



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



Formación médica continuada

## Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores<sup>☆</sup>

Jordi Vila \* y Francesc Marco

Servicio de Microbiología, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, Barcelona, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 30 de abril de 2010

Aceptado el 5 de mayo de 2010

On-line el 26 de junio de 2010

#### Palabras clave:

*P. aeruginosa*

*A. baumannii*

*S. maltophilia*

Resistencia

### RESUMEN

Las 3 especies de bacilos gramnegativos no fermentadores más relevantes clínicamente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* son, frecuentemente, multirresistentes. La resistencia de *P. aeruginosa* a los betalactámicos depende de la producción de betalactamasa cromosómica, betalactamasas plasmídicas, alteraciones de la permeabilidad (pérdida de la porina OprD, relacionada con la resistencia a carbapenémicos), y de bombas de expulsión activa, en especial MexAB-OprM. En las cepas resistentes a aminoglucósidos, la principal causa es la producción de enzimas inactivantes; también está implicada la bomba de expulsión MexXY-OprM. La resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa* se relaciona con alteraciones de las topoisomerasas, alteraciones de las porinas y bombas de expulsión activa. La multiresistencia de *A. baumannii* normalmente se asocia a la adquisición de islas de resistencia que poseen genes que confieren resistencia a diversas clases de agentes antibacterianos. Si bien diversas beta-lactamasas tanto de amplio espectro como de espectro extendido han sido descritas en este microorganismo, la principal resistencia a betalactámicos se relaciona con la hiperproducción de la cefalosporinasa cromosómica (AmpC) asociada a la presencia de *ISAbal* en el promotor del gen *blaampC*. El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos es la adquisición de carbapenemasas clase B (metallo-β-lactamasas) y clase D (oxacilinasas), sin embargo la pérdida de una porina puede contribuir a modular la CIM final. La resistencia a aminoglucósidos se ha relacionado con enzimas modificantes y la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa (AdeABC) y la resistencia a quinolonas con alteraciones de las dianas conjuntamente con la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa. *S. maltophilia* presenta resistencia natural a carbapenémicos y otros betalactámicos por producción de dos betalactamasas (L-1 y L-2). También en esta especie se han descrito enzimas modificantes de aminoglucósidos. A diferencia de lo observado en otros muchos organismos, la resistencia de *S. maltophilia* a quinolonas se relaciona más con bombas de expulsión que con alteraciones de la diana.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram

### ABSTRACT

#### Keywords:

*P. aeruginosa*

*A. baumannii*

*S. maltophilia*

Resistance

Among non-fermenting Gram-negative rods, the most clinically important species are *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*, which are frequently multiresistant. *P. aeruginosa* resistance to beta-lactams depends on the production of chromosomal and plasmid-mediated beta-lactamases, altered permeability (loss of OprD porin is related to carbapenem-resistance) and active efflux systems, particularly MexAB-OprM. In aminoglycoside resistant strains, the main mechanism of resistance is the production of modifying enzymes; the efflux pump MexXY-OprM is also involved. Quinolone resistance in *P. aeruginosa* is related to changes in topoisomerases, altered permeability and efflux pumps. Multiresistance in *A. baumannii* may be associated with the acquisition of resistant islands carrying different resistant determining factors. Several broad- and extended-spectrum beta-lactamases have been shown in this microorganism, however the main mechanism of resistance to betalactams is the hyperproduction of the chromosomal cephalosporinase (AmpC) related to the presence of the *ISAbal* in the promoter region of this gene. The main mechanism of resistance to carbapenems is the acquisition of carbapenemas type B (metallo-β-lactamasas) or class D (oxacillinas), however the loss of a porin can also contribute to modulate the final MIC. The resistance to aminoglycosides has been associated with the production of modifying enzymes or the overexpression of efflux pump (AdeABC), whereas the resistance to quinolones is related to changes in the protein targets as well to the overexpression of efflux pump(s). *S. maltophilia* show resistance to beta-lactams including carbapenems due to the production of two beta-lactamases (L-1 and L-2). Aminoglycoside-modifying enzymes have also been described in this species. In contrast to that observed in other organisms, *S. maltophilia* resistance to quinolones has been mainly related to active efflux, rather than to targets alterations.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Nota: Sección acreditada por el SEAFORMEC. Consultar preguntas de cada artículo en: <http://www.elsevier.es/eimc/formacion>

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jvila@ub.edu](mailto:jvila@ub.edu) (J. Vila).

## Introducción

Con el término de bacilos gramnegativos no fermentadores se designa un grupo heterogéneo de microorganismos incapaces de fermentar diversos hidratos de carbono, entre ellos la glucosa. La mayoría de ellos son aerobios estrictos y abundan en reservorios naturales como el suelo y agua, formando también parte de la microbiota normal del hombre. Muchos de ellos se comportan como patógenos oportunistas y pueden causar infecciones graves en el hombre. Los más importantes desde el punto de vista clínico son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Muchas veces las infecciones ocasionadas por estos microorganismos se manifiestan en individuos hospitalizados, inmunodeprimidos, portadores de material protésico o ampliamente instrumentados y tratados con antibióticos. La habilidad de sobrevivir y persistir en superficies inertes probablemente asociada a la producción de biopelícula puede jugar un papel importante en la capacidad de ocasionar infecciones nosocomiales y brotes epidémicos. La existencia frecuente de multirresistencia o panresistencia en estos microorganismos, junto con la necesidad de dilucidar si se trata de una infección o una simple colonización, generan problemas y dilemas terapéuticos.

## *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo ubicuo, ampliamente distribuido en la naturaleza y responsable de diversos tipos de infecciones. El tratamiento de estas infecciones, ya sean de origen nosocomial o adquiridas en la comunidad, representa un verdadero reto terapéutico. En este sentido, el tratamiento de una infección grave como la bacteriemia es un claro ejemplo de lo que comentamos, ya que la evolución clínica favorable del proceso está influenciada por la correcta elección de la terapéutica antimicrobiana inicial<sup>1</sup>. Esta elección no suele ser fácil ya que *P. aeruginosa* se caracteriza por expresar una resistencia natural (intrínseca) a diversos antibióticos y por su capacidad para desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos durante el tratamiento mediante la adquisición de genes de resistencia situados en elementos genéticos móviles (plásmidos, integrones) o a través de mutaciones que alteran la expresión o la función de mecanismos de codificación cromosómica<sup>2,3</sup>. La tarea del laboratorio de microbiología tampoco es sencilla. Un aspecto clave es determinar correctamente la sensibilidad de *P. aeruginosa* a los antibióticos potencialmente activos empleando las diferentes metodologías desarrolladas para ello. En todas ellas es básico que tengamos en cuenta que existen diversos factores que pueden influir en el resultado final (inóculo correcto, medio de cultivo y su pH, concentración de iones, difusión de algunos antibióticos en el agar, temperatura y tiempo de incubación)<sup>4</sup>. El otro aspecto de enorme importancia es intentar reconocer los mecanismos de resistencia de la cepa estudiada con el empleo de antibióticos que sean buenos marcadores fenotípicos. Con frecuencia es una tarea muy complicada por diversas razones: expresión simultánea de diferentes mecanismos de resistencia que afectan, parcial o totalmente, a los mismos antibióticos; la eficacia variable de estos mecanismos en diferentes cepas y la poca capacidad de los métodos empleados habitualmente para detectar las resistencias de bajo nivel<sup>4,5</sup>. En los apartados que siguen a continuación se comentarán los mecanismos de resistencia a los antibióticos con actividad frente a *P. aeruginosa* y su expresión fenotípica en la lectura del antibiograma.

## Resistencia natural

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a múltiples antibióticos sin relación estructural se debe a varios factores: escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de una betalactamasa cromosómica inducible tipo AmpC y la expresión constitutiva de diversos sistemas de expulsión activa, sobre todo MexAB-OprM<sup>4,6,7</sup>. La participación conjunta de estos 3 factores condiciona resistencia natural a penicilina, aminopenicilinas, incluidas las combinadas con inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona, cefalosporinas de tercera generación orales, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina, novobiocina y ácido nalidixico.

