

Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa

Elisenda Miró^a, Clara Vergés^a, Isabel García^b, Beatriz Mirelis^a, Ferrán Navarro^a, Pere Coll^a, Guillermo Prats^{a,d} y Luis Martínez-Martínez^{b,c,e}

^aServicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. ^bDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Sevilla. ^cHospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. ^dDirección actual: Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. ^eDirección actual: Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

ANTECEDENTES. Se ha estudiado la implicación de distintos mecanismos de resistencia a quinolonas y betalactámicos en cepas de *Salmonella enterica* resistentes a ambos grupos de antimicrobianos aisladas secuencialmente de pacientes tratados con fluoroquinolonas durante un largo período.

MÉTODOS. La clonalidad de las distintas cepas se determinó mediante serotipado y macrorrestricción genómica en campo pulsante. En el estudio de la sensibilidad se calcularon los valores de la CIM a betalactámicos, quinolonas, cloranfenicol y tetraciclina. Para la caracterización de los mecanismos de resistencia implicados se descartó la presencia de betalactamasas mediante técnica colorimétrica; se secuenciaron las regiones determinantes de resistencia a quinolonas de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, realizándose estudios de complementación para evaluar la importancia de las mutaciones encontradas; se obtuvo el perfil de proteínas de la membrana externa, se determinó el efecto de fenil-arginil-naftilamida (FAN, 20 mg/l) en la CIM de varias quinolonas y se midió la acumulación de norfloxacin en presencia y en ausencia de un inhibidor metabólico.

RESULTADOS. Se han detectado mutaciones en *gyrA* (Asp₈₇ → Gly; Ser₈₃ → Phe; Asp₈₇ → Lys), *gyrB* (Ser₄₆₃ → Phe) y *parC* (Glu₈₄ → Gly); alteraciones en la expresión de las porinas (disminución de la porina equivalente a OmpF en *Escherichia coli*) y tanto en una cepa clínica como en un mutante obtenido *in vitro*, se observó la expresión de un mecanismo de expulsión activa de norfloxacin. En presencia de FAN las CIM de ácido nalidíxico disminuyeron (salvo en una cepa) de 4 a 32 veces, las de pefloxacin disminuyeron 4-16 veces en 5 de 9 cepas evaluadas, y las de norfloxacin y ciprofloxacino no variaron o lo hicieron en una sola dilución.

CONCLUSIÓN. La resistencia a quinolonas se expresa por la combinación de mutaciones en los genes que codifican las topoisomerasas, alteraciones de la permeabilidad y una expulsión activa. Estos dos últimos mecanismos también contribuirían a la disminución de la sensibilidad a betalactámicos.

Palabras clave: *Salmonella*. Quinolonas. Topoisomerasas. Porinas. Bombas de expulsión activa. Inhibidores de expulsión.

Resistance to quinolones and beta-lactams in *Salmonella enterica* due to mutations in topoisomerase-encoding genes, altered cell permeability and expression of an active efflux system

BACKGROUND. The mechanisms of resistance to fluoroquinolones and beta-lactams were studied in isolates of *Salmonella enterica* resistant to both antimicrobial groups, isolated over time from two patients treated with fluoroquinolones.

METHODS. The clonal relationships among the various strains was established by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. MICs for beta-lactams, quinolones, chloramphenicol and tetracycline were determined. Presence of beta-lactamases was ruled out by a colorimetric assay. Quinolone resistance-determining regions of the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes were sequenced, and the relevance of the mutations in these regions was evaluated by complementation assays. Outer membrane protein profiles, the effect of phenyl-arginyl-naphtylamide (PAN, 20 mg/l) on the MICs of several quinolones, and norfloxacin accumulation in the absence and in the presence of a metabolic inhibitor were also determined.

RESULTS. The following mutations were found: *gyrA* (Asp₈₇ → Gly; Ser₈₃ → Phe; Asp₈₇ → Lys), *gyrB* (Ser₄₆₃ → Phe) and *parC* (Glu₈₄ → Gly). Altered outer membrane protein profiles, including decreased expression of a porin equivalent to OmpF from *Escherichia coli* was observed. Active efflux of norfloxacin was proved in both a clinical

Correspondencia: Dra. E. Miró.
Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M.^a Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: emiro@hsp.santpau.es

Manuscrito recibido el 15-5-2003, aceptado el 5-9-2003.

isolate and a mutant obtained *in vitro*. In the presence of PAN, nalidixic acid MICs decreased 4-32 times (except in one strain), pefloxacin MICs decreased 4-16 times for 5 out of 9 evaluated strains, and MICs of both norfloxacin and ciprofloxacin did not change or changed within a single dilution step.

CONCLUSIONS. Quinolone-resistance is the consequence of a combination of mutations in topoisomerase-encoding genes, altered permeability and active efflux. Altered permeability and active efflux would also contribute to decreased susceptibility to beta-lactams.

Key words: *Salmonella*. Quinolones. Topoisomerases. Porins. Efflux pumps. Efflux inhibitors.

Introducción

El tratamiento de las infecciones sistémicas por *Salmonella*, así como la erradicación del estado de portador, no es fácil cuando la cepa es multirresistente. Las fluoroquinolonas y los nuevos betalactámicos constituyen una importante alternativa terapéutica frente a este microorganismo, tanto por su actividad bactericida como por sus excelentes propiedades farmacocinéticas¹⁻³.

El principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas en las bacterias gramnegativas se debe a mutaciones en los genes de la ADN-girasa (*gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*)⁴. Otros mecanismos involucrados en la resistencia a estos antimicrobianos incluyen las alteraciones en la expresión de las porinas o del lipopolisacárido, que disminuyen la penetración del antimicrobiano al interior de la bacteria, la expresión de bombas de achique, que expulsan el antimicrobiano hacia el exterior⁵⁻⁷, y la presencia de la proteína Qnr, de origen plasmídico, que protege a la topoisomerasa de la acción de las quinolonas^{8,9}. En el caso concreto de *Salmonella* se han descrito mutaciones en los genes que codifican la ADN-girasa^{1-3,10-13}, y muy recientemente en *parC*¹⁴⁻¹⁶ y se ha comprobado la importancia de la hiperexpresión de bombas de expulsión activa^{3,17-19}. Aunque también se han detectado alteraciones en las proteínas de la membrana externa, aún no se ha podido demostrar en *Salmonella* la correlación directa entre la ausencia de ciertas porinas y la resistencia a fluoroquinolonas³.

La resistencia a los betalactámicos en bacterias gramnegativas se debe, principalmente, a la expresión de betalactamasas^{4,20}, contribuyendo también las alteraciones de la permeabilidad²¹, la presencia de bombas de achique⁶ y las alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilina (*penicillin binding proteins*, PBP)²². En *Salmonella enterica* la resistencia a ampicilina se debe principalmente a la producción de las betalactamasas TEM-1, TEM-2, PSE-1, OXA-1 o SHV-1, habiéndose descrito una baja incidencia de betalactamasas de espectro extendido o de cefamicinasas plasmídicas²³⁻²⁵.

Si bien se han descrito cepas de *Salmonella* resistentes a betalactámicos^{19,23,24} o a quinolonas^{1,3,13,26-28}, hasta el momento, las cepas de *Salmonella* con resistencia simultánea a ambas clases de antimicrobianos son infrecuentes, siendo también poco habitual el desarrollo de estas resistencias durante el tratamiento^{17,28-30}.

Por otro lado, se han documentado fracasos terapéuticos tras tratamiento con fluoroquinolonas en caso de infección por cepas de *Salmonella* resistentes al ácido nalidíxico y con bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas³¹.

El objetivo de este estudio ha sido determinar los mecanismos implicados en la resistencia a las fluoroquinolonas y a los betalactámicos en cepas de *S. enterica* aisladas de 2 pacientes tratados con fluoroquinolonas.

Métodos

Paciente A

Varón de 44 años, seropositivo para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que tras una enteritis por *S. enterica* en Agosto de 1993 (cepa no disponible), tratada con amoxicilina, quedó como portador crónico, iniciándose por ello un tratamiento continuo con norfloxacin (500 mg/12 h) durante 3 años. Desde enero de 1994 hasta abril de 1996, el paciente presentó varios episodios de gastroenteritis, en cada uno de los cuales se aisló de las heces una cepa de *S. enterica* (cepas A1 a A10). De la última cepa aislada (A10) se seleccionó una mutante con alto nivel de resistencia a ciprofloxacino (A10M), mediante el método de gradiente de Szybalski³².

Paciente B

Varón de 68 años diagnosticado de colitis ulcerosa desde hace 30 años, con antecedentes patológicos de colecistectomía por colecistitis en 1985. En 1988, fue diagnosticado de colangitis esclerosante en fase inicial, realizándosele profilaxis con norfloxacin (500 mg/48 h). En agosto de 1998 fue ingresado en otro hospital por gastroenteritis por *S. enterica* (cepa no disponible), que fue tratada con ciprofloxacino (500 mg/12 h) durante una semana. En septiembre del mismo año ingresó por un cuadro séptico de probable foco biliar, aislándose *S. enterica* del hemocultivo (cepa no disponible) y de las heces (cepa B1). Se inició tratamiento con ciprofloxacino intravenoso (400 mg/8 h), por lo que presentó una buena evolución clínica. Al alta se continuó con norfloxacin como descontaminación intestinal selectiva (400 mg/48 h) para la prevención de recurrencias de los episodios de colangitis. Entre octubre y diciembre de 1998 reingresó en diversas ocasiones por síndrome febril de probable foco biliar. Durante todo este período se le administró profilácticamente, de forma continua, ciprofloxacino (500 mg/24 h). En diciembre de 1998 acudió al hospital por diarrea y fiebre y se aisló en distintos coprocultivos seriados *S. enterica* (cepas B2 y B3), detectándose, asimismo, toxina de *Clostridium difficile*. Este episodio se trató con amoxicilina-ácido clavulánico y metronidazol, continuándose la profilaxis con ciprofloxacino.

Serotipificación

La determinación de la serotipificación de las cepas se realizó en el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (Majadahonda, Madrid, España).

Electroforesis en campo pulsante

La extracción de ADN se realizó según Rasheed et al³³, utilizando como enzima de restricción *XbaI* (Roche, Mannheim, Alemania). Las condiciones empleadas fueron de 21 h a 250V de 5 a 50 s, a 14 °C en un gel de agarosa al 1% en TBE al 0,5x (Trizma 0,1M, ácido bórico 0,1M y EDTA 0,2 mM) (Sigma, Madrid, España).

Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio inicial de la sensibilidad se realizó por la técnica de disco-difusión siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{34,35}. La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó mediante la técnica del Etest (Biodisk, Solna, Suecia), siguiendo las recomendaciones del

fabricante. Se evaluaron los siguientes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ciprofloxacino, clinafloxacino, levofloxacino, norfloxacino, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cefuroxima y tetraciclina. La CIM a cloranfenicol se determinó por la técnica de microdilución (Sensititre, Trek Diagnostic System, West Sussex, Inglaterra)³⁵.

En otra serie de experimentos se evaluó la actividad del inhibidor de bombas de expulsión activa fenil-arginil-naftilamida (Sigma, Madrid, España). Para ello se determinó mediante microdilución (siguiendo las normas del NCCLS³⁵) la CIM de ácido nalidíxico (Sigma), pefloxacino (Rhône-Poulenc, St. Antoine, Francia), ciprofloxacino (Sigma) y norfloxacino (Sigma) frente a 6 cepas del paciente A (A1, A3, A4, A6, A10 y A10M) y frente a las 3 cepas del paciente B, en ausencia y en presencia (20 mg/l) de dicho compuesto.

Detección de betalactamasas

Para la obtención del extracto de betalactamasas se siguió un protocolo previamente descrito³⁶. La presencia de betalactamasas se detectó por colorimetría, mezclando 100 µl del extracto crudo de betalactamasas con 50 µl de una solución de 1 mg/ml de nitrocefina (Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

Secuenciación de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*

Para la amplificación de las regiones que determinan resistencia a quinolonas (*quinolone-resistance determining region*, QRDR) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* se utilizaron los iniciadores y las condiciones descritas por Giraud et al². La secuenciación de los productos amplificados se realizó utilizando iniciadores marcados con una sonda fluorescente (Cy5 dideoxi) y el secuenciador ALF Express (Automatic Laser Fluorescent DNA Sequencer, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Las secuencias nucleotídicas obtenidas y las aminoácidas deducidas se analizaron mediante el software disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Estudios de complementación

Los plásmidos pBP507 (vector), pBP517 (*gyrA*+) y pBP548 (*gyrB*+) se introdujeron mediante transformación en las cepas de *S. enterica* B2 y B3. Estos plásmidos son portadores de los genes *gyrA* y *gyrB* salvajes, por lo que permiten restablecer la sensibilidad a las quinolonas en los correspondientes transformantes si la resistencia es consecuencia en la cepa original de mutaciones en *gyrA* o *gyrB*, respectivamente^{1,37}.

Perfil de proteínas de la membrana externa (OMP)

Las OMP se obtuvieron a partir de un cultivo en fase exponencial de 40 ml de Mueller Hinton, empleando un método descrito previamente³⁸. Las bacterias se separaron mediante centrifugación (5.000 × g, 4 °C, 15 min) y posteriormente se sonicaron. Las envolturas celulares se recuperaron mediante centrifugación (13.000 × g, 4 °C, 45 min) y se trataron con laurilsarcosinato (Sigma, Madrid, España). Finalmente y mediante una centrifugación adicional (13.000 × g, 4 °C, 45 min), se obtuvieron las OMP. Los perfiles de OMP se determinaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y tinción con azul Coomassie. Como control se utilizó la cepa de *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* NCTC 5188.

Determinación de la acumulación de norfloxacino

La acumulación basal de norfloxacino se realizó siguiendo la metodología descrita previamente³⁹. Las bacterias se separaron por centrifugación y se resuspendieron en tampón fosfato-salino a una densidad óptica (a 520 nm) de 1,5. La suspensión bacteriana se incubó con norfloxacino (10 mg/l) a 37 °C durante 30 min. Las bacterias se separaron del líquido extracelular mediante centrifugación diferencial a través de una capa de aceite de silicona (densidad, 1,029 g/cm³) y se lisaron en tampón 0,1 M de glicina-HCl (pH 3,0). Las muestras se centrifugaron a 12.800 × g durante 5 min y la cantidad de norfloxacino se determinó por espectrofluorometría (Hitachi 2000, Tokio, Japón). En otra serie de experimentos en paralelo, se evaluó el efecto del carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP, 0,1 mM, Sigma, Madrid, España) sobre la acumulación de norfloxacino. Para ello, tras la preincubación de las bacterias con norfloxacino durante 10 min (10 mg/l) se añadió el inhibidor metabólico y se realizó una incubación adicional de 20 min. Los experimentos se realizaron tres veces, en días diferentes. Cada día, las determinaciones se realizaron por duplicado.

Resultados

Todas las cepas aisladas en el paciente A pertenecían a la subespecie I de *S. enterica*, pero eran rugosas e inmóviles, por lo que no pudo determinarse su serotipo, mientras que las cepas aisladas en el paciente B pertenecían al serotipo Enteritidis. Mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante se obtuvieron patrones de restricción idénticos entre las cepas de un mismo paciente, e idéntico patrón entre las cepas de ambos pacientes. Clínicamente no parece que haya relación alguna entre ambos pacientes.

