

Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias

Ferran Navarro Risueño, Elisenda Miró Cardona y Beatriz Mirelis Otero

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. España.

A pesar de que la mayoría de los mecanismos de resistencia implicados en las enterobacterias se conocen con bastante detalle, quedan aún muchos aspectos por determinar, especialmente cuando se intenta predecir la respuesta clínica. El patrón de resistencia observado en el antibiograma de un microorganismo concreto debe ser la suma del patrón de resistencia natural característico de la especie más las resistencias adquiridas. El principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos y aminoglicósidos en enterobacterias es el enzimático, donde cada enzima reconoce un/os determinados betalactámicos o aminoglicósidos, respectivamente. Ello se traduce en un patrón de resistencia concreto que permite deducir la/las enzimas implicadas. Sin embargo, la resistencia enzimática no es el único mecanismo y muy frecuentemente el patrón observado es multifactorial. La resistencia a las quinolonas se debe a mutaciones puntuales y secuenciales, que se pueden ir seleccionando con fluoroquinolonas inicialmente activas e incrementar escalonadamente su resistencia.

Palabras clave: Enterobacterias. Determinación de la sensibilidad. Resistencia.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20(5):225-34

Interpretive reading of the antibiogram of enterobacteria

Many of the resistance mechanisms of enterobacteria to antimicrobial agents are well understood; nevertheless several aspects remain unsolved, particularly with regard to prediction of clinical response. The resistance pattern observed in the antibiogram of a specific organism should be the sum of the natural resistance pattern, characteristic of the species, plus the acquired resistance. In enterobacteria the principal mechanism of resistance to beta lactams and aminoglycosides is enzyme production. Each enzyme recognizes one or more specific beta lactam or aminoglycoside, as a substrate. This translates as a specific resistance phenotype that allows one to infer the enzyme(s) implicated. Enzyme resistance is not, however, the only mechanism of resistance to these agents; often the pattern observed is multifactorial. Resistance to quinolones is due to point and sequence mutations which

may be selected by initially active fluoroquinolones and cause a stepwise increase of resistance.

Key words: Enterobacteria. Determination of sensitivity. Resistance.

Introducción

El gran número de especies dentro de la familia de las enterobacterias conlleva una gran variabilidad de patrones de sensibilidad natural. Esta diversidad se ve además incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia, tanto de microorganismos de la misma especie como de otras. La adquisición de multirresistencia puede llevar a la ineficacia de la mayoría de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica¹. Tal como quedó reflejado en el primer trabajo de esta serie, realizar una lectura interpretativa de los patrones de resistencia, tanto naturales como adquiridos, presupone deducir el mecanismo de resistencia asociado a un fenotipo y predecir así la respuesta clínica a un determinado antimicrobiano, haya sido éste evaluado *in vitro* o no².

La lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias, a pesar de que la mayoría de los mecanismos de resistencia implicados se conocen con bastante detalle, continúa siendo objeto de discusiones, y quedan todavía numerosos aspectos por determinar, sobre todo cuando se intenta predecir la respuesta clínica³. En este sentido, deben realizarse estudios clínicos para reconocer la repercusión *in vivo* de estos patrones de resistencia.

En la presente revisión se han recopilado diferentes opiniones aparecidas en la bibliografía, destacando las del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁴, las del Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM)⁵ y las de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)⁶.

Antes de realizar el antibiograma cabe plantearse cuáles son los antimicrobianos a evaluar. El NCCLS⁴ y la SEIMC⁶ proponen una serie de antibióticos clasificados en función de su interés terapéutico. La SFM sugiere dos grupos, uno con los antimicrobianos necesarios para una orientación terapéutica y el otro, que contiene los antimicrobianos utilizados como alternativa en microorganismos multirresistentes, los de utilidad para realizar un seguimiento epidemiológico y aquellos para ayudar en la interpretación del antibiograma⁷.

En la tabla 1 se propone una lista de antibióticos a evaluar en enterobacterias, asociando los criterios seguidos por los distintos comités, pensando principalmente en aquellos útiles para la lectura interpretada del antibiograma. Cabe señalar que cada centro hospitalario o laboratorio tiene una estructura funcional y unas prioridades que hacen que varíen los elementos disponibles para realizar una lectura interpretada.

Correspondencia: Dr. F. Navarro Risueño.
Servicio de Microbiología. Hospital de Sant Pau.
Avda. Padre Claret, 167. 08025 Barcelona.
Correo electrónico: fnavarro@hsp.santpau.es

TABLA 1. Clasificación de los antimicrobianos que se deben evaluar en las enterobacterias

Estándar	Complementarios
Amoxicilina o ampicilina (A)	Ticarcilina (B)
Amoxicilina-ácido clavulánico (B)	Ticarcilina-ácido clavulánico (B)
Cefalotina/cefazolina (A)	Piperacilina (B)
Cefotaxima/ceftriaxona (B)	Piperacilina-tazobactam (B)
Ceftazidima (C)	Cefuroxima (B)
Gentamicina (A)	Cefoxitina (B)
Amicacina (B)	Cefepime (B)
Ácido nalidíxico (D)	Aztreonam (C)
Ciprofloxacino/ofloxacino (B)	Imipenem/meropenem (B)
Norfloxacino (D)	Kanamicina (C)
Trimetoprim-sulfametoxazol (B, D)	Tobramicina (C)
Nitrofurantoína (D)	Netilmicina (C)
	Cloranfenicol (C)
	Tetraciclina (C)
	Sulfamidas (D)
	Trimetoprim (D)
	Colistina (C)*
	Fosfomicina (B, D)

*Como ayuda en la identificación. Datos procedentes de la NCCLS⁴, la SFM⁵ y la SEIMC⁶: A: de forma rutinaria; B: de forma rutinaria pero sólo informar en caso de resistencias a antimicrobianos de la misma clase del grupo A o en situaciones concretas; C: en situaciones muy concretas como multirresistencias o brotes epidémicos; D: sólo en caso de infección urinaria.

