



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*

Cristina Seral García, María Pardos de la Gándara y Francisco Javier Castillo García*

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

RESUMEN

Palabras clave:

Betalactamasas de espectro extendido
Métodos fenotípicos de cribado y confirmación
Métodos moleculares de caracterización

Los métodos de detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) comienzan por una adecuada interpretación de los perfiles de sensibilidad aplicando los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma. Posteriormente, se elegirán métodos de confirmación apropiados, basados en la inhibición de la enzima por inhibidores de betalactamasas, generalmente el ácido clavulánico. Deben utilizarse, al menos, dos sustratos –cefotaxima o ceftriaxona y ceftazidima– para detectar enzimas con baja actividad hidrolítica para alguno de los sustratos en las enterobacterias que no poseen AmpC, y añadir cefepima, o utilizar inhibidores de AmpC, en aquellos microorganismos que posean esta enzima. La identificación de las enzimas responsables del fenotipo BLEE confirmado puede realizarse, en el mismo laboratorio o en centros de referencia, siguiendo un protocolo de pruebas bioquímicas y moleculares que al menos permita descartar los genes relacionados con más frecuencia con los perfiles fenotípicos predominantes en nuestra región. Es importante conocer las combinaciones enzimas-microorganismos frecuentes en nuestra área geográfica, los vehículos de transmisión genética involucrados en su diseminación y las principales características epidemiológicas de las infecciones que producen para establecer la dimensión del problema y analizar su evolución, a fin de intentar instaurar medidas que contribuyan a limitar su diseminación.

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

Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*

ABSTRACT

Keywords:

Extended spectrum beta-lactamases
Screening and confirmatory phenotypic methods
Molecular methods of detection

Methods for detecting ESBL-producing *Enterobacteriaceae* begin by a correct interpretation of the susceptibility profiles, applying the usual criteria for interpretative reading of the antibiogram. Appropriate confirmatory methods will be consequently chosen, based on the inhibition of the enzyme by beta-lactamases inhibitors, generally clavulanic acid. In case of non-AmpC-producing *Enterobacteriaceae*, at least two substrates should be used –cefotaxime or ceftriaxone and ceftazidime– to detect enzymes with a low hydrolytic activity against both substrates. Cefepime or AmpC-inhibitors should be recommended for AmpC-producing microorganisms. The identification of the enzymes responsible for the confirmed ESBL phenotype can be performed, either in the clinical laboratory or in reference centres, following a protocol of biochemical and molecular reactions able to detect and characterize, at least, those genes more frequently related to the predominant phenotypic profiles in our region. It is important to know which are the most prevalent combinations enzyme-microorganism, the vehicles for the genetic transmission involved in their dissemination, and the main epidemiological characteristics of the infections that they produce, in order to establish the dimensions of the problem and conduct surveillance studies, with the aim of achieving measures to control the wide spread.

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

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fcastillo@salud.aragon.es (F.J. Castillo García).

Origen y tipos de betalactamasas de espectro extendido

El mecanismo más importante de resistencia a los betalactámicos en las enterobacterias es la producción de betalactamasas. Muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* poseen betalactamasas cromosómicas naturales, probablemente derivadas de las propias proteínas fijadoras de penicilina (PBP, del inglés *penicillin-binding protein*), con las que tienen analogía secuencial y estructural. Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos móviles, y su producción puede ser constitutiva o inducible. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamas, pero no las carbapenemas. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. En 1983 se descubrió en Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más amplio espectro (SHV-2), inaugurando el capítulo de las BLEE^{1,2}. En Francia, un año después, se describió una TEM-3 con fenotipo semejante³. En 1989 se detectó un aislado clínico de *Escherichia coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima⁴. Se considera que las cefotaximas CTX-M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp. Tanto las secuencias de inserción (IS, del inglés *insertion sequences*) como algunos fagos estarían involucrados en este salto a los plásmidos. Entre 1986 y 1992 aparecieron, casi simultáneamente, las primeras CTX-M en Japón, Alemania, Argentina, Italia y Francia⁵. El grupo CTX-M ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria. Se han aislado en casi todas las enterobacterias, en particular en *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter*. Actualmente se detectan, sobre todo, en *E. coli* y en pacientes con infecciones contraídas en la comunidad, produciéndose un flujo de aislados desde este ambiente al medio hospitalario. Su éxito epidemiológico se debe a la presencia de genes *bla*_{BLEE} en elementos móviles (plásmidos o transposones) y su asociación a integrones, más que a su diseminación clonal, como SHV y TEM⁶. En 1991, en Turquía, y más tarde en Francia, se detectaron por primera vez oxacilinasas, que se inhibían débilmente por el ácido clavulánico pero que conferían, por lo demás, un fenotipo similar al de las BLEE. Resultaron ser mutantes de las betalactamasas tipo OXA, la mayoría de OXA-10. Se han descrito 11 variedades hasta la fecha, y aunque principalmente afectan a *Pseudomonas*, también se han descrito en enterobacterias⁷.

Hoy se conocen más de 160 variantes de TEM, la mayoría de ellas BLEE, pero también aquí se incluyen las enzimas IRT (*inhibitor resistant TEM*) y CMT (*complex mutant TEM*), más de 115 para SHV y más de 80 de CTX-M (clasificadas en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25), y la cifra sigue creciendo. Además, aparecen nuevas BLEE como PER, VEB, GES, SFO, TLA, BEL, BES e IBC^{5,8}. Las diferencias en las secuencias de aminoácidos de las enzimas TEM, SHV y otras enzimas (OXA, CTX-M, CMY, IMP, VIM, KPC) están actualizadas en la página web dedicada a la nomenclatura de George Jacoby y Karen Bush⁹.

Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, algunos microorganismos producen betalactamasas cromosómicas que, en caso de hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. Entre las enterobacterias que producen estas betalactamasas de forma natural se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri* y distintas especies del género *Kluyvera*. En este artículo, al referirnos a las BLEE, haremos mención sólo a las betalactamasas de codificación plasmídica, ya que son las que suponen un riesgo epidemiológico importante por su alta capacidad de diseminación.

Presencia de BLEE en enterobacterias distintas de *E. coli* y *Klebsiella*

Diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en Europa y otras áreas geográficas revelan un aumento de la prevalencia y la dispersión de las BLEE, principalmente en *E. coli* y *Klebsiella*. Respecto a otros géneros de la familia, el estudio MYSTIC de 2004 informa de una prevalencia en *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Proteus mirabilis* por debajo del 4%¹⁰, siendo en 2006 de un 1,4% para *P. mirabilis*¹¹. Los datos del estudio SENTRY indican que el 5,3% de *P. mirabilis* son portadores de BLEE, mientras que, en Italia, en infecciones extrahospitalarias, principalmente urinarias, es *P. mirabilis* el microorganismo que alberga BLEE con más frecuencia. En el estudio SMART de 2004, el 22% de las cepas de *Enterobacter* aisladas de infecciones intraabdominales producían BLEE. En general, la prevalencia de BLEE en Europa es mayor que en Estados Unidos y menor que en Asia y Sudamérica, aunque se encuentran amplias diferencias en los distintos países europeos. Parece que algunos microorganismos que expresan ciertas enzimas están mejor adaptados a algunas áreas geográficas. Y, si bien el Reino Unido sigue siendo el país europeo con una mayor prevalencia de aislados BLEE, es destacable que países del norte y el este de Europa, Suecia, Noruega y Alemania, que tradicionalmente contaban con tasas inferiores al resto de países europeos, ya se están igualando⁸. Las BLEE más frecuentes en la actualidad son TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32.

Género *Enterobacter*

Enterobacter, como *Citrobacter*, *Serratia*, *Providencia* y *Morganella*, poseen betalactamasas cromosómicas inducibles. Estas betalactamasas son enzimas de clase C que pueden conferir resistencia constitutiva a las oximiino-cefalosporinas si son hiperproducidas como consecuencia de una desrepresión mutacional¹². Respecto a la presencia de BLEE, *Enterobacter aerogenes* portador de TEM-24 se ha diseminado en Francia, Italia, España, Bélgica y Portugal en forma de brotes epidémicos^{13,14}. En un estudio realizado en Estados Unidos sobre *Enterobacter* aislados de hemocultivos, 15 de 45 aislamientos poseían una BLEE tipo SHV (SHV-2,-5,-7,-12,-14,-30), además de AmpC, no existiendo relación clonal entre las cepas¹⁵. SHV-12 se ha encontrado en *Enterobacter cloacae* también en otros países como Taiwán¹⁶. En un estudio de 12 años realizado en un hospital de nuestro país, CTX-M-10 fue predominante en *E. cloacae*, y se encontraron cinco clones diferentes entre los diez aislamientos detectados¹³. En Portugal, en un estudio de prevalencia de BLEE en enterobacterias de origen clínico, encontraron en *E. cloacae* las enzimas TEM-10 y SHV-12 y en *E. aerogenes* las enzimas TEM-24 y TEM-116⁶. En nuestro país, recientemente se ha descrito un brote epidémico hospitalario causado por una cepa de *E. cloacae* productora de SFO-1, codificada en un plásmido; es la primera vez que se detecta esta enzima fuera de Japón¹⁷.

Proteus mirabilis

P. mirabilis carece de betalactamasas cromosómicas de tipo AmpC, así que la resistencia enzimática a betalactámicos depende de la adquisición de genes de resistencia desde otras bacterias. En un estudio español reciente se ha encontrado una notable diversidad de enzimas BLEE (CTX-M-1, CTX-M-32 y VEB-4) en *P. mirabilis*, y la prevalencia, aunque baja, se había incrementado a lo largo de los años¹⁸. En Portugal se halló en *P. mirabilis* de origen clínico la enzima TEM-24⁶.

Salmonella enterica

A diferencia de otras enterobacterias, el género *Salmonella* carece de betalactamasas cromosómicas constitutivas. Ello podría explicar-