TABLA 1. CIM (mg/l) de fluoroquinolonas y betalactámicos de las cepas de *S. enterica* aisladas de ambos pacientes

Cepas	Quinolonas					Betalactámicos					CM	TC
	NAL	CIP	NOR	LEV	CLX	AMP	FOX	CXM	CTX	CAZ		
Paciente A												
A1	3	0,008	0,064	0,064	0,012	0,75	1	1,5	0,094	0,38	≤ 8	3
A2	0,5	0,006	0,064	0,023	0,012	0,5*	1,5*	1	0,016	0,032	≤ 8	2
A3	24*	0,006	0,12	0,25	0,012	0,047	0,19	0,38	0,016	0,19	≤ 8	0,5
A4	> 256	0,094	0,75	0,032	0,047	0,75	1	64	0,25	0,25	≤ 8	2
A5	> 256	0,19	1,5	0,38	0,094	1,5	1,5	128	0,25	0,5	16	3
A6	> 256	0,5	3	2	0,5	2	4	> 256	0,38	1	16	8
A7	> 256	0,75	4	2	0,25	1	2*	48	0,12	0,25	16	8
A8	> 256	1	4	2	0,25	0,75	0,75	48*	0,12	0,25	≤ 8	3
A9	> 256	2	8	6	0,75	4	6	> 256	0,38	1	16	4
A10	> 256	0,5	2	1,5	0,25	2	16*	> 256	0,5	0,75	16	4
A10M	> 256	> 32	> 32	> 32	2	2	8	> 256	0,5	1	≤ 8	2
Paciente B												
B1	> 256	0,19	0,5	0,25	0,047	1	1,5	4	0,064	0,25	ND	3
B2	> 256	2	12	8	0,38	12	24	48	0,75	1,5	ND	6
B3	> 256	12	32	32	0,75	16	> 256	256	2	3	ND	6

*Se observan colonias dentro del halo de inhibición.

CIM: concentración inhibitoria mínima; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; NOR: norfloxacino; LEV: levofloxacino; CLX: clinafloxacino; AMP: ampicilina; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CM: cloranfenicol; TC: tetraciclina; ND: no determinado.

TABLA 2. Papel de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas detectadas en las cepas de *S. enterica* estudiadas

Cepas	Fecha de aislado	CIM (mg/l)				Mutaciones en genes de ADN-girasa topoisomerasa			OMP			Acumulación de norfloxacin	
		NAL	CIP	FOX	CXM	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	A	F	C	Basal (sin CCCP)	Con CCCP
A1	Enero-1994	3	0,008	1	1,5	Normal	Normal	Normal	+	+	+	382 ± 10	327 ± 10
A2	Junio-1994	0,5	0,006	1,5*	1	Normal	Normal	Normal	+	+	+	556 ± 8	571 ± 10
A3	Febrero-1995	24*	0,006	0,19	0,38	Asp ₈₇ → Gly	Normal	Normal	+	±	+	464 ± 69	444 ± 53
A4	Febrero-1995	> 256	0,094	1	64	Asp ₈₇ → Gly	Normal	Normal	+	±	+	417 ± 76	478 ± 78
A5	Marzo-1995	> 256	0,19	1,5	128	Asp ₈₇ → Gly	Normal	Normal	+	±	+	447 ± 58	494 ± 32
A6	Mayo-1995	> 256	0,5	4	> 256	Asp ₈₇ → Gly Ser ₈₃ → Phe	Normal	Normal	+	-	+	390 ± 36	374 ± 16
A7	Diciembre-1995	> 256	0,75	2*	48	Asp ₈₇ → Gly Ser ₈₃ → Phe	Normal	Normal	+	±	+	485 ± 62	526 ± 77
A8	Diciembre-1995	> 256	1	0,75	48*	Asp ₈₇ → Gly Ser ₈₃ → Phe	Normal	Glu ₈₄ → Gly	±	+	+	352 ± 37	339 ± 37
A9	Febrero-1996	> 256	2	6	> 256	Asp ₈₇ → Gly Ser ₈₃ → Phe	Normal	Normal	+	±	+	396 ± 15	392 ± 13
A10	Abril-1996	> 256	0,5	16*	> 256	Asp ₈₇ → Gly Ser ₈₃ → Phe	Normal	Glu ₈₄ → Gly	+	-	+	381 ± 29	412 ± 30
A10M		> 256	> 32	8	> 256	Asp ₈₇ → Gly Ser ₈₃ → Phe	Normal	Glu ₈₄ → Gly	+	-	+	242 ± 33	409 ± 40
B1	Septiembre-1998	> 256	0,19	1,5	4	Asp ₈₇ → Lys	Normal	Normal	+	+	+	415 ± 24	393 ± 27
B2	Diciembre-1998	> 256	2	24	48	Asp ₈₇ → Lys	Ser ₄₆₃ → Phe	Normal	+	+	+	328 ± 55	363 ± 62
B3	Diciembre-1998	> 256	12	> 256	256	Asp ₈₇ → Lys	Ser ₄₆₃ → Phe	Normal	+	-	+	262 ± 36	382 ± 29

*Se observan colonias dentro del halo de inhibición.

NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CCCP: carbonilcianide m-clorofenilhidrazona.

+: presencia de OMP; ±, débil presencia de OMP; -, ausencia de OMP.

Los resultados del estudio de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos evaluados se recogen en la tabla 1. Con las cepas del paciente A (A1-A10) pueden establecerse cuatro grupos: el primer grupo lo constituirían las cepas A1 y A2, aisladas en 1994, sensibles a todos los antimicrobianos. El segundo lo constituye la cepa A3, aislada en febrero de 1995, que con respecto a las cepas precedentes presenta resistencia moderada al ácido nalidíxico, discreta disminución de la sensibilidad al norfloxacin y levofloxacin (pero sin variación en la sensibilidad a ciprofloxacino y clinafloxacino) y leve aumento de la sensibilidad a betalactámicos. En el tercer grupo estarían las cepas A4 y A5, aisladas a comienzos de 1995, resistentes al ácido nalidíxico y con valores de CIM de fluoroquinolonas más elevados, mostrándose además resistentes a cefuroxima y presentando un moderado incremento de la CIM de cefotaxima y ceftazidima. Por último, el cuarto grupo incluye las cepas A6 a A10, aisladas a finales del mismo año y principio de 1996, donde es más evidente el incremento de la resistencia a fluoroquinolonas. En este último grupo también se observaron variaciones en la actividad de cefuroxima y de otros betalactámicos.