En la presente revisión se pretende indicar las bases para realizar una lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias para las principales familias utilizadas en la práctica clínica: betalactámicos, aminoglicósidos y quinolonas, y de manera muy sucinta se detallarán los mecanismos de resistencia implicados.

Betalactámicos

La familia de los betalactámicos es una de las familias de antimicrobianos más numerosa y más utilizada en la práctica clínica. A lo largo de los años, se han ido incorporando nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos, capaces de superar las resistencias adquiridas frente a sus predecesores¹.

Aunque la resistencia a los betalactámicos está definida por distintos mecanismos (producción de enzimas, alteraciones de la permeabilidad, alteración de la diana y,

presumiblemente, expresión de bombas de eliminación activa), el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en enterobacterias es el enzimático, por producción de las betalactamasas. En esta revisión, la interpretación del antibiograma se basará fundamentalmente en la presencia de dichas enzimas, aunque debe considerarse también que en algunos casos la resistencia obedece a la asociación de distintos mecanismos de resistencia. Un ejemplo de esta última situación lo constituye las cepas de *Enterobacter*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con sensibilidad disminuida o resistencia a carbapenemas. En estos casos se observa una disminución de la permeabilidad asociada a una hiperproducción de la betalactamasa cromosómica en *Enterobacter* o a una betalactamasa plasmídica de clase C en *E. coli* y *Klebsiella*⁷⁻⁹; en general, todas las enzimas de clase C presentan cierta actividad hidrolítica frente a carbapenemas, que no se manifiesta fenotípicamente si no existe una alteración simultánea de la permeabilidad⁷. En esta situación de disminución de la permeabilidad es frecuente que también se vean afectadas otras familias de antimicrobianos, como cloranfenicol, trimetoprim o quinolonas, entre otros (observándose una disminución discreta de la sensibilidad)¹⁰.

En la actualidad se han descrito betalactamasas capaces de inactivar a la práctica totalidad de betalactámicos utilizados en terapéutica, y algunas de ellas, aunque difíciles de detectar, han comportado fracasos terapéuticos. Por ello, debe realizarse una cuidadosa lectura interpretada del patrón de resistencia con una doble finalidad; por un lado, no dar falsas sensibilidades y, por otro, llevar a cabo un seguimiento de determinadas betalactamasas capaces de difundir y producir brotes epidémicos.

En primer lugar se describirán los fenotipos de resistencia naturales de la mayoría de especies de interés clínico (tabla 2) y, posteriormente, se analizan los diferentes patrones de resistencia adquiridos.

Fenotipos de resistencia natural

Todas las enterobacterias de interés clínico, con la única excepción de *Salmonella* y muy probablemente de *Proteus mirabilis*, son portadoras de una betalactamasa cromosómica natural y propia de cada especie^{11,12}. En la tabla 3 se detallan los diferentes patrones de sensibilidad natural a betalactámicos esperados en función de la betalactamasa

TABLA 2. Patrones de resistencia natural en diferentes especies de enterobacterias (modificada de la SFM⁵)

Especies	AMP	AMC	TIC	C1G	FOX	CXM	GM	TET	CHL	NIT
<i>Klebsiella</i>	R		R							
<i>Citrobacter koseri</i>	R		R							
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R		R	R	r				
<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R	r				
<i>Serratia marcescens</i>	R	R		R	r	R			R	
<i>Proteus mirabilis</i>								R	R	R
<i>P. vulgaris</i>	R			R		R			R	R
<i>Moraxella morgani</i>	R	R		R	r	R			R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R		R	r		R		R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R				

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; TIC: ticarcilina; C1G: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; GM: gentamicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol y NIT: nitrofurantoina. R, resistente; r, halos reducidos o concentración mínima inhibitoria (CIM) elevadas, pero dentro del rango de sensibilidad.

TABLA 3. Principales patrones de resistencia a betalactámicos de mayor interés clínico en función de la betalactamasa implicada

