

Producción de betalactamasas y patrones de resistencia bacteriana, 1988-1991

Eduardo Rodríguez Noriega ♦ Rayo Morfin Otero ♦ Sergio Esparza Ahumada

Resumen

Para preservar un uso racional de antibióticos en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas se requiere de la observación constante de los patrones de resistencia bacteriana. Con el propósito de conocer la evolución de la resistencia bacteriana en la comunidad y en las bacterias responsables de infecciones nosocomiales se inició un programa de vigilancia centinela en 1988. Se incluyeron para su estudio 4942 bacterias aisladas de diversos sitios obtenidos de infecciones comunitarias como nosocomiales de niños y adultos. Las muestras de infecciones nosocomiales provenían de pacientes internados en el Hospital Civil de Guadalajara, un hospital universitario de tercer nivel y de un Hospital de segundo nivel de atención y las muestras de infecciones comunitarias de pacientes evaluados en la Consulta Externa Infectológica del Hospital Civil de Guadalajara. Se incluyeron 3584 bacterias de infecciones comunitarias, 1138 gram positivas y 2446 gram negativas, así como 1358 bacterias de infecciones nosocomiales, 509 gram positivas y 849 negativas. El porcentaje de bacterias gram negativas productoras de betalactamasas fue siempre superior a las de las gram positivas. Estos porcentajes se mantuvieron estables durante el periodo de observación. La resistencia a antibióticos betalactámicos no protegidos con un inhibidor de betalactamasas, varía entre 64-100% en las bacterias gram negativas y entre 81-96% entre algunas gram positivas. Durante los últimos años ha aumentado la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, Imipenem y Quinolonas; en especial en las bacterias gram negativas. La implementación de programas de vigilancia de la evolución de la resistencia bacteriana a nivel local y su análisis y discusión a nivel nacional e internacional, dan un mejor uso de los antimicrobianos y un mejor control de la resistencia bacteriana.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, vigilancia, betalactamasas, patrones.

Summary

The adequate use of antimicrobial agents depends to a great degree on the results obtained from the continuous surveillance of bacterial resistance patterns. In order to determine these resistance patterns of bacterial pathogens responsible for community and nosocomial infections a sentinel surveillance program was started in 1988. An analysis of both pediatric and adult cases revealed 4942 bacteria isolated from different sites. Most samples from community infections were obtained from out patients seen in the infections disease clinic of the Hospital Civil de Guadalajara. Of the bacteria identified, 3584 were derived from community infections. Of those 1138 were gram positive and 2446 were gram-negative. The study also included 1350 nosocomial isolated of which 509 were gram-positive bacteria and 849 were gram-negative bacteria. Overall the gram-negative bacteria were more frequently Beta-lactamase producers than the gram-positive bacteria. Resistance to beta-lactam antibiotics ranged from 64-100% in gram negative bacteria and from 81.96% in some gram positive bacteria. During the last 2 years the resistance to third generation cephalosporins, imipenem and quinolones in gram-negative bacteria has steadily increased. Only through the continuous surveillance of bacterial resistance and the implementation of programs to combat bacterial resistance will the use of valuable antibiotics be prolonged and the activity of other ones be preserved for future use.

Key words: Bacterial resistance, surveillance, betalactamases.

Introducción

La presencia de bacterias resistentes a diversos antimicrobianos causan infecciones comunitarias o infecciones nosocomiales; es aún un problema grave para el responsable de la atención médica. La mayoría de las bacterias aunque previamente sensible a los antibióticos, bajo la presión específica de un antimicrobiano puede desarrollar no sólo diversos mecanismos de resistencia sino la capacidad de transmitir esa información a otras bacterias. La vigilancia continua de los patrones de resistencia /sensibilidad bacteriana es quizás el método más sencillo y fácil de implementar con el cual se puede intentar prevenir o combatir la resistencia bacteriana.^{1,2}

Las infecciones causadas por bacterias resistentes son responsables de estancia hospitalaria prolongada y mayor mortalidad cuando se compara con infecciones similares, pero provocadas por bacterias sensibles.³ Esta flora bacteriana resistente, usualmente se considera como responsable sólo de infecciones nosocomiales, puede encontrarse en otros sitios considerados como comunitarios.⁴

