

Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia

Luis Martínez-Martínez

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

Las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) no sólo son resistentes a los compuestos hidrolizados por estas enzimas, sino que con frecuencia presentan mecanismos adicionales que las hacen resistentes a cefamicinas, combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas e incluso carbapenemes. Las alteraciones de la permeabilidad y la producción de betalactamasas adicionales (incluidas las enzimas tipo AmpC y carbapenemasas) suelen ser las causas de esta resistencia incrementada a betalactámicos. La disminución de la permeabilidad como causa de resistencia se ha estudiado con mayor detalle en *Klebsiella pneumoniae*, organismo en el que la pérdida de las 2 porinas principales, OmpK35 y OmpK36, causa resistencia a ceftioxitina e incremento en la resistencia a diversos betalactámicos y a otras familias de compuestos. Aunque no se conocen con detalle las causas de la pérdida de las porinas, se ha demostrado que para OmpK36 ello se relaciona con alteraciones estructurales del gen codificador, en especial su interrupción por una secuencia de inserción. Las tasas de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol también son mayores en las cepas que producen BLEE que en las que carecen de BLEE. La resistencia a quinolonas en cepas productoras de BLEE es multifactorial; intervienen en ella alteraciones en las topoisomerasas similares a las observadas en cepas sin BLEE, disminución de la permeabilidad, expresión de bombas de expulsión activa, y producción de proteínas mediadas por plásmidos de la familia Qnr (QnrA, QnrB, QnrS) o de la acetilasa AAC(6')-Ib-cr. La resistencia a aminoglucósidos suele estar relacionada con la producción de diferentes enzimas modificadoras de aminoglucósidos, codificadas por genes incluidos en integrones. También los integrones contienen genes causantes de resistencia a sulfamidas y a trimetoprim (implicados en la resistencia a cotrimoxazol) y en ocasiones a tetraciclinas.

Palabras clave: Enterobacterias. Betalactamasas de espectro extendido. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Porinas. Bombas de expulsión activa. Qnr. Topoisomerasas.

Association of ESBL with other resistance mechanisms

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing enterobacterias, in addition to being resistant to the compounds hydrolyzed by these enzymes, frequently present other mechanisms causing resistance to cephamycins, beta-lactam plus beta-lactamase inhibitor combinations and even carbapenems. The usual cause of this increased resistance to beta-lactams is altered permeability and production of additional beta-lactamases (including AmpC-type enzymes and carbapenemasas). Decreased permeability as a cause of resistance has been studied in greatest detail in *Klebsiella pneumoniae*. In this species, simultaneous loss of the two major porins, namely OmpK35 and OmpK36, leads to ceftioxin resistance and increased resistance to several beta-lactams and other families of antimicrobial agents. Although the precise mechanisms involved in porin loss are poorly characterized, for OmpK36 this loss has been demonstrated to be related to structural alterations in the corresponding encoding gene, particularly interruption by insertion sequences. Resistance to quinolones, aminoglycosides and co-trimoxazole is also more common among ESBL-producing strains than in strains lacking these enzymes. Resistance to quinolones is multifactorial and is dependent on topoisomerase alterations similar to those found in organisms lacking ESBLs, decreased permeability, increased efflux, and production of plasmid-mediated proteins of the Qnr family (QnrA, QnrB, QnrS), and AAC(6')-Ib-cr acetylase. Resistance to aminoglycosides is usually related to the production of distinct aminoglycoside-modifying enzymes encoded by integron-borne genes. Integrons also contain genes coding for resistance to sulfamides and trimethoprim (involved in co-trimoxazole resistance) and sometimes tetracycline resistance genes.

Key words: Enterobacteria. Extended-spectrum beta-lactamases. Aminoglycoside-modifying enzymes. Porins. Efflux pumps. Qnr. Topoisomerases.

Introducción

Las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) suponen un grave problema terapéutico porque además de ser resistentes a la gran mayoría de be-

Correspondencia: Dr. L. Martínez Martínez.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
Ayda. Marqués de Valdecilla, s/n. 39008 Santander. España.
Correo electrónico: lmartinez@humv.es

TABLA 1. Actividad in vitro de varios antimicrobianos frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE en España*

Antimicrobiano	<i>E. coli</i> (n=170)		<i>K. pneumoniae</i> (n = 70)	
	CIM ₉₀ (µg/l)	Cepas sensibles, %	CIM ₉₀ (µg/l)	Cepas sensibles, %
Cefoxitina	16	76,5	8	94
Cefotetan	2	98	0,5	98,5
Amoxicilina-ácido clavulánico	32/16	69	32/16	40
Piperacilina-tazobactam	128/4	85/4	> 1.024/4	74/4
Imipenem	0,125	100	0,25	100
Meropenem	≤ 0,06	100	≤ 0,06	100
Amicacina	2	93,5	16	91
Gentamicina	1	66	> 128	33
Tobramicina	1	65	32	38,5
Ciprofloxacino	4	37,5	2	88,5
Cotrimoxazol	304/16	25	608/32	40

BLEE: betalactamasas de espectro extendido; CIM₉₀: concentración mínima inhibitoria del 90%.*Adaptado de Hernández et al².

talactámicos presentan altas tasas de resistencia a antimicrobianos de otras familias¹.

A título orientativo, en la tabla 1 se recogen de forma resumida los datos de actividad *in vitro* procedentes de un estudio multicéntrico en España (en el que participaron 40 hospitales) sobre *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE^{2,3}. Como puede observarse, la totalidad de las cepas evaluadas fueron sensibles a los 2 carbapenemes estudiados y más del 90% lo fueron también a amicacina. Puede observarse que algunas cepas de *K. pneumoniae* y casi la cuarta parte de las de *E. coli* eran resistentes a cefoxitina. Queda también patente el alto grado de resistencia a otros aminoglucósidos (más en *K. pneumoniae*), quinolonas (más en *E. coli*) y cotrimoxazol. Desde el punto de vista cualitativo, estos resultados no difieren significativamente de lo que se ha descrito en estudios similares⁴⁻⁶.

Otros trabajos, en los que directamente se han comparado las tasas de sensibilidad o de resistencia de cepas que producen y que no producen BLEE, confirman la idea que las cepas productoras son más resistentes a diversos grupos de antimicrobianos que las cepas sensibles. Este hecho queda patente en las tablas 2, 3 y 4, donde se recoge información de nuestro país y de otras zonas geográficas^{2,4-6}.

