

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos

Ferran Navarro^{a,b,*}, Jorge Calvo^c, Rafael Cantón^d, Felipe Fernández-Cuenca^e y Beatriz Mirelis^a

^a Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

^b Departament de Genètica i de Micobiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

^d Servicio de Microbiología y CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS),

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

^e UGC Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 30 de marzo de 2011

Aceptado el 31 de marzo de 2011

On-line el 21 junio 2011

Palabras clave:

Betalactamasas

IRT

AmpC

BLEE

Carbapenemasas

Quinolonas

Aminoglucósidos

Enterobacterias

Bacilos gramnegativos no fermentadores

Haemophilus

Neisseria

Keywords:

Beta-lactamases

IRT

AmpC

ESBL

Carbapenemases

Quinolones

Aminoglycosides

Enterobacteriaceae

Non-fermenters gram-negative bacilli

Haemophilus

Neisseria

R E S U M E N

La detección de los mecanismos de resistencia en los microorganismos gramnegativos tiene una gran repercusión clínica y epidemiológica, existiendo aún hoy en día una cierta discusión sobre cuál es la mejor técnica fenotípica para este fin, así como si se deben o no interpretar los resultados *in vitro* de sensibilidad. Se describen los fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos en bacilos gramnegativos, así como las diferentes herramientas fenotípicas disponibles para su detección e interpretación clínica. También se incluyen las betalactamasas de espectro extendido, las resistentes a los inhibidores, las de tipo AmpC y las carbapenemasas; las resistencias a quinolonas por mutaciones en los genes de la DNA girasa y la topoisomerasa IV o las mediadas por plásmidos; y los patrones de resistencia a aminoglucósidos debidos a la expresión de enzimas modificadoras. En un apartado específico se discute la detección fenotípica de la resistencia a los antibióticos betalactámicos en *Neisseria* spp. y *Haemophilus influenzae*.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria

A B S T R A C T

Detecting resistance in gram-negative microorganisms has a strong clinical and epidemiological impact, but there is still a great deal of debate about the most sensitive phenotypic method and whether *in vitro* susceptibility results should be interpreted. The present work reviews the phenotypes and mechanisms of resistance to beta-lactams, quinolones and aminoglycosides in gram-negative bacilli and also revises the different phenotypic methods used for their detection. A clinical interpretation of *in vitro* susceptibility results is also discussed. Extended-spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases, AmpC type beta-lactamases and carbapenemases are thoroughly reviewed. As regards quinolones, the resistance mediated both by plasmids and by mutations in the DNA gyrase and the topoisomerase IV genes is also reviewed. This report includes resistance patterns to aminoglycosides caused by modifying enzymes. Phenotypic detection of beta-lactam resistance in *Neisseria* spp. and *Haemophilus influenzae* is also reviewed in a separate section.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

En la presente revisión, se describen una serie de herramientas fenotípicas útiles para la detección de determinados mecanismos de resistencia en los microorganismos gramnegativos que

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fnavarror@santpau.cat (F. Navarro).

Tabla 1

Principales patrones de resistencia a betalactámicos en función de la betalactamasa implicada en las principales enterobacterias que carecen de betalactamasa tipo AmpC cromosómica inducible.

Fenotipo	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G	C4G	CARB	Observaciones
Natural	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Presencia de AmpC a niveles basales en <i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella enterica</i> <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp. son clínicamente resistentes a C1G y C2G
TEM-1, TEM-2 o SHV-1	R	S	R	r	S	S	S	S	S	S	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1. <i>Klebsiella</i> spp. presentan este patrón de forma natural al ser portadoras de SHV-1 o relacionadas
Hiperproducción de AmpC cromosómica o AmpC adquirida	R	R	R	r/R	R	R	R	r/R	S	S	Presencia en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> spp. de AmpC hiperproducida
Hiperproducción de TEM-1, TEM-2 o SHV1	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	En caso de tratarse de SHV-1 puede llegar a afectar ligeramente a ceftazidima
BLEE	R	V	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	
IRT	R	R	R	S/I/R	S	S	S	S	S	S	
OXA	R	R	R	R	r	S	S	S	S/r	S	Se suele ver sensibilidad disminuida a cefepima, manteniéndose la sensibilidad a C3G
Carbapenemasa	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r/R	En caso de carbapenemasas de clase B el aztreonam se muestra sensible. Algunas carbapenemasas como OXA-48 hidrolizan escasamente a las cefalosporinas de amplio espectro, pudiendo aparecer sensibles en su interpretación

En negrita se resaltan los antibióticos clave para la sospecha de cada una de las betalactamasas implicadas.

AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CARB: carbapenémicos; C1G: cefalosporinas de primera generación; C3G: cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos; C4G: cefalosporinas de cuarta generación; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina; PIP: piperacilina; R: resistente; r: halos reducidos o CMI elevadas con respecto al fenotipo salvaje, pero habitualmente dentro del rango de sensibilidad; S: sensible; TIC: ticarcilina; V: variable.

pueden implicar diferentes actitudes terapéuticas o tener interés epidemiológico¹. La práctica totalidad de los mecanismos descritos se refieren a las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y puntualmente también a otros bacilos gramnegativos no fermentadores, entre los que destaca el género *Acinetobacter*. La resistencia a betalactámicos en *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp. se tratan en un apartado específico por presentar mecanismos de resistencia peculiares.

En esta revisión se han recogido diferentes opiniones, criterios y recomendaciones aparecidas en la literatura, destacando las del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*^{2,3}, *Comité de l'Antibiogramme* de la Sociedad Francesa de Microbiología (CASFM)⁴, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*⁵, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), del grupo GEMARA (Grupo de estudio de los mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos) y antiguas recomendaciones de MENSURA (Mesa Española de Normalización de las Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos)^{6,7}. Por último, es necesario aclarar que en la mayoría de los casos (excepto en los apartados en los que se hace mención expresa a las recomendaciones terapéuticas), los términos de sensible o resistente no se refieren necesariamente a las categorías clínicas de interpretación basadas en los puntos de corte sino a consideraciones microbiológicas de pertenencia a las poblaciones salvajes (sin mecanismos de resistencia y por tanto sensible) o la expresión de un mecanismo de resistencia.

Betalactamasas resistentes a los inhibidores (IRT, OXA)

La asociación amoxicilina-ácido clavulánico presenta actividad frente a un gran número de enterobacterias incluyendo las resistentes a la amoxicilina por producción de betalactamasas de amplio espectro como TEM-1, TEM-2 o SHV-1. Estas betalactamasas hidrolizan penicilinas (aminopenicilinas [ampicilina, amoxicilina], carboxipenicilinas [ticarcilina]) y, como se ha mencionado, son sensibles a los inhibidores de betalactamasa. A partir de estas enzimas y mediante mutaciones puntuales aparecieron

las betalactamasas resistentes a la inhibición por los inhibidores de betalactamasas. Estas enzimas 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. Además, algunas oxacilinasas como la OXA-1, también confieren un fenotipo similar al de las IRT, que se caracteriza por resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas siendo insensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa de clase A como el ácido clavulánico y, en su gran mayoría no tienen actividad sobre el resto de betalactámicos⁸⁻¹².

Detección fenotípica de betalactamasas resistentes a los inhibidores

La detección de estas enzimas es factible solo en enterobacterias naturalmente sensibles a la asociación amoxicilina-ácido clavulánico. Por tanto, y debido a la superposición de mecanismos de resistencia, su presencia no puede detectarse fenotípicamente en las enterobacterias naturalmente resistentes a esta asociación como *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* o los bacilos gramnegativos no fermentadores (*P. aeruginosa*) portadores de betalactamasa tipo AmpC inducible^{13,14}. Así, para el resto de enterobacterias a partir de los antibiogramas realizados, bien por la técnica de disco-difusión o bien por la de microdilución, se puede sospechar la presencia de las enzimas IRT y OXA, aunque su confirmación definitiva debe ser realizada mediante técnicas moleculares dado que son varios los mecanismos que pueden dar patrones de resistencia similares. En la *tabla 1* se muestran algunas características fenotípicas diferenciales de los distintos mecanismos implicados en la resistencia a las asociaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasa¹⁵.