se por el coste biológico que supone su mantenimiento, pues se considera que la expresión a alto nivel de este tipo de enzimas resultaría incompatible con la capacidad invasiva y de multiplicación intracelular de *Salmonella*. Así pues, lo más habitual es que, si *Salmonella* llega a producir betalactamasas, éstas sean de origen plasmídico, y de ellas, las más frecuentes son de tipo TEM, SHV, OXA y CTX-M. Por otra parte, hay que destacar, por su amplia distribución (hasta un 55% de todos los aislados mundiales del serotipo), el clon de *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104 y sus derivados, que expresa el fenotipo de pentarresistencia ACSSuT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamidas y tetraciclina). Los genes (*bla_{PSE-1}*, *floR*, *aadA1*, *sul1* y *tetG*) responsables de las resistencias suelen encontrarse dentro del denominado islote de patogenicidad de *Salmonella* 1 (ISG-1), de localización cromosómica. Se han descrito aislados en aves de corral que albergaban, al mismo tiempo, este ISG-1 en el cromosoma y una BLEE *bla_{TEM-52}* en un plásmido conjugativo¹⁹. Otro grupo de aislados de *Salmonella* Typhimurium de distribución internacional alberga en plásmidos híbridos de virulencia y resistencia una penicilinasasa OXA-1, entre otros genes de resistencia responsables también de un fenotipo ACSSuT²⁰. Varios estudios, procedentes de diferentes países, describen aislados de *Salmonella* Typhimurium que, produciendo igualmente una OXA-1 plasmídica, presentan una sensibilidad disminuida a la cefepima, lo que puede dificultar su diferenciación inicial de una cepa BLEE^{21,22}. Los últimos estudios europeos muestran un bajo porcentaje de BLEE en *Salmonella*, lo que no resta trascendencia a su presencia y eventual difusión, ya que el tratamiento de pacientes con cepas portadoras de este mecanismo de resistencia puede verse seriamente limitado²³. Las BLEE detectadas en *S. enterica* más frecuentes en Europa proceden tanto de pacientes humanos –enfermos y portadores asintomáticos– como de animales de granja y de compañía. De hecho, se ha demostrado la difusión clonal de cepas de origen humano y animal del serotipo Virchow portadoras de *bla_{CTX-M-9}* aisladas en España²⁴. A destacar, los distintos brotes de *Salmonella* Virchow portadora de *bla_{CTX-M-2}* o *bla_{CTX-M-9}*, así como los hallazgos de diversos serotipos portadores de *bla_{TEM-14}* o *bla_{TEM-52}* y de *bla_{SHV-12}*^{8,19,25,26}. También se ha descrito la incorporación de una BLEE, una CTX-M-15, en el cromosoma bacteriano a partir de plásmidos conjugativos, concretamente en aislados de *Salmonella* serotipo Concord, procedentes de Etiopía²⁷. En un estudio reciente de caracterización de BLEE en *S. enterica* realizado en nuestro país se hallaron las enzimas CTX-M-15, CTX-M-10 y SHV-12²⁸.

Detección de BLEE en el laboratorio de microbiología

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE se han diseñado para *E. coli* y *Klebsiella*, y se fundamentan en la inhibición de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas. No se puede menospreciar la presencia, cada vez mayor, de BLEE en enterobacterias productoras de betalactamasas cromosómicas AmpC, en las que las mutantes desreprimidas enmascaran la presencia de BLEE, complicando su detección. Además, está creciendo la incidencia de enterobacterias portadoras de AmpC plasmídicas. Con independencia de los métodos que elija cada laboratorio para su estudio, el primer paso ha de ser siempre un riguroso análisis del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos con los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma que permita detectar fenotipos compatibles con su presencia²⁹.

Métodos fenotípicos de cribado para la investigación de BLEE

Desde la década de 1980 se han publicado diferentes protocolos con pruebas fenotípicas que exploran las dos características principales de las BLEE: sensibilidad disminuida a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam e inhibición de la resistencia por ácido clavulánico. Sin embargo, la detección de BLEE en microorganismos

productores de AmpC resulta difícil con estos métodos, porque las betalactamasas de tipo AmpC resisten la inhibición por ácido clavulánico y, además, el propio ácido clavulánico puede actuar como inductor de la betalactamasa AmpC presente en el cromosoma de determinadas especies³⁰. El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda hacer un cribado de la posible producción de BLEE en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. También incluye a *P. mirabilis*, cuando su presencia es clínicamente relevante, como en hemocultivos. Sin embargo, todavía no incluye recomendaciones para los microorganismos en los que podrían regir los mismos criterios, como *Salmonella*, o para los productores de AmpC (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Cricobacter freundii*, etc.). Se propone una prueba inicial, mediante microdilución en caldo o mediante difusión en agar con discos, para evaluar la sensibilidad a más de uno de los siguientes antibióticos: cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Una disminución de la sensibilidad a uno o más de los antimicrobianos probados puede indicar la presencia de una BLEE y deberá procederse a realizar una prueba fenotípica de confirmación³¹. Se considerarán sospechosas las cepas con una concentración mínima inhibitoria (CMI) $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ para cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona o aztreonam en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *P. mirabilis*. Si se utiliza el método de difusión en agar con discos, la sospecha deberá establecerse cuando se registren diámetros de inhibición para cefpodoxima $\leq 17 \text{ mm}$, ceftazidima $\leq 22 \text{ mm}$, aztreonam $\leq 27 \text{ mm}$, cefotaxima $\leq 27 \text{ mm}$ y ceftriaxona $\leq 25 \text{ mm}$ en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, y diámetros para cefpodoxima $\leq 22 \text{ mm}$, ceftazidima $\leq 22 \text{ mm}$ y cefotaxima $\leq 27 \text{ mm}$ en el caso de *P. mirabilis*. También se recomienda usar las cepas control *E. coli* ATCC 25922 no productor de BLEE y *K. pneumoniae* ATCC 700603 productor de BLEE.

