



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada

Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias [☆]

Ferran Navarro ^{a,b,*}, Elisenda Miró ^a y Beatriz Mirelis ^{a,b}

^a Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

^b Universitat Autònoma de Barcelona, 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 30 de junio de 2010

Palabras clave:

Enterobacterias

Estudios de sensibilidad

Mecanismos de resistencia

RESUMEN

El patrón de resistencia observado en el antibiograma de un microorganismo debe ser la suma del patrón de resistencia natural característico de la especie más el de las resistencias adquiridas. El principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos y aminoglucósidos en enterobacterias es el enzimático, donde cada enzima reconoce uno/os determinado/os betalactámicos o aminoglucósidos, respectivamente. Ello, se traduce en un patrón de resistencia concreto que permite deducir la/las enzimas implicadas. Sin embargo, la resistencia enzimática no es el único mecanismo y, frecuentemente, el patrón observado es multifactorial. La resistencia a las quinolonas se debe mayoritariamente a mutaciones cromosómicas puntuales y secuenciales, que pueden seleccionarse por tratamientos con fluoroquinolonas inicialmente activas. En los últimos años, sin embargo, ciertos genes plasmídicos que codifican enzimas modificadoras de las quinolonas o protectores de la diana, se han visto implicados en la resistencia de bajo nivel a este grupo de antimicrobianos.

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

Interpretive reading of enterobacteria antibiograms

ABSTRACT

The resistance pattern observed in the antibiogram of an isolate should be the sum of its natural resistance pattern, characteristic of the species, plus the acquired resistances. In *Enterobacteriaceae*, the production of inactivating enzymes is the main mechanism of resistance to beta-lactams and aminoglycosides. Each one of these enzymes recognizes one or more specific beta-lactams or aminoglycosides as substrate. This substrate specificity implies a specific resistance pattern from which we can deduce the enzymes present in the isolate. However, enzymatic-mediated resistance is not the only mechanism implicated and resistance is frequently multifactorial. Resistance to quinolones is mainly due to precise, sequential chromosomal mutations that can be selected by fluoroquinolone treatments. Recently, certain plasmid-mediated genes which code enzymes that modify quinolones or that are target protectors have been implicated in the low level resistance to quinolones.

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

Keywords:

Enterobacteriaceae

Susceptibility studies

Resistance mechanisms

El gran número de especies dentro de la familia de las enterobacterias conlleva una gran variabilidad de patrones de resistencia natural. Esta diversidad se ve, además, incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia tanto de microorganismos de la misma especie como de otras. La adquisición de multiresistencia puede llevar a la ineficacia de la mayoría de los antimicrobianos utilizados en clínica¹. El realizar una lectura interpretada de los patrones de resistencia, tanto naturales como adquiridos, presupone deducir el mecanismo de resistencia asociado a un fenotipo y predecir así la respuesta clínica a un determinado antimicrobiano, haya sido este evaluado *in vitro* o no².

Si bien cada vez más se conocen mejor los diferentes mecanismos de resistencia, la lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias, continua siendo objeto de discusiones, y quedan todavía numerosos aspectos por determinar, especialmente cuando se intenta predecir la respuesta clínica¹⁻³. En este sentido deben realizarse estudios clínicos para reconocer la repercusión *in vivo* de estos patrones de resistencia.

En la presente revisión se han recogido diferentes opiniones aparecidas en la literatura, destacando las del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁴, *Comité de l'Antibiogramme* de la Sociedad Francesa de Microbiología (CASFM)⁵, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)⁶, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)⁷ y las de los grupos GEMARA y MENSURA⁸.

Es importante la elección de los antimicrobianos a evaluar en el antibiograma; los comités científicos antes señalados proponen,

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

* Autor para correspondencia.

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

para realizar un seguimiento epidemiológico o para la interpretación del antibiograma, una serie de antibióticos clasificados en función de su interés terapéutico o de su utilidad como alternativa en microorganismos multiresistentes. Estos aspectos se mencionarán en el último capítulo de esta serie.

En la presente revisión se pretende indicar las bases para realizar una lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias para las principales familias utilizadas en clínica: betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, y de manera muy sucinta se detallarán los mecanismos de resistencia implicados.

Betalactámicos

Es una amplia familia de antibióticos bactericidas y uno de los grupos más numeroso y de mayor utilización en clínica, que incluye las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Desde el descubrimiento de la penicilina hemos seguido la aparición progresiva de nuevas moléculas sintetizadas con la finalidad, entre otras, de incrementar el espectro de acción y la actividad frente a bacterias que iban adquiriendo resistencia¹.

Aunque la resistencia a los betalactámicos está definida por distintos mecanismos (producción de enzimas, alteraciones de la permeabilidad, alteración de la diana y, presumiblemente, expresión de bombas de expulsión activa), el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en enterobacterias es el enzimático, por producción de las betalactamasas. En la presente revisión, la interpretación del antibiograma se basará fundamentalmente en la presencia de dichas enzimas, aunque debe considerarse también, que en algunos casos la resistencia sea fruto de la asociación de distintos mecanismos de resistencia. Un ejemplo de ello lo constituye la sensibilidad disminuida o resistencia a carbapenémicos en distintas enterobacterias en que existe una disminución de la permeabilidad asociada a otros mecanismos como la hiperproducción de la β -lactamasa cromosómica en *Enterobacter* o a la presencia de una β -lactamasa plasmídica de clase C o de una β -lactamasa de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella*⁹⁻¹²; en general todas las enzimas de clase C presentan cierta actividad hidrolítica frente a carbapenémicos, que no se manifiesta fenotípicamente si no existe una alteración simultánea de la permeabilidad^{3,9}. En esta situación de disminución de la permeabilidad, es frecuente que también se vean afectadas otras familias de antimicrobianos como cloranfenicol, trimetoprim o quinolonas entre otros (observándose una disminución discreta de la sensibilidad)^{12,13}.