En los bacilos gram negativos la membrana externa representa una barrera semipermeable a la entrada de moléculas, substratos o antibióticos. La entrada de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño, como los antibióticos betalactámicos, está restringida a unas estructuras concretas de la membrana externa, denominadas porinas, auténticos canales que generalmente están llenos de agua. Esta limitación es más acusada en *P. aeruginosa* ya que la permeabilidad de la membrana externa es unas 90 veces inferior a la de *E. coli*<sup>8</sup>. La porina más abundante en la membrana externa de *P. aeruginosa* es OprF, pero a pesar de su elevado número es una ruta poco eficiente para el paso de los antibióticos, probablemente debido a la propia «arquitectura» de la porina<sup>8</sup>. La porina OprD permite el paso de moléculas zwiteriónicas, como los carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem) y OprC y OprE son porinas inducibles en anaerobiosis aunque es probable que estén presentes en pequeñas cantidades en cepas salvajes. Mutantes triples sin oprC, oprD y oprE son sensibles a todos los antibióticos antipseudomónicos (excepto carbapenémicos, por la pérdida de OprD). Otra porina, OprB, está implicada en la entrada al interior de la célula de carbohidratos pero no hay evidencias que participe en la entrada de antibióticos<sup>8</sup>. El papel de la betalactamasa cromosómica inducible AmpC y los sistemas de expulsión activa en la resistencia a los antibióticos se comentará en los apartados correspondientes del artículo.

## Resistencia a antibióticos betalactámicos

El fenotipo «salvaje» o sensible de *P. aeruginosa* a los antibióticos betalactámicos se caracteriza por su sensibilidad a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina), ceftazidima, cefsulodina, cefepima, cefoperazona, aztreonam y carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem). En *P. aeruginosa*, el mecanismo más importante de resistencia adquirida a los antibióticos betalactámicos se debe a la producción de β-lactamasas. En este microorganismo podemos encontrar los cuatro tipos de enzimas descritos según la clasificación molecular de Ambler: A, C, D (serina-β-lactamasas) y B (metalo-β-lactamasas).

### β-lactamasa AmpC

*P. aeruginosa* produce una β-lactamasa cromosómica inducible de clase C (AmpC) codificada por el gen ampC<sup>9</sup> similar a la de algunas enterobacterias (*Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *M. morganii*). En condiciones normales esta enzima con actividad cefosporinasa se secreta en pequeñas cantidades (bajo nivel de expresión) y es la responsable de la resistencia a aminopenicilinas y a cefalosporinas de espectro reducido. No se inhibe con ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Su producción puede incrementarse de 100 a 1.000

vezes en presencia de antibióticos betalactámicos inductores, como cefoxitina o imipenem, aunque es una sobreexpresión reversible que desaparece al retirar el agente inductor. La producción de AmpC también aumenta cuando se producen mutaciones cromosómicas que afectan a las proteínas involucradas en su inducción, fenómeno que condiciona una expresión constitutiva de elevado nivel<sup>10</sup>. Sin embargo, la desrepresión de AmpC en *P. aeruginosa* es un fenómeno más complejo que el que tiene lugar en las especies de enterobacterias que poseen esta enzima y el fenotipo de desrepresión puede ser parcial para evolucionar posteriormente a completo o total<sup>3</sup>. Cuando la producción de AmpC está aumentada de forma significativa, *P. aeruginosa* expresa resistencia a todos los antibióticos betalactámicos con la excepción de los carbapenémicos. A diferencia de lo que ocurre con los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, la desrepresión de AmpC en *P. aeruginosa* también afecta a cefepima. Aunque se pensó que ello podría ser debido a diferencias en la actividad hidrolítica de AmpC, los datos disponibles no apoyan esta idea y probablemente la impermeabilidad de la membrana externa junto con la sobreexpresión de AmpC serían los responsables de la menor actividad de cefepima<sup>8</sup>. En la tabla 1 se presentan los diferentes fenotipos de resistencia a los antibióticos betalactámicos según la expresión de la β-lactamasa AmpC.

Los mecanismos que regulan la expresión de *ampC* son similares a los estudiados en *E. cloacae* y en su inducción participan diversos genes<sup>3</sup>. *ampG* codifica una proteína de transmembrana (AmpG) que actúa como una permeasa para los muropéptidos liberados durante el proceso de formación de la pared celular. Una vez en el interior de la célula estos muropéptidos, que son considerados la molécula señal en la inducción de *ampC*, son modificados por otra proteína, AmpD, producto del gen *ampD*, dando lugar a la formación de péptidos libres y ácido murámico. Un tercer gen *ampR*, codifica un factor de transcripción, AmpR, perteneciente a la familia de proteínas reguladoras LysR. En la mayoría de cepas con desrepresión de *ampC* se detectan mutaciones en el gen *ampD* que conducen a una expresión disminuida o inactivación de AmpD. En estas cepas se afecta el procesamiento de los muropéptidos, lo que conlleva un incremento de su cantidad en el citoplasma y permite su unión a AmpR que cambiaría su conformación y daría lugar a un aumento significativo de la expresión de *ampC*<sup>3</sup>. Se ha sugerido que un

cuarto gen, *ampE* podría participar en la regulación de AmpC pero los datos disponibles no son concluyentes<sup>11</sup>. Datos recientes demuestran que en la expresión de *ampC*, intervienen además de AmpD, 2 proteínas homólogas denominadas AmpDh2 y AmpDh3<sup>12,13</sup>. Para que se produzca una desrepresión completa y que esta se exprese de forma constitutiva es necesario que se produzca la delección combinada de los 3 genes homólogos. Finalmente, se ha sugerido que en la compleja regulación de la expresión de *ampC* probablemente intervienen otros factores como por ejemplo la PBP4 codificada por el gen *dacB*<sup>14</sup>.

#### β-Lactamasas de clase A

Las β-lactamasas de clase A y pertenecientes al grupo funcional 2c de Bush hidrolizan la carbenicilina, ticarcilina y piperacilina. Se inhiben con ác. clavulánico y tazobactam pero su detección no siempre es fácil ya que puede interferir la inducción de la β-lactamasa cromosómica AmpC. Se han descrito diversos enzimas pertenecientes a este grupo: TEM 1-2, PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4<sup>15</sup>. Los enzimas PSE-1, PSE-4 y CARB-3 son similares ya que solo difieren en 1 o 2 aminoácidos pero, en cambio, solo comparten un 86,3% de homología con CARB-4<sup>16</sup>. Las cepas con carbenicilinasas (CARB) pueden manifestar una sensibilidad variable a cefepima y aztreonam pero, en ausencia de otros mecanismos de resistencia, siempre son sensibles a ceftazidima y carbapenémicos (tabla 1).

Las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A pertenecen al grupo funcional 2b'. Su presencia es responsable de la resistencia a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepima, cefpiroma y aztreonam. También se inhiben con ácido clavulánico y tazobactam y su afinidad por los carbapenémicos es baja, por lo que se mantiene la actividad de imipenem, meropenem y doripenem (tabla 1). En *P. aeruginosa*, como sucede en la familia *Enterobacteriaceae*, se han encontrado BLEEs derivadas de enzimas tipo TEM (TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116) y SHV (SHV-2a, SHV-5, SHV-12), pero además se han descrito otros tipos: PER (PER-1), VEB (VEB-1, VEB-1a, VEB-1b, VEB-2), GES (GES-1, GES-2, GES-5, GES-8 (IBC-2), GES-9) y BEL (BEL-1)<sup>9,17</sup>. Los genes responsables de su síntesis están localizados en el cromosoma, plásmidos o integrones. El grado de hidrólisis de ceftazidima, cefepima y aztreonam depende del tipo de enzima que, por otra parte, se puede inhibir en mayor o menor medida con los diferentes inhibidores de β-lactamasas. Las BLEEs tipo GES tienen algunas características que debemos destacar. GES-1 se caracteriza por manifestar una actividad catalítica de bajo nivel así como una baja afinidad por la mayoría de los substratos<sup>18</sup>. A diferencia de la mayoría de las BLEEs de clase A, tiene una fuerte afinidad por la cefoxitina. GES-2, que difiere de GES-1 en una sola mutación, hidroliza a los carbapenémicos, por ello debe considerarse como una carbapenemasa de clase A<sup>19</sup>. La actividad catalítica para imipenem es 100 veces más elevada que la que expresa GES-1, pero es mucho más baja que la manifestada por las metalo-β-lactamasas de clase B.