Durante los últimos 20 años, se ha demostrado resistencia en bacterias gram-negativas responsables de infecciones nosocomiales con patrones de resistencia que se pueden encontrar en diversos países.^{5,6} La introducción de nuevos betalactámicos aumentó las posibilidades de resistencia al inducir nuevos mecanismos operativos aun durante la terapia; fenómeno ya descrito para ciertos enteropatógenos.^{7,8} Asimismo se ha reportado que las bacterias de ciertas infecciones nosocomiales tienden a ser más invasivas.^{5,9,10}

Durante los próximos años la problemática previa será complicada con la aparición de nuevos mecanismos de resistencia,^{11,12} con la presencia de mecanismos múltiples de resistencia en los que uno de ellos prominentemente sea una betalactamasa,^{13,20} y con el rápido desarrollo de resistencias múltiples en bacterias gram-positivas como *S. aureus*,²¹⁻²⁵ *Enterococos*²⁶ y otras consideradas como patógenos comunitarios.²⁷⁻³⁶

El problema de la resistencia bacteriana en el Hospital Civil de Guadalajara y la ciudad de Guadalajara ha sido sólo analizado en el pasado, durante el desarrollo de una epidemia o dentro de la problemática de unidades de cuidados intensivos. A partir de 1988, se inicia la recolección de bacterias, y su análisis sistematizado dentro de un programa de vigilancia centinela de resistencia bacteriana, que pretende definir los cambios en los patrones de resistencia, tanto de patógenos nosocomiales y comunitarios. Los datos que se presentan a continuación deben ser motivo de análisis y discusión por otros grupos interesados en el fenómeno de resistencia bacteriana para que sea la creación de una red de comunicación e información la que le permita al clínico un uso racional de todos los antimicrobianos.

Material y métodos

Se analizaron 4942 bacterias aisladas de secreciones: orinas, sangre y diversos líquidos obtenidos de infecciones comunitarias y nosocomiales durante los años de 1988-1991 (Cuadro 1). Los aislamientos nosocomiales incluyeron tanto infecciones en niños como en adultos de un hospital universitario de tercer nivel (Hospital Civil de Guadalajara) y de un hospital de segundo nivel, ambos en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México. Todos los aislamientos comunitarios fueron tomados de diversas infecciones manejadas en la Consulta Externa (Pediátrica y de Adultos) de Infectología del hospital que atiende a la población abierta de la ciudad de Guadalajara.

Cuadro 1. Origen de las bacterias aisladas.

PERIODO	NÚMERO AISLADAS DE								
	SECRECIONES		ORINA		SANGRE		LÍQUIDOS		TOTAL
	GP	GN	GP	GN	GP	GN	GP	GN	
1988	91	165	9	113	11	32	2	7	430
1989	286	459	42	403	33	61	7	4	1295
1990	419	527	37	381	20	59	33	51	1527
1991	556	539	25	388	34	67	42	39	1690
TOTAL	1352	1690	113	1285	98	219	84	101	4942

GP = Gram-positivas, GN = Gram-negativas

La mayor cantidad de aislamientos fue hecha en 1989, 1990 y 1991 (Cuadro 1). Se incluyeron 3584 bacterias de infecciones comunitarias, 1138 gram-positivas y 2446 gram-negativas, así como 1358 bacterias de infecciones nosocomiales, 509 gram-positivas y 849 gram-negativas.

Después del aislamiento primario, la identificación fue hecha con dos métodos de microdilución (Microscan, Baxter y Minitek, BBL). La determinación de producción de betalactamasas fue hecha a través de un disco con nitrocefina (Cefinase, BBL Microbiology Systems) y con un método microiodométrico. La determinación de susceptibilidad a los antimicrobianos fue hecha para cada bacteria con un método de Microdilución (Microscan, Baxter) y con el método de Kirby-Bauer.