En la actualidad se han descrito betalactamasas capaces de inactivar a la práctica totalidad de betalactámicos utilizados en

terapéutica, y algunas de ellas, aunque difíciles de detectar, han comportado fracasos terapéuticos. Por ello se debe realizar una cuidadosa lectura interpretada del patrón de resistencia con una doble finalidad, por un lado evitar las falsas sensibilidades y por otro hacer el seguimiento de determinadas betalactamasas capaces de difundir y producir brotes epidémicos.

En primer lugar se describirán los fenotipos de resistencia naturales de la mayoría de especies de interés clínico (tabla 1) y, posteriormente, se analizarán los diferentes patrones de resistencia adquiridos.

Fenotipos de resistencia natural: las enterobacterias de interés clínico, con la única excepción de *Salmonella* y *Proteus mirabilis*, son portadoras de una betalactamasa cromosómica natural propia de cada especie^{14,15}. En la tabla 2 se detallan los diferentes patrones de resistencia a betalactámicos esperados en función de la betalactamasa implicada. Estos fenotipos de sensibilidad pueden clasificarse en 4 grupos.

El primer grupo (Grupo 1), formado por *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella enterica* y *P. mirabilis*, presenta un fenotipo sensible a todos los betalactámicos. Tanto *E. coli* como *Shigella* son portadoras de una betalactamasa cromosómica de clase C de Ambler^{3,16} que en su forma natural o salvaje se expresa a un nivel muy bajo, y no confiere resistencia de trascendencia clínica¹⁵.

El segundo grupo (Grupo 2), en el que se encuentran *Klebsiella* spp., *Citrobacter koseri* y *Citrobacter amalonaticus*, entre otras especies, presenta resistencia de bajo nivel a aminopenicilinas (ampicilina) y carboxipenicilinas (ticarcilina) y sensibilidad disminuida o intermedia a ureidopenicilinas (piperacilina), manteniéndose sensibles a cefalosporinas, monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos (imipenem) y a las asociaciones con inhibidores de betalactamasa (amoxicilina-ác. clavulánico).

La resistencia es debida a la producción de una betalactamasa cromosómica de clase A¹⁶, con actividad penicilinas, que en el caso de *K. pneumoniae* se trata de la betalactamasa SHV-1 o relacionadas (betalactamasas plasmídicas clásicas) y en *K. oxytoca* se trata de la K1 que si se hiperproduce se comporta como una betalactamasa de espectro extendido (véase apartado BLEE)¹⁵.

El tercer grupo (Grupo 3) está compuesto por *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp., *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, y *P. penneri*. Todas presentan una betalactamasa cromosómica inducible con actividad cefalosporinas que, en general, les confiere resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación (C1G), manteniéndose sensibles a carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, cefalosporinas de tercera (C3G) y cuarta (C4G) generación, monobactámicos y carbapenémicos.

Tabla 1

Patrones de resistencia natural en diferentes especies de enterobacterias (modificada del CASFM⁵)

Especies	AMP	AMC	TIC	C1G	FOX	CXM	GEN	TET	COL	NIT
<i>Klebsiella</i>	R		R							
<i>Citrobacter koseri</i>	R		R							
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	R		R							
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R		R	R	r				
<i>Hafnia alvei</i>	R	R		R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R		R	r	R				
<i>Proteus mirabilis</i>								R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R			R		R			R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R		R	r	R			R	R
<i>Providencia</i> spp.	R	R		R	r		R		R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R				

AMC: amoxicilina-ác. clavulánico; AMP: ampicilina; COL: colistina; CXM: cefuroxima; C1G: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefoxitina; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; TIC: ticarcilina; NIT: nitrofurantoína; R: resistente; r: halos reducidos o CIM elevadas, pero dentro del rango de sensibilidad.

Tabla 2
Principales patrones de resistencia a betalactámicos en función de la betalactamasa implicada de mayor interés clínico

Fenotipo	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G	C4G	CARB	Incidencia ^a	Observaciones
Grupo 1 <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>												
Natural	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Moderada	Presencia de AmpC a niveles basales en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> . <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> son clínicamente resistentes a C1G y C2G
Natural ↑	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Baja	Presencia en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> de AmpC hiperproducida
Penicilinasas	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S	Moderada	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1
Penicilinasas ↑	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	Baja	Informar como resistentes las C1G
BLEE	R	V	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	Baja	En caso de tratarse de SHV-1 puede llegar a afectar ligeramente a la ceftazidima
IRT	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Rara	Ver texto
AmpC	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Baja	
adquirida												
Carbapenemasas	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r	Baja	En caso de carbapenemasas de clase B el aztreonam se muestra sensible
Grupo 2 <i>Klebsiella</i> spp., <i>C. koseri</i> , <i>C. amalonaticus</i>												
Natural	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S	Alta	En <i>K. pneumoniae</i> es por la expresión de SHV-1 o LEN, en <i>K. oxytoca</i> por la K1 y en <i>C. koseri</i> y <i>C. amalonaticus</i> por CKO y CdiA, respectivamente
K1 ↑	R	S/R	R	R	R	S	r	S/r	S	S	Baja	Informar como resistente las C1G
Penicilinasas ↑	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	Baja	Cuando exista resistencia a aztreonam se considerará la categoría de resistente en las C3G para las que se observe sinergia con ácido clavulánico
BLEE	R	S/r	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	Moderada	La hiperproducción de SHV-1 puede llegar a afectar ligeramente a la ceftazidima
IRT	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Rara	Ver texto
AmpC	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Baja	
adquirida												
Carbapenemasas	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r	Baja	En caso de carbapenemasas de clase B el aztreonam se muestra sensible
Grupo 3 <i>Enterobacter</i> , <i>C. freundii</i>												
Natural	R	R	S	S	R	R	r	S	S	S	Alta	Por producción de AmpC inducible. Advertir la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactámicos.
Natural ↑	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Moderada	Patrón indistinguible del de las betalactamasas AmpC adquiridas
Penicilinasas	R	R	R	R	R	R	r	S	S	S	Moderada	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Advertir de la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactámicos
BLEE	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S/R	S	Baja	Ver texto
Carbapenemasas	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r	Baja	En caso de carbapenemasas de clase B el aztreonam se muestra sensible
<i>S. marcescens</i> , <i>M. morgani</i> , <i>Providencia</i>												
Natural	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	Alta	Por producción de AmpC inducible. Advertir de la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactámicos
Penicilinasas	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	Moderada	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Advertir de la posible selección de cepas resistentes a C3G y monobactámicos
Natural ↑	R	R	R	R	R	S/r	R	r/R	S	S	Baja	Desrepresión de la expresión de la AmpC
BLEE	R	R	R	R	R	r/R	R	r/R	S/R	S	Rara	Ver texto
Carbapenemasas	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r	Baja	En caso de carbapenemasas de clase B el aztreonam se muestra sensible
<i>P. vulgaris</i> , <i>P. penneri</i>												
Natural	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	Alta	Por producción de la betalactamasa cromosómica de clase A
Penicilinasas	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	Alta	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1
Natural ↑	R	S	R	R	R	S	R	r/R	S	S	Rara	Por hiperproducción de la betalactamasa cromosómica de clase A