#### β-lactamasas de clase D (oxacilinasas)

Las oxacilinasas (enzimas tipo OXA) son enzimas de clase D que pertenecen al grupo funcional 2d. Representan un amplio grupo de enzimas con un espectro hidrolítico muy desigual que generalmente están codificadas por genes integrados en plásmidos o integrones. Una característica de estas enzimas es que no se inhiben con ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam, con la excepción de OXA-18, lo que dificulta su detección en el laboratorio. La clasificación de las oxacilinasas es compleja. Poirel

**Tabla 1**  
Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*. Mecanismos de resistencia enzimáticos

Fenotipos de resistencia										
TIC	TCL	PIP	PTZ	CAZ	CEF	ATM	IMP	MER	Mecanismo de resistencia	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	
r	R	r	r	r	S/r	r	S	S	Desrepresión parcial AmpC	
R	R	R	R	R	r/R	R	S	S	Desrepresión total AmpC	
R	S	R	S	S	S/r	S/r	S	S	β-lactamasa de clase A-No BLEE*	
R	S/r	R	S/r	R	R	R	S	S	β-lactamasa de clase A-BLEE**	
R	S	R	S	R	R	R	r/R	r/R	GES-2	
r/R	r/R	r/R	r/R	S	R	S	S	S	OXA-1, OXA-31	
R	R	R	R	R	r/R	r/R	S	S	OXAs-BLEE	
R	R	R	R	R	R	S	r/R	r/R	Metalo-β-lactamasa***	

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefepima; IMP: Imipenem; MER: meropenem; PIP: piperacilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; R: resistente; S: sensible; r: sensibilidad disminuida; TCL: ticarcilina/ác. Clavulánico; TIC: ticarcilina.

\* TEM 1-2, PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4.

\*\* Derivadas de enzimas TEM y SHV, PER, VEB.

\*\*\* IMP, VIM, SPM y GIM.

et al<sup>20</sup> acaban de publicar una revisión en la que dividen estas enzimas según su espectro de actividad y diversidad genética.

Las enzimas OXA clásicas (OXA-1, OXA-2, OXA-10) se caracterizan por determinar resistencia a carboxipenicilinas y ureidope-nicilinas, pero no a ceftazidima<sup>14</sup>. En el subgrupo OXA-1 se incluye OXA-31, que deriva de OXA-1 por la substitución de 2 aminoácidos. Ambas tienen la capacidad de hidrolizar a cefepima pero no a ceftazidima<sup>21</sup>.

Las oxacilinasas con mayor importancia clínica son las que expresan un espectro de actividad hidrolítica extendido que incluye cefotaxima, ceftazidima, cefepima, cefpiroma y aztreonam aunque el grado de actividad es variable. La mayoría de estas oxacilinasas se han encontrado en *P. aeruginosa* y derivan de β-lactamasas OXA con espectro reducido que han experimentado una mutación puntual. No obstante, también se han descrito enzimas con escasa similitud de aminoácidos con las clásicas OXA y que expresan el mismo espectro extendido. En general, las derivadas de oxacilinasas clásicas afectan sobre todo la actividad de ceftazidima (OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-19, OXA-32) con una actividad hidrolítica variable frente a cefepima y aztreonam. OXA-15, que deriva de OXA-2 hidroliza más a ceftazidima que a cefepima y aztreonam<sup>22</sup> y en cambio, OXA-32, que también deriva de OXA-2 hidroliza ceftazidima pero no cefotaxima y es inhibida por cefoxitina<sup>23</sup>. Las enzimas OXA-11, OXA-14 y OXA-19 afectan principalmente la actividad de ceftazidima mientras que el substrato preferido de OXA-17 es la cefotaxima. Las diferentes variantes de OXA-10 determinan un nivel de resistencia de bajo nivel a cefepima pero alto para ceftazidima. La enzima OXA-18 tiene un grado de similitud con el resto de OXAs según el análisis de los aminoácidos que la componen inferior al 50%<sup>24</sup>. Su actividad hidrolítica se parece al de una BLEE de clase A y, a diferencia del resto de oxacilinasas, se inhibe con ácido clavulánico. En el año 2003 se describió una nueva enzima parecida a OXA-18 (66% de similitud), OXA-45<sup>25</sup>. El perfil de los substratos que afecta es parecido y también se inhibe con ác. clavulánico. En la tabla 1 se incluyen algunos fenotipos de resistencia según el tipo de enzimas de este grupo.

Algunas oxacilinasas adquiridas tienen la capacidad de hidrolizar los carbapenémicos sin afectar de forma significativa a las cefalosporinas de espectro extendido. La mayoría de estos enzimas se han identificado en *Acinetobacter* spp. Sin embargo, recientemente se ha comunicado la detección de OXA-40 en 2 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en nuestro país<sup>26</sup>.

#### Metalo-β-lactamasas

Las carbapenemasas que necesitan la presencia de Zn<sup>2+</sup> en su centro activo se conocen con el nombre de metalo-β-lactamasas. Son β-lactamasas de clase B que determinan resistencia a los antibióticos β-lactámicos, incluidos los carbapenémicos. Los monobactams, como el aztreonam, no se ven afectados por la actividad hidrolítica de estos enzimas (tabla 1). Las metalo-β-lactamasas no se inhiben con ácido clavulánico ni tazobactam y en cambio, sí son inhibidas por quelantes iónicos divalentes como el EDTA<sup>27</sup>. En *P. aeruginosa* se han identificado cuatro tipos de metalo-β-lactamasas: IMP, VIM, SPM y GIM. La primera carbape-nemasa descrita en *P. aeruginosa* (IMP-1) se encontró en Japón durante un estudio realizado con cepas aisladas en los años 1992-1994<sup>28</sup>. El gen responsable estaba localizado en un plásmido de gran tamaño (36 Kb) y formaba parte de un «cassette» incluido en un integrón de clase 1 (In31). Desde entonces se han comunicado diversas variantes del enzima IMP en diferentes países: IMP-7, IMP-9, IMP-13, IMP-16, IMP-18.

La carbapenemasa VIM-1 se encontró en una cepa de *P. aeruginosa* aislada en Italia en 1997<sup>29</sup>. Su grado de similitud con IMP, según el análisis de los aminoácidos, es inferior al 30% aunque tiene el mismo espectro de hidrólisis<sup>26</sup>. Hasta la actualidad se han descrito diferentes variantes de la carbapenemasa VIM-1 (VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-5, VIM-7, VIM-8, VIM-11, VIM-13, VIM-15 y VIM-16) con un grado de similitud muy elevado entre ellas<sup>16</sup>. Los genes responsables forman parte de un integrón localizado en un plásmido o en el cromosoma. Las descripciones más frecuentes corresponden a la VIM-2, una metalo-β-lactamasa que también se ha encontrado en nuestro país<sup>30-33</sup>. En el año 2008 se describió una nueva carbapenemasa, VIM-13, hallada en una cepa de *P. aeruginosa* aislada en Mallorca<sup>34</sup>. El gen responsable, *bla*<sub>VIM-13</sub>, se encontraba en un integrón de clase 1 que también contenía una nueva variante del gen *aacA4* que confiere resistencia a gentamicina y tobramicina.

