

# Resistencia a las Nuevas Fluoroquinolonas en *Staphylococcus aureus* Aislados de Queratitis Bacterianas en Relación con la Presencia de Mutaciones Específicas

SILVIA B. ROSSETTI, LEONARDO P. D'ALESSANDRO

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Investigar la actividad in vitro de gatifloxacina (GAT) y moxifloxacina (MOX) en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de queratitis bacterianas, con mutaciones en los genes de las enzimas DNA girasa (*gyrA*) y Topoisomerasa IV (*grlA*), resistentes a ciprofloxacina (CIP) y ofloxacina (OFX).

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se estudiaron 46 cepas de *S. aureus* resistentes a la CIP y OFX aisladas de queratitis bacterianas y 20 cepas susceptibles. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para CIP, OFX, GAT y MOX por la técnica de dilución en caldo. Las mutaciones en los genes *gyrA* y *grlA* se realizaron utilizando una técnica de PCR-RFLP.

**RESULTADOS:** Las cepas susceptibles no presentaron mutaciones y fueron sensibles a todas las fluoroquinolonas. Veintisiete de las 46 cepas resistentes tenían mutaciones en ambos genes *gyrA* y *grlA*, con CIMs de 32 a 256 µg/ml para CIP y OFX y CIMs de 4 a 64 µg/ml para GAT y MOX. Las restantes cepas sólo tenían una mutación en el gen *grlA* con CIMs de 16 a 32 µg/ml para CIP y OFX; de 0.12 a 4 µg/ml para GAT y de 0.06 a 4 µg/ml para MOX.

**CONCLUSIONES:** MOX y GAT fueron activas in vitro en cepas de *S. aureus* resistentes a CIP y OFX portadoras de una mutación, aisladas de queratitis bacterianas. En cambio, MOX y GAT no fueron activas in vitro en cepas portadoras de dos mutaciones. *OFTALMOL CLIN EXP 2007;1: 4-6*

**PALABRAS CLAVES:** Fluoroquinolonas, *Staphylococcus aureus*, resistencia bacteriana, mutaciones, queratitis bacteriana.

## Resistance to the new generation of fluoroquinolones and the presence of specific mutations in *Staphylococcus aureus* isolated from bacterial keratitis

### ABSTRACT

**PURPOSE:** To investigate the in vitro activity of gatifloxacin (GAT) and moxifloxacin (MOX) in ciprofloxacin (CIP) and ofloxacin (OFX) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bacterial keratitis with mutations in the *grlA* and *gyrA* genes.

**MATERIAL AND METHODS:** Forty-six *S. aureus* strains, resistant to CIP and OFX isolated from bacterial keratitis and 20 susceptible strains were studied. The minimal inhibitory concentration (MIC) was established for CIP, OFX, GAT and MOX using the broth microdilution technique. *GyrA* and *grlA* gene mutations were identified using PCR-RFLP technique.

**RESULTS:** Susceptible strains were sensible to all the fluoroquinolones and did not present mutations. Twenty seven of the 46 resistant strains had mutations in both genes, *grlA* and *gyrA*, their MIC were 32 to 256 µg/ml for CIP and OFX, and 4 to 64 µg/ml for GAT and MOX. The remaining strains only had one mutation in the *grlA* gene, with a MIC of 16 to 32 µg/ml for CIP and OFX, 0.12 to 4 µg/ml for GAT, and 0.06 to 4 µg/ml for MOX.