Todas las cepas del paciente B (B1-B3) presentaron resistencia al ácido nalidíxico, observándose en las cepas B2 y B3 un incremento de la CIM, tanto a fluoroquinolonas como a betalactámicos.

Para evaluar los posibles mecanismos implicados en la resistencia a betalactámicos y a fluoroquinolonas se realizó la siguiente aproximación:

1. Descartar la presencia de una betalactamasa, que explicaría la resistencia a los betalactámicos.

TABLA 3. Efecto de la fenil-arginil-naftilamida (FAN, 20 mg/l) en la CIM de 4 quinolonas frente a cepas de *Salmonella*

Cepa	Número de veces que disminuye la CIM en presencia de FAN			
	NAL	PLF	CIP	NOR
A1	2	-2*	2	-2
A3	4	2	0	2
A4	4	2	0	0
A6	16	4	0	0
A10	32	2	0	0
A10M	> 4	4	0	-2
B1	16	4	2	0
B2	32	16	2	2
B3	> 16	16	2	2

Datos expresados como número de veces que disminuye la concentración inhibitoria mínima (CIM) en presencia de FAN con respecto a la CIM en ausencia del inhibidor.

*Un valor negativo indica que en presencia de FAN se produce un aumento de la CIM, en vez de una disminución.

NAL: ácido nalidíxico; PLF: pefloxacin; CIP: ciprofloxacino; NOR: norfloxacin.

2. Buscar mutaciones en las regiones QRDR de los genes de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV, que explicarían la resistencia a fluoroquinolonas.

3. Estudiar la existencia de alteraciones en las proteínas de la membrana externa y/o en la expresión de un mecanismo de expulsión activa, que se relacionaría con resistencia a ambas familias de antimicrobianos. Los resultados de estos estudios se detallan en las tablas 2 y 3.

Ninguna de las cepas de los 2 pacientes evaluados presentó actividad betalactamasa.

Las cepas A3, A4 y A5 mostraron una mutación en el *gyrA* (Asp₈₇ → Gly). En las cepas A6, A7 y A9, pudo observarse además una segunda mutación en *gyrA* (Ser₈₃ → Phe). Por último, las cepas A8 y A10 (y A10M) presentaron una tercera mutación en el gen *parC* (Glu₈₄ → Gly).

Todas las cepas presentaron dos o tres proteínas de membrana externa (fig. 1). En función de las movilidades electroforéticas, y por analogía con lo descrito en *Salmonella* y en otras enterobacterias, todas las cepas presentaron una banda que se corresponde con OmpA (la proteína de menor peso molecular) y una o dos porinas. La expresión de OmpA estaba reducida en la cepa A8. Las cepas A1, A2 y A8 presentaron dos porinas; en las cepas A3, A4, A5, A7 y A9 se observó una disminución de la expresión de la porina de menor peso molecular (correspondiente a OmpF) y en las cepas A6, A10 y A10M se produjo la pérdida completa de esta misma porina (fig. 1).

Por lo que se refiere a la acumulación de norfloxacin en las distintas cepas de este paciente, puede observarse cierta variabilidad en los valores basales, que oscilaron entre 328 ± 10 y 556 ± 8 ng/mg de peso bacteriano seco, correspondiendo el mayor valor de acumulación a la cepa A2 (tabla 2). Sólo en la cepa A10M pudo observarse un aumento significativo de la acumulación de norfloxacin en presencia de CCCP con respecto al valor basal. Los resultados de este experimento sugieren que en esta cepa existe un mecanismo de expulsión activa. En presencia de FAN, las CIM de norfloxacin no variaron (tres de las seis cepas evaluadas) o incluso aumentaron al doble (dos de las seis cepas). De forma análoga, las CIM de ciprofloxacino no variaron (cinco de las seis cepas) o sólo disminuyó dos veces

(la cepa restante). Por el contrario, la FAN consiguió un descenso significativo (al menos cuatro veces) las CIM de ácido nalidíxico (cinco de las seis cepas) y las CIM de pefloxacin (dos de las seis cepas) (tabla 3).

Todas las cepas del paciente B presentaron una mutación en *gyrA* (Asp₈₇ → Lys), observándose, además, en B2 y B3 una segunda mutación en *gyrB* (Ser₄₆₃ → Phe). Sólo se observó la pérdida de OmpF y un aumento significativo en la acumulación de norfloxacin en presencia de CCCP respecto al valor basal en la cepa B3 (fig. 1) (tabla 2). La FAN disminuyó las CIM de ácido nalidíxico (16 a 32 veces) y de pefloxacin (4 a 16 veces), pero en presencia de este inhibidor las CIM de norfloxacin o ciprofloxacino no variaron o disminuyeron sólo a la mitad (tabla 3).