En el año 2002 se describieron dos nuevas metalo-β-lactamasas en Brasil y Alemania denominadas SPM-1 y GIM-1<sup>35,36</sup>. La primera de ellas, descrita recientemente en Europa<sup>37</sup>, tiene un elevado peso molecular debido a la presencia de un bucle que contiene 23 residuos de aminoácidos y manifiesta cierta actividad frente a aztreonam. El gen responsable de la síntesis de GIM-1, *bla*<sub>GIM-1</sub> se localiza en un integrón de clase 1 (In77) transportado en un plásmido de 22 kb y que contiene otros genes de resistencia: *aacA4*, *aadA1* y *bla*<sub>OXA-2</sub>.

#### Alteración de la permeabilidad (porina OprD)

La porina OprD permite la entrada al interior de *P. aeruginosa* de aminoácidos, péptidos pequeños y carbapenémicos<sup>8</sup>. Como OprD es la principal vía de entrada de los carbapenémicos, la pérdida de esta porina comporta una disminución de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a estos antibióticos<sup>7,38</sup>. En comparación con imipenem, la entrada al interior de la célula de meropenem parece verse menos afectada ya que en cepas sin OprD, la CIM de imipenem tiene un valor entre 8-32 µg/ml y la de meropenem entre 2-4 µg/ml (tabla 2). Por ello se sugirió que meropenem podría utilizar otras vías de entrada a través de la membrana externa de *P. aeruginosa*<sup>39</sup>. Estudios recientes realizados en paralelo con cepas isogénicas, empleando el fenotipo salvaje y el mutante OprD deficiente, demuestran que se produce una disminución de la sensibilidad a todos los carbapenémicos. Así, para meropenem se observa un aumento de los valores de CIM entre 4-32 veces, para imipenem entre 4-16 veces y para doripenem entre 8-32 veces<sup>38</sup>. La potencia intrínseca de meropenem y doripenem frente a *P. aeruginosa* es 4 veces superior a la de imipenem. Por ello, como en las cepas sin mutación los valores de CIM de imipenem ya son de 1-4 µg/ml, al producirse la pérdida de la porina OprD, la CIM de este carbapenémico es más elevada que la de meropenem o doripenem.

#### Sistemas de expulsión activa

El análisis del genoma de *P. aeruginosa* ha revelado que este microorganismo posee diversos sistemas de expulsión activa integrados en 5 «superfamilias», aunque predominan los que pertenecen a la familia RND (*resistance-nodulation-division*)<sup>40</sup>. Este sistema está integrado por 3 componentes básicos: una proteína localizada en la membrana citoplasmática que actúa como transportador, un segundo componente representado por una proteína o factor de membrana externo y el sistema se completa con una tercera proteína situada en el espacio periplásmico que une las otras<sup>2</sup>. Los sistemas de expulsión más frecuentes en *P.*

*aeruginosa* son MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. Afectan en mayor o menor grado la actividad no solo de los antibióticos betalactámicos y carbapenémicos sino también de otros antibióticos (fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclínas, cloranfenicol, lincomicina, novobiocina)<sup>3,17</sup>. Los sistemas MexAB-OprM y MexXY-OprM participan en los mecanismos de resistencia natural y adquirida a varios antibióticos mientras que MexCD-OprJ, MexEF-OprN solo actúan en casos de resistencia adquirida<sup>3,41</sup>. En la tabla 2 se resumen los principales fenotipos de resistencia esperados según el sistema de expulsión activa expresado.

La sobreproducción de MexAB-OprM se produce por un incremento de la transcripción del operón *mexAB-oprM* debido a mutaciones en el gen de localización cromosómica *mexR* que codifica la proteína represora MexR. Otros genes, como *nalB*, *nalD*, *nalC*, también intervienen en la regulación del operón<sup>42</sup>. La sobreexpresión de MexAB-OprM condiciona una disminución de la actividad de carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam. También se observa una disminución de la actividad de meropenem mientras que imipenem no se afecta debido a la diferente estructura molecular a nivel de la cadena lateral.

El operón *mexCD-oprJ* está gobernado negativamente por NfxB, producto del gen *nfxB*. Mutantes *nfxB*-conducen a una hiperexpresión de MexCD-OprJ que afecta a antibióticos betalactámicos con una preferencia sobre las cefalosporinas de 4.<sup>a</sup> generación (cefepima, cefpiroma). Se han descrito 2 tipos de mutantes, A y B,

con diferente nivel de producción de MexCD-OprJ y sensibilidad a los antibióticos<sup>3</sup>.

La expresión del operón *mexEF-oprN*, a diferencia de lo que ocurre con los comentados previamente, no está suprimida por un regulador negativo. MexT, producto del gen *mexT* y miembro de la familia LysR de activadores, actúa regulando de forma positiva este operón, aunque otros genes también están implicados: *mexS*, *mvaT* y *nfxC*. Las cepas que sobreexpresan *mexEF-oprN* se caracterizan por expulsar fluoroquinolonas y por manifestar una disminución de la sensibilidad a carbapenémicos, en especial imipenem. Esta pérdida de sensibilidad se asocia a una disminución de la porina OprD en cuya expresión participa MexT<sup>3</sup>.

El operón *mexXY* carece de un gen que codifica para la proteína de membrana externa. Como contrapartida, MexXY puede asociarse con OprM y probablemente con otras proteínas como OpmB, OpmG, OpmH y Opml, para formar el sistema funcional típico de 3 proteínas. El operón está regulado negativamente por el gen *mexZ*, cuya mutación da lugar a una sobreexpresión de *mexXY* que afecta a varios antibióticos. Entre los antibióticos betalactámicos el más afectado es cefepima<sup>3</sup>.

## Resistencia a aminoglucósidos

El mecanismo más importante de resistencia a los aminoglucósidos en *P. aeruginosa* es la modificación enzimática del antibiótico, con la consiguiente disminución de la afinidad del antibiótico por la subunidad ribosómica 30S. Los enzimas responsables están codificados por genes de localización plasmídica y según el radical sobre el que actúan se denominan: fosforiltransferasas (APH), adeniltransferasas o nucleotidiltransferasas (AAD o ANT) y acetiltransferasas (AAC). En la tabla 3 se incluyen los enzimas modificantes más frecuentes en *P. aeruginosa* y los substratos sobre los que actúan.

La metilación de la subunidad 16S del ARN ribosomal se debe a la acción de un enzima localizado en un transposón insertado en un plásmido<sup>43</sup>. Este nuevo mecanismo de resistencia se describió por primera vez en una cepa aislada en Japón<sup>44</sup> y confiere resistencia de alto nivel a amikacina, tobramicina, netilmicina y gentamicina (tabla 3). En *P. aeruginosa* se han descrito 2 metilasas, RmtA y RmtD con un grado de similitud moderado entre ellas<sup>43</sup>.

El sistema de expulsión activa MexXY cooperando con OprM, OpmB, OpmG ó Opml<sup>45</sup> es un mecanismo relativamente poco frecuente de resistencia a los aminoglucósidos. Si existe un problema de permeabilidad manifiesta con dificultad para atravesar la membrana externa nos encontraremos con una cepa que expresa resistencia a todos los aminoglucósidos, una

Tabla 2

Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*. Deficiencia de porinas y sistemas de expulsión activa

Fenotipos de resistencia									
TIC	TCL	PIP	PTZ	CAZ	CEF	ATM	IMP	MER	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	S	R	r		Pérdida porina OprD
R	R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	r	Sistema MexAB-OprM
r/R	r/R	r/R	r/R	R	r/R	S	S		Sistema MexCD-OprJ
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r		Sistema MexEF-OprN*
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	S		Sistema MexXY-OprM

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefepima; IMP: Imipenem; MER: meropenem; PIP: piperacilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; R: resistente; S: sensible; r: sensibilidad disminuida; TCL: ticarcilina/ác. Clavulánico; TIC: ticarcilina.

\* MexEF-OprN esta regulado por el factor de transcripción MexT, el cual también regula negativamente la expresión de OprD, por lo que la disminución en la sensibilidad a carbapenémicos en este fenotipo es debido a la sobreexpresión de MexT.