Generalmente, una cepa que expresa una betalactamasa de tipo IRT presentará resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas (en mayor o menor medida) y sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico^{9,10,13}. Estas cepas muestran además sensibilidad a las cefalosporinas,

incluyendo las de primera generación. También se afecta la asociación ampicilina-sulbactam y generalmente suele mantenerse o disminuir levemente la sensibilidad a piperacilina-tazobactam, posiblemente por la acción intrínseca de la piperacilina. Este patrón se puede ver alterado ante la presencia añadida de otros mecanismos de resistencia¹⁵.

Las cepas portadoras de las betalactamasas tipo OXA comentadas previamente (principalmente OXA-1) suelen presentar patrones similares a las portadoras de IRT. Así presentan resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam. Una característica de las enzimas de tipo OXA es que generalmente presentan una menor sensibilidad a cefepima. Debido a una cierta actividad del ácido clavulánico y a la menor sensibilidad de cefepima, es frecuente observar (especialmente mediante la técnica de disco-difusión) sinergia entre el ácido clavulánico y cefepima, siendo este patrón característico de las enzimas tipo OXA-1.

Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

Ante la presencia de enzimas tipo IRT u OXA, deberíamos prescindir de tratamientos con las asociaciones de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasa como amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam, presentándose como válida cualquier otra alternativa en función del antibiograma, del foco infeccioso y de la situación clínica del paciente. En el caso de la asociación piperacilina-tazobactam, debido a la propia actividad de la piperacilina, podría plantearse como alternativa siempre que se observe sensibilidad *in vitro*. En el caso de enterobacterias portadoras de betalactamasas tipo OXA debe plantearse también la conveniencia de evitar el uso de cefepima, especialmente si esta betalactamasa está hiperproducida y se observa disminución de la sensibilidad *in vitro*.

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Un grupo importante de enzimas son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefotaxina) ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico¹⁶. Estas betalactamasas pertenecen a la clase molecular A de Ambler y entre ellas se encuentran las de tipo TEM y SHV (derivadas de enzimas con menor espectro de hidrólisis), la familia CTX-M (procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*), y otras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby¹⁷⁻²⁰.

Otras enzimas BLEE también pertenecientes a la clase A, aunque del subgrupo 2ber son las betalactamasas CMT (*complex mutant TEM*) como la TEM-50 que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas⁹. Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de), se consideran también betalactamasas de espectro extendido y se han descrito con mayor frecuencia en *P. aeruginosa*.

Desde su descripción inicial, se han identificado más de 300 BLEE diferentes, y la mayoría pertenece a las familias TEM, SHV y CTX-M (<http://www.lahey.org/webt.asp>).

Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido

La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica y esto viene condicionado

por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia. Su detección se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos. Otra de las características de estas enzimas es que son inhibidas por el ácido clavulánico (tabla 1)^{13,17}.

Se han desarrollado diversas pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, la mayoría basadas en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico¹⁵. Entre ellas destaca la técnica de disco-difusión en la que la presencia de una BLEE se sospecha no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de amplio espectro o los monobactámicos y el ácido clavulánico, cuando previamente se han situado de forma estratégica los discos^{15,17,18,21}.

Otras técnicas basadas en el mismo principio son la utilización de discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico y su variante en las técnicas de microdilución que permiten conocer las CMI de las cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor. La técnica de difusión en gradiente (Etest) con tiras combinadas de cefalosporinas con y sin inhibidor es también de utilidad para la detección de BLEE¹⁵.

Todas estas pruebas requieren como mínimo 48 horas desde que el producto patológico llega al laboratorio. Se han buscado nuevos métodos para acortar este tiempo por lo que se han diseñado medios cromogénicos para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE. Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (bioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagarTM ESBL (CHROMagar).

Otro método cromogénico rápido es el Cica-beta-Test (Kanto Chemical) que se utiliza para la detección rápida de BLEE directamente de la colonia de enterobacteria aislada. El método utiliza una cefalosporina cromogénica (HMRZ-86) y el ácido clavulánico como inhibidor para detectar rápidamente si el aislado es portador o no de una BLEE. Esta técnica permite asimismo detectar metalo-betalactamasas y AmpC hiperproducidas mediante el uso de EDTA y ácido bórico, respectivamente.

Es importante recordar que algunas enterobacterias poseen betalactamasas cromosómicas que hidrolizan las cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Cuando se hiperproducen dan lugar a un patrón fenotípico de resistencia compatible con la presencia de una BLEE. Entre ellas se encuentra la betalactamasa K1 de *Klebsiella oxytoca*, la SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* y las cefalosporinas CepA de *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*.

Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

El grado de hidrólisis frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos puede variar según el tipo de BLEE y el nivel de producción, pudiendo aparecer sensibles *in vitro* a algunos de estos antibacterianos²². El CLSI antes del año 2010² recomendaba informar las cepas con fenotipo de BLEE como resistentes a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam indistintamente del valor de la CMI o del halo de inhibición mientras que el EUCAST⁵ recomendaba interpretar como intermedio un resultado sensible y como resistente un resultado intermedio. En el año 2010 ambos comités modificaron los puntos de corte de las cefalosporinas y aztreonam basándose en estudios PK/PD y efectuaron una nueva recomendación consistente en informar la sensibilidad de los aislados con BLEE según los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad *in vitro* independientemente del mecanismo de resistencia^{3,5} (tabla 2).

A pesar de la disminución de los puntos de corte, que parecen dar una buena predicción de la evolución clínica al tratamiento, sigue existiendo discusión sobre la influencia del inóculo bacteriano en el foco de infección. Por lo tanto, la decisión de seguir esta

Tabla 2
Puntos de corte actuales (mg/L) para *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* del CLSI y EUCAST

Microorganismo	Antimicrobiano	CLSI (2010) ^a		EUCAST (2011) ^b		
		S	R	S	R	ECOFF ^c
<i>Enterobacteriaceae</i>	Cefuroxima (parenteral)	≤ 8	≥ 2	≤ 8	> 8	≤ 8 ^d
	Cefotaxima	≤ 1 (≤ 8)	≥ 4 (≥ 64)	≤ 1	> 2	≤ 0,25 ^d
	Ceftazidima	≤ 4 (≤ 8)	≥ 16 (≥ 32)	≤ 1	> 4	≤ 0,5 ^d
	Cefepima	≤ 8 (≤ 8)	≥ 32 (≥ 32)	≤ 1	> 4	≤ 0,125
	Aztreonam	≤ 4 (≤ 8)	≥ 16 (≥ 32)	≤ 1	> 4	≤ 0,25 ^d
	Imipenem	≤ 1 (≤ 4)	≥ 4 (≥ 16)	≤ 2	> 8	≤ 0,5/≤ 1 ^e
	Meropenem	≤ 1 (≤ 4)	≥ 4 (≥ 16)	≤ 2	> 8	≤ 0,125
	Ertapenem	≤ 0,25 (≤ 2)	≥ 1 (≥ 8)	≤ 0,5	> 1	≤ 0,06
	Doripenem	≤ 1	≥ 4	≤ 1	> 4	≤ 0,12
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	≤ 4	≥ 16	≤ 4	> 8	≤ 4
	Meropenem	≤ 4	≥ 16	≤ 2	> 8	≤ 2
	Doripenem	-	-	≤ 1	> 4	≤ 1

^aDocumento M100-S20-U, junio de 2010, y documento M100-S20. Entre parentesis los puntos de corte anteriores a estos documentos; ^bversión 1.3, enero 2011; ^cpunto de corte epidemiológico; ^d*E. coli*; ^e*E.coli*/*K. pneumoniae*.

recomendación dependerá de criterios locales atendiendo a criterios epidemiológicos y de política de antimicrobianos y a la realización de estudios clínicos que aseguren la eficacia terapéutica de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias productoras de BLEE en diferentes situaciones clínicas.