Los estudios de complementación demostraron que la introducción del plásmido pBP517 (con *gyrA* salvaje) en las cepas B2 y B3 disminuía la CIM de ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacin y levofloxacin (tabla 4). De igual forma, la transformación de las cepas B2 y B3 con el plásmido pBP548 (que codifica *gyrB* salvaje) redujo ligeramente la CIM de norfloxacin y de levofloxacin en la cepa B2, y la CIM de ciprofloxacino y levofloxacin en B3. La CIM de las tres fluoroquinolonas ensayadas fueron de dos a tres veces mayores frente a los transformantes de la cepa B3 que frente a los transformantes de la cepa B2. La expresión de *GyrA* o *GyrB* salvajes a partir de los correspondientes plásmidos no afectó significativamente (como sería de esperar) la CIM de los betalactámicos estudiados.

En ninguna de las cepas estudiadas de ambos pacientes se encontraron mutaciones en el gen *parE*.

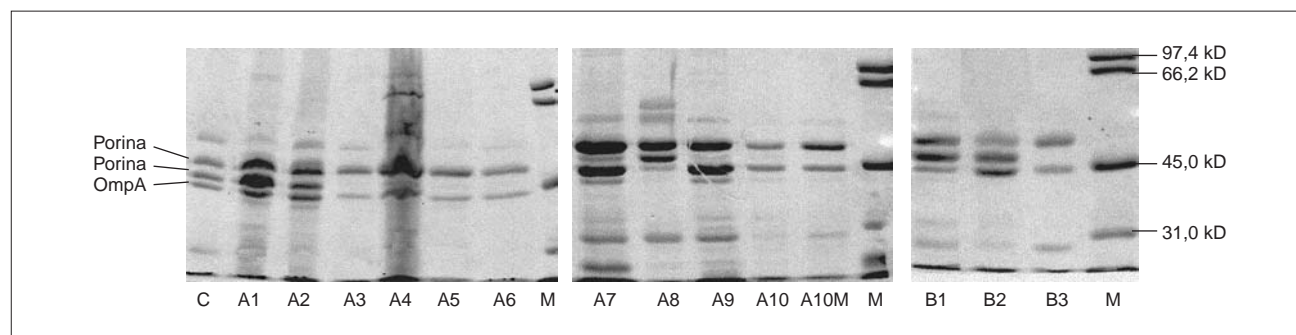


Figura 1. SDS-PAGE de las proteínas de la membrana externa de las distintas cepas de *S. enterica* aisladas de los pacientes A y B.

TABLA 4. Estudios de complementación con los plásmidos pBP507 (vector), pBP517 (*gyrA* +) y pBP548 (*gyrB* +)

	CIM (mg/l)								
	NAL	CIP	NOR	LEV	AMP	FOX	CXM	CTX	CAZ
B2	> 256	2	12	8	12	24	48	0,75	1,5
B2 + pBP507	> 256	2	8	3	8	12	32	0,5	1,5
B2 + pBP517	24	0,25	3	0,5	6	12	24	0,5	1
B2 + pBP548	> 256	2	4	1	4	8	32	0,5	1,5
B3	> 256	12	32	32	16	> 256	256	2	3
B3 + pBP507	> 256	8	24	12	16	96	256	3	3
B3 + pBP517	24	0,75	8	1	16	256	128	1,5	3
B3 + pBP548	> 256	1	12	2	8	96	128	2	4

NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; NOR: norfloxacin; LEV: levofloxacin; CLX: clinafloxacino; AMP: ampicilina; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

Discusión

Las infecciones por *Salmonella* continúan siendo un importante problema sanitario en nuestro país^{25,40,41}. Es importante, por tanto, profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en las especies de este género y en el impacto terapéutico de los mismos.

En los dos pacientes incluidos en este estudio, que fueron tratados durante un largo período de tiempo con fluoroquinolonas, se obtuvieron cepas de salmonela con resistencia creciente a quinolonas y a betalactámicos. Las características fenotípicas, junto con las genotípicas (mutaciones detectadas), apoyan la relación clonal de las cepas aisladas en ambos pacientes.

Estudios previos han puesto de manifiesto que las alteraciones en las topoisomerasas no son suficientes para explicar la resistencia a quinolonas en *S. enterica*¹³. En consonancia con esta observación, nuestros resultados ponen de manifiesto que los mecanismos de resistencia involucrados en las cepas evaluadas son múltiples e incluyen mutaciones en las topoisomerasas (genes *gyrA* y quizá *parC*, en el paciente A; y *gyrA* y *gyrB* en el paciente B), alteraciones en la permeabilidad celular (principalmente debido a la disminución de la expresión de la porina OmpF, en ambos pacientes) y expresión de un mecanismo de eliminación activa.

Las mutaciones Asp₈₇ → Gly y Ser₈₃ → Phe en *gyrA* son las descritas con mayor frecuencia en *S. enterica*¹¹. La mutación Asp₈₇ → Gly parece conferir resistencia sólo al ácido nalidíxico. En *Escherichia coli*, la resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas requiere una segunda mutación en el mismo gen y/o una mutación en *parC*³⁷. En nuestro caso, en las cepas con dos mutaciones en *gyrA* el incremento de la CIM a ciprofloxacino oscila entre 2 y 4 veces respecto a la cepa A5, o de 8 a 12 veces respecto a la cepa A3, ambas con una sola mutación en *gyrA*. No parece que la mutación Glu₈₄ → Gly en *parC* observada en las cepas clínicas A8 y A10 tenga por sí misma un papel destacado en el nivel de resistencia, pues en ambas cepas no se observa ningún incremento de la resistencia con respecto a las cepas A7 o A9 (que carecen de ella).