Tabla 3

Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa*

Fenotipos de resistencia					
GM	TOB	NET	AK	CIP	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	—
R	S	S	S	—	AAC (3)-I
R	R	R	S	—	AAC (3)-II
S/r	R	R	R	—	AAC (6')-I
R	R	R	S	—	AAC (6')-II
R	R	S	S	—	ANT (2')-I
R	R	R	R	—	Metilación ribosomal
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	Sistema de expulsión MexXY-OprM
R	R	R	R	r/R	Enzimas+sistema de expulsión+permeabilidad
—	—	—	—	r/R	Sistemas de expulsión MexAB-OprM, CD-OprJ, EF-OprN
—	—	—	—	r	Mutación en <i>gyrA</i>
—	—	—	—	R	Mutación en <i>gyrA+parC</i>

AK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; GM: gentamicina; NET: netilmicina; R: resistente; r: sensibilidad disminuida; S: sensible; TOB: tobramicina.

situación más habitual en aislados de pacientes con fibrosis quística<sup>46</sup>. Es muy probable que en algunas cepas también se produzca la suma de otros mecanismos no-enzimáticos, como la síntesis del lipopolisacárido (LPS), tal como sugieren los estudios de El'Garch et al<sup>47</sup> en los que se demuestra un aumento gradual de la resistencia a aminoglucósidos.

### Resistencia a fluorquinolonas

La resistencia a fluorquinolonas en *P. aeruginosa* se debe sobre todo a cambios estructurales en la diana (ADN girasa y topoisomerasa IV) o a sistemas de expulsión activa<sup>48</sup>. Mutaciones puntuales en el gen *gyrA* localizado en el motivo QRDR (*quinolone-resistance-determining-region*) da lugar a la síntesis de una ADN girasa o topoisomerasa II con baja afinidad por las fluoroquinolonas<sup>49</sup>. Un único cambio en un aminoácido sería responsable de un nivel de resistencia moderado mientras que mutaciones que afectan al gen *gyrA* y al gen *parC* (subunidad A de la topoisomerasa IV) condicionaría un elevado grado de resistencia<sup>50</sup>.

Las fluoroquinolonas penetran al interior de la bacteria a través de porinas y por difusión a través de la membrana citoplasmática. Si se produce una disminución en el número de las porinas disminuye la acumulación de la quinolonas, aunque esta situación no parece ser suficiente para que la bacteria manifieste resistencia<sup>51</sup>. La sobreexpresión de los 4 sistemas de expulsión activa comentados en el apartado de los antibióticos betalactámicos también afectan a las fluoroquinolonas<sup>41</sup>, aunque en general condicionan un bajo grado de resistencia. Se han encontrado otros sistemas de expulsión activa poco frecuentes que condicionan una disminución de la actividad de las fluoroquinolonas: MexVW-OpmM, MexGHI-OpmD y MexPQ-OpmE<sup>3</sup>. En *P. aeruginosa* la resistencia de alto nivel a las fluoroquinolonas se debe a la participación conjunta de los sistemas de expulsión activa y a las mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV<sup>52</sup>. En la tabla 3 se han incluido los fenotipos de resistencia a ciprofloxacina según el mecanismo expresado.

### *Acinetobacter baumannii*

La taxonomía del género *Acinetobacter* ha sufrido diversos cambios a lo largo de la historia. Actualmente se aceptan 32 genoespecies<sup>53</sup> definidas en base a la hibridación ADN-ADN, de estas, las de mayor interés como causa de enfermedad infecciosa en el hombre son: *A. calcoaceticus* (genoespecie 1); *A. baumannii* (genoespecie 2), *Acinetobacter* sp. (genoespecies 3 y 13), *A. haemolyticus* (genoespecie 4), *A. junii* (genoespecie 5), *A. lwoffii* (genoespecie 8). En diversos estudios se ha demostrado que algunas especies son difíciles de diferenciar por pruebas fenotípicas. El complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* consiste en 4 genoespecies (genoespecies 1, 2, 3 y 13) genéticamente distintas pero fenotípicamente muy similares, por lo que se recomienda para la especiación utilizar una prueba genotípica como puede ser el ARDRA (*ribosomal DNA restriction analysis*).

Sin duda alguna, *A. baumannii* es la especie aislada con más frecuencia y con mayor importancia clínica, además de ser de manera significativa la especie más resistente a los antibióticos<sup>54,55</sup>, mientras que *A. lwoffii*, la segunda especie en frecuencia de aislamientos, es mucho más sensible a los agentes antimicrobianos. Por ello, la presente revisión se basa fundamentalmente en los fenotipos de resistencia a los antimicrobianos de *A. baumannii*.

La membrana externa de *A. baumannii* es menos permeable a los antimicrobianos que la membrana externa de *E. coli*. Sato y

Nakae<sup>56</sup> analizaron la permeabilidad de la membrana externa de *A. calcoaceticus* y encontraron que el coeficiente de permeabilidad a las cefalosporinas era de 2 a 7 veces menor que el que presenta *P. aeruginosa* para los mismos betalactámicos. Por todo ello, estos autores sugieren que una causa de la resistencia intrínseca que presenta *A. calcoaceticus* a los antibióticos puede ser atribuida a la presencia de un escaso número de porinas que además poseen un tamaño de poro pequeño. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la expresión constitutiva del sistema de expulsión activa (AdeIJK) puede también contribuir a la resistencia intrínseca de este microorganismo a diversos agentes antibacterianos<sup>57</sup>. La resistencia de algunos antibacterianos específicos se puede también explicar por la expresión de ciertas bombas de expulsión activa, por ejemplo, la expresión de la bomba CraA que afecta al cloranfenicol<sup>58</sup> y que parece expresarse constitutivamente y TetA que es una bomba adquirida que afecta tetraciclinas<sup>59</sup>.

### Resistencia a antibióticos betalactámicos

En la actualidad, *A. baumannii* es resistente a la mayoría de betalactámicos, en especial penicilinas y cefalosporinas, en particular en pacientes que se encuentran en áreas de cuidados intensivos. Así pues, es infrecuente encontrar una cepa de este microorganismo con un fenotipo que presente una total sensibilidad a los betalactámicos (tabla 4). La resistencia a ampicilina, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas se ha relacionado con la presencia de betalactamasas plasmídicas de amplio espectro como las tipo TEM-1, TEM-2, OXA-21 y la carbénicilinasa, CARB-5<sup>60-63</sup>. Más recientemente, se ha descrito la penicilinasa SCO-1 en diversas especies de *Acinetobacter* aisladas en Argentina<sup>64</sup>.

Sin embargo, resultados recientes<sup>65-68</sup> sugieren que la sobreexpresión de una cefalosporinasa cromosómica tipo AmpC, también denominada ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinase*), es el mecanismo más frecuente de resistencia a betalactámicos y genera un fenotipo de resistencia caracterizado por resistencia a ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima y ceftazidima. Esta cefalosporinasa cromosómica se expresa a bajo nivel y en estos casos no confiere resistencia a ceftazidima. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *bla<sub>ampC</sub>* se asocia a la presencia de una secuencia de inserción (ISAb1) insertada en el promotor de dicho gen<sup>68-70</sup>. Esta secuencia de inserción posee un promotor que es utilizado por la RNA polimerasa para expresar dicha cefalosporinasa. La hiperproducción de AmpC confiere resistencia a ticarcilina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam sin afectar cefoxitina o

Tabla 4

Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Acinetobacter baumannii*

Fenotipos de resistencia								Mecanismo de resistencia
AMP	TIC	PIP	CTX	CAZ	CEF	IMP	Mecanismo de resistencia	
S	S	S	S	S	S	S	–	
R	S	S	S	S	S	S	Bajo nivel de expresión de AmpC	
R	R	R/r	R	R	R/r	S	Elevado nivel de expresión de AmpC	
R	R	R/r	R	R	S	S	BLEEs*	
R	R	S	S	S	S	R/r	Carbapenemasa**	
R	R	R	R	R	R	R	Carbapenemasa+AmpC	

AMP: Ampicilina; CAZ: ceftazidima; CEF: Cefepima; CTX: cefotaxima; IMP: Imipenem; PIP: piperacilina; R: resistente; r: sensibilidad disminuida; S: sensible; TIC: ticarcilina.