AMC: amoxicilina-ác. clavulánico; AMP: ampicilina; BLEE: betalactamasa de espectro extendido; CARB: carbapenémicos; CXM: cefuroxima; C1G: cefalosporinas de primera generación; C3G: cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos; C4G: cefalosporinas de cuarta generación; FOX: cefoxitina; IRT: «Inhibitory-resistant TEM type» (betalactamasa resistente a los inhibidores); K1: betalactamasa cromosómica de *Klebsiella oxytoca*; PIP: piperacilina; R: resistente; r: halos reducidos o CIM elevadas con respecto al fenotipo salvaje, pero dentro del rango de sensibilidad; S: sensible; TIC: ticarcilina; ↑: Hiperproducción.

^a Rara: < 1%; Baja: 1-15%; Moderada: 15-75%; Alta: > 75%. Esta incidencia puede oscilar en función de la población estudiada. Datos del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau^{9,18,20-23,28,32}.

Dentro de este grupo *C. freundii*, *Enterobacter*, *Providencia*, *M. morgani*, *Serratia* y *H. alvei*, presentan una betalactamasa de clase C que les confiere resistencia a las asociaciones de inhibidores y una sensibilidad variable a cefoxitina. *Enterobacter* y *C. freundii* son resistentes a cefoxitina y presentan sensibilidad disminuida a cefuroxima, mientras que *M. morgani*, *Providencia* y *Serratia*, son resistentes a cefuroxima y moderadamente resistentes a cefoxitina¹⁶. El carácter inducible de estas enzimas es

fácilmente detectable mediante la técnica de difusión; cuando se disponen los discos de cefoxitina o imipenem próximos a los de las C3G o C4G, puede observarse un antagonismo entre ambos antibióticos fruto de la inducción en la producción de betalactamasas que ejercen los primeros^{4,7}.

Por el contrario, *P. vulgaris* y *P. penneri* son portadores de una betalactamasa cromosómica de clase A, siendo resistentes a cefuroxima y sensibles a cefoxitina y a las asociaciones con

inhibidores de la betalactamasa, por lo que frecuentemente se refieren a estas enzimas como cefuroximasas.

Finalmente, el cuarto grupo (Grupo 4) incluye *Yesinia enterocolitica* que muestra, en la mayoría de las cepas, un fenotipo de cefalosporinasa inducible y penicilinas, siendo resistente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, amoxicilina-ác. clavulánico y C1G y C2G. Este fenotipo es producto de la síntesis de 2 enzimas, una de clase A y otra de clase C^{16,17}.

Si bien los patrones de resistencia a los betalactámicos comentados previamente están mediados por diferentes betalactamasas, debe tenerse presente la existencia de otros mecanismos naturales como por ejemplo la disminución de la permeabilidad, por la cual *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*, presentan una menor sensibilidad a los carbapenémicos.

Fenotipos de resistencia adquirida: cuando una especie presenta un antibiograma que no concuerda con los descritos como fenotipos naturales, puede deberse a la presencia de resistencias adquiridas, en cuyo caso los datos observados deben evaluarse para conocer el mecanismo que los produce e interpretarlo. Siempre hay que asegurar la correcta identificación de la especie.

La resistencia adquirida modifica el patrón natural de resistencia de una especie determinada, siendo el patrón de resistencia resultante la suma de la resistencia natural más la adquirida.

La presencia de nuevas enzimas, no propias de la especie, puede ser debida a la adquisición de material genético (elementos móviles como plásmidos, transposones o secuencias de inserción; integrones o fragmentos de DNA) por diferentes vías como la conjugación, la transformación o la transducción. En todos los casos se trata de material extracromosómico que la bacteria adquiere y que puede asimilar y perpetuar a su progenie, bien en plásmidos bien incorporándolo a su cromosoma. Sin embargo, algunos patrones de resistencia vienen dados, no por enzimas adquiridas, sino por mutaciones en los genes cromosómicos naturales de especie, generalmente en la región del promotor o en los genes reguladores de su expresión^{3,15}.

A continuación se describen los distintos fenotipos de resistencia adquirida, que quedan esquematizados en la tabla 2.

