepas), Santia-

go (19 cepas), Constitución (3 cepas), Talca (4 cepas), San Carlos (1 cepa), Chillán (1 cepa), Tomé (3 cepas), Concepción (27 cepas), Talcahuano (10 cepas), Lota (3 cepas), Coronel (9 cepas) y Puerto Montt (1 cepa), entre los años 1990 y 2004 y se mantuvieron a -70°C, en una suspensión glicerol-agua 50% v/v y caldo tripticasa en proporción 1:2.

Estudio de susceptibilidad a las quinolonas. Se determinaron los patrones de resistencia mediante el método de difusión en agar, según las normas del NCCLS (actualmente CLSI), 2002¹¹. Los agentes antibacterianos utilizados fueron: ácido nalidíxico (AN), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), moxifloxacina (MXF) y gatifloxacina (GTX). Los niveles de resistencia se estudiaron determinando la concentración mínima inhibitoria de AN, CIP, LEV y MXF, mediante el método de dilución seriada en agar según el NCCLS (actualmente CLSI), 2002¹².

Amplificación de la zona QRDR de los genes *gyrA* y *gyrB*. Se seleccionaron cepas de diferentes niveles de resistencia, año de aislamiento y origen geográfico. La amplificación se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (RPC) utilizando partidores específicos para la zona QRDR de cada especie bacteriana (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía 2,5 µL de dNTPs (1,25 mM de cada desoxinucleótido), 2,5 µL de tampón de RPC 10x, 1,5 µL de cada partidore (20 pM), 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 5,6 µL de agua destilada estéril (ADE), 0,125 µL de Taq ADN polimerasa (5U/µL) y 10 µL del templado de ADN. El templado se obtuvo a partir del sobrenadante de un cultivo de 10⁹ UFC/ml sometido a ebullición por 15 min y centrifugado a 14.000 rpm por 5 min¹³.

La amplificación fue realizada usando el siguiente programa: 96°C por 3 min, seguido de 24 ciclos de 96°C por 15 s, 50°C por 30 s y 70°C por 90 s, y una extensión final 70°C por 5 min. Los productos de RPC fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% a 100 V en tampón TAE (40 mM TRIS-HCl, 20 mM NaAc, 2 mM Na₂EDTA H₂O, 1,02 M ácido acético). La detección se realizó por tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 mg/L) y posterior visualización en un transiluminador de luz UV.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). La mezcla de reacción incluyó 5 µL

Tabla 1. Partidores utilizados para amplificar los genes *gyr* de las subunidades de la ADN girasa en las distintas especies bacterianas

Especie	Secuencia nucleotídica 5' → 3'	Subunidad	Tamaño (kb)	Ref.
<i>E. coli</i>	TACACCGGTCAACATTGAGG TTAATGATTGCCGCCGTCGG	GyrA	626	14
<i>K. pneumoniae</i>	TACACCGGTCAACATTGAGG TTAATGATTGCCGCCGTCGG	GyrA	626	14
<i>P. aeruginosa</i>	GAGCTGGGCAACGACTGGAACAAGCCC GATACCGCTGGAACCGTTGACCAGCAG	GyrA	363	8
<i>A. baumannii</i>	AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGT GCCATACCTACGGCGATAACC	GyrA	344	8
<i>E. coli</i>	GGA CAA AGA AGG CTA CAG CA CGT CGC GTT GTA CTC AGA TA	GyrB	880	9
<i>K. pneumoniae</i>	TGCTGTGGTAGCGCAGTTTA GCAGATGAACGAACTGCTGA	GyrB	425	este trabajo
<i>P. aeruginosa</i>	GGA CAA AGA AGG CTA CAG CA CGT CGC GTT GTA CTC AGA TA	GyrB	511	10
<i>A. baumannii</i>	GTGAAATGACGCGTCGTAAG CGAATGTGTGAACCATCGAC	GyrB	355	este trabajo

del producto RPC, 2 µl de tampón correspondiente a la enzima a utilizar, 12,5 µl de ADE y 0,5 µl de la enzima. Esta mezcla se incubó a 37°C por 4 h y los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis a 50 V en gel de agarosa de alta resolución al 1,7%.