\*Patrón que genera la OXA-37.

\*\* La CIM generada por la presencia de oxacillinasas con actividad carbapenemasa puede ser baja pero si concomitantemente tiene lugar una disminución de una porina asociada a la resistencia a carbapenémicos se observa un incremento en la CIM.

carbapenémicos. Diversos estudios han demostrado que de manera general aproximadamente el 50% de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* presentan una hiperproducción de AmpC<sup>66,67</sup>. La secuencia de inserción ISAb1 se encuentra aproximadamente en el 69% de los aislamientos clínicos y de estas, en aproximadamente el 78%, la ISAb1 se encuentra insertada en la región del promotor del gen bla<sub>AmpC</sub>, confiriendo resistencia a ceftazidima. Las cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación, que no presentan una hiperproducción de AmpC, pueden poseer un beta-lactamasa de espectro extendido. Diversos tipos de BLEES han sido descritas en *A. baumannii*, entre estas encontramos las tipo PER (PER-1). Este tipo de beta-lactamasa ha sido descrito en el 31% los aislamientos clínicos de *A. baumannii* aislados en Turquía<sup>71</sup>. Esta beta-lactamasa ha sido también encontrada en otros países como Corea del Sur, Bélgica y Francia<sup>72–74</sup>. La BLEE PER-2 se ha descrito en Sud-América<sup>75</sup>. En España, una BLEE tipo oxacilinasa (OXA-37) se ha descrito en un 27% de las cepas de *A. baumannii* aisladas de diversos hospitales españoles (resultados no publicados)<sup>76</sup>. Otras BLEEs tales como CTX-M-2, TEM-92, SHV-5, SHV-12 y VEB-1<sup>77–81</sup> también se han descrito en cepas concretas de *A. baumannii*. Esta última BLEE fue descrita en un clon de *A. baumannii* causante de un brote epidémico en Francia y posteriormente se encontró en diversos hospitales de todo el país y del sur de Bélgica.

Un tipo de beta-lactamasas encontrado a menudo en aislamientos clínicos de *A. baumannii* son las carbapenemasas que confieren resistencia a los carbapenémicos. Dos tipos de carbapenemas han sido descritos hasta la actualidad en *A. baumannii*, las oxacilinasas y las metalo-beta-lactamasas. La OXA-51/69 es otra beta-lactamasa cromosómica descrita en *A. baumannii* y encontrada en todas las cepas estudiadas. Hasta la actualidad se han encontrado 45 derivados de la OXA-51/69<sup>20</sup>. En condiciones normales este enzima presenta una actividad carbapenemasa débil. Sin embargo, se ha observado que puede tener lugar una sobreexpresión del gen bla<sub>OXA-51</sub> asociada también a la inserción de ISAb1 en el promotor de dicho gen<sup>82</sup>. Además de esta oxacilinasa cromosómica con actividad carbapenemasa *A. baumannii* puede adquirir otras oxacilinasas con dicha actividad. Hasta la actualidad se han descrito 3 grupos: las oxacilinasas del grupo de la OXA-23 que incluye la OXA-23, OXA-27 y OXA-49; el grupo de la OXA-24/40 que incluye además la OXA-25, OXA-26 y OXA-72 y finalmente el grupo OXA-58 que incluye además las OXA-96 y OXA-97. Muy recientemente se ha descrito en Brasil la OXA-143 que presenta un 88% de identidad de aminoácidos con la OXA-40<sup>20,83</sup>. La distribución geográfica de estos diversos grupos es bastante heterogénea. En España, analizando 83 aislamientos clínicos pertenecientes a 28 clones distintos, se encontró que el 19% poseían carbapenemasa tipo OXA-58, el 42% OXA 24/40 y el 13% poseían el elemento genético ISAb1 insertado en el promotor del gen bla<sub>OXA-51</sub>, lo que favorece la sobreexpresión de dicho gen. En el mismo estudio no se detectaron carbapenemasas tipo OXA-23, VIM o IMP sugiriendo una baja prevalencia de este tipo de carbapenemasas en *A. baumannii* aislados en España. Por regla general, las cepas que poseen una oxacilinasa tipo OXA24/40 presentan una CIM de imipenem > 32 mg/l, mientras que las que poseen una OXA-58 la CIM es de 16 mg/l. Hasta la actualidad 3 grupos de metalo-beta-lactamasas han sido descritos en *A. baumannii*<sup>82</sup>, estos son: el grupo IMP, con IMP-1, -2, -4, -5, -6 y -11; el grupo VIM, con VIM-1 y -2 y finalmente SIM-1 solo descrita en Corea del Sur. Las variantes de IMP y VIM confieren un elevado nivel de resistencia a carbapenémicos (CIM > 32 mg/l), además confieren resistencia a todos los beta-lactámicos excepto aztreonam, mientras que la presencia de SIM-1 genera niveles de resistencia a imipenem entre 8–16 mg/l<sup>84</sup>.

La expresión disminuida de 3 proteínas de membrana externa se han descrito en aislamientos clínicos de *A. baumannii*

resistentes a imipenem: una proteína con un peso molecular 33–36 kDa, otra, denominada CarO de 29 kDa y finalmente una proteína de 43 kDa que presenta homología con la OprD de *P. aeruginosa*<sup>85</sup>. Finalmente, se ha descrito que la ausencia de una PBP de 73,2 kDa (PBP2a) podría relacionarse con resistencia a imipenem y/o meropenem de bajo nivel (CIM de 4 mg/l), mientras que la ausencia simultánea de esta PBP y otra de 70,1 kDa (PBP2b) se asocia con niveles de resistencia más elevada frente a ambos compuestos (CIM de 8–32 mg/l)<sup>34</sup>.

## Resistencia a aminoglucósidos

Se han descrito en *A. baumannii* diversas enzimas modificantes de los aminoglucósidos, que desempeñan un papel importante en la adquisición de resistencia a estos antibióticos en este microorganismo<sup>60,86,87</sup>. La correlación entre fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos y enzimas modificantes se resume en la tabla 5. La frecuente presencia de 2 o más enzimas en una misma cepa determina, en muchas ocasiones, patrones de resistencia difíciles de presuponer a expensas del perfil fenotípico. Entre los fenotipos de resistencia cabe destacar por su frecuencia el de resistencia a todos los aminoglucósidos que puede ser debida a la combinación de diversas enzimas modificantes, tal vez a la disminución de la acumulación de estos antibióticos relacionada con la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa codificado en el operón AdeABC<sup>88</sup>. Higgins y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de AdeABC aumentaba la CIM de netilmicina a 16 mg/l<sup>89</sup>, por lo que si el antibiograma presenta una CIM de netilmicina de 16 mg/l puede ser un buen indicador de la sobreexpresión de esta bomba de expulsión activa, mientras que si la CIM es ≥ 32 mg/l es probablemente debido a la expresión de un enzima modificante de aminoglucósidos.

## Resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas en la mayoría de bacilos gramnegativos se asocia con mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican las subunidades A de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente. Ambas enzimas son las proteínas diana de las quinolonas. Resultados preliminares<sup>90,91</sup> sugieren que la sobreexpresión de una o varias bombas de expulsión también podrían desempeñar un papel fundamental en la adquisición de resistencia a estos antimicrobianos. En un estudio multicéntrico se encontró que de un total de 244 cepas de *A. baumannii* aisladas

Tabla 5

Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos en *Acinetobacter baumannii*

Fenotipos de resistencia					
GM	TOB	NET	AK	SP	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	Sin EMA* o aph A1/APH (3')-I**
R	S	S	S	S	aac C1***/AAC (3')-I***
R	R	R	S	S	aac C2/AAC (3')-II
S	R	R	R	S	aac A4/AAC (6')-I
S	S	S	S	R	aad A1/ANT (3') (9)
R	R	S	S	S	aad B/ANT (2")-I
S	S	S	R	S	aph A6/APH (3')-VI
R	R	R	R	R	Enzimas+bomba de eflujo (AdeABC)

AK: amikacina; GM: gentamicina; NET: netilmicina; R: resistente; S: sensible; SP: spectinomicina; TOB: tobramicina.