Producción de penicilinasas: la adquisición de betalactamasas plasmídicas de clase A¹⁶ denominadas de amplio espectro o betalactamasas clásicas, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, es responsable de la resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas y de la sensibilidad disminuida o intermedia a ureidopenicilinas. Las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad a cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Sin embargo, una hiperproducción de estas enzimas conlleva resistencia a C1G, C2G (excepto cefamicinas como la cefoxitina) y frecuentemente sensibilidad discretamente disminuida a la asociación amoxicilina-ácido clavulánico. Además, en el caso particular de la hiperproducción de SHV-1, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, puede observarse una resistencia de bajo nivel a ceftazidima¹⁸. En este último caso, puede observarse por técnica de difusión un ligera sinergia entre amoxicilina-ácido clavulánico y ceftazidima (al situar ambos discos a una distancia de 2,5-3 cm) que podría hacer pensar en una betalactamasa de espectro extendido¹⁹.

Producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE): las primeras BLEE que se describieron, derivaban de las betalactamasas mencionadas en el apartado anterior, TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Posteriormente aparecieron otras familias de BLEE como las CTX-M, cuyo origen se encuentra en las cromosómicas de ciertas especies, como *Kluyvera ascorbata* o *K. cryocrescens*²⁰. Estas nuevas BLEE han presentado una rápida expansión en diversas áreas epidemiológicas.

Las BLEE se caracterizan por ser capaces de inactivar la práctica totalidad de cefalosporinas a excepción de las

cefamicinas, manteniendo la sensibilidad a los inhibidores y a los carbapenémicos.

Su detección no siempre es fácil, y debe tenerse en cuenta tanto pequeñas disminuciones de sensibilidad a C3G (incremento de la concentración inhibitoria mínima, CIM, o halo de inhibición disminuido), presencia de sinergia entre C3G o C4G y el ácido clavulánico, bordes de los halos de inhibición irregulares, así como resistencias asociadas especialmente a aminoglucósidos y quinolonas⁵. No es objetivo de esta revisión el detallar la metodología más adecuada para su detección, la cual puede encontrarse en el volumen 12 de los Procedimientos en Microbiología Clínica publicado por la SEIMC¹⁹.

Hasta el 2009, ha existido un consenso para considerar el microorganismo portador de BLEE, independientemente del valor de sensibilidad obtenido (por técnica de difusión o de dilución), como intermedio o resistente a todas las cefalosporinas (incluyendo C3G y C4G). Las asociaciones con inhibidores se mantendrían activas para el tratamiento de las infecciones urinarias según el CASFM⁵.

En los últimos años existe una gran discusión en cuanto a la interpretación del antibiograma y de los puntos de corte establecidos para determinar la sensibilidad de las C3G y C4G en enterobacterias. El CLSI propone, actualmente, considerar la sensibilidad a estas cefalosporinas indistintamente del mecanismo de resistencia implicado según los nuevos puntos de corte propuestos. Esta propuesta plantea la posibilidad de utilizar estas cefalosporinas en el tratamiento de las infecciones por bacterias portadoras de BLEE⁶. Por otro lado el EUCAST está considerando esta posibilidad.

La mayoría de estas enzimas son relativamente fáciles de detectar en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otros microorganismos de los grupos 1 y 2 presentando una mayor dificultad las cepas de enterobacterias del grupo 3 con un patrón de desrepresión de su betalactamasa cromosómica inducible (véase a continuación). En este caso es útil estudiar la presencia de sinergia entre cefepima y ácido clavulánico¹⁹.

Producción de betalactamasas resistentes a los inhibidores: estas betalactamasas derivan también de las betalactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas; no son sensibles a la acción de los inhibidores y no tienen actividad sobre el resto de betalactámicos. Estas betalactamasas se denominaron originariamente IRT (*inhibitor-resistant TEM mutant*) porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2 aunque también se han descrito betalactamasas resistentes a los inhibidores derivadas de SHV-1^{15,21}. Las oxacilinasas (como la OXA-1), pertenecientes a la clase D de Ambler¹⁶, dan lugar a un fenotipo indistinguible del de las IRT²¹. Debido a los escasos estudios sobre la etiología de la resistencia a los inhibidores de las betalactamasas, no se conoce con exactitud la frecuencia de estas betalactamasas (IRT) en clínica, aunque se supone baja.

Hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase A: este fenotipo puede encontrarse en especies como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. penneri*, *P. vulgaris* y *C. koseri*. En el caso de *K. oxytoca* su patrón de resistencia es muy similar al de una BLEE. La sospecha de tratarse de una hiperproducción de la betalactamasa cromosómica (denominada K1)¹⁶ y no de una BLEE viene dada por la sensibilidad a ceftazidima y la elevada resistencia al aztreonam. En el test de sinergia, esta se observa sobretodo con aztreonam y/o con cefotaxima pero no con ceftazidima. En estos casos el CASFM recomienda informar al clínico como cepa con sensibilidad intermedia a aquellos antibióticos que presenten sinergia, independientemente de su sensibilidad⁵. El caso de hiperproducción de la betalactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* ya ha sido comentado previamente en el apartado «producción de penicilinasas».

La otra situación es la de *P. penneri*, *P. vulgaris* y *C. koseri*, donde la hiperproducción de la betalactamasa cromosómica no puede distinguirse de una BLEE, aunque ambas situaciones son muy poco frecuentes en clínica.

Hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase C y AmpC plasmídicas: este fenotipo se caracteriza por presentar resistencia a la práctica totalidad de betalactámicos con la única excepción de los carbapenémicos, aunque las diferentes cefalosporinas serán más o menos hidrolizadas en función del nivel de hiperproducción. Además, se caracterizan por ser inhibidas por substancias como cloxacilina o ácido borónico, las cuales se puede utilizar para poder detectar sinergias con C3G o C4G y así evidenciar la presencia de las betalactamasas AmpC.