Secuenciación del producto RPC. Se secuenció el producto de RPC para *gyrA* de 8 cepas y de *gyrB* para 5 cepas, las que fueron elegidas de acuerdo a presencia o ausencia de la mutación detectada por RFLP. El ADN fue purificado con el *kit* Wizard PCR Prep DNA Purification System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas directamente mediante el método dideoxi en un secuenciador automático de ADN Abi 3730 ó 3100 en la empresa MWG de Estados Unidos de Norteamérica.

RESULTADOS

Detección de mutaciones mediante RFLP. El amplificado por PCR correspondiente a la zona QRDR del gen *gyrA* se sometió a un análisis con enzimas

de restricción (RFLP). El RFLP permite detectar fácilmente mutaciones en el codón 83, ya que, en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, éste se encuentra localizado en el sitio de restricción de las enzimas utilizadas.

En 21/24 (88%) de los aislados de *E. coli* se detectó una mutación en el codón 83 de *gyrA*, con pérdida del primer sitio de restricción para la enzima *HinfI*, lo que llevó a la obtención de dos fragmentos, de 388 y 288 pb, respectivamente. En 18/24 (75%) de las cepas seleccionadas de *A. baumannii* se detectó esta mutación, con pérdida del sitio de restricción de la enzima *HinfI*. En 19/25 (76%) de las cepas *P. aeruginosa* se detectó la mutación, con pérdida del sitio de restricción de la enzima *SstII*. Por último, en 14/18 (78%) de las cepas de *K. pneumoniae* se detectó la mutación, encontrándose también dos fragmentos, de 388 y 288 pb, con pérdida del primer sitio de restricción de *HinfI*.

En la Tabla 2 se muestra la frecuencia de cepas en las que se encontró mutación que afecta al codón 83 del gen *gyrA* y los niveles de resistencia a ciprofloxacina, molécula utilizada como representante de las fluoroquinolonas. De acuerdo a la categorización

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias mínimas de ciprofloxacina sobre bacilos Gram negativos y mutaciones detectadas en los genes de la ADN girasa

CIM	Número de cepas	Número de cepas con mutación en:	
		Codón 83 de <i>gyrA</i>	Codón 426 y 447 de <i>gyrB</i>
≤0,03	1	0	0
0,125	3	0	0
0,25	8	1	0
0,5	6	1	0
1	4	1	0
2	3	3	0
4	3	3	0
8	7	7	0
16	8	8	0
32	8	8	0
64	8	8	0
128	18	18	0
256	7	7	0
512	6	6	0
1.024	1	1	0
Total	91	72 (79,1)	0

(): % de cepas; Susceptible: ≤1 µg/ml, Resistencia Intermedia: 2 µg/ml, Resistente: ≥4 µg/ml.

informada por Brown y Amyes⁷, se encontró que todas las cepas con nivel de resistencia medio (hasta 32 µg/ml) o elevado (>32 µg/ml) a ciprofloxacina, presentaron la mutación en el codón 83 del gen *gyrA*. En cambio, en las cepas con bajo nivel de resistencia (≤1 µg/ml) esta mutación fue infrecuente, encontrándose sólo en 3 de 22 cepas (13,6%). En ninguna de las cepas ensayadas se detectó mutaciones en los codones 426 y 447 de *gyrB*.

Secuenciación. Se realizó un alineamiento con la secuencia patrón para cada especie: *E. coli* K-12 EMBL X06373, *K. pneumoniae* GenBank AF052258, *A. baumannii* EMBL 82165 y *P. aeruginosa* GenBank L29417 (Figura 1). En *E. coli*, la cepa ECR-17 mostró una mutación de C a T en la segunda posición del codón 83, resultando en el cambio de Ser a Leu; además, se observó un cambio de G a A en la primera posición del codón 87, lo que implicó el cambio de Asp a Asn. Esta cepa presentó elevados niveles de resistencia a todas las fluoroquinolonas ensayadas (32 µg/ml) (Tabla 3). La cepa

EC-145, la cual fue susceptible a las fluoroquinolonas, no mostró ninguna mutación.