\* EMA, enzima modificante de aminoglucósidos.

\*\* Los sustratos de este enzima son kanamicina, neomicina, lividomicina y paromomicina.

\*\*\* Gen.

\*\*\*\* Proteína.

**Tabla 6**Fenotipos de resistencia a quinolonas en *Acinetobacter baumannii*

Fenotipos de resistencia			
NAL	CIP	LEV	Mecanismo de resistencia
S	S	S	-
R	R	S	Mutación en <i>gyrA</i> ± bombas de expulsión
R	R	R	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i> ± bombas de expulsión

CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; NAL: ácido nalidíxico; R: resistente; S: sensible.

en diversos hospitales españoles solo el 18,6% eran sensibles a ciprofloxacino. Las cepas de *A. baumannii* sensibles a las quinolonas poseen un rango de CIM de ciprofloxacino (0,06–0,5 mg/l) mayor al que presentan las enterobacterias (0,007–0,5 mg/l), lo cual probablemente se debe a una permeabilidad disminuida a las quinolonas de este microorganismo con respecto, por ejemplo, a *Escherichia coli*, o bien a una expresión constitutiva de alguna bomba de expulsión activa<sup>92,93</sup>. Debido a este nivel basal de resistencia intrínseca, una mutación en *gyrA* ya supone una adquisición de resistencia tanto al ácido nalidíxico como al ciprofloxacino; sin embargo, las CIM de esparfloxacino y trovafloxacino se mantienen a un nivel inferior a 2 mg/l, por lo que es necesario una doble mutación en los genes *gyrA* y *parC*, muchas veces acompañado de una sobreexpresión de un sistema de expulsión activa, para generar un fenotipo caracterizado por resistencia a todas las quinolonas (tabla 6).

En los últimos años se han descrito aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a todos los agentes antibacterianos incluyendo colistina. Recientemente, se ha descrito que la resistencia a colistina en *A. baumannii* se asocia con la expresión del gen *pmrA*, que codifica una proteína perteneciente a un sistema de doble componente. La expresión de este gen conduce a cambios en la expresión de ciertos genes relacionados con la modificación del lípido A. Además otros mecanismos de resistencia como cambios en la expresión de ciertas porinas como OmpW podrían contribuir a dicha resistencia (resultados no publicados).

### *Stenotrophomonas maltophilia*

*S. maltophilia* es un patógeno oportunista que si bien se encuentra frecuentemente asociado con neumonías, sobre todo en pacientes con fibrosis quística, puede ocasionar una amplia variedad de infecciones nosocomiales<sup>93</sup>. Existen una serie de problemas metodológicos asociados con la determinación de la sensibilidad antibiótica de este microorganismo. El método de difusión en disco no es fiable y presenta una baja reproducibilidad<sup>94</sup>. El CLSI recomienda dilución en agar o en caldo para la determinación de la sensibilidad de *S. maltophilia*. Entre los factores que pueden afectar la determinación de la sensibilidad antibiótica se encuentra que la concentración de diversos cationes como Zn<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup> pueden afectar las CIM de imipenem y carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. Otro factor es la temperatura, pues se ha comprobado que este microorganismo presenta menor sensibilidad a aminoglucósidos cuando esta se determina a 30 °C<sup>94</sup>.

### Resistencia a antibióticos betalactámicos

La permeabilidad de la membrana externa de *S. maltophilia* a los antibióticos betalactámicos podría explicar parte de la resistencia intrínseca basal de este microorganismo a estos antibióticos. La baja permeabilidad puede deberse al bajo número

de moléculas de porinas<sup>94</sup>. Sin embargo, recientemente se han descrito diversos sistemas o bombas de expulsión activa que también podrían contribuir a esta resistencia intrínseca<sup>94–96</sup>. Dos betalactamasas tienen un papel importante en la resistencia de este microorganismo a los betalactámicos (tabla 7):

1. La beta-lactamasa cromosómica L-1 es dependiente de Zn<sup>++</sup>, la presentan la mayoría de cepas y posee fundamentalmente actividad penicilinasa; aunque no hidroliza el aztreonam cabe destacar su actividad frente a imipenem y meropenem. No es inhibida por el ácido clavulánico y es sensible a la acción del EDTA.
2. La beta-lactamasa cromosómica L-2 es una beta-lactamasa de serina que posee actividad cefalosporinasa y además hidroliza aztreonam. Esta enzima es sensible a inhibidores de betalactamasas. Ambas enzimas son inducibles.

### Resistencia a aminoglucósidos

Se han descrito algunas cepas de *S. maltophilia* que poseen enzimas modificantes de los aminoglucósidos como acetil o O-nucleotidiltransferasas, entre ellas la AAC(6')-Iz, que inactiva tobramicina y amikacina, y se ha encontrado en un elevado número de cepas de *S. maltophilia* (tabla 8). Sin embargo, el principal mecanismo de resistencia que explica la baja actividad de este tipo de antibióticos frente a *S. maltophilia* es la disminución en la acumulación de aminoglucósidos en el interior de la bacteria. Esto puede ser debido a cambios en proteínas de membrana externa o a nivel de lipopolisacárido<sup>94</sup>.

### Resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas en *S. maltophilia* difiere de los otros gramnegativos no fermentadores descritos en esta publicación, fundamentalmente en el hecho de que las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, que codifican las subunidades A de la ADN girasa y topoisomerasa IV (proteínas diana de las quinolonas) no parecen tener un papel importante en la adquisición de

**Tabla 7**Fenotipos de resistencia a betalactámicos en *Stenotrophomonas maltophilia*

Fenotipos de resistencia						
AMP	TCL	PIP	CTX	IMP	ATM	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	S	-
R	R	R	R	R	S	betalactamasa L1
R	S	r	R	S	R	betalactamasa L2
R	R	R	R	R	R	betalactamasas L1+L2

AMP: Ampicilina; ATM: aztreonam; CTX: cefotaxima; IMP: Imipenem; PIP: piperacilina; R: resistente; r: sensibilidad disminuida; S: sensible; TCL: ticarcilina+ácido clavulánico.

**Tabla 8**Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos en *Stenotrophomonas maltophilia*

Fenotipos de resistencia				
GM	TOB	AK	SP	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	-
S	R	R	S	aac A4/AAC (6')-Iz
S	S	S	R	aad A1/ANT (3') (9)
R	R	R	S	Permeabilidad

AK: amikacina; GM: gentamicina; R: resistente; S: sensible; SP: espectinomicina; TOB: tobramicina.

**Tabla 9**Fenotipos de resistencia a quinolonas en *Stenotrophomonas maltophilia*

Fenotipos de resistencia			
NAL	CIP	LEV	Mecanismo de resistencia
S	S	S	–
S	R	S	Bombas de expulsión ??
R	R	R	Bombas de expulsión

CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; NAL: ácido nalidíxico; R: resistente; S: sensible.

resistencia a las quinolonas, probablemente debido a que en la posición equivalente a la Ser-83 de *E. coli*, en *S. maltophilia* encontramos Gln<sup>97,98</sup>. Recientemente, se ha descrito que en el genoma de este microorganismo<sup>99</sup> se encuentra un gen similar al qnr descrito en enterobacterias y que confiere resistencia a las quinolonas mediante protección de las proteínas diana. Este gen denominado Smqnr confiere resistencia intrínseca a las quinolonas en *S. maltophilia*<sup>100</sup>. No es infrecuente encontrar un fenotipo de resistencia caracterizado por sensibilidad a ácido nalidíxico y resistencia a norfloxacino o ciprofloxacino (tabla 9). Aunque no se han caracterizado sistemas de expulsión activa en *S. maltophilia* que afecten norfloxacino y ciprofloxacino sin afectar al ácido nalidíxico, la sobreexpresión de un sistema de expulsión activo con este patrón de especificidad podría ser la causa de este fenotipo<sup>101</sup>.