Betalactamasas tipo AmpC

Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros)¹⁸ hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas y, en menor medida las de tercera generación, mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación y los carbapenémicos^{13,23}. Este espectro de hidrólisis puede ampliarse y afectar además a cefalosporinas de cuarta generación (AmpC de espectro extendido), pero se desconoce cuál es la prevalencia y la relevancia clínica y epidemiológica de estas variantes de AmpC. La cloxacilina y el aztreonam, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenil-borónico), inhiben a las betalactamasas de tipo AmpC, mientras que el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam no son buenos inhibidores (tabla 1).

La producción de AmpC puede ser constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen *bla*_{AmpC}²³. Cuando el gen *bla*_{AmpC} se expresa de forma constitutiva (ausencia de genes reguladores del tipo *ampD* o *ampR*) puede hacerlo a niveles basales bajos, confiriendo un fenotipo de resistencia natural o salvaje característico de la especie bacteriana (tabla 3), o puede hacerlo a unos niveles muy superiores al basal (sobreexpresión de *bla*_{AmpC} mediada por

mutaciones en el atenuador y/o promotor de *bla*_{AmpC}, adquisición de promotores fuertes para la expresión de *bla*_{AmpC}) produciendo cantidades elevadas de AmpC (hiperproducción de AmpC). En determinadas especies bacterianas como *E. cloacae*, *M. morgani*, *P. aeruginosa* etc. el gen *bla*_{AmpC} se expresa de forma inducible. En los aislados que tienen un gen *bla*_{AmpC} inducible, su expresión puede estar desreprimida establemente de forma parcial o total (mutaciones en genes reguladores de tipo *ampD* y *ampR*) dando lugar a la producción estable de grandes cantidades de AmpC (hiperproducción parcial o total de AmpC)^{13,18,23,24}.

Independientemente del mecanismo que conduce a una hiperproducción de AmpC, los aislados hiperproductores de AmpC presentan un fenotipo de resistencia (fenotipo AmpC) a las penicilinas, las asociaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasa, cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas generalmente las cefamicinas, así como a las de tercera generación, pero en grado variable, dependiendo del nivel de hiperproducción. Los aislados con este fenotipo AmpC suelen ser además sensibles a cefalosporinas de cuarta generación y a los carbapenémicos, aunque dicha sensibilidad se reduce significativamente si se produce la pérdida de alguna porina relacionada con la resistencia antimicrobiana^{13,23}.

Un grupo de betalactamasas de tipo AmpC están codificadas por genes *bla*_{AmpC} asociados a integrones, como los de clase 1, o transposones localizados en plásmidos conjugativos (AmpC plasmídicas). Estos genes *bla*_{AmpC} plasmídicos proceden del cromosoma bacteriano y se clasifican en 6 familias que se diferencian por la homología de sus genes: CIT (derivadas de AmpC cromosómica de *C. freundii*), DHA (derivadas de AmpC cromosómica de *M. morgani*),

Tabla 3
Patrones de resistencia a antibióticos betalactámicos en algunas enterobacterias de interés clínico y epidemiológico

Microorganismo	Fenotipo	Patrón de resistencia									Presencia y localización <i>bla</i> _{AmpC}	Nivel de expresión <i>bla</i> _{AmpC}
		AMP	AMC	TIC	CFZ	CXM	FOX	CTX	FEP	IPM		
<i>P. Proteus mirabilis</i> , <i>S. enterica</i>	Salvaje	S	S	S	S	S	S	S	S	S	No	No
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	PI	Elevado
<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Citrobacter koseri</i>	Salvaje	R	S	R	S	S	S	S	S	S	No	No
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	PI	Elevado
<i>E. coli</i>	Salvaje	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Crom	No o muy bajo
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Crom constitutiva/PI	Elevado
<i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i>	Salvaje	R	R	S	R	S/r	R	S	S	S	Crom inducible	Basal
	AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S	S	Crom desreprimida/PI	Elevado
<i>Providencia spp.</i> , <i>M. morgani</i> , <i>S. marcescens</i>	Salvaje	R	R	S	R	R	S	S	S	S	Crom inducible	Basal
	AmpC	R	R	R	R	R	S/r	r/R	S	S	Crom desreprimida/PI	Elevado

En negrita se resalta los betalactámicos en los que existen diferencias entre el fenotipo natural o salvaje y el fenotipo AmpC.
AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CFZ: cefazolina; Crom: cromosómica; CXM: cefuroxima; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; PI: plasmídica; R: resistencia; r: sensibilidad intermedia; S: sensible; TIC: ticarcilina.

ACC (cuyo origen está relacionado con AmpC cromosómica de *Hafnia alvei*), FOX (derivadas probablemente de AmpC cromosómica de *Aeromonas media*), MOX (presumiblemente derivadas de AmpC cromosómica de *Aeromonas caviae*), EBC (derivadas de las AmpC cromosómicas de *E. cloacae* y/o *Enterobacter asburiae*)^{13,18,23,24}.

Las betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas pueden causar fracasos terapéuticos, similares a los descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC cromosómica inducible (selección de mutantes con desrepresión estable) en tratamientos con betalactámicos.

Detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC

Los métodos fenotípicos para la detección de AmpC plasmídicas son sencillos y económicos, pero solo resultan de utilidad en aislados que no tienen una AmpC cromosómica natural (*Klebsiella* spp., *S. enterica*, *P. mirabilis*) o que la expresan constitutivamente a muy bajo nivel, como ocurre en *E. coli*. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando estos aislados presenten un patrón de resistencias a betalactámicos (fenotipo AmpC) diferente al de su respectivo fenotipo salvaje o de resistencia natural (tabla 3), siendo los marcadores de mayor utilidad la sensibilidad intermedia o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y a algunas de las cefalosporinas de tercera generación^{13,15,23}.

Los métodos fenotípicos más rentables por su eficacia, su sencillez y su bajo coste económico, son el método de sinergia de doble disco (usando discos de cloxacilina o ácido fenil-borónico y discos de cefotaxima y ceftazidima) y el método de discos combinados con inhibidores¹⁵. Existen otros métodos fenotípicos bastante sensibles, pero son más complejos (test en 3D) o más caros que los anteriores (agar cefoxitina, Etest de cefotetán/cefotetán más cloxacilina)²³. En el caso concreto de *E. coli*, la utilización del método de inducción de AmpC puede resultar útil en la detección de AmpC plasmídica puesto que un resultado positivo solo es posible si media la adquisición de una AmpC plasmídica inducible y descarta sin lugar a dudas la hiperproducción de la AmpC cromosómica, dado que ésta no es inducible²³. Se ha descrito otro método simple para diferenciar las AmpC plasmídicas de las AmpC cromosómicas que puede ser de utilidad. Los aislados productores de AmpC plasmídicas suelen presentar colonias dispersas por el borde de los halos de inhibición con discos de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam²⁵.

Los métodos fenotípicos de detección de betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas tienen varias limitaciones importantes que deben ser consideradas para poder realizar una interpretación fiable de los resultados obtenidos. Estos métodos aún no han sido estandarizados por ningún comité u organización de expertos (CLSI, EUCAST, CASFM)²⁻⁵. Un marcador fenotípico muy utilizado para diferenciar la producción de AmpC de la de BLEE es la cefoxitina. Salvo algunas excepciones, los aislados con fenotipo AmpC son generalmente resistentes a cefoxitina, mientras que los aislados productores de BLEE suelen ser sensibles, excepto cuando se produce la pérdida o una disminución en la expresión de alguna porina¹⁵.

Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

En los aislados en los que se ha detectado la producción de una AmpC plasmídica, tanto si éstos no tienen una AmpC cromosómica, como *Klebsiella* spp., *S. enterica* y *P. mirabilis*, como si la tienen, pero ésta no es inducible, como ocurre por ejemplo con *E. coli*, los valores de sensibilidad obtenidos *in vitro* deben informarse sin que sea necesaria la realización de una lectura interpretada de los mismos. En estos casos es aconsejable recomendar el uso de antimicrobianos alternativos a las cefalosporinas de tercera generación, aunque no existen criterios unificados ni consensuados sobre esta recomendación^{13,23}.