Métodos automatizados y cribado de BLEE

Los sistemas automatizados más utilizados en los laboratorios de microbiología clínica son capaces de alertar de la posible producción de BLEE por parte de los microorganismos estudiados. Para hacer el cribado más eficaz, suelen incluir combinaciones de cefalosporinas con ácido clavulánico. La presencia de cefepima en los cribados automáticos facilitará la búsqueda de BLEE en las bacterias productoras de AmpC. Por otra parte, la presencia de cefamicinas (cefóxitina) en el cribado inicial permitirá sospechar la presencia de una enzima de tipo AmpC, especialmente en aquellos géneros que no la produzcan de forma constitutiva. Se han realizado muchos estudios para evaluar la fiabilidad en la detección de BLEE por diferentes sistemas automatizados con resultados diversos^{32,33}. Por último, hay que señalar que se han comercializado medios selectivos cromogénicos para BLEE elaborados por diferentes proveedores (ChromID, bioMérieux, Oxoid) que basan su eficacia en la inclusión de oximiino-cefalosporinas en su composición. Para estudios de portadores se pueden utilizar estos medios o preparar medios suplementados con cefotaxima o ceftazidima (1 $\mu\text{g/ml}$).

Pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE

La prueba fenotípica de confirmación preconizada por el CLSI explora la sensibilidad a cefotaxima y ceftazidima con/sin ácido clavulánico mediante difusión en agar con discos o microdilución en caldo. En el primer caso se requieren discos de cefotaxima (30 μg), ceftazidima (30 μg) y otros con los mismos antibióticos adicionados de ácido clavulánico (10 μg). En el caso de realizar microdilución en caldo, es necesario probar concentraciones de ceftazidima de 0,25-128 $\mu\text{g/ml}$ y de cefotaxima 0,25-64 $\mu\text{g/ml}$, y concentraciones de ceftazidima/ácido clavulánico de 0,25/4-128/4 $\mu\text{g/ml}$ y de cefotaxima/ácido clavulánico de 0,25/4-64/4 $\mu\text{g/ml}$. Se confirma la presencia de una BLEE cuando la sensibilidad a cualquiera de los dos antibióticos en presencia de ácido clavulánico aumenta más de 5 mm el diámetro de inhibición o produce una reducción de más de 3 diluciones en la

CMI. Es importante realizar la prueba de confirmación con cefotaxima y ceftazidima para aumentar la sensibilidad de la técnica. La utilización sólo de ceftazidima reduciría notablemente la probabilidad de detectar las BLEE tipo CTX-M, tan frecuentes en nuestro medio. Siendo que el CLSI no tiene en cuenta la detección de BLEE en enterobacterias diferentes a *E. coli* y *Klebsiella*, y considerando que la sensibilidad encontrada para enterobacterias productoras de AmpC utilizando estos dos antibióticos es baja, algunos autores recomiendan incluir cefepima/cefepima-ácido clavulánico. De este modo se consigue una sensibilidad del 73% (difusión en disco) y del 53% (reducción de > 3 diluciones) en el caso de *E. cloacae*¹⁵. La baja sensibilidad se debería, principalmente, a las cepas que presentan CMI para cefepima más bajas o diámetros amplios. Sin embargo, cuando se consideran sospechosas todas las cepas con CMI ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$, se alcanza una sensibilidad del 93%, aunque la especificidad es baja. El CLSI recomienda interpretar los resultados del antibiograma para penicilinas, cefalosporinas y aztreonam como resistentes si se confirma la presencia de una BLEE. Las recomendaciones que da EUCAST ante la sospecha de una BLEE en cualquier enterobacteria por lectura interpretada del antibiograma (excepto *K. oxytoca* y *C. koseri*) es confirmar la presencia de la BLEE e informar sobre los resultados sensibles como intermedios y los intermedios como resistentes³⁴.

El método de difusión en agar con discos puede ser sustituido en la práctica por la sinergia de doble disco, y las pruebas de microdilución, por la utilización de Epsilon-test® (bioMérieux), como se describe a continuación.

Prueba de sinergia de doble disco

La prueba de sinergia de doble disco (DDST, del inglés *Double-Disc Synergy Test*) fue el primer método propuesto para el cribado de BLEE³⁵. Se lleva a cabo en medio sólido, situando un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20 $\mu\text{g}/10$ μg), y entorno a éste, separados 30 mm (de centro a centro), se disponen discos de cefotaxima (o ceftriaxona), ceftazidima y aztreonam, con una carga estándar de 30 μg . La ampliación del halo de inhibición de los discos colocados alrededor del de amoxicilina-ácido clavulánico indica la producción de una BLEE. Si el resultado de la DDST es negativo, pero la sospecha de producción de BLEE es alta, resultaría necesario repetir la prueba ajustando la distancia entre los discos, generalmente disminuyendo la distancia entre ellos a 20 mm, lo que aumenta la sensibilidad, al menos en *E. cloacae*¹⁵. Con *P. mirabilis* hay que aumentar la distancia hasta 45 mm, porque la BLEE se puede expresar a bajo nivel. Las limitaciones de la doble difusión con discos dependen de la pericia en la realización de la prueba (disposición de los discos) y en la interpretación de la sinergia. En cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de betalactamasas puede verse mermada la capacidad de detección de esta prueba.