En este contexto se definen tres situaciones diferentes. La primera hace referencia a *E. coli* y *Shigella* con una betalactamasa cromosómica no inducible de clase C que normalmente se expresa a niveles muy bajos, por lo que no confiere resistencia clínica. Cuando se halla hiperproducida, confiere resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, las asociaciones con inhibidores, C1G, cefamicinas y en función del grado de hiperproducción, también puede afectar a C3G y monobactámicos, mientras que las C4G y los carbapenémicos se mantienen activos³.

La segunda situación es la que se da en enterobacterias como *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *M. morgani* y *C. freundii* que tienen una betalactamasa cromosómica inducible de clase C. En las infecciones producidas por estos microorganismos (especialmente en infecciones graves o donde no exista una buena difusión del betalactámico) debe tenerse siempre presente que si se tratan con C3G o monobactámicos, que son activos frente a estas cepas, con frecuencia pueden seleccionarse mutantes que, por alteraciones en los genes que regulan la producción de la enzima, den lugar a la producción de gran cantidad de la misma y por lo tanto estas cepas pasen a ser resistentes a las carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, las cefalosporinas (manteniendo cierta actividad las C4G) y monobactámicos. En esta última situación se habla de una betalactamasa desreprimida puesto que de forma natural estos microorganismos presentan un sistema represor de la expresión de la betalactamasa³. En caso de desrepresión puede verse que el patrón de resistencia obtenido es similar al de la hiperproducción de AmpC en *E. coli*.

Todos los betalactámicos son inductores de estas betalactamasas inducibles, en mayor o menor grado, siendo los inductores más fuertes cefoxitina e imipenem (resistente a esta enzima).

Finalmente, la tercera situación se encuentra cuando diferentes betalactamasas cromosómicas de clase C, como las de *C. freundii*, *Enterobacter*, *Morganella*, o *H. alvei*, se encuentran en plásmidos difundiendo a diferentes especies, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* o *S. enterica*³. Estas AmpC plasmídicas, presentan un patrón de resistencia indistinguible del de los grupos anteriores, por ello su detección fenotípica no es fácil en las cepas portadoras de AmpC cromosómica (inducible o no) requiriendo en algunos casos la caracterización de la enzima. Por el contrario, su detección es sencilla en las especies carentes de AmpC^{3,22,23}.

Debido a la falta de técnicas consensuadas para la detección de estas betalactamasas tipo AmpC plasmídicas no se conoce con exactitud la epidemiología de su diseminación, aunque por los datos existentes es baja pero con tendencia a incrementar^{3,22}.

En la primera y última situación, sin que exista consenso³, la elección del antibiótico a utilizar debe sustentarse en los valores de sensibilidad obtenidos y por lo tanto en función del grado de producción de la enzima si es cromosómica y del grado de producción y/o del tipo de betalactamasa AmpC si es plasmídica, el tratamiento podría realizarse con C3G, monobactámicos o carbapenémicos, aunque de existir alternativa no sería

recomendable su uso. En el caso de una betalactamasa desreprimida, donde la cepa presenta resistencia o sensibilidad intermedia a alguna de las C3G y/o monobactámicos, al menos según el CASFM⁵, debe darse como intermedio un resultado sensible a estos antimicrobianos. Además, se debe alertar al clínico, siempre que se trate de un microorganismo con betalactamasa cromosómica inducible, que existe la posibilidad de fracaso terapéutico si se trata con betalactámicos *a priori* activos, en monoterapia, como consecuencia de la selección de cepas resistentes por desrepresión de la betalactamasa cromosómica.

Recientemente ha sido comunicado un nuevo mecanismo de resistencia a betalactámicos debido a la producción de betalactamasas AmpC de espectro ampliado (ESAC) que confieren sensibilidad disminuida a todas las cefalosporinas, incluyendo ceftazidima y cefepima. El patrón fenotípico de resistencia es indistinguible del de las AmpC anteriormente descritas por lo que para su diferenciación son necesarias técnicas moleculares²⁴.

Producción de betalactamasas activas frente a carbapenémicos: las carbapenemasas son betalactamasas que hidrolizan la mayor parte de betalactámicos incluidos los carbapenémicos²⁵. La incidencia de estas enzimas en enterobacterias es muy baja. En enterobacterias se han descrito las tres clases de enzimas con actividad frente a carbapenémicos, las carbapenemasas de clase A (como por ejemplo la betalactamasa KPC), que suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico, y presentan una menor actividad frente a imipenem que a imipenem, las de clase B (metalo-betalactamasas como por ejemplo las VIM o las IMP), las cuales no presentan actividad frente a aztreonam y su acción es inhibida con EDTA y de la clase D, la oxacilinasas OXA-48²⁵⁻²⁷. En nuestro país, la incidencia de estas enzimas en enterobacterias es baja, si bien desde la primera descripción en 2005 de carbapenemasas en *E. coli* y *K. pneumoniae* se han comunicado casos aislados de infección y brotes epidémicos en hospitales por diferentes enterobacterias portadoras de dichas enzimas²⁷⁻³². Las pruebas de sinergia entre carbapenémicos y ác. clavulánico o EDTA pueden ser útiles para sospechar la presencia de betalactamasas de clase A o B respectivamente en enterobacterias. Otra alternativa es el test de Hodge modificado^{4,26}.

La sensibilidad de las enterobacterias portadoras de carbapenemasas a imipenem es variable, pudiendo mostrarse sensible según los puntos de corte establecidos. La eficacia clínica de los carbapenémicos en el tratamiento de las cepas sensibles *in vitro* no ha sido confirmada, por lo que el CLSI recomienda dar el valor de la CIM sin realizar interpretación⁴. En cambio el EUCAST recomienda informar todos los betalactámicos excepto aztreonam como intermedios si son sensibles o como resistentes si son intermedios⁶.