La cepa K-49 de *K. pneumoniae* tuvo un cambio de C a A en la segunda posición del codón 83, resultando en la mutación de Ser a Tyr; esta cepa mostró elevados niveles de resistencia a ciprofloxacina (256 µg/ml). En la cepa K-218 no se observó mutación y fue susceptible a las fluoroquinolonas.

En *A. baumannii*, la cepa 90-39 tuvo una mutación en la posición 83, lo que produjo un cambio de Ser a Leu, debido al cambio de C a T en la segunda posición del codón y sus niveles de resistencia fueron elevados para todas las quinolonas. La cepa 90-38 no mostró ninguna mutación y presentó un nivel de resistencia intermedia a ciprofloxacina y fue susceptible a moxifloxacina y levofloxacina.

La cepa P-103 de *P. aeruginosa* tuvo una mutación de Thr a Ile en la posición 83, producto de un cambio de C a T en la segunda posición del codón, presentando niveles de resistencia eleva-

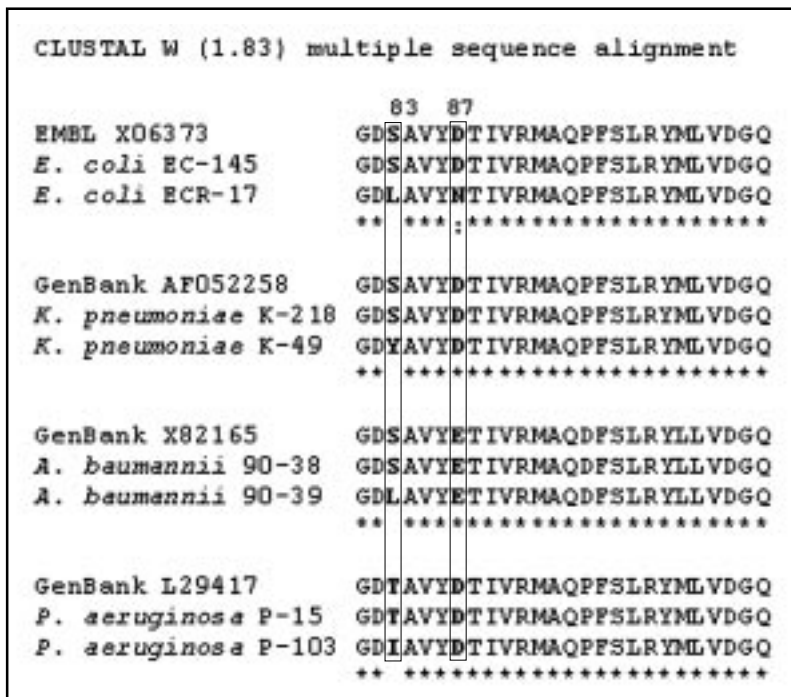


Figura 1. Alineamiento entre las secuencias aminoácidas de la zona QRDR de *gyrA* deducidas de los productos de RPC y las secuencias aminoácidas obtenidas de las bases de datos. Los aminoácidos destacados corresponden a los aminoácidos sujetos a cambio producto de las mutaciones. Se destacan los codones 83 y 87, ya que en ellos frecuentemente se han descrito cambios aminoácidos.

Tabla 3. Cambios aminoácidos originados por las mutaciones en *gyrA* y su relación con los niveles de resistencia a fluoroquinolonas

Especies	Cepa	CIM (µg/ml) de:			Codón 83	Codón 87
		CIP	LEV	MOX		
<i>E. coli</i>	ECR-17	32	32	32	Ser(TCG)→Leu(TTG)	Asp(GAC)→Asn(AAC)
	EC-145	≤0,03	≤0,03	≤0,03	(-)	(-)
<i>K. pneumoniae</i>	K-49	256	1	1	Ser(TCC)→Tyr(TAC)	(-)
	K-218	0,25	≤0,03	0,06	(-)	(-)
<i>A. baumannii</i>	90-38	2	0,5	0,5	(-)	(-)
	90-39	256	16	32	Ser(TCA)→Leu(TTA)	(-)
<i>P. aeruginosa</i>	P-15	1	1	2	(-)	(-)
	P-103	128	64	>64	Thr(AAC)→Ile(ATC)	(-)

En negrita cepas resistentes; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; MOX: moxifloxacina; (-): ausencia de mutación.

dos a todas las quinolonas. La cepa P-15 no presentó mutaciones y fue susceptible a las fluoroquinolonas.