Las causas de estas altas tasas de resistencia son múltiples, tanto desde el punto de vista bioquímico como gené-

tico. Los mecanismos implicados pueden ser consecuencia de mutaciones o de reorganizaciones cromosómicas (alteraciones de la permeabilidad, producción de enzimas de codificación cromosómica) o de la presencia de otros genes de resistencia incluidos en el plásmido que codifica la BLEE, o incluso en otros plásmidos que se encuentren en el mismo microorganismo. Con cierta frecuencia estos genes vehiculados por plásmidos se encuentran en transposones e integrones.

Alteraciones de la permeabilidad y resistencia a betalactámicos

La cefoxitina y otras cefamicinas no son hidrolizadas por las BLEE, por lo que, en teoría, estos compuestos representarían una opción para el tratamiento de las infecciones producidas por cepas que producen estas enzimas¹. Sin embargo, varios estudios han demostrado que, en *K. pneumoniae*, la cefoxitina puede seleccionar (tanto in vivo como in vitro) mutantes resistentes que carecen de las 2 porinas principales⁷.

Las porinas son proteínas triméricas de la membrana externa de los bacilos gramnegativos, con estructura de láminas beta, que forman canales para la penetración inespecífica de compuestos hidrófilos (incluidos muchos

TABLA 2. Actividad in vitro de varios antimicrobianos frente a cepas de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE en el estudio SMART en España*

Especie, n	% de cepas sensibles				
	Piperacilina-Tazobactam	Amicacina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Cefoxitina
<i>Klebsiella</i> spp.					
BLEE, 12	25,0	91,7	50,0	50	91,7
No BLEE, 141	95,7	100	97,9	94,3	95,7
<i>Escherichia coli</i>					
BLEE, 37	83,8	94,6	83,8	59,5	81,1
No BLEE, 534	96,1	99,8	92,9	79,6	94,6
<i>Enterobacter</i> spp.					
BLEE, 5	40,0	100	80,0	80,0	0
No BLEE, 92	81,5	100	100	94,6	9,8

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

*Adaptado de Baquero et al⁴.

TABLA 3. Actividad in vitro de varios antimicrobianos frente a cepas de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE en el estudio SMART a nivel mundial*

Especie, n	% de cepas sensibles				
	Piperacilina-Tazobactam	Amicacina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Cefoxitina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
BLEE, 101	37,6	69,3	30,7	44,6	59,4
No BLEE, 598	95,0	99,2	96,3	91,1	90,1
<i>Escherichia coli</i>					
BLEE, 235	78,7	84,3	37,9	31,1	62,2
No BLEE, 2.385	96,8	99,0	90,9	82,4	93,5
<i>Enterobacter cloacae</i>					
BLEE, 55	30,9	69,1	34,6	41,8	3,6
No BLEE, 285	80,4	98,6	94,0	91,2	7,0
<i>E. aerogenes</i>					
BLEE, 9	66,7	77,8	4,4	33,3	5,9
No BLEE, 69	80,9	100	92,7	89,7	11,1

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

*Adaptado de Paterson et al⁵.

antimicrobianos)⁸. En la cepa de laboratorio de *E. coli* K-12 se han descrito dos porinas principales OmpF y OmpC, de las que en *K. pneumoniae* se conocen sendos homólogos, OmpK35 y OmpK36, respectivamente^{9,10}. En *Salmonella enterica* (con excepción del serovar Typhi) y en *Enterobacter* hay una porina adicional, OmpD, con propiedades similares a OmpF y OmpC. Por el contrario, en *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella morganii* parece que sólo se produce una porina principal, aunque realmente hay muy pocos estudios con estos últimos microorganismos¹¹.

Las enterobacterias poseen, además, poros específicos como LamB (para maltosa y derivados) y PhoE (específica para fosfato), cuyo papel en la resistencia no se conoce con suficiente detalle. Se ha descrito que PhoE podría estar relacionada con la resistencia de *K. pneumoniae* a carbapenem¹². LamB se expresa en medio Mueller-Hinton (con al-

midón, un polímero de la maltosa), pero se desconoce si esa expresión tiene alguna influencia en el grado de resistencia que se observa en comparación con otros medios donde esa porina específica no es aparente.

Muchas enterobacterias contienen también genes que codifican porinas menores (NmpC y OmpN de *E. coli*, OmpK37 de *K. pneumoniae*...) ^{13,14}. Estos genes están sometidos a un estricto control, por lo que las correspondientes proteínas no se expresan, o lo hacen en tan bajo grado que no suelen detectarse cuando el microorganismo crece en las condiciones habituales de laboratorio. Su papel en la resistencia también es poco conocido.

El microorganismo en el que mejor se ha estudiado la contribución de la pérdida de las porinas a la resistencia es *K. pneumoniae*. En las cepas en las que no existen mecanismos adicionales de resistencia, la pérdida aislada de las dos porinas OmpK35 y OmpK36 no aumenta la resis-

TABLA 4. Actividad in vitro de varios antimicrobianos frente a cepas de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE en el estudio SENTRY a nivel mundial*

Especie, n	% de cepas sensibles				
	Piperacilina-Tazobactam	Amicacina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Cefoxitina
<i>Klebsiella</i> spp.					
BLEE, 92	40	89	16	49	30
No BLEE, 158	99	99	97	97	91
CXM-R, 16	74	75	50	63	63
<i>Escherichia coli</i>					
BLEE, 70	71	86	14	16	11
No BLEE, 535	99	100	96	93	71
CXM-R, 40	73	100	40	20	28
<i>Enterobacter</i> spp.					
BLEE, 47	43	94	43	68	36
CXM-NR, 24	100	100	100	100	100
CXM-R, 52	71	94	85	85	75
<i>Proteus</i> spp.					
BLEE, 40	90	98	15	10	5
CXM-NR, 41	100	100	85	83	66
CXM-R, 20	100	95	70	60	25
<i>Global</i> ^a					
BLEE, 312	60	89	25	41	30
CXM-NR, 929	99	99,9	91	92	77
CXM-R, 287	85	96	68	65	595

*Adaptado de Schwaber et al⁶.^aNo se incluyen en la tabla datos referidos a *Providencia* sp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. o *Morganella* sp.