Confirmación fenotípica mediante Etest®

El método de las microdiluciones diseñado por el CLSI puede ser sustituido por el uso de tiras de Epsilon-test (Etest®), que es mucho más cómodo, si bien resulta menos económico. Para detectar BLEE se utilizan un conjunto de tiras de Etest (ESBL CT/CTL, TZ/TZL, PM/PML) que contienen una concentración creciente de la cefalosporina correspondiente (cefotaxima, ceftazidima o cefepima), por un lado, y una concentración creciente de la misma cefalosporina asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4 $\mu\text{g/ml}$), por el otro. El fabricante recomienda la utilización de dos tiras (TZ/TZL y CT/CTL) en el caso de microorganismos que no producen betalactamasas de tipo AmpC e incluir la tira de PM/PML en el caso de microorganismos productores de estas betalactamasas³⁶. Si se observan colonias en los halos de inhibición, el valor de la CMI deberá determinarse observando cuál es la CMI a la que todas las mutantes han sido inhibidas. Si no se siguen estas reglas, la sensibilidad de la técnica disminuye y se observan discrepancias en la lectura³⁷.

Mecanismos de resistencia específicos que pueden inducir a confusión en la detección de BLEE

Puede producirse confusión en la detección de BLEE en diferentes situaciones. En primer lugar, la hiperproducción de SHV-1 en *K. pneumoniae*, causada por la presencia de múltiples copias del plásmido que la codifica, puede dar un fenotipo compatible con una BLEE. En estos casos se incrementan las CMI a ceftazidima (4-8 $\mu\text{g/ml}$) y aztreonam (1-2 $\mu\text{g/ml}$), mientras que se ven afectadas escasamente las CMI de cefotaxima, cefepima y ceftiproma. Además, hay una disminución de la sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico.

Otra posibilidad de confusión deriva de la hiperproducción, por parte de *K. oxytoca*, de betalactamasas cromosómicas K1 sensibles a los inhibidores (grupo 2be). Estas cepas producen ampliación del halo con cefuroxima, ceftriaxona, aztreonam, cefotaxima y cefepima, pero no con ceftazidima. La hiperproducción no confiere resistencia a la ceftazidima. Por lo tanto, para diferenciar una cepa de *K. oxytoca* hiperproductora de K1 de una productora de BLEE, habrá que fijarse en la CMI de la ceftazidima, y si disminuye en presencia de ácido clavulánico. De forma prácticamente constante, estas cepas son resistentes a las combinaciones con inhibidores de betalactamasas.

Una tercera posibilidad de confusión proviene de la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas inducibles de *Proteus vulgaris*, *P. penneri* o *C. koseri*, que son cefuroximasas inhibidas por el ácido clavulánico (grupo 2e). Éstas pueden dar una ampliación del halo de cefuroxima, ceftriaxona y cefotaxima, en presencia del inhibidor. En cambio, permanecen sensibles la ceftazidima y el aztreonam.

En cuarto lugar, algunas betalactamasas de tipo OXA (grupo 2d) pueden afectar también a las cefalosporinas de tercera generación, especialmente a la cefotaxima y al aztreonam, como OXA-10, OXA-11, OXA-14, OXA-18 y OXA-28. Este tipo de enzimas a veces se incluyen como BLEE, pero no hay consenso para hacerlo. La acción inhibidora del ácido clavulánico sobre estas enzimas suele ser moderada, menor que la ejercida sobre las BLEE propiamente dichas³⁸.

Una quinta posibilidad de confusión se debe a la hiperproducción de OXA-1, especialmente descrita en *E. coli* y, más recientemente, en *Salmonella*, que puede originar una disminución de la sensibilidad a la cefepima o a la ceftiproma, sin afectar a las cefalosporinas de tercera generación²¹.

Por último, las BLEE resistentes a los inhibidores, también llamadas *complex mutant* TEM (CMT), son enzimas derivadas de TEM que combinan mutaciones propias de las BLEE y las IRT (p. ej., TEM-125), y muestran resistencia a la amoxicilina-ácido clavulánico, sensibilidad disminuida a la ceftazidima (16 mg/l) y sensibilidad a la cefotaxima y a la cefepima. La DDST será positiva con ceftazidima a 20 mm³⁹.

Detección de BLEE en cepas productoras de AmpC

También es destacable el problema que plantean algunas enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo AmpC, que pueden interferir en el diagnóstico correcto de las BLEE, enmascarando su detección al responder de la misma manera al cribado. Es el caso de: a) AmpC cromosómica inducible, a veces incluso desreprimida, como en *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella morganii* y *C. freundii*; b) AmpC cromosómica hiperproducida por mutaciones en la región del promotor/atenuador del gen cromosómico, como ocurre en *E. coli* y *Shigella*, y c) AmpC plasmídicas, potencialmente presentes en todas las enterobacterias.

En estos casos se pueden aplicar las siguientes modificaciones en el cribado:

- Incluir en la prueba de sinergia un disco de cefepima, cefalosporina de cuarta generación menos afectada por las resistencias de tipo AmpC, y considerar la investigación de BLEE ante una CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para cefepima¹⁵; si bien este método no es infalible, pues algu-

nas BLEE muestran una actividad mínima sobre esta cefalosporina¹⁶, ya que se ha descrito en *E. aerogenes* algún caso de hiperproducción de AmpC, posiblemente alterada por modificación de algún aminoácido, que muestra actividad hidrolítica sobre la cefepima; en este caso, la hiperproducción se confirma empleando susstratos que inhiban esta enzima⁴⁰.