El producto de RPC secuenciado del gen *gyrB* no evidenció cambios nucleotídicos que se tradujeran en un cambio en la secuencia aminoácida

en la zona QRDR. En una cepa de *K. pneumoniae* y en una de *P. aeruginosa* la zona QRDR permaneció totalmente conservada en el producto de RPC secuenciado.

DISCUSIÓN

La mutación en el codón 83 de *gyrA* fue encontrada en todas las cepas resistentes a fluoroquinolonas, lo que indica que este mecanismo está involucrado en la resistencia y efectivamente disminuye la susceptibilidad de estas bacterias, pero no necesariamente las convierte en clínicamente resistentes^{1,15,16}. La resistencia de importancia clínica depende del cambio aminoacídico ocurrido y, además, de la existencia de otras mutaciones, particularmente en la topoisomerasa IV, como también de otros mecanismos, como son la participación de bombas de eflujo.

La secuencia aminoacídica obtenida a partir de la secuencia de ADN, permitió la comparación con una secuencia sin mutación, obtenida desde bases de datos. Así, se logró establecer que las secuencias de los productos de RPC concuerdan con lo descrito por otros autores^{14,17,18}. Por ejemplo, las secuencias nucleotídicas de las cepas de *E. coli* susceptible (EC-145) y la cepa de *E. coli* K12 presentaron exactamente los cambios descritos previamente por Weigel y col¹⁴. Estos cambios nucleotídicos correspondieron a mutaciones silenciosas, por lo que no se tradujeron en cambios aminoacídicos. En cambio, en los codones 83 y 87 de la cepa resistente de *E. coli* se encontró una doble mutación, descrita anteriormente^{1,14}, que se ha asociado con niveles elevados de resistencia a quinolonas. Respecto de las cepas de *K. pneumoniae*, se observó un cambio de Ser a Tyr, el que ha sido informado por otros autores en cepas con valores bajos a medios de CIM (CIM_{CIP} <2 y 16 µg/ml, respectivamente)^{5,14,19}. Debido a que en este trabajo se encontró un nivel elevado de resistencia a ciprofloxacina (256 µg/ml), es posible sugerir que, además, podrían existir mutaciones en genes de la topoisomerasa IV, o bien en genes reguladores de bombas de eflujo. En las mutaciones de la cepa de *A. baumannii* se observó un cambio de Ser a Leu. Este cambio ha sido

anteriormente asociado a niveles medio a elevado de resistencia a ciprofloxacina (CIM 4-128 µg/ml)^{6,20,21}, lo cual coincide con el nivel de resistencia a ciprofloxacina de la cepa de *A. baumannii* analizada en el presente estudio, sobre la cual ciprofloxacina presentó una CIM de 256 µg/ml. El nivel de resistencia de la cepa de *P. aeruginosa* P-103 puede ser explicado por la mutación única en *gyrA*, ya que el cambio de Thr a Ile se ha asociado con elevados niveles de resistencia (CIM_{CIP} >32 µg/ml)²²; sin embargo, al igual que en *A. baumannii*, no se descarta que existan otros mecanismos involucrados.

Al parecer, en las bacterias ensayadas en este trabajo, las mutaciones en el gen *gyrB* no juegan un rol de importancia en su resistencia a fluoroquinolonas. No obstante, este mecanismo ha sido informado para cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*^{9,10}. Debido a que se ha descrito un posible aumento de afinidad por ciprofloxacina a causa de una mutación en el codón 447 de la zona QRDR de *gyrB*²³, se secuenciaron cepas con bajos niveles de resistencia a ciprofloxacina, pero no se detectó ninguna mutación en estas bacterias.