Fenotipo	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G; M	C4G	CARB	Incidencia ^a	Observaciones
Grupo 1 (<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>)												
Natural	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Moderada	Presencia de AmpC a niveles basales en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> . <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> son clínicamente resistentes a C1G y C2G
Natural	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Baja	Presencia en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> de AmpC hiperproducida
Penicilinas	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S	Moderada	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Informar como resistentes las C1G excepto en infección del tracto urinario (ITU)
Penicilinas	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	Baja	En caso de tratarse de SHV-1 puede llegar a afectar ligeramente a la ceftazidima
BLEE	R	S/r	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	Rara	Considerar como resistente a las C3G, monobactamas y C4G, incluyendo probablemente cefoxitina
IRT	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Rara	
Cefamicinas	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Rara	
Grupo 2 (<i>Klebsiella</i> , <i>C. koseri</i>)												
Natural	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S	Alta	En <i>K. pneumoniae</i> es por la expresión de SHV-1 o LEN, en <i>K. oxytoca</i> por la K1 y en <i>C. koseri</i> por la betalactamasa clase A. Informar como resistente las C1G excepto en ITU
K1	R	S/R	R	R	R	S	r	S/r	S	S	Baja	Cuando exista resistencia a aztreonam se considerará la categoría de resistente en las C3G para las que se observe sinergia con ácido clavulánico
Penicilinas	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	Baja	La hiperproducción de SHV-1 puede llegar a afectar ligeramente a la ceftazidima
BLEE	R	S/r	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	Rara	Considerar como resistente a las C3G y C4G, incluyendo probablemente cefoxitina
IRT	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Rara	
Cefamicinas	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Rara	
Grupo 3 <i>Enterobacter</i> , <i>C. freundii</i>												
Natural	R	R	S	S	R	R	r	S	S	S	Alta	Por producción de AmpC inducible. Advertir la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactamas
Natural	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Moderada	Patrón indistinguible del de las cefamicinas plasmídicas
Natural + penicilinas	R	R	R	R	R	R	r	S	S	S	Moderada	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Advertir de la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactamas
BLEE	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S/R	S	Rara	Considerar como resistentes a las C3G, monobactamas y C4G

(Continúa)

TABLA 3. Principales patrones de resistencia a betalactámicos de mayor interés clínico en función de la betalactamasa implicada (Continuación)

Fenotipo	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G; M	C4G	CARB	Incidencia ^a	Observaciones
<i>S. marcescens, M. morgani, Providencia</i>												
Natural	R	R	S	S	R	r/R	R	S	S	S	Alta	Por producción de AmpC inducible. Advertir de la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactamas
Natural + penicilinas	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	Moderada	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1 Advertir de la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactamas
Natural	R	R	R	R	R	r/R	R	R	S	S	Baja	Desrepresión de la expresión de la AmpC
Natural + BLEE	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S/R	S	Rara	Considerar como resistentes las C3G, monobactamas y C4G
<i>P. vulgaris, P. penneri</i>												
Natural	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	Alta	Por producción de la betalactamasa cromosómica de clase A
Natural + penicilinas	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	Alta	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1
Natural	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	Rara	Por hiperproducción de la betalactamasa cromosómica de clase A

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; TIC: ticarcilina; PIP: piperacilina; C1G: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; C3G: cefalosporinas de tercera generación; M: monobactamas; C4G: cefalosporinas de cuarta generación; CARB: carbapenemas; : hiperproducción; S: sensible; R: resistente; r: halos reducidos o CIM elevadas con respecto al fenotipo salvaje, pero dentro del rango de sensibilidad.
^aRara: < 1%; baja: 1-15%; moderada: 15-75%; alta: > 75%. Esta incidencia puede oscilar en función de la población estudiada. Datos del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau^{7,19,20,37,38}.

implicada. Estos fenotipos de sensibilidad pueden clasificarse en 4 grupos.

El primer grupo (grupo 1), formado por *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* y *P. mirabilis*, presenta un fenotipo sensible a todos los betalactámicos. Tanto *E. coli* como *Shigella* son portadoras de una betalactamasa cromosómica de clase C de Ambler¹³ que en su forma natural o salvaje se expresa a nivel muy bajo, y no confiere resistencia de relevancia clínica¹².

El segundo grupo (grupo 2), en el que se encuentran *Klebsiella*, *Citrobacter koseri* y *Citrobacter amalonaticus*, entre otras especies, presenta resistencia de bajo nivel a aminopenicilinas (ampicilina) y carboxipenicilinas (ticarcilina) y sensibilidad disminuida o intermedia a ureidopenicilinas (piperacilina), manteniéndose sensibles a cefalosporinas, monobactamas (aztreonam), carbapenemas (imipenem) y a las asociaciones con inhibidores de betalactamasa (amoxicilina-ácido clavulánico).

La resistencia es debida a la producción de una betalactamasa cromosómica de clase A¹³, con actividad penicilinas, que en el caso de *K. pneumoniae* puede ser idéntica a la SHV-1 (una betalactamasa plasmídica clásica) y en *K. oxytoca* se trata de la K1 que si se hiperproduce se comporta como una betalactamasa de espectro extendido (véase apartado "Hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase A")¹².

El tercer grupo (grupo 3) está compuesto por *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Morganella morgani*, *Serratia*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*. Todas presentan una betalactamasa cromosómica induci-

ble con actividad cefalosporinasa que, en general, les confiere resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación (C1G), manteniéndose sensibles a carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, cefalosporinas de tercera (C3G) y cuarta (C4G) generación, monobactamas y carbapenemas.

Dentro de este grupo, *C. freundii*, *Enterobacter*, *Providencia*, *M. morgani*, *Serratia*, *H. alvei*, presentan una betalactamasa de clase C que les confiere resistencia a las asociaciones de inhibidores y una sensibilidad variable a cefoxitina. *Enterobacter* y *C. freundii* son resistentes a cefoxitina y presentan sensibilidad disminuida a cefuroxima, mientras que *M. morgani*, *Providencia* y *Serratia* son resistentes a cefuroxima y moderadamente resistentes a cefoxitina¹³.