Fenotipos complejos de resistencia adquirida: los patrones de resistencia presentados serían los observados en casos de expresión de un único mecanismo. Con frecuencia se aíslan microorganismos que producen distintas betalactamasas y que además comparten otros mecanismos de resistencia, siendo difícil deducir, inequívocamente, a partir del perfil fenotípico de resistencia observado, los mecanismos involucrados, por lo que su elucidación requiere de técnicas especiales (isoelectroenfoque, estudios cinéticos, PCR, secuenciación, etc.).

Aminoglucósidos

El comportamiento de un aminoglucósido frente a una enterobacteria depende, como mínimo, de 5 factores: a) la difusión pasiva a través de la membrana externa; b) el transporte activo a través de la membrana interna; c) la afinidad del aminoglucósido por su diana (una proteína ribosómica); d) la metilación de la unidad 16S del RNA ribosómico, y e) la presencia de enzimas

inactivantes³³⁻³⁵. Los 3 primeros factores no tienen una gran relevancia en clínica. Las mutaciones que afectan la difusión pasiva a través de la membrana externa, porinas o estructura del polisacárido, conllevan a la vez una resistencia cruzada con otras familias de antimicrobianos; mutaciones que afectan el transporte activo a través de la membrana interna se han descrito principalmente en *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y comporta una resistencia de bajo nivel que afecta a todos los aminoglucósidos³⁴. Las mutaciones en la diana de los aminoglucósidos son poco frecuentes en cepas aisladas en clínica, y son muy específicas para cada aminoglucósido, lo cual no produce un fenotipo de resistencia cruzada³⁴. Desde el 2003 han sido descritos distintos genes como responsables de la metilación postranscripcional del RNA ribosómico (*armA*, *rmt* o *npmA*) y de momento con una prevalencia moderada y geográficamente dependiente³³.

Sin embargo, el mecanismo más importante de resistencia a los aminoglucósidos sigue siendo la inactivación enzimática. Se han descrito 3 tipos de enzimas: las acetiltransferasas (AAC) que acetilan un grupo amino del antibiótico, las fosfotransferasas (APH) que fosforilan un grupo hidroxilo y, finalmente las nucleotidiltransferasas (ANT) que adenilan también un grupo hidroxilo. Cada enzima reconoce un cierto número de antibióticos aminoglucósidos, lo cual se traduce en un fenotipo de resistencia concreto. El conocimiento de los distintos fenotipos es indispensable para la lectura interpretada del antibiograma^{34,35}.

Fenotipos de resistencia natural

La mayoría de las especies de enterobacterias, son naturalmente sensibles a los aminoglucósidos, con las excepciones de *Providencia stuartii* y *Serratia marcescens* en cuyo cromosoma se encuentran los genes *aac(2')-Ia* y *aac(6')-Ic*, respectivamente. AAC(2') confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina, mientras que la enzima AAC(6') confiere solo una leve resistencia a tobramicina, observándose en el antibiograma por disco-difusión halos de inhibición más reducidos que para el resto de enterobacterias, halos que corresponden a CIM para este antibiótico de entre 1-4 mg/l. Esta disminución de la sensibilidad a tobramicina se interpreta como que *S. marcescens* es resistente a dicho antibiótico^{5,6}. Mutaciones en este gen causan

una hiperproducción de la enzima que confiere una resistencia de alto nivel a tobramicina, kanamicina y netilmicina y moderada a amicacina³⁵.

Fenotipos de resistencia adquirida

La resistencia enzimática a los aminoglucósidos puede deberse a 2 mecanismos distintos, a la producción de una o varias enzimas inactivantes (AAC, APH y ANT) y a la presencia de metiltransferasas (*ArmA*, *Rmt* o *Npm*). Ambos mecanismos confieren una resistencia de alto nivel. Los fenotipos de resistencia por producción de una sola enzima se resumen en la tabla 3. El fenotipo de resistencia por varias enzimas es más difícil de determinar, aunque en algunos casos es predecible por el efecto aditivo de 2 patrones distintos. Asimismo, cabe señalar que la resistencia de alto nivel a todos los aminoglucósidos no se debe solo a la producción de enzimas sino que generalmente intervienen también alteraciones en la permeabilidad³⁵.

Para la detección de los distintos fenotipos de resistencia es importante una correcta elección de los aminoglucósidos en estudio. Puede hacerse un antibiograma completo, por ejemplo para el estudio epidemiológico de los genes de resistencia de las cepas, o bien un antibiograma reducido donde solo se incluya los aminoglucósidos de uso en terapéutica. Para el antibiograma completo se recomienda el estudio de la amicacina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, y tobramicina. El estudio de la estreptomina puede ser optativo, pues su uso en clínica ha quedado reducido al tratamiento de la tuberculosis. Sin embargo, en un estudio epidemiológico es el único marcador de la presencia de las enzimas APH (3'') y ANT (3'')-Ia³⁶. En cambio para el antibiograma corto es suficiente el estudio de la amicacina, gentamicina, y tobramicina.