TABLA 5. CIM (µg/l) de betalactámicos frente a dos pares de cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE que expresan o no porinas

Cepa	BLEE	OmpK35	OmpK36	Cefoxitina	Cefotaxima	Imipenem	Meropenem
LB3	SHV-5	—	+	4	4	0,25	NE
LB4	SHV-5	—	—	128	64	0,25	NE
CSUB10S	SHV-2	—	+	2	4	0,125	0,03
CSUB10R	SHV-2	—	—	128	512	0,5	4

BLEE: betalactamasas de espectro extendido; CIM: concentración mínima inhibitoria; NE: no evaluado.

tencia a betalactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas o cloranfenicol, como tampoco ocurre si se pierde la cápsula o el antígeno O del lipopolisacárido¹⁵. Si la cepa expresa una betalactamasa eficiente y se pierden las 2 porinas simultáneamente, aumentan las concentraciones inhibitorias mínimas [CIM] de betalactámicos, pero no de otros compuestos^{7,15}.

Las cepas de *K. pneumoniae* que no producen BLEE suelen expresar tanto OmpK35 como OmpK36, pero las cepas que producen BLEE habitualmente expresan una sola porina (con frecuencia OmpK36)¹⁰. Se ha sugerido que la ausencia de OmpK35 en estas cepas puede ser uno de los factores que contribuyan a la mayor resistencia de las cepas BLEE a antimicrobianos no betalactámicos y a favorecer la selección de mecanismos adicionales de resistencia, en particular a la pérdida completa de porinas.

La pérdida (o la modificación) de las porinas en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE causan resistencia a cefoxitina y contribuyen al aumento de la resistencia a otros betalactámicos (tabla 5)⁷. Indirectamente, este mecanismo también contribuye a una mayor resistencia a fluoroquinolonas. No está claro si la pérdida de porinas también es la causa de la resistencia a otra cefamicina, cefotetan. En un estudio in vitro con 12 cepas de *K. pneumoniae* deficientes en OmpK35 y OmpK36 y productoras de BLEE, para las que la CIM de cefoxitina fue ≥ 32 µg/l en todos los casos, las CIM de cefotetan fueron ≤ 16 µg/l para 11 de ellas¹⁶.

Al expresar la porina OmpK36 en cepas de *K. pneumoniae* BLEE positivas deficientes en las dos porinas principales (mediante la introducción de un plásmido que contiene el gen correspondiente), se revierte la resistencia a cefoxitina y se disminuye la resistencia a oximino-cefalosporinas (tabla 6). Ocurre algo similar al expresar, con la misma metodología, la porina OmpK35, y en ese caso las reducciones observadas fueron incluso mayores que las obtenidas con la expresión de OmpK36 (tabla 6): entre 4 y 8 veces para cefepima, cefotetan, cefotaxima y cef-

triaxona, y hasta 128 veces para ceftazidima. La producción de OmpK35 en una cepa que ya expresa OmpK36 sólo disminuye, a lo sumo, la CIM de los betalactámicos una dilución, si se toma como referencia los valores que corresponderían a la cepa que sólo produce OmpK35^{17,18}. Esto hace pensar que (al menos en *K. pneumoniae*) la producción de una de las 2 porinas es suficiente para asegurar la penetración de betalactámicos (y, presumiblemente, de otros compuestos) y que, como se había inferido inicialmente, la resistencia a cefoxitina y el aumento de la resistencia a oximino-cefalosporinas requiere la pérdida simultánea tanto de OmpK35 como de OmpK36 (tabla 3).

Los carbapenemes son activos frente a las cepas productoras de BLEE, incluso en la gran mayoría de los casos, frente a las que carecen de porinas, y para muchos autores son el tratamiento de elección en infecciones graves por cepas BLEE positivas.

Estudios in vitro en *K. pneumoniae* sugieren que la pérdida de las porinas apenas si tiene algún efecto en la actividad de imipenem, pero afecta moderadamente a la de meropenem. Aún así, como en términos cuantitativos el efecto sobre meropenem es pequeño, las CIM de este carbapenem suelen seguir por debajo del punto de corte de resistencia. Se ha descrito una cepa clínica de *K. pneumoniae* productora de SHV-2 y deficiente en OmpK35 y OmpK36 para la que las CIM de imipenem y de meropenem fueron, respectivamente, de 8 y 16 µg/l. También en cepas deficientes en porinas en las que se introdujo un plásmido que codifica SHV-2 se ha visto una disminución de la actividad in vitro de imipenem y meropenem (en particular, al emplear un inóculo elevado, de 10^7 ufc/ml)¹⁷. Estudios más recientes sugieren que la pérdida de las porinas puede afectar a la actividad in vitro de ertapenem, pero aún se dispone de poca información al respecto y se desconoce el potencial de este compuesto para seleccionar mutantes deficientes en porinas. Es posible que las cepas sin porinas productoras de BLEE y resistentes a er-

TABLA 6. CIM (µg/l) de betalactámicos frente a cepas clínicas y de laboratorio de *Klebsiella pneumoniae* con diferente expresión de OmpK35 y OmpK36

Cepa	Porina	Cefoxitina	Cefotaxima	Imipenem	Meropenem
CSUB10S	OmpK36	2	4	0,125	0,03
CSUB10R	Ninguna	128	512	0,5	4
CSUB10R pSHA25	OmpK36	2	4	0,25	0,03
CSUB10R pSHA16	OmpK35	1	0,5	0,125	0,03
CSUB10S pSHA16	OmpK35	1	1	0,125	0,03
	OmpK36				

BLEE: betalactamasas de espectro extendido; CIM: concentración inhibitoria mínima.

tapenem contengan otros mecanismos de resistencia que aún no han sido definidos con precisión. En cepas de laboratorio sin porinas en las que se expresaron diferentes BLEE (diversas enzimas SHV, algunas enzimas TEM o CTX-M-5 o CTX-M-14), se ha comprobado¹⁹ que las CIM de ertapenem oscilaron entre 4 y 16 µg/l. También se han descrito algunas cepas clínicas de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem, en particular en pacientes que han sido tratados previamente con este compuesto; estas cepas son deficientes en porinas y expresan enzimas del grupo CTX-M-1^{20,21}. Aunque en estos casos las CIM de otros carbapenemes son más bajas, se está planteando, a pesar de ello, cierta controversia sobre el uso de ertapenem para el tratamiento de las infecciones por cepas productoras de BLEE.