Resultados

Las bacterias aisladas tanto de la comunidad como de infecciones nosocomiales fueron productoras de betalactamasas en porcentajes similares; cifras que se mantuvieron estables durante los años de 1989-1991 (Cuadros 2 y 3). Las bacterias gram-negativas siempre superaron en cuanto a la producción de betalactamasas a las bacterias gram-positivas tanto en infecciones comunitarias como en infecciones nosocomiales (Cuadros 2 y 3). Las cinco principales bacterias gram-

negativas productoras de betalactamasas fueron *A. xylosoxidans*, *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. y *E. coli*. con *S. aureus* y Estafilococos coagulasa negativos como las principales bacterias gram-positivas (Cuadro 4).

Cuadro 2. Número de bacterias aisladas de la comunidad productoras de betalactamasas.

PERIODO / TIPO DE BACTERIA	NÚMERO	(PORCENTAJE)
1989 GRAM-POSITIVA (N=299)	225	(75)
GRAM-NEGATIVA (N=766)	694	(91)
1990 GRAM-POSITIVA (N=346)	272	(79)
GRAM-NEGATIVA (N=712)	680	(96)
1991 GRAM-POSITIVA (N=404)	293	(73)
GRAM-NEGATIVA (N=714)	674	(94)

Cuadro 3. Número de bacterias aisladas de infecciones nosocomiales productoras de betalactamasas.

Periodo / tipo de bacteria	Número	(Porcentaje)
1989 GRAM-POSITIVA (N=69)	45	(65)
GRAM-NEGATIVA (N=161)	148	(92)
1990 GRAM-POSITIVA (N=163)	98	(60)
GRAM-NEGATIVA (N=300)	289	(96)
1991 GRAM-POSITIVA (N=253)	166	(66)
GRAM-NEGATIVA (N=319)	267	(44)

Cuadro 4. Principales bacterias productoras de betalactamasas

GRAM-NEGATIVAS (%)	GRAM-POSITIVAS (%)
<i>A. Xylosoxidans</i> (100)	<i>S. Aureus</i> (90.5)
<i>Serratia</i> spp. (93.8)	Estafilococos Coagulasa Negativos (79.9)
<i>Klebsiella</i> spp. (90.1)	
<i>Pseudomonas</i> spp. (87.9)	
<i>E. Coli</i> (81.3)	

La presencia de porcentajes elevados de producción de betalactamasas para cada bacteria tuvo relación estrecha con el porcentaje de resistencia a diversos antimicrobianos. Las bacterias gram-negativas como *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp fueron altamente resistente a ampicilinas; con la asociación de un betalactámico con un inhibidor de betalactamasas mejorando en algo su actividad (Cuadro 5). Estas dos bacterias además, demostrando ya resistencia a antibióticos de recién introducción como las cefalosporinas de tercera generación, "Imipenem" y "Quinolonas" (Cuadro 5). Un fenómeno similar fue observado en bacterias gram-positivas en donde *S. aureus* y Estafilococos coagulasa negativos fueron muy resistentes a los betalactámicos no protegidos con un inhibidor de las betalactamasas. Ambos tipos de estafilococos con poca resistencia a vancomicina pero con un importante porcentaje de resistencia a las quinolonas (Cuadro 6).

Cuadro 5. Patrones de resistencia de bacterias Gram-negativas aisladas de secreciones.

BACTERIA	% BETALACTAMASA POSITIVO	% RESISTENTE A					
		AM	TIM	CTX	CAZ	IMP	CP
<i>Pseudomonas</i> spp. (N=227)	86	97	36	17	16	10	7
<i>Klebsiella</i> spp. (N=135)	85	95	6	2	2	4	0
<i>E. Coli</i> (N=118)	79	64	34	8	4	4	5

AM = Ampicilina, TIM = Ticarcilina-Ácido Clavulánico, CTX = Cefotaxima, CAZ = Ceftazidima, IMP = Imipenem, CP = Ciprofloxacina

Cuadro 6. Patrones de resistencia de bacterias Gram-positivas aisladas de secreciones.