Entre los agentes antimicrobianos que presentan una mayor actividad frente a este microorganismo se encuentran el cotrimoxazol, que se considera el antimicrobiano de primera elección, así como la minociclina y la doxiciclina<sup>102</sup>.

## Bibliografía

- Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1306–11.
- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34:634–40.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:582–610.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:560–78.
- Vedel G. Simple method to determine β-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:657–64.
- Livermore DM. Penicillin-binding proteins, porins and outer-membrane permeability of carbencillín-resistant and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 1984;18:261–70.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas* porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:247–50.
- Hancock RE, Brinkman FS. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:17–38.
- Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:557–84.
- Bagge N, Ciolfi O, Hentzer M, Campbell JL, Givskov M, Hoiby N. Constitutive high expression of chromosomal β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3406–11.
- Langaele TY, Dargis M, Huletsky A. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:3296–300.
- Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of β-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4733–8.
- Moya B, Juan C, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring β-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3694–700.
- Moya B, Dotsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000353.
- Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:11–8.
- Sanschagrin F, Bejaoui N, Levesque RC. Structure of CARB-4 and AER-1 carbencillín hydrolyzing β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:1966–72.
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58:1133–48.
- Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla<sub>GES-1</sub> and fused product of aac(3')-Ib/aac(6')-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:638–45.
- Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:561–5.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:24–38.
- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Léotard S, Pagès JM, Nordmann P. Oxacillinas-mediated resistance to ceftipime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1615–20.
- Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 3117–22.
- Poirel L, Gerome P, De Champs C, Stephanazzi J, Naas T, Nordmann P. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding extenden-spectrum variant of OXA-2 β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:566–9.
- Philippon LN, Naas T, Bouthors A-T, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2188–95.
- Toleman MA, Rolston K, Jones TN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2859–63.
- Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol*. 2009;57:493–5.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:321–31.
- Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, et al. Multifocal outbreaks of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum β-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:349–53.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of bla<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1584–90.
- Prats G, Miró E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:932–3.
- Peña C, Suárez C, Tubau F, Gutiérrez O, Domínguez A, Oliver A, et al. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-β-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1026–9.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Spanish hospitals: Molecular epidemiology and mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:4329–35.
- Rodríguez MC, Ruiz del B, Rodríguez-Mirones C, Romo M, Monteagudo I, Martínez-Martínez L. Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metallobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2010;28:99–103.
- Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, et al. Characterization of the new metallo-β-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3589–96.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:673–9.
- Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β-lactamase gene, bla<sub>GIM1</sub>, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:4654–61.
- El Salabi A, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-β-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:582.
- Sakyo S, Timita H, Tanimoto K, Fujimoto S, Ike Y. Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Agents Chemother*. 2006;59:220–8.
- Pérez FJ, Gimeno C, Navarro D, García-de-Lomas J. Meropenem permeation through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* can involve pathways other than OprD porin channel. *Chemotherapy*. 1996;42:210–4.

40. Stover CK, Phan XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406:959–64.
41. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing, exAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1797–802.
42. Saito K, Yoneyama H, Nakae T. *nal-B* type mutations causing the overexpression on the MexA-MexB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;179:67–72.
43. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanisms against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;45:88–94; Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanisms against aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:785–90.
44. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003;362:1188–893.
45. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrates specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:3322–7.
46. MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirks JE, et al. Aminoglycoside resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J Infect Dis*. 2000;181:1180–4.
47. El-Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plesiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51: 1016–21.
48. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:337–41.
49. Nakano M, Deguchi T, Kawamura T, Yasuda M, Kimura M, Okano Y, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2289–91.
50. Jalal S, Wretlind B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. 1998;4:257–61.
51. Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1393–9.
52. Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, Nakae T. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol*. 2002;46: 391–5.
53. Dijkshoorn L, Nemec A, Siebert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:939–51.
54. Vila J, Pachón J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9:587–99.
55. Pachón J, Vila J. Treatment of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Op Invest Drugs*. 2009;10:150–6.
56. Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1991;28: 35–45.
57. Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P, Ade IJK. A resistant nodulation cel division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52: 557–62.
58. Roca I, Martí S, Espinal PA, Martínez P, Gibert I, Vila J. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4013–4.
59. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:477–80.
60. Vila J, Marco F, Marcos MA, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, et al. In Vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:138–41.
61. Devaud M, Kayser FH, Baché B. Transposon mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22: 323–9.
62. Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2757–9.
63. Paul G, Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E, Nérot P, Philippon A. Novel carbapenil-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1989;59:45–50.
64. Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasterian F, et al. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2179–84.
65. Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:428–32.
66. Danes C, Navia MM, Ruiz J, Marco F, Jurado A, Jimenez de Anta MT, et al. Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) in the MICs of different beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:261–3.
67. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudieu C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:629–35.
68. Ruiz M, Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Vila J. Prevalence of ISAb1 in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;274:63–6.
69. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Piker R, Livermore DM, et al. The role of ISAb1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;258:72–7.
70. Segal H, Nelson EC, Elisha BG. Genetic environment and transcription of ampC in *Acinetobacter baumanii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:612–4.
71. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygün G, Coskunkan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multi-center study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2265–9.
72. Yong D, Shin H, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1749–51.
73. Naas T, Nordmann P, Heidt A. Inter-country transfer or PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29:226–8.
74. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Delghedere Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:178–82.
75. Celenza G, Pellegrini C, Cascamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of bla<sub>CTX-M</sub> and bla<sub>PER-2</sub> beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:975–8.
76. Navia MM, Ruiz J, Vila J. Characterization of an integron carrying a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist*. 2002;8:261–5.
77. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3978–84.
78. Endemiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, Hujer KM, et al. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2211–4.
79. Naas T, Namdar F, Réglier-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York city. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:1174–6.
80. Al Naiemi N, Duim B, Savelkoul PHM, Spanjaard L, de Jonge E, Bart A, et al. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4862–4.
81. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3542–7.
82. Ruiz M, Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolyzing oxacillinas in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1192–8.
83. Higgins PG, Poirel L, Lehman M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:5035–8.
84. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:306–25.
85. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:1201–15.
86. Vila J, Ruiz J, Navia MM, Becerril B, García I, Perrea S, et al. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol*. 1999;37:758–61.
87. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*. 2004;53:1233–40.
88. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-Nodulation-Cell Division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:3375–80.
89. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:821–3.
90. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta MT. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1201–3.
91. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta MT. Quinolone resistance in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 1997;39:757–62.
92. Vila J, Ribera A, Marco F, Ruiz J, Mensa J, Chaves J, et al. Activity of ciprofloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:471–7.
93. Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:697–702.

94. Denton M, Kerr KGM. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microb Rev. 1998;11: 57–80.
95. Alonso A, Martínez JL. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:3079–86.
96. Vila J, Martínez JL. Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. Curr Drug Targets. 2008;9:797–807.
97. Ribera A, Domenech-Sánchez A, Ruiz J, Benedí VJ, Jimenez de Anta MT, Vila J. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates [en prensa]. Microb Drug Resist. 2002.
98. Valdezate S, Vindel A, Echeita A, Baquero F, Cantón R. Topoisomerase II and IV quinolone resistance-determining regions in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates with different levels of quinolone susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:665–71.
99. Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. BMC Microbiol. 2008;8:148.
100. Sánchez MB, Martínez JL. SmQnr contribuye a la resistencia intrínseca a los quinolones en *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:580–1.
101. Ribera A, Jurado A, Ruiz J, Marco F, Del Valle O, Mensa J, et al. In vitro activity of cinafloxacin in comparison with other quinolones against *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates in the presence and absence of reserpine. Diag Microbiol Infect Dis. 2002;42:123–8.
102. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F, Cantón R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:1581–4.