El CASFM⁴ recomienda que cuando las pruebas de sensibilidad antimicrobiana indican que el aislado presenta sensibilidad disminuida o resistencia a algunas de las cefalosporinas de tercera generación se informen todas ellas como resistentes (si presentan sensibilidad intermedia) o con sensibilidad intermedia (si son sensibles), independientemente de que el microorganismo produzca una AmpC cromosómica o una AmpC plasmídica. En el caso que sean sensibles a todas las cefalosporinas, se aconseja informar, particularmente con *Enterobacter* spp. y *C. freundii*, la posibilidad de que se produzca un fracaso terapéutico si el tratamiento se realiza con cefalosporias de tercera generación, por la selección de mutantes AmpC establemente desreprimidos^{4,13}. Si después de 3-4 días de tratamiento antimicrobiano continúa aislándose la misma especie bacteriana se recomienda repetir las pruebas de sensibilidad para determinar si se ha producido un incremento en la resistencia a betalactámicos.

Carbapenemasas

En los últimos años se ha producido una gran alarma y preocupación por la gran dispersión de los bacilos gramnegativos resistentes a los carbapenémicos por producción de betalactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos trasferibles²⁶⁻²⁹. Estas enzimas se denominan genéricamente carbapenemasas y se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010¹⁸. En la tabla 4 se recogen estas enzimas, indicando las más relevantes y los microorganismos en los que se encuentran habitualmente. Asimismo, en las tablas 1 y 4 se muestran sus características más sobresalientes y que pueden utilizarse para su reconocimiento fenotípico.

El grupo más importante de carbapenemasas lo constituyen las metalo-betalactamasas pertenecientes a la clase B o grupo 3 de Bush y Jacoby. Las enzimas principales son las IMP y VIM que tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos betalactámicos con la excepción del aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Sin embargo, se inhiben por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, compuestos tiólicos como el ácido 2-mercaptopropiónico, o el ácido dipicolínico^{26,30}. Con características similares se han descrito enzimas de los grupos SPM, GIM, SIM, AIM, DIM y KHM, y más recientemente el enzima NDM-1 que ha creado una importante alarma mediática debido al perfil multiresistente o panresistente de los aislados que la producen^{28,31}. El perfil hidrolítico que presenta esta enzima es similar a la de otras metalo-betalactamasas³².

Otro grupo importante de carbapenemasas son las de clase A (grupo 2f). Estas enzimas, cuyo primer representante fue la betalactamasa SME, confieren un fenotipo con pérdida marcada de sensibilidad a los carbapenémicos y un perfil hidrolítico que incluye el aztreonam y en menor medida a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. No son inhibidas por el EDTA, pero como peculiaridad destaca la inhibición parcial por ácido clavulánico (mejor con tazobactam). Otras enzimas relacionadas son las de los grupos IMI (IMI-1 y -2) y NMC-A. No obstante, dentro de las carbapenemasas de clase A, las que tienen mayor importancia epidemiológica son las denominadas KPC. Son de naturaleza plasmídica asociadas al trasposón *Tn4401*. Asimismo, y aunque no de manera exclusiva, se han encontrado mayoritariamente ligadas a la secuencia tipo (ST) 258 de *K. pneumoniae*. Las enzimas KPC se han descrito no solo en *Enterobacteriaceae* sino también en *P. aeruginosa* y en *A. baumannii*. En España su aparición ha sido más tardía y no está ligada al clon ST258^{33,34}.

Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas KPC hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Como excepción tendrían una menor tasa de hidrólisis de las

Tabla 4
Clasificación general de las carbapenemasas

Clase molecular ^a (Grupo funcional ^b)	Enzimas	Inhibición por		ATM	Microorganismos	Localización genética
		CLA	EDTA			
A (2f)	Sme, IMI, NmcA	±	-	R	<i>S. marcescens</i> <i>E. cloacae</i>	Crom
	KPC	+	-	R	Enterobacterias	PI
	GES	+	-	R	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>	PI
B (3)	L1	-	+	S/R ^c	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Crom
	CcrA				<i>Bacteroides fragilis</i>	
	Cpha				<i>Aeromonas hydrophila</i>	
	BclI				<i>Bacillus cereus</i>	
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	S	Enterobacterias	PI (Crom) ^d
D (2df)	OXA (OXA-48)	±	-	S	<i>Pseudomonas</i> spp. BGNNF	Crom, PI
					<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	
					Enterobacterias	

^aSegún la clasificación de Ambler; ^bSegún la clasificación de Bush y Jacoby, 2010; ^cPuede aparecer resistente por la coexistencia con otros mecanismos de resistencia; ^dOcasionalmente de codificación cromosómica.

ATM: aztreonam; BGNNF: bacilos gramnegativos no fermentadores; CLA: ácido clavulánico; Crom, cromosómica; PI, plasmídica

cefamicinas aunque los valores de CMI que se obtienen suelen estar por encima del punto de corte de sensibilidad. No se inhiben por el ácido clavulánico, pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para su reconocimiento fenotípico. No obstante, la inhibición por el ácido borónico no es exclusiva de las enzimas KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las betalactamasas de tipo AmpC y que con la excepción del enzima CMY-10 no hidrolizan carbapenémicos¹⁵.

Dentro de las carbapenemasas de clase A deben citarse también algunas variantes de la BLEE de tipo GES como GES-4 encontrada en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y en enterobacterias que hidroliza de forma eficiente penicilinas y cefalosporinas y muy débilmente a los carbapenémicos.

En el grupo de las OXA (clase D de Ambler y 2df de Bush y Jacoby) también se encuentran variantes que hidrolizan los carbapenémicos²⁷. Entre ellas destacan las variantes de los subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 y, en menor medida, OXA-51 descritas en *Acinetobacter* spp. y sobre todo la OXA-48 descrita en enterobacterias en países del entorno mediterráneo. La detección fenotípica de OXA-48 es compleja ya que la hidrólisis de los carbapenémicos es poco eficiente y prácticamente inexistente para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación¹⁵. El perfil de sensibilidad que confieren mantiene las características generales de las OXA al ser poco inhibida por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Por ello, en un antibiograma habitual de *K. pneumoniae* o *E. coli*, enterobacterias en las que mayoritariamente se ha encontrado la OXA-48, se mostrarían resistentes a las penicilinas y sus asociaciones con los inhibidores de betalactamasas de clase A, sensibles a las cefalosporinas y con pérdida de sensibilidad a los carbapenémicos.

Detección fenotípica de carbapenemasas

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas. En este último punto es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan «enmascarar» el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad, la presencia de bombas de expulsión, afectación de las PBP o presencia simultánea de otras betalactamasas. En este sentido, no es igual la expresión de una

carbapenemasa en *P. aeruginosa* o en *A. baumannii* que en *E. coli*, *K. pneumoniae* o en una cepa de *E. cloacae*. Cada una de estas especies tiene sus peculiaridades fenotípicas naturales que deben ser contempladas^{13,26,28,30}.

Desde un punto de vista práctico y una vez observado en el antibiograma, la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, generalmente ilustrado por la sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos, es importante verificar que existe un mecanismo de inactivación de los carbapenémicos. Se recomienda investigar este hecho en las cepas en las que los valores de CMI de los carbapenémicos se incrementan por encima de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos (separan las poblaciones salvajes de aquellas que presentan mecanismos de resistencia). El método de referencia no siempre al alcance de todos los laboratorios, sería el ensayo espectrofotométrico, por lo que se han propuesto métodos biológicos (bioensayos) sencillos que permiten su detección¹⁵. La prueba modificada de Hodge³⁵ fue recomendada por vez primera por el CLSI en el año 2009 como test fenotípico de confirmación. Tiene una elevada sensibilidad, pero no sirve para la diferenciación del tipo de carbapenemasa. A pesar de su sencillez, el test de Hodge modificado tiene detractores por las discordancias observadas con algunas cepas. Se han observado resultados falsos negativos por la baja expresión de la carbapenemasa, sobre todo con cepas con metalo-betalactamasa y oxacilinasas. No obstante, los falsos negativos pueden evitarse añadiendo sulfato de zinc al medio que incrementan la expresión del enzima (en el caso de las metalo-betalactamasas). También se han comunicado falsos positivos con cepas productoras de CTX-M-15 y pérdida de porinas y con las cepas hiperproductoras de AmpC. Asimismo, se ha discutido cuál es el carbapenémico más adecuado para el test de Hodge modificado, recomendándose la utilización de meropenem y ertapenem^{15,26,35}.