Por el contrario, *P. vulgaris* y *P. penneri* son portadores de una betalactamasa cromosómica de clase A, siendo resistentes a cefuroxima y sensibles a cefoxitina y a las asociaciones con inhibidores de la betalactamasa, por lo que con frecuencia se refieren a estas enzimas como cefuroximas.

El carácter inducible de estas enzimas es fácilmente detectable mediante la técnica de difusión; cuando se disponen los discos de cefoxitina o imipenem próximos a los de las C3G o C4G puede observarse un antagonismo entre ambos antibióticos, resultado de la inducción en la producción de betalactamasas que ejercen los primeros^{4,14}.

Finalmente, el cuarto grupo (grupo 4) incluye *Yersinia enterocolitica*, que muestra, en la mayoría de las cepas, un fenotipo de cefalosporinasa inducible y penicilinas y es

resistente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y a C1G y C2G. Este fenotipo es producto de la síntesis de dos enzimas, una de clase A y otra de clase C^{13,15}.

Si bien los patrones de resistencia a los betalactámicos, comentados previamente están mediados por diferentes betalactamasas, debe tenerse presente la existencia de otros mecanismos naturales como, por ejemplo, la disminución de la permeabilidad, por la cual *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* presentan una menor sensibilidad a las carbapenemas.

Fenotipos de resistencia adquirida

Cuando una especie presenta un antibiograma que no concuerda con los descritos como fenotipos naturales puede deberse a un error en la identificación del microorganismo o a la presencia de resistencias adquiridas, en cuyo caso los datos observados deben evaluarse para conocer el mecanismo que los produce e interpretarlo.

La resistencia adquirida modifica el patrón natural de resistencia de una especie determinada, siendo el patrón de resistencia resultante la suma de la resistencia natural más la adquirida.

La presencia de nuevas enzimas, no propias de la especie, puede deberse a la adquisición de genes por diferentes vías como son la conjugación, la transformación o la transducción. En todos los casos se trata de material extracromosómico que la bacteria adquiere y que puede asimilar y perpetuar a su progenie, bien en forma de plásmido, bien incorporándolo en su cromosoma. Sin embargo, algunos patrones de resistencia vienen dados no por enzimas adquiridas, sino por mutaciones en los genes cromosómicos naturales de especie, por lo general en la región del promotor o en los genes reguladores de su expresión^{12,16-18}.

A continuación se describen los distintos fenotipos de resistencia adquirida, que quedan esquematizados en la tabla 3.

Producción de penicilinasas

La adquisición de betalactamasas plasmídicas de clase A¹³, denominadas de amplio espectro o betalactamasas clásicas, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, es responsable de la resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas y de la sensibilidad disminuida o intermedia a ureidopenicilinas. Las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad a cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas. Sin embargo, una hiperproducción de estas enzimas conlleva resistencia a C1G, C2G (excepto cefamicinas como la cefoxitina) y con frecuencia sensibilidad discretamente disminuida a la asociación amoxicilina-ácido clavulánico. Además, en el caso particular de la hiperproducción de SHV-1, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, puede observarse una resistencia de bajo nivel a ceftazidima¹⁹. En este último caso puede observarse por técnica de difusión una ligera sinergia entre amoxicilina-ácido clavulánico y ceftazidima (al situar ambos discos a una distancia de 2,5 a 3 cm) que podría hacer pensar en una betalactamasa de espectro extendido¹⁴.

Producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE)

El grupo mayoritario de BLEE deriva de las betalactamasas mencionadas en el apartado anterior: TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Otra familia de BLEE, la CTX-M, cuyo

origen no está en las betalactamasas mencionadas anteriormente, sino, probablemente, en las cromosómicas de ciertas especies, como *Kluyvera ascorbata* o *K. cryocrescens*²⁰, ha iniciado una rápida expansión, aislándose en la actualidad con mayor frecuencia en diversas áreas epidemiológicas.

Las BLEE se caracterizan por ser capaces de inactivar la práctica totalidad de cefalosporinas, a excepción de las cefamicinas, manteniendo la sensibilidad a los inhibidores y a las carbapenemas.

Su detección no siempre es fácil, y debe tenerse en cuenta tanto pequeñas disminuciones de sensibilidad a C3G (incremento de la CIM o halo de inhibición disminuido), presencia de sinergia entre C3G o C4G y el ácido clavulánico, bordes de los halos de inhibición irregulares, así como resistencias asociadas, especialmente a aminoglicósidos⁵. No es objetivo de esta revisión el detallar la metodología más adecuada para su detección, la cual puede encontrarse en el volumen 12 de los *Procedimientos en microbiología clínica* publicado por la SEIMC¹⁴. Existe un consenso para considerar el microorganismo portador de esta betalactamasa, con independencia del valor de sensibilidad obtenido (sea por la técnica de difusión o de dilución), como intermedio o resistente a todas las cefalosporinas (incluyendo C3G y C4G), y existe cierta discusión sobre si deben o no considerarse resistentes a las cefamicinas^{4,6,14}, aunque el laboratorio debe resaltar que el uso de cefamicinas conlleva el riesgo de selección de mutantes resistentes (por alteración de la permeabilidad).