Algunos autores opinan que este compuesto ejercería menor presión selectiva sobre *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* (dada su escasa actividad frente a estos no fermentadores), pero otros consideran que el compuesto, precisamente por esa menor actividad, podría activar mecanismos de resistencia que finalmente afectarían también a otros carbapenemes.

La sobreexpresión de OmpK37 en una cepa de *K. pneumoniae* deficiente en OmpK35 y OmpK36 disminuye las CIM tanto de imipenem como de meropenem, pero como esta proteína se expresa en cantidades mínimas o indetectables en condiciones naturales, resulta complejo conocer cuál es su verdadera importancia en la resistencia del microorganismo a los dos carbapenemes¹⁴.

Los mecanismos genéticos implicados en la pérdida de porinas no han sido aclarados completamente. En *E. coli* el gen *marA* causa simultáneamente una pérdida de OmpF y un incremento en la expresión de la bomba de expulsión activa AcrAB-TolC²². Muchas enterobacterias poseen un análogo de *marA* y genes similares a los que regulan su expresión en *E. coli*²³. Además, la pérdida de la porina OmpK36 en *K. pneumoniae* se relaciona con la interrupción del correspondiente gen por una secuencia de inserción, y con menor frecuencia por mutaciones puntuales o deleciones en OmpK36²⁴.

A diferencia de lo que se sabe en relación con las alteraciones de la permeabilidad por pérdida de porinas en *K. pneumoniae* productoras de BLEE, disponemos de muy poca información sobre cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE. Esta situación puede parecer un tanto paradójica, porque sí se conocen con detalle aspectos estructurales, funcionales y de regulación de las porinas en la cepa de laboratorio *E. coli* K-12.

El consenso habitualmente aceptado es que la pérdida de OmpF y OmpC en cepas de *E. coli* aumenta el grado de resistencia a betalactámicos cuando existe una betalactamasa eficiente, como se ha demostrado para *K. pneumoniae*^{25,26}. Sin embargo, los perfiles de porinas de las cepas clínicas de *E. coli* que producen BLEE sólo son similares a los de la cepa K-12 en una minoría de casos²⁷, y además en esta especie, la resistencia a cefoxitina no guarda una buena relación con el patrón de porinas, probablemente porque en ese fenotipo intervienen directamente otros mecanismos (AmpC cromosómica, bombas de expulsión activa) que hasta ahora no han sido adecuadamente explorados.

La importancia de las alteraciones de la permeabilidad en otras enterobacterias que producen BLEE (*Enterobacter*,

Serratia) no se ha estudiado con suficiente detalle hasta ahora. Es de esperar que la situación sea similar a la que se ha descrito para *K. pneumoniae* y *E. coli*, y para cepas de la misma especie que carecen de BLEE.

Otros mecanismos implicados en la resistencia a betalactámicos

El fenotipo de resistencia causado por BLEE puede estar enmascarado por la expresión de otras betalactamasas en la misma cepa. Ello no sólo tiene implicaciones terapéuticas, sino que también puede interferir con la detección de BLEE en el laboratorio, incluso cuando se utilizan métodos de referencia²⁸.

Las tasas de resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y a piperacilina-tazobactam en enterobacterias productoras de BLEE han sido muy diversas, aunque en la práctica totalidad de los estudios realizados siempre se ha reconocido un número significativo de cepas resistentes. Es posible que algunas de estas diferencias se deban, más allá de mecanismos adicionales, al propio tipo de BLEE. Por ejemplo, las enzimas de la familia CTX-M se suelen inhibir más fácilmente con tazobactam que con ácido clavulánico, y por ello en este grupo en concreto las tasas de resistencia a piperacilina-tazobactam suelen ser menores que las de amoxicilina-ácido clavulánico¹.

En un estudio de 1994²⁹ sobre cepas de *K. pneumoniae* aisladas en unidades de cuidados intensivos de hospitales europeos productoras de BLEE, la tasa de resistencia a piperacilina-tazobactam alcanzó el 30% (aunque con importantes variaciones geográficas). Esta tasa creció hasta el 61% cuando el estudio se repitió en 1997-1998³⁰. Los autores sugieren la posibilidad de que esta resistencia se relacione con la existencia de BLEE que se inhiben poco por tazobactam, o por la coexistencia de mecanismos adicionales. La práctica totalidad de las de *K. pneumoniae* productoras de BLEE expresan SHV-1 o un enzima relacionada, y muchas cepas de *E. coli* productoras de BLEE producen además TEM-1. La hiperproducción de estas enzimas (a veces en asociación con alteraciones de la permeabilidad) puede ocasionar resistencia a combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas³¹, pero realmente, el papel relativo de cada una de estas posibilidades no se conoce con precisión.

Existen múltiples estudios sobre la producción de BLEE en enterobacterias que contienen una AmpC cromosómica desreprimible. Esta situación se ha descrito en *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*.

La producción de BLEE compromete la utilidad clínica de cefepima, que en muchos casos presenta buena actividad in vitro frente a cepas similares que carecen de BLEE. La hiperproducción de AmpC en esos casos también enmascara la detección de la BLEE empleando la metodología habitual, basada en el empleo de discos de cefotaxima y ceftazidima con y sin ácido clavulánico, por lo que muchos autores sugieren el empleo de cefepima, con y sin ácido clavulánico, para detectar el fenotipo BLEE. La pérdida de porinas en estas cepas acaba por ocasionar fenotipos de resistencia cuyas bases no llegan a establecerse con facilidad en las condiciones habituales de trabajo del laboratorio clínico.

Tomando como prototipo de esta situación a *Enterobacter*, en esta especie se han descrito muy diversos tipos de BLEE, tanto de la familia TEM como de la SHV y de la CTX-M. En varios países europeos (incluida España) se han identificado cepas epidémicas de *E. aerogenes* productoras de enzimas tipo TEM, en particular TEM-24^{32,34}. Se han descrito también en nuestro país cepas de *Enterobacter* productoras de TEM-27, SHV-12 y de CTX-M-10³⁵ (datos personales no publicados).