En el paciente B, además de la mutación Asp₈₇ → Lys en *gyrA*, se observa una segunda mutación en el gen *gyrB* de Ser₄₆₃ → Phe. En este mismo codón, Gensberg et al¹⁰ describieron en *S. typhimurium* un cambio aminoacídico de Ser → Tyr. Mediante la prueba de complementación se ha demostrado la importancia de la mutación en *gyrA* en la resistencia de las cepas del paciente B tanto a ácido nalidíxico como a fluoroquinolonas. Con esta misma aproximación se ha observado que la mutación en *gyrB* también está relacionada con la resistencia a quinolonas. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Heisig¹, quien comprobó que la resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas en *Salmonella* puede deberse a la presencia de las mutaciones tanto en *gyrA* como en *gyrB*.

Los resultados sobre el efecto de la expresión de porinas en el nivel de resistencia no son concluyentes. Si se compara la actividad de los antimicrobianos frente a dos pares de cepas que difieren en el nivel de expresión de OmpF (A6 y A7, por un lado y A9 y A10 por otro) puede observarse que las cepas deficientes en dicha porina son algo más resistentes a betalactámicos, pero no a quinolonas. En

cualquier caso, la disminución de la expresión o la pérdida de OmpF no explica completamente el aumento de resistencia a cefuroxima, cefoxitina y cefotaxima que se observa en algunas cepas aisladas. Teniendo en cuenta que las cepas carecen de betalactamasa, es de suponer que éstas deben expresar mecanismos adicionales de resistencia a los betalactámicos (¿alteraciones de PBP?). En *Klebsiella pneumoniae*^{38,42} y en *E. coli* (datos no publicados) la pérdida de sólo una de las porinas principales tiene escasa relevancia clínica en la resistencia a betalactámicos y quinolonas, presumiblemente porque la expresión de la otra porina permite la entrada de suficiente antimicrobiano como para inhibir al microorganismo. Serían necesarios nuevos estudios, en los que por técnicas genéticas se reexpresen la porina perdida, para conocer el impacto real de este mecanismo en la resistencia, y para evaluar la relevancia de estos canales en la penetración de diferentes familias de antimicrobianos.

El hecho de que en las cepas A10M (mutante obtenida *in vitro*) y B3 (seleccionada *in vivo*) haya un aumento en la acumulación de norfloxacino por inactivación de la bomba mediante CCCP sugiere que ambas presentan un incremento en la actividad del sistema de bombeo activo. Es interesante resaltar que aunque la expresión de un sistema de expulsión se relaciona con un incremento de la resistencia a quinolonas, no afecta a otras familias de antimicrobianos, como betalactámicos, tetraciclina o cloranfenicol. La observación de que los transformantes de la cepa B2 son más sensibles que los de la cepa B3 (tanto cuando se expresa *gyrA* salvaje como cuando se expresa *gyrB* salvaje) sugiere que la pérdida de una porina y la expresión de un mecanismo de expulsión activa en esta última causan una disminución de la acumulación de quinolonas y, por ello, una menor actividad de estos agentes. En *E. coli*^{6,17} y en *S. typhimurium*⁴³ el sistema de expulsión activa más importante es AcrAB, sometido a múltiples mecanismos de regulación. Los operones *marRAB* y *soxRS*, que regulan *acrAB*, intervienen también en el control de la expresión de la porina OmpF. Se han descrito varias mutaciones en estos sistemas de regulación que causan incremento en la expresión de AcrAB y disminución en la de OmpF⁴³. Esta situación es similar a la que se ha observado en este estudio en la cepa B3 del paciente B (fig. 1). El bajo impacto que tiene en la CIM la expresión de este doble mecanismo, ya ha sido descrito por Piddock et al²⁷. La existencia de otras porinas, por donde los antimicrobianos pueden seguir penetrando en ausencia de OmpF explicaría esta situación, como recientemente se ha comprobado en cepas de *K. pneumoniae*⁴⁴.

La disminución, en presencia de FAN, de las CIM de ácido nalidíxico frente a 5 de las 6 cepas del paciente A y frente a las 3 cepas del paciente B también indica que dichas cepas expresan un mecanismo de expulsión activa. Se ha apreciado un efecto similar, pero menos marcado, en relación con pefloxacino, pero las CIM de ciprofloxacino y de norfloxacino no variaron, o lo hicieron mínimamente. El hecho de que las disminuciones inducidas por FAN sean más marcadas para ácido nalidíxico y pefloxacino (dos de las quinolonas más hidrófobas) que para ciprofloxacino y norfloxacino es compatible con la teoría actualmente aceptada de que las bombas de expulsión reconocen de forma poco específica sustratos preferentemente hidrófobos. Existen pocos datos sobre el modo de interacción de CCCP y

FAN con las bombas de expulsión activa, y tampoco se sabe a ciencia cierta si ambos inhibidores actúan sobre el mismo (o los mismos) sistema(s) de expulsión. Es posible que las diferencias en los efectos observados con FAN y con CCCP se deban a la distinta capacidad de ambos compuestos para inhibir distintos sistemas de expulsión activa que, a su vez, pueden estar implicados de diferente forma en la eliminación de algunas quinolonas y no de otras. También podría ocurrir que la disminución de la acumulación de norfloxacin en presencia de CCCP sólo se traduzca en un pequeño incremento de la CIM en cepas que tienen alteraciones en las dianas de las quinolonas (como se ha comprobado previamente en cepas de *K. pneumoniae*⁴²), lo que a su vez explicaría el mínimo descenso de la CIM de norfloxacin en presencia de FAN. Los resultados de este estudio son similares a otros obtenidos en nuestro laboratorio con cepas de *K. pneumoniae* en las que se han caracterizado los mecanismos de resistencia a quinolonas (datos no publicados). Todo ello indica que son necesarios muchos más estudios para comprender los mecanismos de expulsión activa en enterobacterias y la verdadera significación de las distintas aproximaciones metodológicas empleadas para poner de manifiesto este tipo de mecanismo de resistencia.