La mayoría de estas enzimas son relativamente fáciles de detectar en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otros microorganismos de los grupos 1 y 2, presentando una mayor dificultad las cepas de enterobacterias del grupo 3 con un patrón de desrepresión de su betalactamasa cromosómica inducible (véase a continuación). En este caso es útil estudiar la presencia de sinergia entre cefepime y ácido clavulánico¹⁴.

Producción de betalactamasas resistentes a los inhibidores

Estas betalactamasas derivan también de las betalactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas son insensibles a la acción de los inhibidores de betalactámicos. Estas betalactamasas se han denominado IRT (*inhibitor-resistant TEM mutant*) porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2, aunque también se han descrito derivadas de SHV-1^{12,21}. Por otro lado, las oxacilinasas (como la OXA-1) pertenecientes a la clase D de Ambler¹³ producen un fenotipo indistinguible del de las IRT²².

Hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase A

Este fenotipo puede encontrarse en especies como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. penneri*, *P. vulgaris* y *C. koseri*. En el caso de *K. oxytoca* su patrón de resistencia es muy similar al de una BLEE. La sospecha de tratarse de una hiperproducción de la betalactamasa cromosómica (denominada K1)¹⁶ y no de una BLEE viene dada por la sensibilidad a ceftazidima y la elevada resistencia al aztreonam. En la prueba de sinergia ésta se observa sobre todo con aztreonam y/o con cefotaxima, pero no con ceftazidi-

ma. En estos casos la SFM recomienda informar al clínico como cepa con sensibilidad intermedia de aquellos antibióticos que presenten sinergia, independientemente de su sensibilidad⁵. El caso de hiperproducción de la betalactamasa cromosómica de *K. pneumoniae*, ya se ha comentado previamente en el apartado "Producción de penicilinasas".

La otra situación es la de *P. penneri*, *P. vulgaris* y *C. koseri*, donde la hiperproducción de la betalactamasa cromosómica no puede distinguirse de una BLEE, aunque ambas situaciones son muy poco frecuentes en la práctica clínica.

Hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase C y cefamicinasas plasmídicas

Este fenotipo se caracteriza por presentar resistencia a la práctica totalidad de betalactámicos con la única excepción de las carbapenemas, aunque las diferentes cefalosporinas serán más o menos hidrolizadas en función del nivel de hiperproducción.

En este contexto se definen tres situaciones diferentes. La primera hace referencia a *E. coli* y *Shigella* con una betalactamasa cromosómica no inducible de clase C (AmpC) que normalmente se expresa a niveles muy bajos, por lo que no confiere resistencia. Cuando se halla hiperproducida confiere resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, las asociaciones con inhibidores, C1G, cefamicinas, y en función del grado de hiperproducción también puede afectar a C3G y monobactamas, mientras que las C4G y las carbapenemas se mantienen activas¹⁷.

La segunda situación es la que se da en enterobacterias como *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *M. organii* y *C. freundii*, que tienen una betalactamasa cromosómica inducible de clase C. En las infecciones producidas por estos microorganismos (sobre todo en infecciones graves o donde no exista una buena difusión del betalactámico) debe tenerse siempre presente que si se tratan con C3G o monobactamas, que son activos frente a estas cepas, con frecuencia pueden seleccionarse mutantes que, por alteraciones en los genes que regulan la producción de la enzima, provoquen la producción de gran cantidad de la misma y, por tanto, estas cepas pasen a ser resistentes a las carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, las cefalosporinas (manteniendo cierta actividad las C4G) y monobactamas. En esta última situación se habla de una betalactamasa desreprimida, puesto que de forma natural estos microorganismos presentan un sistema represor de la expresión de la betalactamasa¹⁸. En caso de desrepresión puede verse que el patrón de resistencia obtenido es similar al de la hiperproducción de AmpC en *E. coli* y *Shigella*.

Todos los betalactámicos son inductores de estas betalactamasas inducibles, en mayor o menor grado, siendo los inductores más fuertes cefoxitina e imipenem (insensible a esta enzima). Por ello nunca deben administrarse varios betalactámicos asociados (en particular a cefoxitina) para tratar infecciones por estos microorganismos.

Finalmente, la tercera situación se encuentra cuando diferentes betalactamasas cromosómicas, como las de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Aeromonas* o *H. alvei*, que pertenecen a la clase C, han pasado a un plásmido difundiendo a diferentes especies, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* o *Salmonella*²³. Estas cefamicinasas plasmídicas, cuyo patrón de resistencia es indistinguible del de los grupos anteriores, tienen la única excepción de

que se expresan constitutivamente y no son inducibles (con algunas excepciones), por ello su detección en *E. coli* es difícil si no se caracteriza la enzima.

En la primera y última situación, sin que exista consenso³, la elección del antibiótico que se utilice debe sustentarse en los valores de sensibilidad obtenidos y, por tanto, en función del grado de producción de la enzima si es cromosómica y del grado de producción y/o del tipo de cefamicinasa si es plasmídica; el tratamiento podría realizarse con C3G, monobactamas o carbapenemas, aunque de existir alternativa no sería recomendable su uso. En el caso de una betalactamasa desreprimida, donde la cepa presenta resistencia o sensibilidad intermedia a alguna de las C3G y/o monobactamas, al menos según la SFM⁵, debe darse como intermedio un resultado sensible a estos antimicrobianos. Además se debe alertar al clínico, siempre que se trate de un microorganismo con betalactamasa cromosómica inducible, que existe la posibilidad de fracaso terapéutico si se trata con betalactámicos activos *a priori*, como consecuencia de la selección de cepas resistentes por desrepresión de la betalactamasa cromosómica.