Las betalactamasas plasmídicas de clase C se han descrito fundamentalmente en *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. enterica* y *E. coli*, pero también en algunas cepas que poseen la variante cromosómica de AmpC (*Enterobacter*...) ³⁶. Como la mayoría de estas cepas con AmpC plasmídica no posee el gen regulador *ampR*, la expresión de la enzima es similar a la que tiene lugar en la desrepresión de AmpC cromosómica. Cuando la expresión de la enzima AmpC plasmídica coincide en el mismo microorganismo con la de una BLEE, el fenotipo obtenido es complejo, y afecta a la práctica totalidad de los betalactámicos, incluidos, en ocasiones, los carbapenemes. Este fenotipo puede recordar al de la asociación de BLEE con una pérdida de permeabilidad de la membrana externa. Es difícil diferenciar ambas situaciones atendiendo sólo a la actividad de antimicrobianos, pero se han propuesto diversos métodos en los que el empleo de inhibidores de AmpC (cloxacilina, derivados del ácido borónico) facilita el reconocimiento de la BLEE^{16,37,38}.

Se conocen, igualmente, cepas productoras que combinan la producción de BLEE y de carbapenemasas de clases A o B (GES-3 y SHV-12, GES-7 más VIM-2; IBC-1 más VIM-2). Como ejemplo de la complejidad que puede suponer el estudio de las betalactamasas en aislados clínicos, se han descrito recientemente en un hospital de Túnez cepas de *K. pneumoniae* que producen simultáneamente CTX-M-15, TEM-1, SHV-1, la enzima de clase C CMY-4 y la metalobetalactamasa VIM-4. Los microorganismos eran resistentes a todos los betalactámicos, incluido imipenem, y tenían una sensibilidad disminuida a meropenem (CIM de 2 mg/l). Además VIM-4 formaba parte de un integrón que también contenía genes de resistencia a aminoglucósidos y trimetoprim³⁹.

Resistencia a quinolonas

Múltiples estudios, incluidos los ya reseñados con anterioridad, han indicado que las cepas productoras de BLEE son, con más frecuencia, resistentes a quinolonas que las que carecen de estas enzimas. En otro estudio publicado en 2000 sobre bacteriemia por *K. pneumoniae* en 12 hospitales de 7 países, un 5,5% (25/452) de los casos estuvo producido por cepas resistentes a ciprofloxacino, y de ellas el 60% producía una BLEE, frente a un 16% de cepas sensibles a ciprofloxacino que expresaban BLEE; en conjunto, el 18% de las cepas evaluadas productoras de BLEE eran resistentes a ciprofloxacino⁴⁰. Igualmente, en un estudio en 15 hospitales de Brooklyn, EE.UU., sobre enterobacterias productoras de BLEE, las tasas de resistencia a quinolonas fueron del 50% para *K. pneumoniae*, del 5% para *E. coli* y del 11% para *P. mirabilis*⁴¹. En Israel, la resistencia a ciprofloxacino en 312 cepas de enterobacterias

productoras de BLEE fue del 59%, en comparación con cifras del 8 al 35% para cepas no productoras de estas enzimas. Estas cifras fueron aún más llamativas para *E. coli* y *P. mirabilis*, donde la tasa de resistencia entre las cepas productoras de BLEE fue de 84 y el 90%, respectivamente⁶.

La resistencia a quinolonas en cepas productoras de BLEE puede estar en relación con el tipo de enzima considerada y con el microorganismo que alberga la enzima. En un reciente estudio en Italia sobre betalactamasas de la familia CTX-M, la resistencia a ciprofloxacino en cepas de *E. coli* que producían CTX-M-1 (35), CTX-M-15 (64) y CTX-M-32 (4) fueron del 46, el 98 y el 100%, respectivamente, mientras que todas las cepas de *K. pneumoniae* evaluadas (3 con CTX-M-1, 5 con CTX-M-15 y 2 con CTX-M-32) fueron sensibles a ciprofloxacino⁴².

Otro hallazgo interesante deriva de los resultados de un estudio multicéntrico francés sobre cepas productoras de BLEE. En él, el 73,8 y el 66,2% de las cepas de *E. coli* que producen CTX-M eran resistentes a ácido nalidíxico y ciprofloxacino, respectivamente, frente al 51,1 y el 42,6% de resistencia para estos dos agentes en cepas que producían BLEE de las familias TEM o SHV⁴³.

Es posible, incluso, que la asociación entre producción de BLEE y la existencia de mecanismos de resistencia a quinolonas sea aún mayor de la que se ha publicado, pues en muchos estudios la definición de resistencia a fluoroquinolonas se realiza siguiendo los criterios del CLSI, que establece puntos de corte excesivamente altos, que dificultan el reconocimiento de cepas con una única mutación en *gyrA* o con un mecanismo de bajo grado de resistencia mediado por plásmidos. Por ejemplo, en Bélgica se han descrito cepas de *Salmonella enterica* serovar. Virchow que producen CTX-M-2 y, en todos los casos, sensibilidad reducida a ciprofloxacino, con CIM de este compuesto entre 0,5 y 1 µg/l⁴⁴.

La expresión de OmpK35 o, en menor medida, de OmpK36 en *K. pneumoniae* productora de BLEE y deficiente en ambas porinas disminuye la CIM de fluoroquinolonas (así como de tetraciclinas y cloranfenicol)^{17,18}. Esta observación se realizó en cepas que, además, tenían alteraciones en el gen *gyrA* y era mucho más manifiesta para las quinolonas menos activas (con muy poca repercusión sobre clinafloxacino), por lo que, como para otras situaciones, la pérdida de las porinas contribuye más a la resistencia a quinolonas cuando el microorganismo posee mecanismos adicionales de resistencia.

Las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE eliminan activamente quinolonas con más frecuencia que las cepas que carecen de estas enzimas⁴⁵. En este mismo sentido, el mecanismo de eliminación activa también es más frecuente en cepas completamente deficientes en porinas (el 70% de las cepas) que en las cepas que expresan porinas (9,3%). Como las cepas sin porinas casi sólo se reconocen entre cepas BLEE, una de las explicaciones de la mayor tasa de resistencia a quinolonas en estas cepas es la frecuente asociación en éstas de alteraciones de la permeabilidad y de expresión de bombas de expulsión activa.