**CONCLUSIONS:** MOX and GAT were active in vitro in *S. aureus* strains carriers of one mutation isolated from bacterial keratitis resistant to CIP and OFX. On the other hand, MOX and GAT were not active in vitro, in *S. aureus* strains carriers of two mutations. *OFTALMOL CLIN EXP 2007;1: 4-6*

**KEY WORDS:** Fluoroquinolones, *Staphylococcus aureus*, bacterial resistance, mutations, bacterial keratitis.

Recibido 12/05/2007  
Aceptado 27/06/2007  
Laboratorio de Microbiología  
y Biología Molecular,  
Fundación Oftalmológica  
Argentina Jorge Malbrán  
(SBR) y Clínica Oftalmológica  
Malbrán (LPD).  
Correspondencia:  
Dra. Silvia Rossetti  
Fundación Oftalmológica  
Argentina Jorge Malbrán,  
Buenos Aires, Argentina  
Azcuénaga 1077 - PB. B-1115  
silvia\_rossetti@fibertel.com.ar

**E**l *Staphylococcus aureus* es uno de los principales microorganismos productores de queratitis bacterianas. La resistencia de este germen a las fluoroquinolonas se ha incrementado en los últimos años tanto en cepas aisladas de infecciones sistémicas como oculares, y en especial dentro de los *S. aureus* meticilino-resistentes.<sup>1</sup> Las fluoroquinolonas

de 2<sup>da</sup> generación como la ciprofloxacina (CIP) y la ofloxacina (OFX) son efectivas contra bacterias gramnegativas pero su actividad sobre grampositivas es limitada por la aparición de resistencia.<sup>2</sup> Las fluoroquinolonas de 4<sup>a</sup> generación, moxifloxacina (MOX) y gatifloxacina (GAT), tienen mayor actividad sobre gérmenes grampositivos y mantienen su actividad sobre gramnegativas. Las

fluoroquinolonas de 2<sup>da</sup> generación inhiben la síntesis del DNA de bacterias grampositivas por acción sobre la Topoisomerasa IV, la MOX y la GAT, en cambio, tienen una acción dual sobre la DNA girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV.<sup>3</sup> Los mecanismos más comunes de resistencia a las fluoroquinolonas desarrollados por los *S. aureus* involucran mutaciones en los genes que codifican las subunidades A de la DNA girasa y la topoisomerasa IV (*gyrA* y *griA* respectivamente), que se encuentran agrupadas en una región altamente homóloga llamada región determinante de resistencia a las quinolonas (QRDR). También se han descrito mutaciones en *gyrB*, gen que codifica la subunidad B de la DNA girasa y un mecanismo que consiste en la sobre-expresión del *norA*, gen que codifica a la proteína NorA. Esta proteína interviene en el transporte de las fluoroquinolonas y de otros compuestos no relacionados fuera de la bacteria.<sup>3</sup>

El objetivo de este trabajo fué estudiar cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de queratitis bacterianas, seleccionadas por ser resistentes in vitro a las viejas fluoroquinolonas y ser portadoras de mutaciones de resistencia, y comparar la susceptibilidad in vitro de distintas cepas de *S. aureus* a las 8-metoxi fluoroquinolonas, GAT y MOX, introducidas recientemente al mercado oftalmológico.

## Materiales y Métodos

Se estudió la actividad in vitro de GAT y MOX en 46 cepas de *S. aureus* meticilino-resistentes y resistentes a las viejas fluoroquinolonas OFX y CIP, aislados de queratitis bacterianas. También se estudiaron 20 cepas de *S. aureus* susceptibles a las fluoroquinolonas y a la meticilina aislados de queratitis bacterianas. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para CIP, OFX, GAT y MOX fueron determinadas por la técnica de dilución en caldo de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>4</sup> En las cepas de *S. aureus* se detectaron la presencia de *mecA* y las mutaciones de resistencia a las fluoroquinolonas en QRDR para *griA* en el codón 80 y para *gyrA* en el codón 84, mediante 3 técnicas de PCR independientes.<sup>5-7</sup> Para GAT y MOX se hallaron la CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> y se calculó el cociente inhibitorio ( $C_{max}/CIM_{90}$ ) utilizando los valores de la concentración corneal máxima ( $C_{max}$ ) publicados por los laboratorios con las dosificaciones propuestas por los respectivos autores.<sup>8,9</sup> La  $C_{max}$  utilizada fue de 48.5 µg/ml para MOX y de 15.7 µg/ml para GAT.