Los valores basales de acumulación de norfloxacin en las cepas clínicas del paciente A (en las que no se observa expresión de un mecanismo de expulsión activa) presentan variaciones importantes. Es interesante resaltar que en la cepa A2, donde se produce la mayor acumulación basal de norfloxacin, los valores de CIM de ácido nalidixico y de algunas fluoroquinolonas son los más bajos de toda la serie. Aunque es posible que ello sea debido a un fenómeno dependiente del método empleado (sometido a variación, como indican los valores de desviación estándar obtenidos), no debe descartarse que ello sea la consecuencia de una regulación fina de los sistemas de expulsión activa de *Salmonella*. Para aclarar este aspecto, y para valorar el impacto real de las bombas de expulsión en la resistencia a quinolonas en esta especie son necesarios estudios adicionales.

Bibliografía

- Heisig P. High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes. *J Antimicrob Chemother* 1993;32:367-77.
- Giraud E, Brisabois A, Martel JL, Chaslus-Dancla E. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 2131-7.
- Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:3-16.
- Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura Interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:225-34.
- Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41: 2067-75.
- Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):32-41.
- Martínez JL, Alonso A, Gómez-Gómez JM, Baquero F. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg? *J Antimicrob Chemother* 1998;42:683-8.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
- Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5638-42.
- Gensberg K, JY, Piddock LJ. A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 1995;132:293.
- Piddock LJV, Ricci V, McLaren I, Griggs DJ. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 1998;41: 635-41.
- Ruiz J, Castro D, Goni P, Santamaría JA, Borrego JJ, Vila J. Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype *Typhimurium*. *J Med Microbiol* 1997;46:623-8.
- Reyna F, Huesca M, González V, Fuchs LY. *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1621-3.
- Guerra B, Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant salmonella isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2059.
- Hansen H, Heisig P. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant salmonellae selected in vitro. *Microb Drug Resist* 2003;9:25-32.
- Nakaya H, Yasuhara A, Yoshimura K, Oshihai Y, Izumiya H, Watanabe H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica typhimurium* with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg Infect Dis* 2003;9:255-7.
- Giraud E, Cloeckaert A, Kerboeuf D, Chaslus-Dancla E. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 1223-8.
- 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.
- Nikaido H, Basina M, Nguyen V, Rosenberg EY. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol* 1998;180:4686-92.
- Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
- Jaffe A, Chabbert YA, Semonin O. Role of porins proteins *OmpF* and *OmpC* in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22: 942-8.
- Pitout JD, Sanders CC, Sanders WEJ. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *Am J Med* 1997;103:51-9.
- Navarro F, Pérez-Trallero E, Marimón 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;48:383-9.
- Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miró E, Gómez J, Mirelis B. *Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *J Clin Microbiol* 2000;38:4676-8.
- Prats G, Mirelis B, Llovet T, Muñoz C, Miró E, Navarro F. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1140-5.
- Gensberg K, Jin YF, Piddock LJV. A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 1995;132:293.
- Piddock LJ, Griggs DJ, Hall MC, Jin YF. Ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* obtained from two patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:662-6.
- 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.
- Ruiz J, Capitano L, Núñez I, Castro D, Sierra J, Hatha M, et al. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:699-702.
- Pers C, Sogaard P, Pallesen L. Selection of multiple resistance in *Salmonella enteritidis* during treatment with ciprofloxacin. *Scand J Infect Dis* 1996;28:529-31.
- Crump JA, Barrett TJ, Nelson JT, Angulo FJ. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype Typhi and for non-Typhi salmonellae. *Clin Infect Dis* 2003;37:75-81.
- Szybalski W, Bryson V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J Bacteriol* 1952;64:489-99.
- Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:647-53.

34. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; NCCLS document M2-A7. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.
35. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard fifth edition. NCCLS document M7-A5. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.
36. Miró E, Del Cuerpo 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;42:535-8.
37. Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:879-85.
38. Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás JM, Benedí VJ, Jacoby GA. *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:342-8.
39. Martínez-Martínez L, García I, Ballesta S, Benedí VJ, Hernández-Allés S, Pascual A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1850-2.
40. Rodríguez F de C, Solís Cuesta F, Navarro F, Muñoz J, Tejero R, Ibarra González A, et al. *Salmonella* spp. Serotipos aislados en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba durante un período de 8 años (1993-2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:208-11.
41. Perez-Ciordia I, Ferrero M, Sánchez E, Abadías M, Martínez-Navarro F, Herrera D. Enteritis por *Salmonella* en Huesca. 1996-1999. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:16-21.
42. Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo MA, García I, Joyanes P, Doménech-Sánchez A, et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3926-32.
43. Sulavik MC, Dazer M, Miller PF. The *Salmonella typhimurium* *mar* locus: Molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. *J Bacteriol* 1997;179:1857-66.
44. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés H, Conejo MC, Pascual A, Tomás JM, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* *OmpK35* porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3332-5.