Para interpretar el patrón de sensibilidad a los aminoglucósidos se debe estar alerta ante situaciones donde puede haber una débil expresión de la enzima⁵. En este contexto debe tenerse en cuenta que: 1) ante una cepa sensible a amicacina, pero con sensibilidad intermedia o resistente a tobramicina y/o netilmicina y sensible a gentamicina debería interpretarse sensibilidad intermedia a amicacina, ya que puede tratarse de la producción de la enzima AAC(6') (tabla 3); 2) cuando se observa una

Tabla 3

Fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos por producción de una sola enzima inactivante^{14,34-36}

Fenotipo	Enzima	Incidencia	Lectura del antibiograma
Str	APH(3'')	Elevada	Resistencia a estreptomina. La adición de un disco de espectinomicina, discrimina entre la APH(3'') y la ANT(3'') pues esta última confiere resistencia a estreptomina y espectinomicina
Str/Spc	ANT(3'')	Moderada	
K Nm	APH(3')-I	Moderada	Resistencia de alto nivel a kanamicina y neomicina. La enzima de tipo I es más frecuente que la II
G	APH(3')-II	Rara	
	AAC(3)-I	Rara	Reducción del diámetro del halo de inhibición de la gentamicina, a veces de difícil visualización
KGT	ANT(2'')	Baja	Reducción del diámetro del halo de inhibición de la kanamicina, gentamicina y en menor grado de la tobramicina
KTGNt	AAC(3)-II	Moderada	Resistencia de alto nivel a gentamicina y tobramicina, disminución importante del halo de la netilmicina y moderada para la kanamicina
KTANt	AAC(3)-IV	Rara	
	AAC(6')	Baja	Resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina, y netilmicina y moderada para la amicacina. Es un fenotipo fácil de diferenciar pues son cepas sensibles a gentamicina. Presente, esencialmente, en <i>Serratia</i>
GTNtNm	AAC(2')	Rara	Resistencia moderada a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina. Difícil de detectar. En el género <i>Providencia</i> es una resistencia natural de localización cromosómica

A: amicacina; G: gentamicina; K: kanamicina; Nm: neomicina; Nt: netilmicina; Str: estreptomina; Spc: espectinomicina; T: tobramicina.
Rara: 0-1%; Baja: 1-15%; Moderada: 15-75%; Alta: 475%. Esta incidencia puede oscilar en función de la población estudiada.

disminución del halo de inhibición sólo de la gentamicina (comprendido entre 16–19 mm), debe considerarse sensibilidad intermedia a gentamicina por producción de la enzima AAC(3)-I; 3) si la gentamicina es resistente o presenta un halo de inhibición reducido y en la tobramicina también se observa reducción del halo de inhibición (16–19 mm), debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la tobramicina pues puede estar presente la enzima ANT(2''); y 4) debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la netilmicina cuando haya una reducción del diámetro de inhibición (comprendido entre 19–22 mm), si también aparecen reducidos los halos de la gentamicina y la tobramicina, pues puede estar presente la enzima AAC(3)-II o AAC(3)-IV⁵.

Fluoroquinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, de las cuales cabe destacar el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, cuyo espectro de actividad se centra en las bacterias gramnegativas pero que ha ido ampliándose sobre grampositivos, anaerobios e incluso micobacterias con las nuevas fluoroquinolonas como moxifloxacino³⁷.

La actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas se basa en la inhibición de las topoisomerasas, la topoisomerasa II o ADN girasa y la topoisomerasa IV. Ambas son enzimas heterotetraméricas formadas por 2 subunidades, A y B, codificadas respectivamente por los genes *gyrA* y *gyrB* en la ADN girasa y *parC* y *parE* en la topoisomerasa IV^{38,39}.

Los principales mecanismos de resistencia descritos son consecuencia de mutaciones en los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV; mutaciones que afectan las porinas o el lipopolisacárido, impidiendo la penetración del antimicrobiano al interior de la bacteria; y/o la presencia de bombas de expulsión que expulsan el antimicrobiano hacia su exterior³⁸. El incremento de bombeo, así como alteraciones en la permeabilidad por parte de la bacteria normalmente conlleva una resistencia de bajo nivel. Ambos mecanismos pueden encontrarse asociados con mutaciones en las topoisomerasas, incrementando el nivel de resistencia y contribuyendo, a su vez, a la selección de la resistencia a lo largo del tratamiento. Hasta 1998 todos los mecanismos de resistencia a quinolonas eran cromosómicos. Sin embargo, en los últimos años se describen con mayor frecuencia resistencias mediadas por plásmidos (PMQR)^{40,41}. La resistencia plasmídica mejor estudiada es la mediada por los genes *qnr*. Estos genes, codifican unas proteínas que protegen la ADN girasa o la topoisomerasa IV contra el efecto inhibitorio de las quinolonas. Dos mecanismos adicionales de PMQR fueron descritos recientemente. En un caso se trata de una variante del gen que codifica la enzima inactivante de aminogluco-sidos AAC(6'), el del *aac (6')-Ib-cr*, que acetila también las quinolonas (además de los aminogluco-sidos) inactivándolas⁴¹. En el segundo caso, se trata de los genes *oqxAB* y el *qepA* que codifican bombas de expulsión activa. Todos estos genes plasmídicos determinan incrementos relativamente pequeños en las CIM de quinolonas, pero estos cambios pueden ser suficientes para facilitar la selección de mutantes con niveles más altos de resistencia⁴¹.

En el caso de alteraciones de la diana, en microorganismos gramnegativos, la ADN girasa parece ser la primera diana para todas las quinolonas³⁸. Las alteraciones en la diana se concentran en una región de la enzima, denominada QRDR (*quinolone resistance-determining region*). Alteraciones en las regiones QRDR tanto de las 2 subunidades de la ADN girasa como de las 2 de topoisomerasa IV van asociadas a un incremento en la CIM de todas las quinolonas; de hecho, la resistencia a las quinolonas parece ser fruto de varios escalones en cada uno de los cuales se produce una

nueva mutación, de este modo la cepa, tras una primera mutación en un QRDR generalmente de *GyrA*, aparecerá resistente al ácido nalidíxico pero sensible a fluoroquinolonas (incrementando ligeramente sus CIM) y posteriormente mutaciones en este u otro QRDR harán que la cepa pase a ser resistente a fluoroquinolonas (aunque no a todas por igual). Generalmente, estas mutaciones sucesivas van asociadas a otros mecanismos como son las bombas de expulsión^{42,43}. Así, la interpretación del antibiograma de las quinolonas presenta pocos matices. Se aconseja que en los casos donde se observe resistencia a alguna fluoroquinolona, solo se utilicen las que se muestran activas si no existe alternativa terapéutica, aunque si esta discrepancia es muy evidente, muy probablemente se trate de un error metodológico¹⁴. Así, ante una resistencia a alguna fluoroquinolona deberíamos considerar resistencia a todas ellas^{5,6}.