Producción de betalactamasas activas frente a carbapenemas

La incidencia de estas enzimas en enterobacterias es muy baja y produce una resistencia de alto nivel, no sólo al imipenem, sino también al resto de betalactámicos. Existen dos clases de enzimas con actividad frente a carbapenemas, las carbapenemasas de clase A, que suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico, y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem, y las de clase B (metaloenzimas), las cuales no presentan actividad frente a aztreonam y su acción es inhibida con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)²⁴. En nuestro país ya se han descrito las primeras carbapenemasas, aunque no en enterobacterias, sino en *Pseudomonas aeruginosa*²⁵.

Fenotipos complejos de resistencia adquirida

Los patrones de resistencia comentados hasta aquí serían los observados en casos de expresión de un único mecanismo. En muchas ocasiones se aíslan microorganismos que producen distintas betalactamasas, siendo difícil deducir, inequívocamente, del perfil fenotípico de resistencia, los mecanismos involucrados, por lo que su elucidación requiere de técnicas especiales (isoelectroenfoque, reacción en cadena de la polimerasa [PCR], secuenciación, etc.).

La interpretación del antibiograma de una enterobacteria se basa en un primer estadio, en el conocimiento de la resistencia natural de cada especie, y cualquier alteración de este patrón de sensibilidad esperado se debe a una resistencia adquirida; aunque siempre ha de tenerse en cuenta la posibilidad de un error en la identificación de la cepa. En este sentido, por ejemplo, debe contestarse como mínimo sensibilidad intermedia o resistente a los antimicrobianos que se esperaría que fueran resistentes en función de su patrón natural, pero que se observan en el antibiograma como sensibles (tablas 2 y 3)⁵.

Aminoglicósidos

El comportamiento de un aminoglicósido frente a una enterobacteria depende, como mínimo, de cuatro factores:

a) la difusión pasiva a través de la membrana externa; b) el transporte activo a través de la membrana interna; c) la afinidad del aminoglicósido por su diana (una proteína ribosomal), y d) la presencia de enzimas inactivantes. Los tres primeros factores no tienen una gran relevancia en clínica. Las mutaciones que afectan la difusión pasiva a través de la membrana externa, porinas o estructura del polisacárido, conllevan a la vez una resistencia cruzada con otras familias de antimicrobianos; mutaciones que afectan el transporte activo a través de la membrana interna se han descrito principalmente en *E. coli* y *P. aeruginosa*, y comporta una resistencia de bajo nivel que afecta a todos los aminoglicósidos²⁶. Por último, mutaciones en la diana de los aminoglicósidos son muy escasas en cepas aisladas en la práctica clínica y son muy específicas para cada aminoglicósido, lo cual no produce un fenotipo de resistencia cruzada²⁶.

El mecanismo más importante de resistencia a los aminoglicósidos es la inactivación enzimática. Se han descrito tres tipos de enzimas: las acetiltransferasas (AAC) que acetilan un grupo amino del antibiótico, las fosfotransferasas (APH) que fosforilan un grupo hidroxilo y, finalmente, a las nucleotidiltransferasas (ANT) que adenilan también un grupo hidroxilo. Cada enzima reconoce un cierto número de antibióticos aminoglicósidos, lo cual se traduce en un fenotipo de resistencia concreto. El conocimiento de los distintos fenotipos es indispensable para la lectura interpretada del antibiograma^{26,27}.

Fenotipos de resistencia natural

La mayoría de los géneros de enterobacterias son naturalmente sensibles a los aminoglicósidos, con las excepciones de *Providencia*, con una resistencia natural a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina debido a la presencia en el cromosoma del gen *aac(2')-Ia* y *Serratia marcescens*, que presenta también en el cromosoma el gen *aac(6')* que confiere un diámetro de inhibición a la tobramicina, más reducido que el resto de enterobacterias, diámetro que corresponde a una concentración inhibitoria mínima (CIM) para este antibiótico de entre 1 a 4 mg/l, y es

considerado como resistente. Mutaciones en el gen de la AAC(6') causan una hiperproducción de la enzima que confiere una resistencia de alto nivel a tobramicina, kanamicina y netilmicina.

Fenotipos de resistencias adquirida

La resistencia enzimática a los aminoglicósidos puede deberse a la producción de una o varias enzimas. Los fenotipos de resistencia por producción de una sola enzima se resumen en la tabla 4. El fenotipo de resistencia por varias enzimas es más difícil de determinar, aunque en algunos casos es predecible por el efecto aditivo de dos patrones distintos. Asimismo, cabe señalar que la resistencia de alto nivel a todos los aminoglicósidos no se debe sólo a la producción de enzimas, sino que intervienen también alteraciones en la permeabilidad²⁷.

Para la detección de los distintos fenotipos de resistencia es importante una correcta elección de los aminoglicósidos en estudio. Puede hacerse un antibiograma completo, por ejemplo, para el estudio epidemiológico de los genes de resistencia de las cepas, o bien un antibiograma reducido donde sólo se incluyan los aminoglicósidos de uso en terapéutica. Para el antibiograma completo se recomienda el estudio de la amicacina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina y tobramicina. El estudio de la estreptomina puede ser optativo, pues su uso en la práctica clínica ha quedado reducido al tratamiento de la tuberculosis. Sin embargo, en un estudio epidemiológico es el único marcador de la presencia de la enzima APH (3^m)²⁸. Por el contrario, para el antibiograma corto es suficiente el estudio de la amicacina, gentamicina, netilmicina y tobramicina.