## Glosario de términos utilizados

CIM<sub>50</sub>: Concentración mínima de antibiótico necesaria para inhibir al 50% de las cepas.

CIM<sub>90</sub>: Concentración mínima de antibiótico necesaria para inhibir al 90% de las cepas.

$C_{max}$ : Concentración máxima de antibiótico que se obtiene en córnea utilizando terapia tópica.

IQ: Cociente Inhibitorio. Índice utilizado para predecir la eficacia antibacteriana de antibióticos concentración-dependientes. Se calcula con la fórmula  $C_{max}/CIM_{90}$ .

MPC: Concentración preventiva de mutaciones. Es la concentración de un antibiótico que previene el desarrollo de cepas resistentes por mutaciones.

*mecA*: el gen que codifica PBP2a, responsable de la resistencia a la meticilina y otros antibióticos β-lactámicos.

Concentración bactericida óptima y curvas de muerte bacteriana: Las fluoroquinolonas presentan una cinética de muerte bacteriana concentración-dependiente, por el contrario los antibióticos β-lactámicos son tiempo-dependientes con pocas diferencias de muerte bacteriana por encima de la CIM. Para las nuevas fluoroquinolonas la máxima muerte bacteriana se alcanza a 8 veces la CIM y el tiempo mínimo necesario para alcanzarlo es de 4 a 6 horas para los *Staphylococcus*.

## Resultados

Las cepas susceptibles no presentaron mutaciones y fueron sensibles a todas las fluoroquinolonas (Tabla 1). Veintisiete de las 46 cepas resistentes tenían mutaciones en ambos genes *griA* y *gyrA*; con CIMs de 32.0-256.0 µg/ml para CIP y OFX y CIMs de 4.0-64.0 µg/ml para GAT y MOX (Tabla 2). Las 19 cepas restantes sólo tenían una mutación en el gen *griA* con CIMs de 16.0-32.0 µg/ml para CIP y OFX; de 0.12-4.0 µg/ml para GAT y de 0.06-4.0 µg/ml para MOX (Tabla 3). Las 46 cepas resistentes a las fluoroquinolonas fueron resistentes a la meticilina y presentaron el gen *mecA*.

## Conclusiones

Las cepas estudiadas de *Staphylococcus aureus* susceptibles in vitro a las fluoroquinolonas no presentaron las mutaciones de resistencia *gyrA* y *griA*.

La moxifloxacin y gatifloxacin fueron altamente activas (CIM 0.06-0,12 µg/ml y 0.06-0.5 µg/ml respectivamente)

**Tabla 1. Cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a las fluoroquinolonas sin mutaciones.**

Fluoroquinolona	Rango (µg/ml)	CIM50 (µg/ml)	CIM90 (µg/ml)	IQ
Ofloxacin	0.12-2.0	0.25	1.0	NR
Ciprofloxacina	0.12-2.0	0.25	1.0	NR
Gatifloxacin	≤0.06-0.5	0.06	0.25	62.80
Moxifloxacin	≤0.06-0.12	0.06	0.12	404.16

Referencias: CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>: concentración inhibitoria mínima para el 50% y 90% de las cepas estudiadas; IQ: cociente inhibitorio.

**Tabla 2. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a las fluoroquinolonas con 2 mutaciones una en *griA* y otra en *gyrA*.**

Fluoroquinolona	Rango (µg/ml)	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	IQ
Ofloxacina	64,0-≥256,0	128,0	≥256,0	NR
Ciprofloxacina	64,0-≥256,0	64,0	≥256,0	NR
Gatifloxacina	4,0-64,0	16,0	64,0	0,245
Moxifloxacina	4,0-64,0	16,0	64,0	0,757

Referencias: CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>: concentración inhibitoria mínima para el 50% y 90% de las cepas estudiadas; IQ: cociente inhibitorio.

en las cepas de *S. aureus* susceptibles a las viejas fluoroquinolonas y no portadoras de mutaciones con CIMs inferiores a la CIP y OFX (CIM 0.12-2.0 µg/ml).