- Disminuir la distancia entre los discos de cefalosporinas o aztreonam y el de amoxicilina-ácido clavulánico a 25 o incluso 20 mm²⁹.
- Se ha aconsejado utilizar un disco de cefuroxima en la DDST porque es más sensible a las betalactamasas, incluso tras eventuales mutaciones de éstas⁴¹.
- Incluir un disco de cefoxitina, para descartar una AmpC plasmídica en los géneros bacterianos que no la produzcan de forma constitutiva, aunque algunas enzimas del grupo ACC pueden mostrarse sensibles a cefamicinas^{42,43}. La resistencia a la cefoxitina y a la combinación amoxicilina-ácido clavulánico refuerza la sospecha de la presencia de una AmpC plasmídica, si bien otro mecanismo de resistencia que podría afectar a la cefoxitina es la impermeabilidad de la membrana por alteración de las porinas, que se descartaría con un disco de cefotetán, resistente en el caso de AmpC.
- La sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico descarta, en principio, la betalactamasa de tipo AmpC, y apunta, más bien, a una BLEE como causa de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Si bien la resistencia a esta combinación también puede deberse a una elevada producción de BLEE, o a la existencia de BLEE resistentes a inhibidores, además de otros múltiples mecanismos de resistencia que pueden coexistir o no con la BLEE, como IRTs, enzimas OXA, hiperproducción de SHV-1, TEM-1, K1, etc.
- El ácido borónico y la cloxacilina inhiben la actividad de las betalactamasas de clase C. Existen numerosos estudios que confirman su utilidad para detectar microorganismos que poseen simultáneamente una BLEE y una betalactamasa de tipo AmpC. La prueba se realiza adicionando ácido 3-amino-fenil-borónico en discos que contienen cefotaxima o ceftazidima con/sin ácido clavulánico. También se puede emplear la técnica de difusión con doble disco que revelaría un efecto sinérgico entre la cefoxitina o el cefotetán y el ácido borónico, o bien emplear tiras de Etest con cefotetán (resistente) y cefotetán/cloxacilina (disminución de las CMI). Se puede también realizar una DDST en Müller Hinton conteniendo cloxacilina (50-350 µg/ml) o ácido borónico (300-400 µg/ml) con el fin de inhibir la enzima AmpC y desenmascarar la presencia de la BLEE⁴⁴.

Métodos bioquímicos y moleculares

La identificación de las enzimas responsables del fenotipo BLEE confirmado deberá realizarse siguiendo un protocolo que al menos permita descartar los genes relacionados con más frecuencia con los perfiles fenotípicos predominantes en nuestra región.

Determinación del punto isoelectrónico

Un primer paso será la determinación del punto isoelectrónico en gradiente de pH de las distintas betalactamasas que pueda estar produciendo la bacteria objeto de estudio. Para ello, se ha de cultivar la cepa sobre un medio adicionado de una de las cefalosporinas a las que ha demostrado ser resistente, con el fin de que se produzca una mayor cantidad de enzima. Tras lisar el cultivo por sonicación y purificar el extracto proteico por ultracentrifugación, se somete el sonificado a una electroforesis (PhastSystem apparatus, Pharmacia, Uppsala, Suecia) en gel de poliacrilamida por gradiente de pH, con un intervalo entre 3 y 9 (PhastGel 3-9, Pharmacia), y tras la coloración con nitrocefina (500 µg/ml; Oxoid) se comparan los puntos isoelectrónicos (pI) obtenidos con los de otras betalactamasas conocidas^{29,45,46}: TEM: pI 5,2-6,5; SHV: pI 7,0-8,2; CTX-M: pI 7,6-9,0. El isoelectroenfoque analítico se utiliza poco actualmente debido a la descripción de diferentes BLEE que comparten idéntico punto isoelectrónico. Es de utilidad para detectar varias enzimas en un mismo aislamiento, o

para limitar el número de enzimas que hay que investigar y escoger las amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) más convenientes.

Amplificación y secuenciación del gen *bla*_{BLEE}

Entre los métodos moleculares, destacan las técnicas de amplificación utilizando los cebadores generales que se incluyen en la tabla 1 para confirmar el grupo al que puede pertenecer la betalactamasa encontrada. La posterior secuenciación de los productos obtenidos permitirá determinar con exactitud la enzima BLEE. Si los puntos isoelectrónicos encontrados son de tallas diferentes, o todas las reacciones de PCR resultan negativas, se podrá investigar la presencia de otros genes menos frecuentes en nuestra área.

Estudio del entorno genético de las BLEE

Dado que la mayoría de los genes de resistencia de tipo *bla*_{BLEE} se encuentran en las enterobacterias formando parte de integrones de clase I, que a su vez suelen ser movilizados en plásmidos o transposones, es recomendable analizar la ubicación de los genes encontrados para poder establecer una mejor previsión acerca de la expansión potencial de los mismos, no sólo de forma clonal, sino también entre distintas especies y géneros. Para ello, podemos realizar una PCR utilizando las regiones constantes que flanquean a los casetes de genes en los integrones de clase I, que nos permitirá descartar su relación con el gen encontrado. Su posterior secuenciación determinará los genes que conforman los casetes del integrón (tabla 2).