BACTERIA ORIGEN	% BETALACTAMASA POSITIVO	% RESISTENTE A				
		AM	AUG	VA	CP	IMP
<i>S. Aureus</i> (n=264)	91	96	8	3	11	4
Stafilococos Coagulasa Negativos (N=171)	83	81	11	5	10	14

AM = Ampicilina, AUG = Amoxicilina-Ácido Clavulánico, VA = Vancomicina, CP = Ciprofloxacina, IMP = Imipenem.

Al comparar los patrones generales de resistencia en especial de bacterias gram-negativas aisladas tanto de la comunidad como de infecciones nosocomiales algunas diferencias importantes son de anotar. La resistencia a los aminoglicosidos es más frecuente en los aislamientos

nosocomiales que los comunitarios en especial en *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp* (Cuadro 7). La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en especial para *E. coli* y *Klebsiella spp* fue más alta para la comunidad y un hospital de tercer nivel de atención que para un hospital de segundo nivel de atención (Cuadro 7).

Cuadro 7. Patrones de resistencia en bacterias de la comunidad y de infecciones nosocomiales* 1988-1991.

BACTERIAS/ORIGEN	PORCENTAJE RESISTENTES A						
	EN	AMI	AMP	CTX	CAZ	IMP	CP
E. COLI:							
COMUNIDAD (N=468)	7	7	58	8	3	3	5
NOSOCOMIAL I (N=288)	3	6	64	3	0	0	6
NOSOCOMIAL (N=68)	23	0	80	0	11	0	0
KLEBSIELLA spp							
COMUNIDAD (N=240)	9	9	97	9	9	6	0
NOSOCOMIAL I (N=160)	41	18	100	18	9	0	0
NOSOCOMIAL II (N=88)	13	13	72	0	11	0	0
ENTEROBACTER spp							
COMUNIDAD (N=268)	19	12	50	16	16	0	0
NOSOCOMIAL I (N=96)	66	66	100	21	19	0	0
NOSOCOMIAL II (N=16)	50	0	100	25	25	0	0

* Hospital de tercer nivel de atención = Nosocomial I, Hospital de segundo nivel de atención = Nosocomial II.

GfN- Gentamicina, AMI- Amikacina, AMP= Ampicilina, CTX- Cefotaxima, CAz- Ceflazidima, IMP -Imipenem, CP = Ciprofloxacina.

Finalmente, fueron analizados dos tipos principales de enterococos responsables tanto de infecciones urinarias comunitarias como de diversas infecciones nosocomiales. El 4.8 por ciento fueron productores de betalactamasas con diferentes patrones de resistencia en los dos principales tipos *E. faecalis* y *E. faecium* (Cuadro 8).

Discusión y conclusiones

En esta primera fase de nuestro programa de vigilancia centinela de resistencia bacteriana, el análisis de la producción de betalactamasas por los microorganismos aislados fue de primera importancia. Es conocido que la inactivación de un antibiótico por una enzima (betalactamasas) es uno de los 4 mecanismos de resistencia comunes y que usualmente este mecanismo se asocia a otros. Las bacterias además de ser capaces de volverse resistentes a través de la alteración del sitio blanco (receptor), de disminuir la permeabilidad al

transporte del antibiótico o de crear un receptor nuevo, pueden ser inducidas a producir todo tipo de betalactamasas.^{12,13-30} La producción de betalactamasas en las bacterias revisadas parece ser un mecanismo extremadamente común de resistencia a los antimicrobianos. El alto porcentaje de producción de betalactamasas por las bacterias gram-negativas y la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y antibióticos monobactámicos habla de que estas enzimas son inducibles y de amplio espectro.¹⁶⁻²⁰ Este fenómeno parece existir por el momento principalmente en *E. coli*, *Klebsiella spp* tanto de la comunidad como de los aislamientos de un hospital de tercer nivel, probablemente secundario al gran consumo de los antibióticos que son capaces de inducir este proceso

Cuadro 8. Patrones de resistencia de *E. Faecalis* y *E. Faecium*.