En 1998 se describió una cepa de *K. pneumoniae* aislada en EE.UU. con un plásmido que contiene el gen *qnrA*⁴⁶, implicado en resistencia de grado bajo a quinolonas por un mecanismo de protección de la diana. Este hallazgo ofreció una nueva explicación a la corresponsabilidad entre betalactámicos y quinolonas en enterobacterias. El gen *qnrA* se ha

descrito en varios entornos genéticos, pero en general, se encuentra asociado al elemento ISCR1 (previamente conocido como *orf513*) formando parte de un integrón complejo, que también puede contener otros genes de resistencia. El aislamiento inicial de *K. pneumoniae* con *qnrA* producía la betalactamasa plasmídica FOX-5, y con posterioridad se identificaron algunas otras cepas que también expresaban simultáneamente *qnrA* y una betalactamasa plasmídica de clase C. Poco después se comprobó la presencia del gen en cepas productoras de BLEE; desde entonces se han descrito cepas productoras de BLEE y *QnrA* en múltiples localizaciones geográficas. Esta asociación se ha descrito para las familias SHV (SHV-5, SHV-7, SHV-12) y CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14), en diferentes especies, incluidas *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae* y *Salmonella enterica*⁴²⁻⁵⁶. También se ha encontrado una asociación entre *QnrA* y VEB-1 en distintas especies de enterobacterias con integrones de clase 1 procedentes del Sudeste asiático, Europa y América del Norte^{55,57}. Globalmente, al evaluar la presencia de *QnrA* en cepas productoras de BLEE se han observado grandes diferencias, desde menos del 1% en España hasta el 4% en un hospital de París, e incluso un 48% en cepas del Sudeste asiático.

Se han descrito varios alelos de *qnrA*, y otros 2 genes, *qnrS* y *qnrB* (también con distintas variantes), que codifican proteínas relacionadas con *QnrA*, que también son capaces de ocasionar resistencia plasmídica a quinolonas de bajo nivel.

El gen *qnrB* se descubrió en una cepa de *K. pneumoniae* de la India que producía CTX-M-15, y también se ha identificado en este mismo país en cepas clínicas de la misma especie que producían SHV-12, y en cepas de *Citrobacter koseri*, *E. cloacae*, y *E. coli* procedentes de EE.UU. productoras de SHV-12⁵⁸. En otro estudio reciente, se han identificado varias cepas de *S. enterica* que contienen plásmidos conjugativos con variantes de *qnrB*; en una de las cepas (serovar Mbandaka) el plásmido también codificaba SHV-30⁵⁹. Los genes *qnrB* también son plasmídicos, asociados con frecuencia a *Orf1005*, y a veces a *Orf513* y a otros genes de origen cromosómico de función no determinada.

El gen *qnrS* se identificó inicialmente en una cepa de *Shigella flexneri* que no produce BLEE. Con posterioridad se ha descrito en otras enterobacterias, en particular en *E. cloacae*, en España, que ocasionalmente producen SHV-12⁶⁰.

En cepas de *E. coli* procedentes de Shangai se ha descrito una acetilasa, codificada por el gen *aac(6')-Ib-cr*, que causa resistencia de grado bajo a las quinolonas que contienen un grupo piperacínico (ciprofloxacino, norfloxacino), así como a algunos aminoglucósidos (kanamicina, tobramicina, amikacina)⁶¹. El gen en cuestión es una variante poco frecuente (hasta donde se sabe) de *aac(6')-Ib*, del que se diferencia en tan sólo dos bases. El gen que codifica esta acetilasa especial también se ha identificado en EE.UU., donde se ha detectado en un 28% de 313 cepas de enterobacterias resistentes a ceftazidima⁶², y en Portugal, en cepas de *E. coli* que producen CTX-M-15 (junto con OXA-1 y TEM-1)⁶³.

Resistencia a aminoglucósidos

Como en el caso de las quinolonas, las cepas productoras de BLEE son con más frecuencia resistentes a aminoglucósidos que las cepas no productoras. Como puede

apreciarse en las tablas 1 a 4, las tasas de resistencia suelen ser menores a amikacina que a otros aminoglucósidos de uso clínico habitual.

Ya se ha comentado la importancia del gen *aac(6')-Ib-cr* en la resistencia combinada a aminoglucósidos y a quinolonas. En otros estudios se ha evaluado también la presencia de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) en cepas BLEE, aunque el número de publicaciones sobre este tema es comparativamente mucho menor que el referido al de las bases genéticas de la producción de BLEE.

Uno de los primeros estudios sobre EMA en cepas productoras de BLEE se realizó en España en 1992⁶⁴ con cepas procedentes de dos centros hospitalarios de Madrid. Empleando una metodología basada en el análisis fenotípico y en el ensayo de detección de la modificación del aminoglucósido con un soporte de fosfoceulosa, se observó una tasa alta de resistencia a aminoglucósidos: el 84% para gentamicina y tobramicina, el 78% para netilmicina, el 65% para estreptomina y kanamicina, el 57% para espectinomina y el 19% para amikacina. Entre las 78 cepas productoras de SHV-2 se detectaron EMA en el 98,7%; las enzimas más prevalentes fueron AAC(3)-II, APH(3''), AAD(3''), AAC(6')-I y AAC(3)-V. Las 42 cepas productoras de enzimas TEM producían EMA; las más frecuentes fueron AAC(3)-II, APH(3''), AAD(3''), APH(3')-I, AAC(3)-V y AAD(2''). La mayoría de estas enzimas se cotransferían con la BLEE en ensayos de conjugación o transformación.

Sin embargo, y con posterioridad, en muchos estudios, el análisis de las EMA en cepas BLEE positivas se ha realizado de un modo indirecto, determinando la presencia de integrones que, con frecuencia, son los vehículos de los genes que codifican este tipo de enzimas. Siguiendo esta aproximación, se ha descrito en Australia que el 65% de 50 cepas de *Klebsiella* spp. productoras de SHV-12 contenían el gen *aadB* (resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina), y en un 61% de ellas (40% del total de cepas evaluadas) también se detectaba *aadA2* (resistencia a estreptomina y espectinomina)⁶⁵. Este hallazgo es similar al observado en Holanda, donde en cepas de *K. pneumoniae* productoras de SHV-5 se detectaron los genes *aadB* (83%) y *aadA2* (27%)⁶⁶. Los plásmidos implicados en la diseminación de estas resistencias contienen, con frecuencia, copias de la secuencia de inserción IS26 por delante del gen SHV, por lo que tal vez este elemento móvil está implicado en la creación de islas de resistencia en las que se facilita la integración de genes de resistencia.

En otro estudio en Chile con cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, las tasas de resistencia a amikacina y gentamicina fueron del 65 y el 47%, respectivamente, y los principales genes encontrados fueron los que codifican AAC(6')-Ib (69%) y AAC(3)-IIa (36%), y en menor medida ANT(3'')-Ia, APH(3')-Ia⁶⁷.