Como se ha comentado, las cepas de enterobacterias con CIM elevadas de ácido nalidíxico, presentan ya una mutación en la ADN girasa, por lo que solo es necesaria una segunda mutación para que la cepa adquiera una resistencia de alto nivel a ciprofloxacino⁴⁴. Es pues importante, informar de la presencia de dichas cepas por la mayor probabilidad que presentan de adquirir resistencia a fluoroquinolonas y el consiguiente riesgo de fracaso terapéutico tras tratamiento con dichos antimicrobianos. En este sentido, varios autores consideran oportuno informar una cepa con sensibilidad intermedia a fluoroquinolonas si presenta resistencia a ácido nalidíxico^{45,46} y de hecho, se aconseja dar resistencia a fluoroquinolonas en el caso de observarse resistencia a ácido nalidíxico en *Salmonella*⁴⁶.

En cepas sin mutaciones en QRDR, la expresión aislada de un mecanismo de PMQR puede conllevar una disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas, en ausencia de resistencia a ácido nalidíxico. Las consecuencias clínicas de este mecanismo aún son poco conocidas, aunque debido al riesgo de selección de mutantes con alto nivel de resistencia en este tipo de cepas, algunos autores han sugerido que las mismas se consideren, al menos, con sensibilidad intermedia a quinolonas^{47,48}.

Bibliografía

- Bradford PA. Extended-spectrum betalactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933–51.
- Cantón R. Necesidad clínica de la lectura interpretada del antibiograma. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010. (en prensa).
- Jacoby GA. AmpC betalactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161–82.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. (Edition de Janvier 2010). Disponible en: <http://www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1>.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2009. Disponible en: <http://www.eucast.org>.
- García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. 11. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 1ª ed., 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/>.
- Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, et al.; Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad *in vitro* con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:394–400.
- Miró E, Alonso C, Navarro F, Mirelis B, Prats G. Resistencia al imipenem en *Enterobacter aerogenes*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13:278–82.
- Stapleton PD, Shannon KP, French GL. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 betalactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1206–10.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC betalactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:563–9.
- Martínez-Martínez L. Extended-spectrum betalactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:82–9.

13. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1831–6.
14. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(Suppl 1):87–102.
15. Livermore DM. Betalactamases in Laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557–84.
16. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211–33.
17. Pham JN, Bell SM, Martin L, Carniel E. The betalactamases and betalactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:951–7.
18. Miró E, del Cuerpo M, Navarro F, Sabaté M, Mirelis B, Prats G. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:535–53.
19. García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. 12. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 1ª ed., 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/>.
20. Navarro F, Miró E. Update on CTX-M-type betalactamases. *Rev Med Microbiol.* 2002;13:63–73.
21. Miró E, Navarro F, Mirelis B, Sabaté M, Rivera A, Coll P, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant betalactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3991–4.
22. Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2009. (on line). PMID: 19523051.
23. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC betalactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:370–2.
24. Mammeri H, Eb F, Berkani A, Nordmann P. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:498–503.
25. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile betalactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440–58.
26. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:99–101.
27. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29:380–8.
28. Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, González JJ, Larrosa N, Sabaté M, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3492–4.
29. Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Dispersal of carbapenemase *bla_{VIM-1}* gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:320–7.
30. Cendejas E, Gómez-Gil R, Gómez Sánchez P, Mingorance J. Detection and characterization of *Enterobacteriaceae* producing metallo-betalactamases in a tertiary-care hospital in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:181–3.
31. Treviño M, Moldes L, Martínez-Lamas L, Varón C, Regueiro BJ. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-β-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, Spain). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28:1253–8.
32. Miró E, Segura C, Navarro F, Sorlí L, Coll P, Horcajada JP, et al. Spread of plasmids containing the *bla_{VIM-1}* and *bla_{CTX-M}* genes and the *qnr* determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010. access Publisher online on January, 20.
33. Fritsche TR, Castanheira M, Millar GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1843–5.
34. Lemozy J, Bismuth R, Courvalin P. Enterobacteries et aminosides. En: Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J, editores. *L'Antibiogramme*. Bruselas: MPC; 1985. p. 111–25.
35. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993;57:138–63.
36. Chiew Y-F, Yeo SF, Hall LMC, Livermore DM. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41:247–51.
37. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(Suppl T1):17–24.
38. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis.* 1998;27(Suppl 1):S54–63.
39. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:385–92.
40. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;351:797–9.
41. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat clinical. *Microbiol Rev.* 2009;22:664–89.
42. Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:10–3.
43. Fluit ADC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:836–71.
44. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barceló A, Goñi P, Giral E, et al. Association between double mutation in the *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2477–9.
45. Wain J, Hoa NT, Chinh NT, Vinh H, Everett MJ, Diep TS, et al. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1404–10.
46. Vasallo FJ, Martín Rabadán P, Alcalá L, García-Lechuz JM, Rodríguez-Creixems, Bouza E. Failure of ciprofloxacin therapy for invasive nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis.* 1998;26:535–6.
47. Cano ME, Rodríguez-Martínez JM, Agüero J, Pascual A, Calvo J, García-Lobo JM, et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol.* 2009 2033–9.
48. Murray A, Mather H, Coia JE, Brown DJ. Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1153–5.