Este trabajo permite afirmar que, en general, la resistencia a fluoroquinolonas se debe a múltiples mutaciones secuenciales en genes que codifican diversos mecanismos, por lo que las cepas que presentan mutación en *gyrA* son de gran importancia clínica, ya que la presencia de una mutación aumenta la probabilidad de adquirir nuevas mutaciones^{24,25}. En general, la resistencia a quinolonas es adquirida en forma gradual, a diferencia de la resistencia mediada por la adquisición de material genético exógeno (plásmidos, transposones, etc.), donde habitualmente hay un incremento brusco de las CIM²⁴, fenómeno típico de la resistencia a β-lactámicos y aminoglucósidos-aminociclitolos.

Este concepto de importancia para el clínico, debe motivar la utilización de quinolonas en forma rigurosa, privilegiando su uso cuando no hay otras alternativas terapéuticas y utilizando dosis y duración adecuada de tratamiento²⁶. Por otra parte, estos resultados también sugieren la necesidad de proseguir estos estudios moleculares en un intento por comprender, de manera más integral, este importante fenómeno multifactorial que involucra la resistencia a fluoroquinolonas en las especies de bacilos Gram negativos.

Agradecimientos

Agradecemos a la Sra. Magda Hernández y Sra. Evelyn Benavente por su asistencia técnica, como

también a todos los laboratorios de los hospitales incluidos en este estudio, por enviarnos desinteresadamente las cepas analizadas en este trabajo.

REFERENCIAS

1. RUIZ J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1109-17.
2. TRAN J, JACOBY G, HOOPER D. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 118-25.
3. YOSHIDA H, BOGAKI M, NAKAMURA M, NAKAMURA S. Quinolone resistant-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1271-2.
4. EVERETT M, FANG Y, RICCI V, PIDDOK L. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2380-6.
5. DEGUCHI K, FUKUOKA A, YASUDA M, NAKANO S, KANEMATSU E, NISHINO Y ET AL. Alterations in the GyrA subunit of DNA Gyrase and the ParC subunit of Topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 699-701.
6. VILA J, RUIZ J, GOÑI P, MARCOS M, JIMÉNEZ DE ANTA M. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1201-3.
7. HIGGINS P, FLUIT A, MILATOVIC D, VERHOEF J, SHMITZ F. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 409-13.
8. BROWN S, AMYES S. Quinolone Resistance. In: *Methods in Molecular Medicine*. New Jersey: Editorial Humana Press Inc. 1998; 617-39.
9. KOMP P, KARLSSON S, HUGHES D. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3222-32.
10. AKASAKA T, TANAKA M, YAMAGUCHI A, SATO K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2263-8.
11. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) 2002. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests approved standard. 7th Edition. NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.
12. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) 2002. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 5th Edition. NCCLS document M7-A5. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.
13. REYES A, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S, ZEMELMAN R, GONZÁLEZ G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 317-21.
14. WEIGEL L, STEWARD C, TENOVER F. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2661-7.
15. JACOBY G. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S120-126.
16. CHEN F, LO H. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36: 1-9.
17. KUREISHI A, DIVER M, BECKTHOLD B, SCHOLLAARDT T, BRYAN L. Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1944-52.
18. SWANBERG S, WANG J. Cloning and sequencing of the *Escherichia coli gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *J Mol Biol* 1987; 197: 729-36.
19. BRISSE S, MILATOVIC D, FLUIT A, VERHOEF J, MARTIN N, SCHEURING S ET AL. Comparative *in vitro* activities of

- Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, and Trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogens*. Clinical isolates with alterations in GyrA and ParC Proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2051-5.
20. KYU J, SEON Y, KEUN Y, SU B. Mutations in the gyrA and parC Genes in Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol Immunol* 2005; 647-53.
 21. VILA J, RUIZ J, GOÑI P, JIMÉNEZ T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 757-62.
 22. YUNEZAWA M, TAKAHATA M, MATSUNARA N, WATANABE Y, NARITA H. DNA Gyrase gyrA mutations in Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1970-2.
 23. HEDDLE J, MAXWELL A. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of gyrB. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1805-15.
 24. OTEO J, CAMPOS J. Uso de quinolonas y resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 201-3.
 25. MARTÍNEZ J, ALONSO A, GÓMEZ-GÓMEZ J, BAQUERO F. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg? *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 683-8.
 26. GARCÍA P. Resistencia bacteriana en Chile. *Rev Chil Infect* 2003; 20: S11-S23.