Se han descrito metilasas que producen una metilación postranscripcional del ARNr, causante de una disminución de la afinidad por la diana de los aminoglucósidos del grupo de las deoxiestreptaminas con sustituciones 4,6 (arbecacina, amikacina, tobramicina y gentamicina). Algunas cepas de *E. coli* y de *K. pneumoniae* productoras de BLEE de la familia CTX-M poseen genes *armA* o *rmtB*, que codifican estas metilasas^{68,69}.

En un estudio con 34 cepas de enterobacterias procedentes de diferentes países con un fenotipo compatible con

la producción de CTX-M, se detectó *armA* en 12 casos, siempre en relación con CTX-M-3 codificadas por plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncL/M. El gen formaba parte de un transposón Tn1548 que también contenía genes de resistencia para estreptomicina-espectinomicina [*ant(3'')*9], sulfamidas (*sul1*) y trimetoprim (*dfrXII*)⁷⁰. Esta asociación entre CTX-M-3 y la presencia de *armA* en plásmidos IncL/M también se ha observado en otro estudio en Bélgica, en el que se evaluaron cepas de enterobacterias con un grado alto de resistencia a gentamicina, tobramicina y ampicacina⁷¹.

En un estudio en Corea del Sur sobre bacterias gram-negativas resistentes a ampicacina o arbecacina se detectó *armA* en 14 cepas de *K. pneumoniae* y en otras 10 cepas de enterobacterias, y el gen *rmtB* en una cepa de *K. pneumoniae*. En la mayoría de estas cepas (19/24) la prueba del doble disco para detección de BLEE fue positiva⁶⁹; muchas de las cepas eran resistentes a quinolonas y producían también una betalactamasa de clase C.

Resistencia a otros antimicrobianos

Los elementos móviles que codifican BLEE también pueden contener genes de resistencia para, entre otros, cotrimoxazol y tetraciclinas.

Los integrones de clase 1 de las cepas BLEE positivas incluyen un gen de resistencia a sulfamidas en su región común, y además pueden portar diferentes genes de resistencia a trimetoprim. Se ha realizado un estudio en Madrid⁷² en el que se evaluó la presencia de integrones en cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas durante un período de 12 años, así como en cepas no productoras de BLEE y en cepas aisladas de voluntarios sanos. Se identificaron integrones de clase 1 en el 60% de las cepas clínicas de BLEE, en el 40% de las cepas no BLEE y en el 26% de las cepas obtenidas de voluntarios. Por lo que se refiere a integrones de clase 2, se identificaron en el 13, el 12 y el 18% de esos mismos grupos de cepas. Se consiguió la transferencia del integrón junto con el gen que codificaba la BLEE en cepas con integrones de clase 1 y CTX-M-9/14 (95%), SHV (33%) o TEM (23%); por el contrario, no hubo una transferencia conjunta de los dos elementos cuando se trataba de los integrones de clase 2. En conjunto, se identificaron 7 tipos de integrones de clase 1 y 3 de clase 2. Los integrones de clase 1 contenían siempre alguna EMA (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5* o *aac(6')*-Ib) y con frecuencia determinantes de resistencia a trimetoprim, incluidos *dhfrA1*, *dhfrA12* y *dhfrA17*. También se identificó *dhfrA1* en uno de los tipos de integrones de clase 2.

En cepas de *S. enterica* serovar. Livingstone identificadas en Túnez y productoras de SCTX-M-27 se ha identificado un integrón de clase 1 con el gen *dfrA21*, causante de resistencia a trimetoprim, y vehiculado por un plásmido de 90 kb⁷³.

La detección de genes de resistencia a tetraciclinas en cepas productoras de BLEE está pobremente documentada. La información disponible procede, fundamentalmente, de datos de secuencias de elementos móviles que codifican BLEE. La secuenciación completa del plásmido pC15-a, identificado en una cepa multirresistente de *E. coli* productora de CTX-M-15 en Toronto (Canadá), ha demostrado la presencia de una región de multirresistencia que contiene transposones o copias parciales de transposones y 5 copias de IS26. En esa región se incluyen los ge-

nes que codifican, además de CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA* y los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')*-Ib y *aac(3)*-II. Este plásmido se encontró también en otras cepas multirresistentes aisladas en Canadá y guarda cierta similitud con pCTX15, encontrado previamente en la India, y con otros plásmidos de multirresistencia descritos en cepas de Francia y Senegal⁷⁴.

La fosfomicina representa una opción terapéutica para cepas BLEE en determinadas situaciones clínicas⁷⁵. En un estudio sobre 428 aislados (290 *E. coli* y 138 *K. pneumoniae*), la tasa de resistencia a este compuesto fue del 0,3% en *E. coli* y del 7,2% en *K. pneumoniae*. No se han realizado estudios específicos sobre las causas de la resistencia a fosfomicina en cepas BLEE positivas, aunque se ha comunicado que la frecuencia de resistencia es mayor en microorganismos hipermutadores que producen BLEE⁷⁶.

Bibliografía

- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2122-5.
- Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. GEIH. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de beta-lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2002). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:77-82.
- Baquero F, Cercenado E, Cisterna R, De la Rosa M, García-Rodríguez JA, Gobernado M, et al. Patrones de sensibilidad a antimicrobianos de *Enterobacteriaceae* causantes de infecciones intraabdominales en España: resultados del estudio SMART 2003 Rev Esp Quimioter. 2006;19:51-9.
- Paterson DL, Rossi F, Baquero F, Hsueh PR, Woods GL, Satishchandran V, et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). J Antimicrob Chemother. 2005;55:965-73.
- Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coreistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2137-9.
- Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Alberti S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to ceftiofur and expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 1996;40:342-8.
- Nikaido H. Proteins from large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage Lambda receptor proteins. Methods Enzymol 1983;97:85-100.
- Harder KJ, Nikaido H, Matsushashi M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the OmpF porin. Antimicrob Agents Chemother. 1981;20:549-52.
- Hernández-Allés S, Alberti S, Alvarez D, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiology. 1999;145:673-9.
- Raimondi A, Traverso A, Nikaido H. Imipenem- and meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:1174-80.
- Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of *bla*_(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:3396-406.
- Prilipov A, Phale PS, Koeblnik R, Widmer C, Rosenbusch JP. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* BE. J Bacteriol. 1998;180:3388-92.
- Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, Benedi VJ, Alberti S. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. J Bacteriol. 1999;181:2726-32.
- Hernández-Allés S, Conejo MC, Pascual A, Tomás JM, Benedi VJ, Martínez-Martínez L. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2000;46:273-7.