Para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas directamente de muestras clínicas se ha propuesto la utilización de medios cromogénicos, entre ellos los que se emplean para la detección de BLEE y los que específicamente se han diseñado para la detección de KPC. Los medios cromogénicos para BLEE detectan la presencia de microorganismos con carbapenemasas de las clases A y B, pero no las cepas que tienen OXA-48. No obstante, tienen el inconveniente de ser poco específicos dado que en ellos también crecen los microorganismos productores de BLEE. Los medios cromogénicos específicos para carbapenemasas como el CHROMagarTM KPC (CHROMagar) tienen una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de cepas con enzimas tipo VIM y KPC

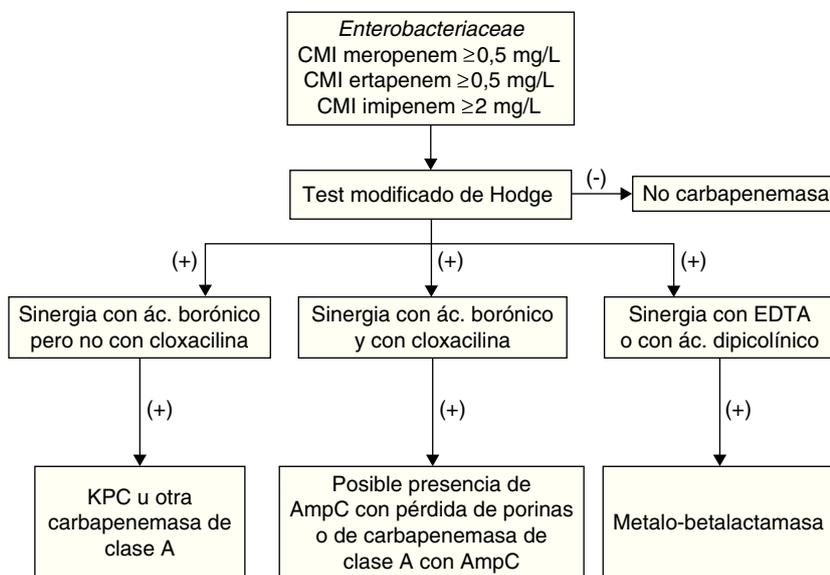


Figura 1. Identificación fenotípica de *Enterobacteriaceae* productores de carbapenemasas.

directamente de muestras rectales, si bien no discrimina el tipo de carbapenemasa.

Diferenciación fenotípica de las diferentes carbapenemasas

Una vez confirmado que la cepa problema produce una enzima que inactiva los carbapenémicos es preciso diferenciar el tipo de carbapenemasa. En *Enterobacteriaceae*, utilizando diferentes inhibidores puede seguirse el esquema que se incluye en la figura 1.

En el caso de las metallo-betalactamasa, la sensibilidad al aztreonam nos orienta hacia este tipo de enzimas que puede confirmarse por la sinergia entre los carbapenémicos y EDTA o entre ceftazidima y EDTA. No obstante, se han detectado falsos positivos con *P. aeruginosa* y particularmente con *A. baumannii* por la actividad intrínseca del EDTA, aunque puede evitarse añadiendo Zn^{2+} al medio de cultivo. Se han diseñado pruebas de aproximación de discos, discos de carbapenémicos combinados con EDTA y tiras de Etest con un carbapenémico y EDTA para identificar fenotípicamente estas enzimas. En algunos casos se añade además fenantrolina o se sustituye EDTA por compuestos tiólicos como el mercaptopropiónico para mejorar la sensibilidad de la prueba¹⁵. También se ha ensayado el ácido dipicolínico con buenos resultados²⁶.

En el método de aproximación de discos es importante «acertar» con la distancia entre los discos del carbapenémico y el inhibidor, sobre todo en las cepas con baja expresión de la carbapenemasa en las que los halos de inhibición son amplios. Por este motivo, existen métodos que incluyen directamente el inhibidor en el mismo disco que el carbapenémico y se compara el halo de inhibición resultante con el que se produce con el carbapenémico solo. Este mismo principio se utiliza con las tiras de Etest que en un extremo contienen imipenem y en el otro imipenem con EDTA. Por diferencia entre los valores de CMI de imipenem sin y con inhibidor se puede inferir la presencia de las carbapenemasas. Asimismo, los sistemas expertos de determinados sistemas automáticos son también útiles para la detección de la metallo-betalactamasa, incluida la NDM-1^{15,32}.

Las KPC confieren resistencia al aztreonam y no se inhiben por el EDTA, pero sí por el ácido borónico y discretamente por el ácido clavulánico. No se recomienda utilizar ácido clavulánico por su baja sensibilidad. La utilización del ácido borónico tiene como inconveniente el ser también un buen inhibidor de AmpC, circunstancia que dificulta la detección de las KPC cuando está presente

esta enzima (por ejemplo en *E. cloacae*). Se ha propuesto utilizar simultáneamente una prueba de discos combinados con cloxacilina para demostrar la presencia de estas betalactamasas tipo AmpC. La sinergia con ácido borónico en las cepas productoras de KPC se puede demostrar con los carbapenémicos y también con cefalosporinas de amplio espectro, preferentemente con cefepima. Se han diseñado pruebas que añaden ácido borónico directamente a los discos y comparan los halos de inhibición con los del carbapenémico sin el ácido borónico²⁶. También se puede observar esta sinergia con pruebas de aproximación de discos. Aunque se han propuesto diferentes compuestos derivados del borónico, se prefiere el ácido fenilborónico al 3'-aminofenilborónico por su mayor capacidad inhibitoria. Asimismo, como sustrato se recomienda preferentemente utilizar meropenem o imipenem ya que con ertapenem pueden observarse resultados falsos positivos cuando el microorganismo estudiado produce AmpC, incluidas las AmpC plasmídicas¹⁵.

Para las carbapenemasas de tipo OXA no es posible utilizar un método fenotípico como el propuesto con las carbapenemasas de clase A o B ya que no existen inhibidores específicos de enzimas de clase D. Por este motivo, se recomienda confirmar la presencia de estas enzimas por métodos moleculares.

Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

Los microorganismos productores de carbapenemasas suelen tener un perfil multirresistente que incluye los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y el cotrimoxazol, circunstancia que restringe sus posibilidades terapéuticas^{36,37}. Como opciones alternativas se ha sugerido la tigeciclina y la colistina, aunque debe confirmarse su sensibilidad con un antibiograma. Se ha recomendado también fosfomicina o nitrofurantoina, sobre todo en el caso de las infecciones urinarias, que debe guiarse por el antibiograma y su interpretación por los puntos de corte correspondientes.

Con respecto a los antibióticos betalactámicos existen controversias acerca de su utilización cuando los valores de CMI (o halos de inhibición) se encuentran por debajo del punto de corte de sensibilidad, circunstancia bastante habitual para los carbapenémicos y las carbapenemasas de tipo VIM y en menor medida para las KPC³⁸. El CLSI³ y EUCAST⁵ recomiendan taxativamente informar los carbapenémicos en función de los puntos de corte de sensibilidad establecidos, algo menores para el CLSI, sin modificar la

interpretación. No obstante, los nuevos puntos de corte de carbapenémicos, sobre todo en *Enterobacteriaceae*, están muy cercanos a los puntos de corte de vigilancia epidemiológica, circunstancia que facilita la detección fenotípica de las carbapenemasas (tabla 2). A pesar de ello, y debido a que la información clínica es todavía muy escasa, la variabilidad de la expresión de las enzimas, la baja reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad (sobre todo con los métodos automáticos) y la muy dispar prevalencia de este tipo de microorganismos, en muchos laboratorios se siguen criterios interpretativos propios que trasforman la categoría sensible de los carbapenémicos a resistente cuando se identifica la presencia de una carbapenemasa (como se hacía con las cefalosporinas de amplio espectro en las cepas productoras de BLEE con anterioridad al cambio de los puntos de corte).