TIPO DE ESTEROCOCCO*	% RESISTENTES A									
	P	AM	VA	STR	G/NB	G/NA	CP	AUG	T/S	IMP
E. FAECALIS (N=96)	9.5	9.5	4	32	97	9.4	31	2	28	10
E. FAECIUM (N=25)	40	40	4	28	80	4	36	24	24	40

* 4.8% Productores de betalactamasas.

P= Penicilina, AM = Ampicilina, VA= Vancomicina, STR = Estreptomicina, G/NB = Gentamicina/Niveles bajos, G/NA = Gentamicina/Niveles altos, CP = Ciprofloxacina, AUG = Amoxicilina-Ácido Clavulánico, T/S = Trimetoprim-Sulfametoxazole, IMP= Imipenem.

Previamente y sólo en unidades cerradas como en la unidad de cuidados intensivos del recién nacido, existió un problema similar en cuanto a que la presión de un antibiótico provocó un aumento dramático en la resistencia a un grupo de aminoglicosidos por la aparición de un enzima inactivador. Previo a 1979 la gentamicina junto con un betalactámico fue la primera elección para el inicio de la terapia empírica en los recién nacidos en los que se sospecha cursaban con el síndrome de bacteremia/meningitis. En ese año la resistencia a gentamicina en *Klebsiella pneumoniae*, el principal patógeno aislado de hemocultivos, llegó a ser de 78 por ciento. Pretendiendo resolver el problema inmediato y en ausencia de otros antibióticos con la cobertura adecuada se decidió suspender gentamicina como terapia inicial y sustituirla por amikacina. Durante los próximos 6 años, esta medida disminuyó la resistencia a gentamicina a los niveles actuales, pero provocó un aumento de la resistencia a la amikacina, principalmente en *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp*.

Con la introducción del uso, en el Hospital Civil de Guadalajara y la ciudad de Guadalajara en 1985, de nuevos antimicrobianos, los patrones de resistencia comunes fueron notablemente modificados. Algunas bacterias gram-negativas además de continuar desarrollando resistencia a las nuevas cefalosporinas, ya desarrollaron resistencia a

quinolonas y monobactámicos. Un fenómeno similar ocurrió en bacterias gram-positivas como *S. aureus*. Este microorganismo junto con otros estafilococos coagulasa negativos son frecuentemente responsables de síndromes infecciosos severos, tanto dentro de los hospitales como en la comunidad. Los estafilococos son frecuentemente betalactamasas positivos; enzima que puede inactivar no sólo los betalactámicos no protegidos, sino los protegidos como es el caso de aquellos asociados con un inhibidor de betalactamasas. Es relevante anotar el hecho que, durante ese periodo de observación, algunos *S. aureus* ya desarrollaron resistencia a quinolonas señalando la presencia en este patógeno de mecanismos de resistencia múltiple.²¹⁻²³

Enterobacterias gram-negativas y los estafilococos fueron y siguen siendo bacterias que debe continuarse vigilando cuidadosamente; otras bacterias sin embargo no deben olvidarse aunque por el momento el problema de resistencia en ellas no sea tan frecuente.²⁶⁻²⁹ Algunos de nuestros enterococos ya son capaces de producir betalactamasas; diferentes *Serratia spp* se han encontrado como responsables de epidemias; otras bacterias gram-negativas causan infecciones en sitios no comunes como es el caso de infección en tejidos blandos.

Parece ser que las bacterias responden agresivamente cuando las sometemos a la "presión" de los antibióticos, desarrollando resistencia; por lo que la vigilancia de los patrones de resistencia debe ser constante y adecuada, para alertarnos a los cambios y adecuar nuestra terapia antimicrobiana. Los resultados de la vigilancia de la resistencia adecuada transmitidos y discutidos serán la base de las luchas próximas para evitar el encontrarnos con una bacteria que sea verdaderamente multirresistente a todo lo disponible.