16. Conejo MC, Van der Hoof M, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Martínez-Martínez L. Cefotetan-Cloxacillin synergy test for differentiation of *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase from strains producing extended-spectrum β -lactamases and deficient in porins. 43rd ICAAC; 2003.
17. Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Álvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, et al. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1669-73.
18. Ardanuy C, Liñares J, Domínguez MA, Hernández-Allés S, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:1636-40.
19. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:3203-6.
20. Elliott E, Brink AJ, Van Greune J, Els Z, Woodford N, Turton J, et al. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. Clin Infect Dis. 2006;42:e95-8.
21. Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JJ, Albertí S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. J Clin Microbiol. 2006;44:2831-7.
22. Cohen SP, McMurtry LM, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:1318-25.
23. Cohen SP, Yan W, Levy SB. A multidrug resistance regulatory chromosomal locus is widespread among enteric bacteria. J Infect Dis. 1993;168:484-8.
24. Hernández-Allés S, Benedí VJ, Martínez-Martínez L, Pascual A, Aguilar A, Tomás JM, et al. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:937-9.
25. Jacoby GA, Carreras I. Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:858-62.
26. Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Martínez JL. Factors determining resistance to β -lactams combined with β -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 1991;27:569-75.
27. Hernández JR, Pascual A, Benedí VJ, Martínez-Martínez L, y GEIH. Proyecto GEIH-LEE 2000: Descripción del perfil de porinas de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas en hospitales españoles. Congreso SEIMC, 2002.
28. Cantón R, Loza E, Del Carmen Conejo M, Baquero F, Martínez-Martínez L, MENSURA Collaborative Group. Quality control for beta-lactam susceptibility testing with a well-defined collection of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains in Spain. J Clin Microbiol. 2003;41:1912-8.
29. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother. 1996;38:409-24.
30. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother. 2000;45:183-9.
31. Rice LB, Carias LL, Hujer AM, Bonafede M, Hutton R, Huyen C, et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:362-7.
32. De Gheldre Y, Struelens MJ, Glupczynski Y, De Mol P, Maes N, Nonhoff C, et al; Groupe pour le Depistage, l'Etude et la Prevention des Infections Hospitalieres (GDEPIH-GOSPIZ). National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. J Clin Microbiol. 2001;39:889-96.
33. Dumarche P, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1128-31.
34. Salso S, Culebras E, Andrade R, Picazo JJ. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in a Spanish hospital. Microb Drug Resist. 2003;9:299-305.
35. Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. J Clin Microbiol. 2002;40:1237-43.
36. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1-11.
37. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum β -lactamases by using boronic acid as an AmpC β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2007;45:1180-4.
38. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. J Clin Microbiol. 2005;43:3110-3.
39. Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, et al. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:4198-201.
40. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gotberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis. 2000;30:473-8.
41. Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. J Antimicrob Chemother. 2000;45:895-8.
42. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2700-6.
43. Lavigne JP, Bouzuges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sot-to A. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. J Clin Microbiol. 2004;42:3805-8.
44. Bertrand S, Weill FX, Cloeckert A, Vrints M, Mairiaux E, Praud K, et al. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). J Clin Microbiol. 2006;44:2897-903.
45. Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo MC, 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 β -lactamase production. Antimicrob. Agents Chemother. 2002;46:3926-32.
46. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 1998;351:797-9.
47. Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. J Antimicrob Chemother. 2005;56:586-9.
48. Nazic H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2146-7.
49. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob. Agents Chemother. 2003;47:2242-8.
50. Rodríguez-Martínez JM. Mecanismo de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:25-31.
51. Robicsek A, Sahm DF, Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC. Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 2005;49:3001-3.
52. Cano ME, Martínez-Martínez L, García-Lobo JM, Calvo J, Agüero J. Detection of *orf513* and *qnrA* among multiresistant Gram-negative clinical isolates in Spain. [Abstract C1-1043.] 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Washington DC, USA; December 16-19 2005.
53. Poirel L, Van De Loo M, Mammert H, Nordmann P. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum β -lactamase VEB-1. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:3091-4.
54. Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-van Hall MA. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. Emerg Infect Dis. 2006;12:807-12.
55. Poirel L, Pitout JD, Calvo L, Rodríguez-Martínez JM, Church D, Nordmann P. In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1525-7.
56. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemother. 2005;56:1115-7. Epub 2005 Oct 31.
57. Mammert H, Van De Loo M, Poirel L, Martínez-Martínez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:71-6.
58. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1178-82.
59. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. Clin Infect Dis. 2006;43:297-304.

60. Cano ME, Rodríguez-Martínez JM, Agüero J, Pascual A, Martínez-Martínez L. Detection of *qnrS* in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Spain. Abstract O52. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nize, France; 1-4 abril de 2006.
61. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006;12:83-8.
62. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3953-5.
63. Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Sousa JC, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3220-1.
64. Fernández-Rodríguez A, Cantón R, Pérez-Díaz JC, Martínez-Beltrán J, Picazo JJ, Baquero F. Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:2536-8.
65. Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White PA. The *aadB* gene cassette is associated with *bla_{SHV}* genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:794-7.
66. Gruteke P, Goessens W, Van Gils J, Peerbooms P, Lemmens-Den Toom N, Van Santen-Verheul M, et al. Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1161-6.
67. Díaz PQ, Bello HT, Domínguez MY, Trabal NF, Mella SM, Zemelman RZ, et al. Resistance to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin among nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases. *Rev Med Chil*. 2004;132:1173-8.
68. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2565-71.
69. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56:305-12.
70. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2949-53.
71. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonça R, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:459-64.
72. Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollan A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1823-9.
73. Bouallegue-Godet O, Ben Salem Y, Fabre L, Demartin M, Grimont PA, Mzoughi R, et al. Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1037-44.
74. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3758-64.
75. De Cueto M, Hernández JR, López-Cerero L, Morillo C, Pascual A. Actividad de fosfomicina frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasa de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:613-6.
76. Ellington MJ, Livermore DM, Pitt TL, Hall LM, Woodford N. Mutators among CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and risk for the emergence of fosfomicin resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:848-52.