Para interpretar el patrón de sensibilidad a los aminoglicósidos se debe estar alerta ante situaciones donde puede haber una débil expresión de la enzima⁵. En este contexto se debe tener presente que: a) ante una cepa sensible a amicacina, pero con sensibilidad intermedia o resistente a tobramicina y netilmicina, debería interpretarse sensibilidad intermedia a amicacina, ya que puede tratarse de la producción de la enzima AAC(6') (tabla 4); b) cuando

TABLA 4. Fenotipos de resistencia a los aminoglicósidos por producción de una sola enzima inactivante^{11,26,28}

Fenotipo	Enzima	Incidencia	Lectura del antibiograma
Str	APH(3'')	Rara	Resistencia a estreptomina. La adición de un disco de espectinomicina discrimina entre la APH(3'') y la ANT(3''), pues esta última confiere resistencia a estreptomina y espectinomicina
Str/Spc	ANT(3'')	Baja	
K Nm	APH(3')-I APH(3')-II	Moderada Rara	Resistencia de alto nivel a kanamicina y neomicina. La enzima de tipo I es más frecuente que la II
G	AAC(3)-I	Baja	Reducción del diámetro del halo de inhibición de la gentamicina, a veces de difícil visualización. También puede ir asociado a la reducción de los halos de la tobramicina y netilmicina
KGT	ANT(2'')	Baja	Reducción del diámetro del halo de inhibición de la kanamicina, gentamicina y en menor grado de la tobramicina
KTGNt	AAC(3)-II AAC(3)-IV	Rara Rara	Resistencia de alto nivel a gentamicina y tobramicina, disminución importante del halo de la netilmicina y moderada para la kanamicina
KTANt	AAC(6')	Rara	Resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina, y netilmicina y moderada para la amicacina. Es un fenotipo fácil de diferenciar, pues son cepas sensibles a gentamicina. Presente esencialmente en <i>Serratia</i>
GTNtNm	AAC(2')	Rara	Resistencia moderada a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina. Difícil de detectar, excepto en el género <i>Providencia</i> , pues es una resistencia natural de localización cromosómica

A: amicacina; G: gentamicina; K: kanamicina; Nm: neomicina; Nt: netilmicina; Spc: espectinomicina; Str: estreptomina; T: tobramicina.

se observa una disminución del halo de inhibición de la gentamicina (comprendido entre 16 y 19 mm) debe considerarse sensibilidad intermedia a gentamicina por producción de la enzima AAC(3)-I: si la gentamicina presenta un halo de inhibición reducido debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la tobramicina, pues puede estar presente la enzima ANT (2''), y c) debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la netilmicina cuando haya una reducción del diámetro de inhibición (comprendido entre 19 y 22 mm) y también si aparecen reducidos los halos de la gentamicina y la tobramicina.

Fluoroquinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, de las cuales cabe destacar el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, cuyo espectro de actividad se centra en las bacterias gramnegativas, pero que ha ido ampliándose sobre grampositivos, anaerobios e incluso micobacterias con las nuevas fluoroquinolonas²⁹.

La actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas se basa en la inhibición de las topoisomerasas, la topoisomerasa II o ADN-girasa y la topoisomerasa IV. Ambas son enzimas heterotetraméricas formadas por dos subunidades, A y B, codificadas respectivamente por los genes *gyrA* y *gyrB* en la ADN-girasa y *parC* y *parE* en la topoisomerasa IV³⁰.

Los principales mecanismos de resistencia descritos son consecuencia de mutaciones en los genes de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV; mutaciones que afectan las porinas o el lipopolisacárido, impidiendo la penetración del antimicrobiano al interior de la bacteria; y/o la presencia de bombas de achique que expulsan el antimicrobiano hacia su exterior³⁰. El incremento de bombeo, así como alteraciones en la permeabilidad por parte de la bacteria, normalmente conlleva una resistencia de bajo nivel. Ambos mecanismos pueden encontrarse asociados con mutaciones en las topoisomerasas, incrementando el nivel de resistencia y contribuyendo a su vez a la selección de la resistencia a lo largo del tratamiento. Por otro lado se ha descrito un plásmido de resistencia a quinolonas, aunque su frecuencia en cepas clínicas es por ahora irrelevante³¹.

En el caso de alteraciones de la diana, en microorganismos gramnegativos, la ADN-girasa parece ser la primera diana para todas las quinolonas³⁰. Las alteraciones en la diana se concentran en una región de la enzima, denominada QRDR (*quinolone resistance-determining region*). Alteraciones en las regiones QRDR, tanto de las dos subunidades de la ADN-girasa como de las dos de topoisomerasa IV, van asociadas a un incremento en la CIM de todas las quinolonas; de hecho, la resistencia a las quinolonas parece ser fruto de varios escalones en cada uno de los cuales se produce una nueva mutación. De este modo la cepa, tras una primera mutación en un QRDR generalmente de *GyrA*, aparecerá resistente al ácido nalidíxico, pero sensible a fluoroquinolonas (incrementando ligeramente sus CIM), y posteriormente mutaciones en éste u otro QRDR harán que la cepa pase a ser resistente a fluoroquinolonas (aunque no a todas por igual). Generalmente estas mutaciones sucesivas se asocian a otros mecanismos como son las bombas de achique^{32,33}. Así, la interpretación del

antibiograma de las quinolonas presenta pocos matices. Livermore et al¹¹ aconsejan que en los casos donde se observe resistencia a alguna fluoroquinolona sólo se utilicen las que se muestran activas si no existe alternativa terapéutica, aunque si esta discrepancia es muy evidente probablemente se trate de un error metodológico.