En el caso de las metalo-beta lactamasa y dado que no hidrolizan el aztreonam podría sugerirse este antibiótico como tratamiento de elección. Un caso particular lo constituirían las carbapenemasas de tipo OXA, esencialmente OXA-48, ya que presentan una ligera pérdida de sensibilidad a los carbapenémicos (suficiente en muchos casos para que se categoricen como resistentes) pero que por su perfil hidrolítico aparecen sensibles a las cefalosporinas de amplio espectro, por lo que se deberían informar como sensibles en espera de estudios clínicos que avalen la modificación de las interpretaciones.

Resistencia a quinolonas

Normalmente la resistencia clínica en enterobacterias se alcanza por una acumulación de mutaciones en los genes de las topoisomerasas, fundamentalmente *gyrA* y *parC*. Estas mutaciones se concentran en una región denominada QRDR (*quinolone-resistance-determining-region*), que codifican aminoácidos próximos al sitio activo de ambas enzimas^{39,40}.

Otros mecanismos de resistencias como la hiperexpresión de bombas de expulsión activa o las alteraciones de las porinas causan un nivel de resistencia bajo. Se han descrito varios sistemas de expulsión activa, de los que AcrAB-TolC en enterobacterias, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM en *P. aeruginosa* son los más conocidos^{13,14,39,40}.

Desde 1998 se empezaron a describir mecanismos de resistencia de origen plasmídico, como la protección de la diana por proteínas Qnr, la modificación de las quinolonas por la acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr, o las bombas de expulsión activa QepA y OqxAB. Aunque la resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos es de bajo nivel, se ha observado (tanto *in vitro* como *in vivo*) que facilitan la selección de mecanismos adicionales de resistencia, que contribuirán a un mayor nivel de resistencia^{13,39-43}.

Detección fenotípica de la resistencia a quinolonas

Los mecanismos cromosómicos de resistencia van apareciendo secuencialmente, y el uso de quinolonas es uno de los factores más importantes en la selección de aislados con resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas. En cuanto a la detección de determinantes plasmídicos de resistencia, no existen marcadores fenotípicos claros para reconocerlos y su detección debe hacerse por métodos moleculares, no siempre accesibles. En los últimos años se ha observado que algunas enterobacterias presentan sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas siendo sensibles a ácido nalidíxico, situación que en muchos casos se ha relacionado con la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas^{15,40,41}.

Los resultados de sensibilidad al ácido nalidíxico y ciprofloxacino son suficientes para el estudio de mecanismos de resistencias a quinolonas en enterobacterias, *Haemophilus* y *Neisseria* spp¹⁵.

Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

- Resistencia de alto nivel a ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino. Presumiblemente presentan ya una mutación en *gyrA*, por lo que es importante informar el riesgo de seleccionar mutantes con resistencia a fluoroquinolonas tras tratamiento con las mismas en este tipo de cepas. El CLSI² solo alerta del fracaso del tratamiento con fluoroquinolonas en caso de infecciones extraintestinales por *S. enterica*. Asimismo EUCAST⁵, recomienda en los aislados de salmonela resistentes al ácido nalidíxico informar como resistentes todas las fluoroquinolonas, pero muchos autores opinan que esta regla debe extenderse al resto de enterobacterias, o al menos interpretarse como «intermedio» sobre todo en situaciones en las que por el lugar de la infección no accedan bien las fluoroquinolonas.
- Resistencia a ácido nalidíxico de alto nivel (CMI > 32 mg/L) y sensibilidad intermedia o resistencia a ciprofloxacino (CMI > 1 mg/L). Muy probablemente son aislados con al menos dos mutaciones en *gyrA* o *gyrA+parC*. Ello implica resistencia a todas las fluoroquinolonas, independientemente de su posible sensibilidad *in vitro* a alguna de ellas. La resistencia a una fluoroquinolona invariablemente conlleva una sensibilidad disminuida al resto de las fluoroquinolonas.
- Sensibilidad disminuida al ácido nalidíxico (CMI 16-32 mg/L) y ciprofloxacino (CMI 0,25-1 mg/L). Este fenotipo sugiere con alta probabilidad la presencia de genes *qnr* y/o de otros genes plasmídicos, sin alteraciones adicionales en las topoisomerasas. No hay consenso al respecto, pero debido al riesgo de selección de mutantes con alto nivel de resistencia, algunos autores han propuesto informarlos como sensibilidad intermedia a quinolonas.

Resistencia a aminoglucósidos

El principal mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos es la inactivación enzimática, habiéndose descrito tres tipos de enzimas inactivantes: las acetiltransferasas (AAC) que acetilan un grupo amino del antibiótico, las fosfotransferasas (APH) que fosforilan un grupo hidroxilo y las nucleotidiltransferasas (ANT) que adenilan también un grupo hidroxilo. Cada enzima reconoce un cierto número de aminoglucósidos, lo cual se traduce en un fenotipo de resistencia concreto^{13,44,45}.

Desde 2003 se han descrito distintos genes como responsables de la metilación postranscripcional del RNA ribosómico (*armA*, *rmt* o *npmA*) y de momento con una prevalencia moderada y geográficamente dependiente. En este caso la resistencia observada suele ser de alto nivel a todos los aminoglucósidos excepto neomicina¹³. Además, una bacteria puede disminuir su sensibilidad a los aminoglucósidos mediante mutaciones que afectan la difusión pasiva a través de la membrana externa, porinas o estructura del polisacárido.

Para la detección de los distintos fenotipos de resistencia adquiridos es importante una correcta elección de los aminoglucósidos 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 solo se incluya los aminoglucósidos de uso en terapéutica. Para el antibiograma completo se recomienda el estudio de la amikacina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina y tobramicina. El estudio de la estreptomina puede ser optativo, dado su reducido uso en clínica, sin embargo, en un estudio epidemiológico es el único marcador de la presencia de las enzimas APH (3'') y ANT (3'')-Ia. En cambio para el antibiograma reducido es suficiente el estudio de la amikacina, gentamicina y tobramicina^{13,15}.

Un determinado patrón de resistencia puede sugerir la presencia de una determinada enzima inactivante de aminoglucósidos. De todos modos, estos patrones se pueden desdibujar ante la

presencia de otras enzimas y/o otros mecanismos tal como se ha comentado¹³. Además, para interpretar el patrón de sensibilidad a los aminoglucósidos se debe estar alerta ante situaciones donde puede haber una débil expresión de la enzima. En este contexto debe tenerse en cuenta que:

- Ante una cepa sensible a amikacina, pero con sensibilidad intermedia o resistente a tobramicina o netilmicina y sensible a gentamicina debería interpretarse sensibilidad intermedia a amikacina, ya que puede tratarse de la producción de la enzima AAC (6").
- Cuando se observa una disminución del halo de inhibición solo 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 es resistente o presenta un halo de inhibición reducido y en la tobramicina también se observa reducción del halo de inhibición (16-19 mm), debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la tobramicina pues puede estar presente la enzima ANT (2").
- Debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la netilmicina cuando haya una reducción del diámetro de inhibición (comprendido entre 19 y 22 mm), si también aparecen reducidos los halos de la gentamicina y la tobramicina, pues puede estar presente la enzima AAC (3)-II o AAC (3)-IV.