MOX y GAT fueron activas en cepas de *S. aureus* resistentes in vitro a CIP y OFX portadoras de una mutación en el gen *griA* con CIM de 16.0 a 32.0 µg/ml para CIP y OFX comparadas con CIM de 0.12 a 4 µg/ml para GAT y 0.06 a 4.0 µg/ml para MOX. Estas concentraciones son fácilmente alcanzables con tratamiento tópico en el estroma corneal aún teniendo en cuenta que es deseable alcanzar tanto la concentración preventiva de mutaciones (4 veces la CIM) como la concentración óptima bactericida, es decir, el máximo efecto de la curva de muerte bacteriana (8 veces la CIM).

Las 27 cepas de *S. aureus* resistentes a las fluoroquinolonas y meticilina resistentes portadoras de dos mutaciones en *griA* y *griA* presentaron CIMs para MOX y GAT de 4.0 a 64.0 µg/ml y por lo tanto fueron resistentes in vitro. Están en el límite de la concentración corneal que estos antibióticos pueden alcanzar sin tener en cuenta tanto la concentración preventiva de mutaciones como el máximo efecto de la curva de muerte bacteriana (4 a 8 veces la CIM).

Este estudio nos muestra que 27 de las 46 (58%) cepas de *S. aureus* resistentes a las viejas fluoroquinolonas y meticilino-resistentes aisladas de queratitis bacterianas, ya presentan mutaciones genéticas que pueden conducir al desarrollo de resistencias clínicas a las nuevas fluoroquinolonas. Es necesario implementar estrategias para evitar el desarrollo de resistencias bacterianas a las nuevas fluoroquinolonas.

El cociente inhibitorio (IQ) de 8 o más, nos permite pre-

**Tabla 3. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a las fluoroquinolonas con 1 mutación**

Fluoroquinolona	Rango (µg/ml)	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	IQ
Ofloxacina	16,0-32,0	16,0	32,0	NR
Ciprofloxacina	8,0-32,0	16,0	32,0	NR
Gatifloxacina	0,12-4,0	1,0	4,0	3,985
Moxifloxacina	0,06-4,0	0,25	2,0	12,4

Referencias: CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>: concentración inhibitoria mínima para el 50% y 90% de las cepas estudiadas; IQ: cociente inhibitorio.

decir una excelente eficacia clínica de la MOX y GAT sobre cepas de *S. aureus* tanto sensibles a las viejas fluoroquinolonas como las resistentes portadoras de una mutación.<sup>10</sup> En cambio este cociente inhibitorio fue insuficiente en cepas resistentes portadoras de 2 mutaciones.

#### Referencias

- Goldstein MH, Kowalsky RP, Gordon YJ. Emerging fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis: a 5-year review. *Ophthalmology* 1999;106:1313-8.
- Alexandrakis G, Alfonso EC, Miller D. Shifting trends in bacterial keratitis in south Florida and emerging resistance to fluoroquinolones. *Ophthalmology* 2000;107:1947-502.
- Hooper DC. Mechanisms of actions and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2000;31:S24-S28.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Sreedharan S, Oram M, Jensen B, et al. DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1990;172:7260-2.
- Ferrero L, Cameron B, Manse B, et al. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol* 1994;13:641-53.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrro CA, and Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:1768-72.
- Robertson SM, Sanders M, Jasheway D, et al. Penetration and distribution of moxifloxacin and ofloxacin into ocular tissues and plasma following topical ocular administration to pigmented rabbits. Presented en Association for Research in Vision and Ophthalmology Meeting, 2003 (Abstract 1454).
- Wittpenn JR, Pascucci SE, Donnenfeld E, et al. Determination of corneal absorption and penetration of topical gatifloxacin. Presented en American Academy of Ophthalmology Meeting, 2004 (Abstract PA087).
- Wilhelmus Kr. Evaluation and prediction of fluoroquinolone pharmacodynamics in bacterial keratitis. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:493-9.