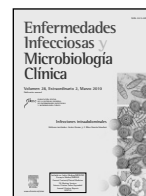




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual

Luis Martínez-Martínez\* y Jorge Calvo

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

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Enterobacterias  
Multirresistencia  
 $\beta$ -lactamasas  
Carbapenems  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Acinetobacter baumannii*

La resistencia a los antimicrobianos en bacterias gramnegativas de importancia clínica es un problema creciente, que en los últimos años ha sobrepasado la barrera nosocomial para afectar también a pacientes no hospitalizados. En enterobacterias, los principales aspectos de esta situación incluyen la resistencia a  $\beta$ -lactámicos (causada por  $\beta$ -lactamasas intrínsecas,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cefamicinas plasmídicas y carbapenemasas, en especial cuando se producen en cepas con trastornos de la permeabilidad por alteraciones en porinas), y la resistencia a quinolonas, un problema multifactorial en el que se está reconociendo la importancia de los mecanismos mediados por plásmidos (proteínas Qnr, acetilasa, bombas de expulsión). Varios estudios en España y en otros países indican que las cepas con estos mecanismos están creciendo, siendo particularmente preocupante la expansión de cepas de *Escherichia coli* y de otras especies que producen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (sobre todo de la familia CTX-M), que afectan a pacientes de la comunidad. Es cada vez más frecuente que estos mecanismos no se observen de forma aislada, sino combinados en una misma cepa, lo que conduce a la multirresistencia. Este problema es también de gran trascendencia clínica en diversos bacilos gramnegativos no fermentadores, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, y en menor medida *Stenotrophomonas maltophilia* y algunas otras especies. En este último grupo de microorganismos la multirresistencia es consecuencia de la presencia de mecanismos intrínsecos (producción de distintos tipos de  $\beta$ -lactamasas, baja permeabilidad y expresión de bombas de expulsión activa) y de la adquisición de genes exógenos. Las dificultades terapéuticas llegan a su extremo en casos de resistencia a carbapenems (de causa multifactorial) y a polimixinas. Es necesario desarrollar nuevos compuestos con actividad frente a bacilos gramnegativos multirresistentes que, junto con otras medidas, ayuden a controlar la grave situación actualmente existente.

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

### The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Enterobacteria  
Multiresistance  
 $\beta$ -lactamases  
Carbapenems  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Acinetobacter baumannii*

Resistance to antimicrobial agents in clinically relevant Gram-negative bacteria is an increasingly important problem, which in the last few years has spread from the hospital setting to the community. In enterobacteria, the main features of this situation include resistance to  $\beta$ -lactams and quinolones.  $\beta$ -Lactam resistance is caused by intrinsic  $\beta$ -lactamases, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, plasmid-mediated cephamycinases and carbapenems, particularly when produced in strains with decreased permeability because of altered porin expression. Quinolone resistance is a multifactorial problem in which the importance of plasmid-mediated mechanisms (Qnr proteins, acetylase, active efflux pumps) is being recognized. Several studies in Spain and other countries show that strains with these resistance mechanisms are being isolated with increased frequency. Of particular concern is the spread of *Escherichia coli* and other species producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (most frequently of the CTX-M family), affecting outpatients. Very commonly these mechanisms are simultaneously expressed within the same bacterial host, leading to a multiresistance phenotype. This problem is also of major clinical importance in non-fermenting Gram-

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lmartinez@hum.es (L. Martínez-Martínez).

negative rods, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* and, to a lesser extent, *Stenotrophomonas maltophilia* and some other species. Multiresistance in non-fermenting organisms results from the presence of intrinsic mechanisms (production of distinct  $\beta$ -lactamases, decreased permeability and expression of several active efflux pumps) and from the acquisition of exogenous genes. Therapeutic difficulties reach their maximum when bacteria express resistance to carbapenems (a multifactorial problem) or to polymyxins. New compounds with specific activity against multiresistant Gram-negative rods should be developed, which, together with other measures, would contribute to controlling the current serious situation.

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

## Introducción

La percepción por la comunidad científica y por la industria farmacéutica de la amenaza que a finales del siglo xx supusieron las bacterias grampositivas multirresistentes, contribuyó decisivamente al desarrollo de nuevos compuestos con actividad frente a este grupo de microorganismos. Desgraciadamente, la introducción de antimicrobianos específicamente dirigidos al tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gramnegativas (sobre todo las que presentan multirresistencia) no ha seguido un desarrollo paralelo.