Resistencia a betalactámicos en *Haemophilus*

Clásicamente los betalactámicos son el tratamiento de primera línea de las infecciones causadas por este microorganismo⁴⁶. Dos mecanismos principales son la causa de la resistencia a las penicilinas: hidrólisis enzimática del antibiótico por betalactamasas plasmídicas, y alteraciones en la proteína PBP3 por mutaciones en el gen *ftsI*^{46,47}. Las betalactamasas son el mecanismo más común, son mayoritariamente de tipo TEM-1, y más raramente TEM-2 o ROB-1^{46,48}. Estas enzimas confieren un perfil de sensibilidad similar con resistencia de alto nivel a amino-, carboxi- y ureido-penicilinas, y son eficazmente inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico (fenotipo BLPAR). Sin embargo, puede haber variaciones en los niveles de resistencia en función del promotor asociado al gen TEM-1, estos promotores pueden tener diferentes afinidades por la RNA polimerasa, dando lugar a una mayor o menor producción de enzima que podría incluso afectar a amoxicilina-ácido clavulánico y cefalosporinas de segunda generación⁴⁶.

Mientras que la resistencia debida a la producción de betalactamasa está asociada a CMI altas de ampicilina (≥ 4 mg/L), la resistencia por alteraciones en la PBP3 se asocia mayoritariamente a cepas con bajas CMI de ampicilina (≤ 2 mg/L)^{46,48}. El fenotipo del mecanismo de resistencia debido a sustituciones de aminoácido en la PBP3 se conoce como «betalactamasa negativa ampicilina resistente (BLNAR)», y se caracteriza por bajos niveles de resistencia a los betalactámicos y a sus combinaciones con inhibidores de betalactamasas.

Por último, cada vez son más frecuentes las cepas BLPACR (betalactamasa positiva amoxicilina-ácido clavulánico resistente) que producen betalactamasa y poseen alteraciones en la PBP3 y se caracterizan por altos niveles de resistencia a ampicilina junto a disminución de la sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico. No se detectan diferencias en los valores de CMI para las cefalosporinas de tercera generación entre las cepas BLNAR y las cepas BLPACR.

Detección fenotípica de la resistencia

Por desgracia, no hay consenso en los puntos de corte de sensibilidad entre los diferentes comités de estandarización. Como se

observa en la tabla 5, hay grandes diferencias entre los puntos de corte de CLSI² y EUCAST⁵ para amoxicilina-ácido clavulánico y las cefalosporinas. EUCAST⁵, además de los cortes clínicos de sensibilidad, aporta puntos de corte epidemiológicos que podrían ser más eficaces a la hora de detectar cepas con bajos niveles de resistencia. El punto de corte para ampicilina propuesto tanto por CLSI² como EUCAST⁵ (≤ 1 mg/L) no es útil ya que clasificaría como sensibles a numerosas cepas BLNAR que presentan valores bajos de CMI para ampicilina (low-BLNAR), que son mayoritarias en España^{46,48}.

Numerosos autores han propuesto diferentes puntos de corte para detectar las cepas BLNAR, aunque la mayoría se inclina por valores de CMI ≥ 1 mg/L para ampicilina, mientras que valores $\leq 0,25$ mg/L descartarían cualquier mecanismo de resistencia⁴⁸. Valores de CMI $\geq 0,5$ mg/L o diámetros de inhibición ≤ 29 mm para cefixima son muy indicativos de cepas BLNAR con mutaciones en el motivo SSN que conllevan una menor sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación, que podría tener un impacto en el tratamiento de infecciones graves como meningitis.

Además del antibiograma convencional, se debe realizar siempre la prueba cromogénica de la nitrocefina para caracterizar las cepas productoras de betalactamasa (BLPAR) y se caracterizan por valores altos de CMI para ampicilina (> 4 mg/L)¹⁵. Por último, valores de CMI ≥ 2 mg/L para amoxicilina-ácido clavulánico en cepas productoras de betalactamasa nos indica con alta probabilidad un fenotipo BLPACR. Si utilizamos el método de Etest, valores de 0,5-1 mg/L también pueden detectarse en las cepas BLPACR. En cambio con valores $< 0,5$ mg/L para amoxicilina-ácido clavulánico se puede descartar la presencia de mutaciones en el gen *ftsI* por ambas metodologías (microdilución y Etest)¹⁵.

El método de difusión con discos se ha demostrado que tiene menos capacidad de discriminación entre cepas BLNAR y cepas sin modificaciones en la PBP3. Si se siguen los puntos de corte establecidos por el CLSI² para ampicilina (disco 10 μ g), la mayoría de las cepas BLNAR identificadas en nuestro país se identificarían como sensibles. Se han propuesto diferentes alternativas con mejor sensibilidad para detectar BLNAR, EUCAST⁵ propone discos de ampicilina 2 μ g (< 16 mm), cefaclor 30 μ g (< 19 mm) o fenoximetilpenicilina 10 μ g (< 15 mm). Otras propuestas publicadas incluyen la utilización de discos de amoxicilina-ácido clavulánico de baja carga (2/1 μ g), cefalotina, cefalexina, cefsulodina, etc. Desafortunadamente, aún no hay resultados concluyentes sobre un método óptimo que pueda ser utilizado por la generalidad de los laboratorios clínicos¹⁵.

Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

Las cepas productoras de betalactamasa deben informarse como resistentes a todas las penicilinas.

Las cepas BLNAR además de ser resistentes a ampicilina, tienen sensibilidad disminuida al resto de los betalactámicos, particularmente las cefalosporinas.

Según el CLSI² y EUCAST⁵, las cepas BLNAR deben informarse como resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, cefaclor, cefamandol, cefetamet, cefonicid, cefprozil, cefuroxima, loracarbef y piperacilina-tazobactam, con independencia del resultado de su sensibilidad *in vitro*.

Comentario aparte merece la utilidad clínica de las cefalosporinas orales de segunda generación como cefaclor y cefuroxima axetil independientemente si son cepas BLNAR o sin mecanismos de resistencia. Hay una disparidad de criterios entre CLSI² y EUCAST⁵ al respecto (tabla 5), aunque el CLSI² comenta que los puntos de corte que aporta para las cefalosporinas orales pueden no ser útiles para el tratamiento de los pacientes. EUCAST⁵ propone puntos de corte clínicos para cefaclor y cefuroxima oral muy por debajo al punto de corte epidemiológico (tabla 5), que en la práctica eso se traduce en informar casi todos los aislados como resistentes a cefaclor e intermedios a cefuroxima axetil. Ello equivale a diámetros del halo

Tabla 5
Puntos de corte (mg/L) para *Haemophilus influenzae* según CLSI y EUCAST

Antimicrobiano	CLSI (2010)		EUCAST (2011 v1.3)			Puntos de corte PK/PD ⁴⁶	
	S	R	S	R	ECOFF	S	R
Ampicilina	≤ 1	≥ 4	≤ 1	> 1	≤ 1	≤ 2	≥ 4
Amoxicilina	-	-	≤ 1	> 1	≤ 1	≤ 2/1-4/2	≥ 4/2-8/4
Amoxicilina-ácido clavulánico ^a	≤ 4/2	≥ 8/4	≤ 1/2	> 1/2	≤ 1	≤ 2/1-4/2	≥ 4/2-8/4
Cefaclor	≤ 8	≥ 32	≤ 0,5	> 0,5	≤ 8	≤ 0,5	≥ 1
Cefuroxima (parenteral)	≤ 4	≥ 16	≤ 1	> 2	≤ 2	≤ 4	≥ 8
Cefuroxima axetil (oral)	≤ 4	≥ 16	≤ 0,12	> 1	≤ 2	≤ 1	≥ 2
Cefixima	≤ 1	-	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,12	≤ 1	≥ 2
Cefotaxima	≤ 2	-	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,06	≤ 2	≥ 4
Ceftriaxona	≤ 2	-	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,06	≤ 2	≥ 4
Imipenem	≤ 4	-	≤ 2	> 2	≤ 2	≤ 4	≥ 8
Meropenem (meningitis)	≤ 0,5	-	≤ 0,25	> 1	≤ 0,25	-	-
Meropenem (no meningitis)	≤ 0,5	-	≤ 2	> 2	≤ 0,25	≤ 4	≥ 8
Doripenem	-	-	≤ 1	> 1	≤ 0,5	-	-
Ertapenem	≤ 0,5	-	≤ 0,5	> 0,5	≤ 0,12	≤ 1	≥ 2

^aPara EUCAST el ácido clavulánico se estudia con una concentración fija de 2 mg/L y para CLSI se estudia a la mitad de la concentración de amoxicilina. ECOFF: punto de corte epidemiológico.

de inhibición ≥ 50 mm como punto de corte de sensibilidad, aunque proponen diámetros < 19 mm con un disco de cefaclor de 30 μ g como *screening* para detectar cepas BLNAR.