Conclusiones

1. La producción de betalactamasas por las bacterias fue un mecanismo de resistencia común en este análisis.
2. Las bacterias gram-negativas son productoras más frecuentes de betalactamasas que las gram-positivas.
3. La producción de betalactamasas durante 1989-1991 se ha mantenido estable.
4. En ciertas enterobacterias las betalactamasas parecen ser inducibles y de amplio espectro.
5. Los cambios en los patrones de resistencia en las bacterias gram-negativas están estrechamente ligados al uso de nuevos antimicrobianos.
6. Existe ya resistencia del *S. aureus* a las quinolonas y producción de betalactamasas por enterococos.
7. La vigilancia de la resistencia bacteriana así como su análisis, difusión y la aplicación de medidas lógicas serán de gran ayuda para combatir el problema de la resistencia bacteriana.

Referencias

1. O'Brien TF: Global Surveillance of Antibiotic Resistance. *Engl J Med* 1992; 326:339-340.
2. O'Brien TF: Resistance of Bacteria to Antimicrobial Agents: Report of Task Force 2. *Rev Infect Dis* 1987;9(Supplement 3): S244-S260.
3. Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. Health and Economic Impacts of Antimicrobial Resistance. *Rev Infect Dis* 1987;9:1065-1075.
4. Gaynes RP, Weinstein RA, Chamberlin W, Kabins SA. Antibiotic Resistant Flora in Nursing Home Patients Admitted to the Hospital. *Arch Intern Med* 1985;145:1804-1807.
5. Noriega ER, Leibowitz RE, Richmond AS, Rubinstein E, Schaeffer S, Simberloff MS, Rahal JJ. Nosocomial Infection caused by Gentamycin Resistant, Streptomycin Sensitive Klebsiella. *J Infect Dis* 1975;131:845.
6. Shimizu K, Kumada T, Hsiett W-C, Chung H-Y, Chong Y, Hare RS, Miller GH, Sabatelli FJ, Howard J. Comparison of Aminoglycoside Resistance Patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile and the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28:282-288.
7. Sanders CC, Sanders WE Jr. Emergence of Resistance during Therapy with the Never Beta-lactam antibiotics: Role of Inducible Beta-lactamasas and Implications for the future. *Rev Infect Dis*. 1983;5:639-648.
8. Murray BE, Rensimer ER, Dupont HL. Emergence of High-Level Trimethoprim Resistance in fecal *Escherichia coli* during oral Administration of Trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole. *N Engl J Med* 1982; 306:130-135.
9. Tullus K, Olson-Liljquist B, Lundstrom G, Burman LG. Antibiotic Susceptibility of 629 Bacterial Blood and CSF Isolates from Swedish Infants and the therapeutic implications. *Acta Paediatr Scand*. 1991;80:205-212.
10. McGowan JE Jr, Hall EC, Parrott PL. Antimicrobial Susceptibility in Gram-negative Bacteremia: are Nosocomial Isolates really more resistant *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1855-1859.
11. Jacoby GA, Archer GL. New Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *N Engl J Med*. 1991; 324: 601-612.
12. Murray BE. New Aspects of antimicrobial Resistance and the resulting Therapeutic Dilemmas. *J Infect Dis*. 1991;163:1184-1194.
13. Bush K. Recent Developments in Beta-lactamase Research and their implications for the future. *Rev Infect Dis*. 1988;10:681-690.
14. Bush K. Characterization of Beta-lactamasas. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33:259-263.
15. Jacoby GA, Medeiros AA, O'Brien T, Pinto ME, Jiang H. Board Spectrum transmissible Beta-lactamasas. *N Engl J Med*. 1988; 319:723-724.
16. Sanders EW, Sanders CC. Inducible Beta-lactamasas: Clinical and Epidemiologic Implications for use of never cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; 10:830-838.
17. Archambaud M, Gerbaud G, Labau E, Marty N, Courvalin P. Possible *in-vivo* transfer of beta-lactamase TEM-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Salmonella Kedougou*. *J Antimicrob Chemother*. 1991;27:427-436.
18. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Poupard MC, Dumas MP, Sirot J. Concomitant Disseminations of three extended-spectrum Beta-lactamasas among different Enterobacteriaceae isolated in a French Hospital *J Antimicrob Chemother*. 1991;27:441-457.
19. Jalakas-Pornull K, Dornobusch K, Kuhn I, Ransjo U, Jonsson C, Broberger U. Characterization of Beta-lactam-resistant *Klebsiella oxytoca* isolated in a neonatal intensive Care Unit. *APMIS*. 1991;99:530-536.
20. Pudłbietski A, Schonling J, Melzer B, Warnatz K, Leusch IIG. Molecular Characterization of a new Plasmid-encoded SHIV-type beta-lactamase (SHY-2 variant) conferring high level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae* *J Gen Microbiol*. 1991;137:569-578.
21. Chambers HF. Methicillin-resistant Staphylococci. *Clin Micro Rev*. 1988;1:173-186.