El papel de las bacterias gramnegativas multirresistentes como agentes etiológicos de infecciones nosocomiales se ha agravado y, con frecuencia creciente, algunos de estos agentes están causando infecciones en pacientes no hospitalizados. El problema tiene también un componente geográfico: diversos patógenos con resistencia a antimicrobianos de primera línea de bajo coste (penicilinas, cotrimoxazol, etc.), que en nuestro entorno no suponen realmente una grave contrariedad terapéutica, sí que pueden serlo en muchos países en desarrollo, en los que no siempre se dispone de compuestos con mayor espectro o actividad intrínseca. Esta revisión se ocupará de los problemas de resistencia en enterobacterias y en bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) en nuestro entorno.

## Resistencia a $\beta$ -lactámicos en enterobacterias

### Resistencia por mecanismos intrínsecos

Las enterobacterias de mayor relevancia clínica presentan resistencia intrínseca a  $\beta$ -lactámicos en relación, fundamentalmente, con la producción de distintos tipos de  $\beta$ -lactamasas<sup>1</sup>.

*Escherichia coli* posee una  $\beta$ -lactamasa de clase C que se produce en baja cantidad, por lo que no compromete la actividad de la mayoría de  $\beta$ -lactámicos. Cuando el enzima se hiperproduce puede llegar a desarrollar niveles de resistencia a diversas penicilinas, combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y cefalosporinas (incluidas las de tercera generación si la cantidad de enzima es suficientemente elevada). En *E. coli* K12 la hiperproducción suele ocurrir por mutaciones en la región del promotor-atenuador de *bla<sub>ampC</sub>*<sup>2</sup>. Probablemente, dichas mutaciones también están implicadas en las cepas clínicas, pero en éstas no hay una correlación clara entre las mutaciones observadas, la cantidad de AmpC producida y el nivel de resistencia observado<sup>3</sup>.

Recientemente, se han descrito mutaciones en el gen estructural *bla<sub>ampC</sub>*, responsables de la producción de AmpC con mayor capacidad hidrolítica frente a  $\beta$ -lactámicos, y un fenotipo de resistencia a cefoxitina y sensibilidad a amoxicilina-clavulánico que podría estar relacionado con alteraciones en la permeabilidad y en la expresión de bombas de expulsión activa<sup>4</sup>.

Varias enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Providencia* spp, etc.) poseen un gen tipo *bla<sub>ampC</sub>* que se expresa de forma basal en cantidades relevantes. Además, en estos casos el gen es inducible (se produce mayor cantidad de AmpC en presencia de  $\beta$ -lactámicos) y se puede

hiperexpresar por mutaciones en genes reguladores<sup>5</sup>. Esta última situación llega a ampliar el espectro de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima) y, cuando se asocia a trastornos de la permeabilidad, incluso a resistencia a cefalosporinas de cuarta generación y a carbapenems.

Las poblaciones bacterianas de estas especies contienen un número bajo (en torno a  $1 \times 10^{-6}$ ) de mutantes desreprimidas. El tratamiento con  $\beta$ -lactámicos con actividad frente a las bacterias que producen una baja producción de AmpC, pero que se hidrolizan por altas cantidades del enzima, eliminan inicialmente la población sensible, pero acaban seleccionando in vivo, en el plazo de varios días, la población desreprimida resistente, lo que conlleva el fracaso terapéutico. Las consecuencias en términos de morbimortalidad e incremento de gasto asociado a este problema se conocen desde hace décadas<sup>6</sup>.

Se han descrito alteraciones estructurales de AmpC responsables del incremento de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (incluyendo cefepima). En *S. marcescens* la producción de una AmpC particular causa mayor resistencia a cefotaxima que a ceftazidima<sup>7</sup>.

### $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

De entre todos los problemas actuales de (multi)resistencia en enterobacterias, probablemente el de mayor interés es el causado por la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Las BLEE son enzimas codificadas por genes plasmídicos que hidrolizan todos los  $\beta$ -lactámicos a excepción de cefamicinas y carbapenems. Se inhiben por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de serina<sup>8</sup>. Se conocen múltiples familias de BLEE, entre las que destacan, por su importancia y frecuencia, TEM, SHV y CTX-M. Hay decenas de variantes de cada una de estas familias, que pueden consultarse de forma actualizada en la página <http://www.lahey.org/Studies/>. Además, hay una amplísima variedad de otros grupos de BLEE, entre los que se incluyen enzimas de tipo OXA, PER, GES, BEL, TLA, SFO, BES, IBC, etc.