Las mutaciones en el gen *ftsI* (BLNAR) provoca un aumento importante en las CMI de las cefalosporinas de tercera generación, que es variable dependiendo de las mutaciones detectadas y otros factores aún no conocidos. Desgraciadamente, no hay consenso en los puntos de corte de sensibilidad y no se conoce suficientemente el impacto clínico de estas mutaciones. En nuestro entorno, aún no son frecuentes las cepas BLNAR, y mucho menos las infecciones graves por estos aislados, por lo que no se han informado fracasos terapéuticos con las cefalosporinas de tercera generación.

Resistencia a betalactámicos en *Neisseria*

Neisseria gonorrhoeae

La penicilina ha sido la base del tratamiento durante varias décadas, pero poco después de su introducción, *N. gonorrhoeae* comenzó a desarrollar resistencia de bajo nivel a penicilina⁴⁹. Esta disminución gradual de la sensibilidad es el resultado del efecto aditivo de múltiples mutaciones cromosómicas que provocan alteración en las PBP, hiperexpresión de las bombas de expulsión y disminución de la entrada de los antibióticos a través de la membrana externa. Al menos 5 genes cromosómicos están implicados en esta resistencia: *ponA*, *penA*, *penB*, *pilQ* y *mtr*. Los genes *ponA* y *penA* codifican las PBP1 y PBP2 respectivamente, cuyas alteraciones afectan únicamente a la actividad de las penicilinas. Mutaciones en *penB* llevan a alteraciones de una porina que también causa resistencia a otras familias de antibióticos como las tetraciclinas y a una pequeña disminución de la sensibilidad a quinolonas. La hiperexpresión de la bomba de expulsión MtrCDE favorece la resistencia a penicilinas, macrólidos, rifampicina, tetraciclinas y quinolonas, y puede estar también implicada en la disminución de sensibilidad a cefalosporinas. Mutaciones en *pilQ* (antiguamente denominado *penC*, que codifica una porina) provoca la resistencia de alto nivel a penicilina en cepas con mutaciones de *penA*, *penB* y *mtr*. Así, las diferentes CMI que se observan son producto de la acción sinérgica de estos diferentes mecanismos, pudiendo provocar resistencia de alto nivel a penicilina.

Además de los mecanismos cromosómicos descritos, la penicilina puede afectarse también por una betalactamasa plasmídica de tipo TEM-1, y puede estar presente en diferentes tipos de plásmidos con una frecuencia geográfica variable. Esa resistencia se considera de alto nivel aunque su expresión *in vitro* es variable (1 a 64 mg/L), y se inhibe por ácido clavulánico, aunque generalmente no es de utilidad terapéutica. En España, alrededor del 90% de las cepas

tienen sensibilidad disminuida o resistencia a penicilina, y se detecta la presencia de penicilinas plasmídica en alrededor de un 20%.

El método de dilución en agar se considera el método de referencia para la determinación de la CMI, sin embargo el método de difusión con tiras de gradiente de antibiótico como el Etest es una alternativa aceptable para la determinación de CMI en la rutina del laboratorio. Hay coincidencia en los puntos de corte de sensibilidad para penicilina del CLSI y EUCAST ($S \leq 0,064$ mg/L; $R > 1$ mg/L).

El método de difusión con discos en cambio presenta resultados más aleatorios sobre todo a la hora de diferenciar los aislados sensibles de aquéllos con sensibilidad disminuida a la mayoría de los antibióticos pero particularmente los betalactámicos.

El antibiograma debe acompañarse además de la prueba cromogénica de nitrocefina para detectar la posible producción de betalactamasa, lo cual implicará resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas, con independencia de su resultado de sensibilidad *in vitro*, mientras que las cefalosporinas no se ven afectadas por este mecanismo¹⁵.

Neisseria meningitidis

La penicilina ha sido históricamente el tratamiento de elección, y desde los años 80 se empezaron a describir aislados con sensibilidad disminuida a penicilina (CMI de 0,12-0,25 mg/L) en todo el mundo, siendo España uno de los países con mayores tasas, superiores al 50%. El mecanismo de resistencia de este fenotipo denominado PenI se debe sobre todo a alteraciones en la PBP2 (codificado por el gen *penA*). El fenotipo afecta con mayor o menor intensidad a las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, imipenem y aztreonam, y se mantiene la actividad de las cefalosporinas de tercera generación^{50,51}.

El método de dilución en agar o la microdilución en caldo se consideran los métodos de elección, aunque también es aceptable el método de Etest o similar, mientras que el método de difusión con discos no es fiable para el estudio de sensibilidad a betalactámicos^{15,50,51}. Se observa una alta tasa de errores menores (sensible o resistente por el método de referencia o la difusión con discos pero intermedio por el otro método) cuando se usan discos de penicilina y ampicilina, incluso con discos de baja carga como penicilina 1 U o ampicilina 2 μ g. CLSI² y EUCAST⁵ proponen los mismos puntos de corte de sensibilidad para penicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona y meropenem.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Martínez-Martínez L, Calvo J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:25-31.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA2010.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20-U (June 2010 Update). Wayne, PA2010.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. Disponible en: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm_2010.pdf.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST. 2011: Available in: <http://www.eucast.org>.
- Cantón R, Alós J, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, et al. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:394-400.
- García-Rodríguez J, Cantón R, García-Sánchez J, Gómez-Lus M, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avilá C, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo J, editor. *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1ª Edición (11), 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>.
- Briñas L, Zarazaga M, Saenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. Beta-lactamasas in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3156-63.
- Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamasas and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:S53-62.
- Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, et al. Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1259-62.
- Miró E, Navarro F, Mirelis B, Sabaté M, Rivera A, Coll P, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant beta-lactamasas at a university hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3991-4.
- Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, et al. Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2368-72.
- Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:638-45.
- Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:726-36.
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. En: Cantón R, Cercenado E, editores. *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2ª Edición (38), 2011. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>.
- Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:3-10.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamasas in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:933-51.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamasas. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:969-76.
- Diestra K, Coque TM, Miro E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, et al. Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:404-10.
- Ángel-Díaz M, Ramón-Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:503-10.
- Trupia LA, Mollerach A, Di Conza JA, Radice M, Mugna V, Mendez E, et al. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:525-8.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamasas: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:657-86.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamasas. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-82.
- Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC beta-lactamasas in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:472-6.
- Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa R, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamasas in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:370-2.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemas in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:112-22.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemas: the versatile beta-lactamasas. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:440-58.
- Walsh TR. Emerging carbapenemas: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:S8-14.
- Oliver A. Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasas en los hospitales: presente y futuro. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:255-6.
- Juan Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en *Pseudomonas* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:19-28.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:597-602.
- Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol*. 2011;49:718-21.
- Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of bla_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1608-14.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:228-36.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:88-91.
- Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:102-11.
- Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1119-25.
- Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007;45:1171-8.
- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:1109-17.
- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41:S120-126.
- Martínez-Martínez L, Cano M, Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6:685-711.
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*. 2011;17:149-82.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:664-89.
- Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SEN-TRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18:414-21.
- Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:430-50.
- Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:368-89.
- Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2487-92.
- García-Cobos S, Campos J, Román F, Carrera C, Pérez-Vázquez M, Aracil B, et al. Low beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2407-14.
- Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhoea: the impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10:555-77.
- Jorgensen JH, Crawford SA, Fulcher LC, Glennen A, Harrington SM, Swenson J, et al. Multilaboratory evaluation of disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1744-54.
- Vázquez JA, Enríquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Arrea L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: any need to act? *FEMS Microbiol Rev*. 2007;31:64-70.