22. Brumfit W, Hamilton-Miller J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N Engl J Med. 1989;320:1188-1196.
23. Schaeffer S. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones J Clin Microb. 1989;27:335-336.
24. Daum TE, Schaberg DR, Terpenning MS, Sottile WS, Kanffman CA. Increasing Resistance of *Staphylococcus aureus* to Ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:1862-1863.
25. Shalit I, Berger SA, Gorea A, Frimerman H. Widespread Quinolone Resistance among Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a general Hospital. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:593-594.
26. Murray BE. The life and times of the Enterococcus. Clin Micro Rev 1990;3:46-65.
27. Spika JS, Facklam RR, Plikaytis BD, Oxtoby MJ. Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae in the United States, 1979-1987. The Pneumococcal Surveillance Working Group. J Infect Dis. 1991;163:1273-1278.
28. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, Miller GB, Witcomb MA, Isaacson M, Ward JI, Austrian R. Emergence of Multiply Resistant Pneumococci. N Engl J Med 1978;299:735-740.
29. Ward J. Antibiotic-resistant Streptococcus Pneumoniae: clinical and epidemiologic Aspects. Rev Infect Dis. 1981;3:254-266.
30. Handwerker S, Tomasz A. Alterations in Penicillin-binding proteins of clinical and laboratory isolates of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* with low Levels of Penicillin Resistance. J Infect Dis. 1986; 153:83-89.
31. Hankenbeck R, Briese T, Chalkely L, Ellerbrok H, Kalliokoski R, Latorre C, Leinone M, Martin C. Variability of Penicillin-binding proteins from Penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae* J Infect Dis. 1991;164:307-312.
32. Hankenbeck R, Briese T, Chalkely L, Ellerbrok H, Kalliokoski R, Latorre C, Leinone M, Martin C. Antigenic variation of penicillin-binding proteins from Penicillin-resistant clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*
33. Garcia-Leoni ME, Cercenado E, Rodeño P, Bernaldo de Quiros JCL, Martínez-Hernández D, Bousza E. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin: a prospective microbiological and clinical Study. Clin Infect Disc. 1992.14:427-435.
34. Muñoz R, Cofey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J, Hakenbeck R, Jacobs M, Musser JM, Spratt BG, et al Intercontinental Spread of a Multiresistant Clone of Serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1991;164:302-306.
35. Seppala H, Nissinen A, Jarvinen H, Huovinen S, Henriksson T, Herva E, Holm SE, Jahkola M, Katila ML, Klaukka T, Kontiainen S, Passi-Metsoma L, Huovinen P. Resistance to erythromycin in group A Streptococci. N Engl J Med. 1993;326:292-297.
36. Saenz Nieto JA, Lujan R, Berron S, Campos J, Viñas M, Fuste C, Vazquez JA, Zhang Q-Y, Bowler LD, Martinez-Suarez JV, Spratt BG. Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant Neisseria Meningitidis in Spain: a 5-year History (1985-1989). Clin Infect Dis. 1992;14:394-402.
37. Gross RJ, Rowe B, Cheasty T, Thomas LY. Increase in Drug Resistance among *Shigella Dysenteriae*, *Shigella Flexneri* and *Shigella Boydii*. Brit Med J. 191;283:575-576.
38. Masecar BL, Robillard NJ. Spontaneous quinolone resistance in *Serratia marcescens* due to a mutation in gyrA. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:898-902.