Las cefamicinas podrían representar una opción terapéutica para cepas con BLEE que carecen de AmpC o que expresan esta enzima a muy bajo nivel, pero (al menos en *K. pneumoniae*) la cefoxitina puede seleccionar mutantes sin porinas que serían resistentes a este compuesto y con resistencia aumentada a otros  $\beta$ -lactámicos y a otros antimicrobianos hidrófilos<sup>9</sup>. También, por desgracia, la coincidencia de otros mecanismos de resistencia ocasiona que muchas cepas productoras de BLEE sean resistentes a las combinaciones, como amoxicilina-clavulánico o piperacilina-tazobactam (que serían activos por la capacidad del inhibidor para bloquear la BLEE). Teniendo en cuenta estas consideraciones microbiológicas, la principal opción terapéutica entre los  $\beta$ -lactámicos para las infecciones graves producidas por enterobacterias productoras de BLEE son los carbapenems, pero ya se han descrito casos de cepas productoras de BLEE que (sin tener una carbapenemasa específica) son resistentes a carbapenems. Se sabe que SHV-38 tiene una débil actividad carbapenemasa y produce moderados incrementos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de imipenem<sup>10</sup>. Igualmente, la expresión de SHV-2 en cepas de

*K. pneumoniae* deficientes en porinas causa una disminución de la sensibilidad a imipenem cuando se emplea un alto inóculo<sup>11</sup>. La producción de diversas CTX-M en cepas que carecen de porinas también se ha documentado recientemente como causa de resistencia a carbapenems, en especial a ertapenem<sup>12,13</sup>.

La detección de las BLEE en el laboratorio clínico es un problema no completamente resuelto. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha estandarizado sendos métodos de difusión y de dilución para su detección en *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *P. mirabilis*, basados en el aumento de la actividad de cefotaxima/ceftazidima en presencia de ácido clavulánico. Posiblemente, esta aproximación también sea útil para la detección de las BLEE en *Salmonella* spp., y con variaciones (incluyendo el uso de cefepima con y sin ácido clavulánico) podría aplicarse a cepas con AmpC cromosómica o con cefamicinas plasmídicas (v. más adelante). En este último caso, el uso de medios suplementados con inhibidores de AmpC (cloxacilina a altas concentraciones, derivados del ácido borónico) también ayuda a detectar la presencia de BLEE.

Las cepas con BLEE tienen distribución mundial. Durante un tiempo el problema estuvo centrado, sobre todo, en hospitales, las especies en las que más frecuentemente se encontraban eran *E. coli* y *K. pneumoniae*, y los principales tipos enzimáticos pertenecían a las familias TEM y SHV. Esta situación ha cambiado de forma drástica en la última década, en la que se han comenzado a aislar de forma cada vez más frecuente cepas productoras de BLEE en el medio extrahospitalario<sup>14</sup>, habiéndose observado un crecimiento enorme de las  $\beta$ -lactamasas de la familia CTX-M, y describiéndose, además, en otras especies (*P. mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Salmonella enterica*, etc.).