Estudio de la transmisibilidad de los genes *bla*_{BLEE}

Conocido el gen responsable del fenotipo demostrado por las bacterias objeto de estudio, es importante determinar la forma en que estas resistencias han sido adquiridas para poder predecir su posterior transmisibilidad a otros géneros y especies de enterobacterias. La mayoría de las BLEE en expansión en nuestro país se localizan en plásmidos conjugativos que por transmisión horizontal transfieren el fenotipo de resistencia de unas especies a otras, incluso entre géneros de enterobacterias diferentes. Resulta por ello interesante valorar la realización de una serie de análisis plasmídicos:

- Conjugación bacteriana: permite deducir la responsabilidad de un plásmido conjugativo en la adquisición y la transmisión horizontal de los genes *bla*_{BLEE}.
- PFGE tras digestión por Nucleasa S1: permite conocer la cantidad y el tamaño de los plásmidos albergados por la cepa resistente. La transferencia de los productos de migración sobre membrana de nitrocelulosa y su posterior hibridación con sondas específicas confirmará la ubicación del gen *bla*_{BLEE} sobre el plásmido correspondiente.

Tabla 1

Cebadores recomendados para la identificación y secuenciación de los principales grupos de genes *bla*_{BLEE} en nuestro medio

Cebadores	Secuencia	Tamaño	Referencia
CTX-M F	CRA TGT GCA GYA CCA GTA A	540 pb	25
CTX-M R	CGC RAT ATC RIT GGT GGT G		
TEM-F	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	1.080 pb	25
TEM-R	GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC		
SHV-F	TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC	795 pb	51
SHV-R	GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG		

Tabla 2

Cebadores recomendados para la identificación y secuenciación de integrones de clase I en nuestro medio

Cebadores	Secuencia	Referencia
INT 5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AGC	52
INT 3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GAT	

– Grupos de incompatibilidad: mediante la técnica de tipificación de replicones (*Replicon Typing*) basada en PCR, se puede determinar el grupo de incompatibilidad al que corresponden los plásmidos responsables de la transmisión de los genes *bla_{BLEE}* entre enterobacterias⁴⁷.

Estudios epidemiológicos

Cuando se encuentra un mismo perfil de resistencias con cierta frecuencia en diferentes aislados, relacionados o no epidemiológicamente, es recomendable analizar la posible interrelación entre las distintas cepas BLEE. Para ello se puede estudiar el perfil de restricción tras digestión del ADN genómico de las bacterias y migración en electroforesis de campo pulsado (PFGE). Los miembros de una misma clona mostrarán perfiles con una similitud superior a un 86%. Se han descrito también nuevas técnicas moleculares, como el análisis del número variable de repeticiones en tándem (VNTR, del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*), que permite determinar la relación filogenética entre las cepas analizadas a partir de las posibles variaciones en cinco regiones del cromosoma bacteriano conocidas por tratarse de pequeñas repeticiones y que, por lo tanto, pese a ser constante su existencia, su tendencia a provocar errores en la transcripción por parte de la ADN-polimerasa propiciará variaciones en el número de copias de cada "alelo" a lo largo del tiempo. Esta técnica está aún en desarrollo, si bien se empieza a utilizar con cierto éxito sobre *S. enterica* serovar Typhimurium y Enteritidis en algunos centros de referencia.