Como se ha comentado, las cepas de enterobacterias con CIM elevadas de ácido nalidíxico presentan ya una mutación en la ADN-girasa, por lo que sólo es necesaria una segunda mutación para que la cepa adquiera una resistencia de alto nivel a ciprofloxacino³⁴. Es, pues, importante, informar de la presencia de dichas cepas por la mayor probabilidad que presentan de adquirir resistencia a fluoroquinolonas y el consiguiente riesgo de fracaso terapéutico tras tratamiento con dichos antimicrobianos. En este sentido varios autores consideran oportuno informar una cepa con sensibilidad intermedia a fluoroquinolonas si presenta resistencia a ácido nalidíxico^{35,36}.

Correlación entre identificación y patrón de sensibilidad

Una vez más quisiéramos resaltar el hecho de que siempre debería existir una perfecta correlación entre la identificación de una determinada cepa y, como mínimo, el patrón de sensibilidad natural (tabla 2). Así, a modo de ejemplo: en *Enterobacter*, *C. freundii* y *Serratia* siempre debiera observarse una betalactamasa cromosómica inducible; *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. koseri*, *P. penneri* y *P. vulgaris* siempre deberían ser resistentes a ampicilina; *Providencia*, *Proteus* y *Morganella* presentarían una resistencia natural a colistina y nitrofurantoína; *Serratia* debería ser siempre resistente a colistina, y *P. mirabilis* a tetraciclinas.

Cualquier microorganismo que no muestre una resistencia esperada debe hacer replantear la identificación de la cepa o el estudio de sensibilidad y de corroborarse la discrepancia debería caracterizarse el mecanismo de resistencia.

Agradecimientos

Agradecemos a G. Prats la revisión crítica del trabajo.

Bibliografía

- Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
- Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002 (en prensa).
- Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001;7:333-6.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M100-S11. Wayne, 2001.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2000-2001. 2001. Disponible en: <http://www.sfm.asso.fr/Sect4/com2001.pdf>.
- García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avilal C, et al. 11. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Pícazo JJ, editor. Procedimientos en Microbiología Clínica. Disponible en: <http://www.seimc.org/>.
- Miró E, Alonso C, Navarro F, Mirelis B, Prats G. Resistencia al imipenem en *Enterobacter aerogenes*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995;13:278-82.

8. Stapleton PD, Shannon KP, French GL. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 β -lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1206-10.
9. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:563-9.
10. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1831-6.
11. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl)S1:87-102.
12. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
13. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
14. García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. 12. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Disponible en: <http://www.seimc.org/>.
15. Pham JN, Bell SM, Martín L, Carniel E. The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:951-7.
16. Fournier B, Lu CY, Lagrange PH, Krishnamoorthy R, Philippon A. Point mutation in the ribnaw box, the molecular basis of β -lactamase overproduction in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1365-8.
17. Nelson EC, Elisha BG. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:957-9.
18. Wiedemann B, Dietz H, Pfeifle D. Induction of β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):42-7.
19. Miró E, del Cuerdo M, Navarro F, Sabaté M, Mirelis B, Prats G. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:535-53.
20. Navarro F, Miro E. Update on CTX-M-type β -lactamases. *Rev Med Microbiol* 2002. En prensa.
21. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouveleki LS. Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:838-40.
22. Chaïbi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM β -lactamase: Phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:447-58.
23. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1-11.
24. Livermore DM. Acquired carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:673-6.
25. Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:932-3.
26. Lemozy J, Bismuth R, Courvalin P. Enterobacteries et aminosides. En: Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J, editores. *L'Antibiogramme*. Bruselas: MPC 1985;111-25.
27. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57:138-63.
28. Chiew YF, Yeo SF, Hall LMC, Livermore DM. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:247-51.
29. Blondeau JM. A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new "respiratory quinolones". *J Antimicrob Chemother* 1999;43(Suppl B):1-11.
30. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):54-63.
31. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
32. Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:10-3.
33. Fluit ADC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:836-71.
34. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goñi PE, Giral E, et al. Association between double mutation in the *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2477-9.
35. Wain J, Hoa NT, Chinh NT, Vinh H, Everett MJ, Diep TS, et al. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis* 1997;25:1404-10.
36. Vasallo FJ, Martín Rabadán P, Alcalá L, García-Lechuz JM, Rodríguez-Creixems, Bouza E. Failure of ciprofloxacin therapy for invasive nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:535-6.
37. Sabaté M, Miro E, Navarro F, Verges C, Aliaga R, Mirelis B, et al. β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates between 1994-1996 in (Barcelona) Spain. *J Antimicrob Chemother* 2002. En prensa.
38. Navarro F, Pérez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother* 2001;48:383-389.