Otros problemas en la detección de BLEE

Para detectar esta forma de resistencia, primero hay que sospechar de su presencia. Ocurre que cada vez se conocen más mecanismos de resistencia a los betalactámicos, y no sólo nuevas betalactamasas, plasmídicas o cromosómicas. Son ya varios los trabajos que describen fenotipos de resistencia a cefalosporinas debidos a alteraciones de la permeabilidad de la pared bacteriana, especialmente relacionadas con el déficit de expresión de porinas de tipo *Omp⁴⁸*, o con la desrepresión de bombas de expulsión, como las que forman el complejo *AcrAB-TolC⁴⁹*. Si bien estos mecanismos de momento no comparten el fenotipo de las BLEE, habrá que mantener un control sobre ellos, dado que el espectro de las diferentes bombas de expulsión conocidas no hace más que aumentar. Otros estudios recientes hablan de nuevas formas de resistencia en *E. coli* o *Salmonella* Typhimurium ligados a genes de detoxificación, operones de síntesis ribosómica o reguladores de proteínas de transporte, que se expresarán de una manera defensiva en presencia de ciertos antimicrobianos, como el triclosán⁵⁰. Estos estudios no hablan directamente de resistencia a los betalactámicos y, por lo tanto, no interfieren con el diagnóstico de las BLEE que nos ocupa, pero no dejan de llamar la atención sobre nuevos frentes que hay que vigilar en la permanente lucha contra las resistencias a antimicrobianos. Se ha sugerido que la corresponsabilidad ha podido desempeñar un papel relevante en la situación epidemiológica actual, favoreciendo el mantenimiento en tiempo y espacio de determinados clones bacterianos productores de BLEE⁸.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28:302-7.
- Knothe H. In-vitro activity of cefotaxime. *Wien Klin Wochenschr Suppl.* 1983;142:4-7.
- Siroit J, Chanal C, Petit A, Siroit D, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect Dis.* 1988;10:850-9.
- Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother.* 1992;29:590-2.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1-14.
- Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Canton R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:2201-4.
- Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999;5:865-79.
- Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:S144-53.
- Jacoby GA, Bush K. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. 2009; Ed.: Lahey CLINIC. Disponible en: <http://www.lahey.org/studies/>.
- Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53:257-64.
- Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem yearly susceptibility test information collection) 2006 results. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:185-92.
- Livermore DM. Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs.* 1987;34:64-88.
- Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1237-43.
- de Gheldre Y, Struelens MJ, Glupczynski Y, de Mol P, Maes N, Nonhoff C, et al. National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol.* 2001;39:889-96.
- Szabo D, Melan MA, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Bethel CR, et al. Molecular analysis of the simultaneous production of two SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* by using single-nucleotide polymorphism genotyping. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4716-20.
- Yu WL, Cheng KC, Chi CJ, Chen HE, Chuang YC, Wu LT. Characterisation and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolated from a district teaching hospital in Taiwan. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:579-82.
- Fernández A, Poza M, Pérez J, Sáez-Nieto R, Villanueva R, Bou G. Estudio de un brote nosocomial causado por *Enterobacter cloacae* (EC) multirresistente productor de la beta-lactamasa SFO-1. XIII Reunión SEIMC: Infecciones por microorganismos multirresistentes. Sevilla: Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009.
- Aragon LM, Mirelis B, Miro E, Mata C, Gomez L, Rivera A, et al. Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:1029-32.
- Cloekaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, et al. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase *bla*TEM-52 gene-carrying Inc11 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1872-5.
- Herrero A, Mendoza MC, Threlfall EJ, Rodicio MR. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28:1087-93.
- Pardos M, Seral C, Arias M, Millán M, Gude M, Algarate S, et al. Caracterización de los mecanismos de resistencia a betalactámicos en *Salmonella* Typhimurium multirresistentes. XIII Reunión SEIMC: Infecciones por microorganismos multirresistentes. Sevilla: Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009.
- Boyle F, Morris D, Kariuki S, Revathi G, Cormican M. Phenotypic and genotypic analysis of a novel extended-spectrum beta-lactamase phenotype (cefepimease). 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, Finlandia: *Eur J Clin Microbiol Infect.* 2009.
- Pary CM, Threlfall EJ. Antimicrobial resistance in typhoidal and non-typhoidal *Salmonellae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:531-8.
- Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Álvarez P, Vinué L, Lantero M, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:292-5.
- Weill FX, Lailier R, Praud K, Kerouanton A, Fabre L, Brisabois A, et al. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5767-73.
- Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13: pii 19044.
- Fabre L, Delaune A, Espie E, Nygard K, Pardos M, Polomack L, et al. Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*CTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1808-16.
- de Toro M, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Riaño I, Undabeitia E, García-Campello M, et al. Caracterización genética de los mecanismos de resistencia a antibióticos en

- cepas clínicas de *Salmonella enterica* con resistencia a amoxicilina-clavulánico o a cefalosporinas de tercera generación. XIII Reunión SEIMC: Infecciones por microorganismos multirresistentes. Sevilla: Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009.
29. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de beta-lactamasas plasmídicas de espectro extendido. 2003; En: Enferm Infecc Microbiol Clin. Boletín de Control de Calidad SEIMC. Disponible en: <http://www.seimc.org>.
 30. Weber DA, Sanders CC. Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:156-8.
 31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA, 2009.
 32. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Sturenberg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1167-74.
 33. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, et al. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3257-62.
 34. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST. 2009; Ed.: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Disponible en: <http://www.eucast.org/>.
 35. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10:867-78.
 36. Sturenberg E, Lang M, Horstkotte MA, Laufs R, Mack D. Evaluation of the MicroScan ESBL plus confirmation panel for detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of oxymino-cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:870-5.
 37. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3703-11.
 38. Naas T, Livermore DM, Nordmann P. Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other beta-lactamase regulators. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:629-37.
 39. Robin F, Delmas J, Archambaud M, Schweitzer C, Chanal C, Bonnet R. CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2403-8.
 40. Barnaud G, Benzerara Y, Gravis J, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Labia R, et al. Selection during cefepime treatment of a new cephalosporinase variant with extended-spectrum resistance to cefepime in an *Enterobacter aerogenes* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1040-2.
 41. García Rodríguez JA, Cantón R, Elías Sánchez J, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. 12. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000; En: Picazo JJ, ed. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Disponible en: <http://www.seimc.org>.
 42. Sanders CC, Sanders WE Jr., Goering RV. In vitro antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;21:968-75.
 43. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:370-2.
 44. Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM). Les recommandations 2009. Ed.: Société Française de Microbiologie. Disponible en: www.sfm.asso.fr.
 45. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:53-8.
 46. Huovinen S. Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated beta-lactamases with Pharmacia PhastSystem. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:1730-2.
 47. Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, di Matteo P, Battisti A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:833-5.
 48. Schumacher H, Skibsted U, Skov R, Scheibel J. Cefuroxime resistance in *Escherichia coli*. Resistance mechanisms and prevalence. *APMIS.* 1996;104:531-8.
 49. Kallman O, Giske CG, Samuelsen O, Wretling B, Kalin M, Olsson-Liljequist B. Interplay of efflux, impermeability, and AmpC activity contributes to cefuroxime resistance in clinical, non-ESBL-producing isolates of *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* 2009;15:91-5.
 50. Bailey AM, Constantinidou C, Ivens A, Garvey MI, Webber MA, Coldham N, et al. Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:973-85.
 51. Arlet G, Rouveau M, Philippon A. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;152:163-7.
 52. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:185-91.