En la página web del European Antimicrobial Resistance Surveillance System (<http://www.rivm.nl/earss/>), puede encontrarse información detallada acerca de la evolución de la resistencia en Europa a cefalosporinas de tercera generación desde el año 2001 en cepas productoras de infecciones invasivas de *E. coli* y *K. pneumoniae*. En un estudio multicéntrico realizado en España en el año 2000<sup>15,16</sup>, en el que participaron 40 centros, la prevalencia de cepas de *E. coli* y de *K. pneumoniae* productoras de BLEE fue del 0,5 y el 2,7%, respectivamente. La mayoría de las cepas de *E. coli* no estaban relacionadas clonalmente, mientras que en bastantes centros sí se observó el agrupamiento clonal de las cepas de *K. pneumoniae*. Las enzimas más frecuentemente identificadas fueron CTX-M-9, SHV-12 y CTX-M-14 en *E. coli*, y TEM-3 y TEM-4 en *K. pneumoniae*. Estos datos coinciden en muchos aspectos con los obtenidos en otro estudio español de 2004 en el que participaron 11 hospitales<sup>17</sup>. Los nuevos datos de otro estudio similar (44 centros participantes), llevado a cabo en 2006<sup>18</sup>, indican que el problema ha crecido considerablemente: las cepas de *E. coli* BLEE(+) supusieron ya el 4,04% (rango: 0,4-20,3%) y las de *K. pneumoniae* el 5,04% (rango: 0-30%). En *E. coli* se identificaron, sobre todo, BLEE de las familias CTX-M (73%) y SHV (26%), con muy baja representación de TEM (1%). Como en el estudio anterior, SHV-12 fue la BLEE más frecuente del tipo SHV, pero entre las CTX-M predominaron CTX-M-14 y CTX-M-15/28. También en *K. pneumoniae* (y a diferencia de lo observado en 2000) predominaron las enzimas CTX-M. Las enzimas concretas más frecuentemente identificadas fueron CTX-M-15 y SHV-12. El importante porcentaje de cepas de *E. coli* causantes de bacteriemia que producen BLEE (cercano al 9% en el segundo estudio multicéntrico antes indicado)<sup>18</sup> implica la necesidad de reconsiderar el tratamiento empírico inicial de los pacientes en los que se sospeche una sepsis causada por esta especie.

El predominio de enzimas CTX-M, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, y el incremento de infecciones fuera del entorno hospitalario se está observando en todo el mundo. Es interesante resaltar también la expansión de clones concretos de ambas especies (p. ej., ST-131 de *E. coli*) que producen CTX-M-15, circunstancia descrita en múltiples países, incluido España<sup>19</sup>.

Las cepas productoras de BLEE son con frecuencia resistentes a otros grupos de antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos y

fluoroquinolonas<sup>9</sup>. La resistencia a aminoglucósidos está relacionada, sobre todo, con la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA). La secuenciación de integrones completos que contienen genes que codifican BLEE (en particular CTX-M) y EMA ha permitido comprobar, en estudios realizados en Francia y en Chile, que los genes más frecuentemente identificados han sido *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa*<sup>20</sup>. La resistencia a quinolonas en cepas que producen BLEE se explica, en parte, por mutaciones en *gyrA* solas o asociadas a mutaciones en *parC*. Además, en *K. pneumoniae* (y presumiblemente en otras enterobacterias) las cepas BLEE(+) acumulan trastornos de la permeabilidad por pérdida de porinas con más frecuencia que las cepas BLEE(-), y cuando la pérdida de dichas porinas es completa las cepas también hiperexpresan con frecuencia un mecanismo de expulsión activa de quinolonas<sup>21</sup>. Finalmente, múltiples estudios recientes indican que algunas cepas BLEE(+) contienen genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (v. más adelante), que contribuyen al fenotipo de resistencia observado.

Los principales factores de riesgo para desarrollar infecciones por cepas BLEE(+) incluyen<sup>22</sup> gravedad de la enfermedad de base, uso de sondas urinarias, catéteres arteriales y tubos nasogástricos, nutrición parenteral, hemodiálisis y uso previo de antimicrobianos, en particular de cefalosporinas de amplio espectro y de quinolonas, aunque algunos estudios también indican aminoglucósidos y cotrimoxazol. Las infecciones comunitarias por *E. coli* productoras de BLEE tipo CTX-M se observan con más frecuencia en pacientes ancianos, con diabetes mellitus, sondados y tratados previamente con quinolonas.

#### Cefamicinas plasmídicas

Las enterobacterias que carecen de un gen cromosómico *bla<sub>ampc</sub>*, como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* y *P. mirabilis*, pueden adquirir plásmidos que codifican una  $\beta$ -lactamasa de clase C (cefamicinas plasmídicas)<sup>23</sup>. Sorprendentemente, dichas enzimas también se han identificado en especies en las que ya hay un gen cromosómico, como *Enterobacter* spp., *C. freundii* o *E. coli*. Se conocen desde 1989 e incluyen diversas familias, que pueden incluir diferentes alelos cada una: ACC, ACT, CMY, DHA, FOX, LAT, MIR y MOX. Las más frecuentes identificadas son FOX-5, CMY-2, ACT-1, AAC-1 y DHA-1. La mayoría son constitutivas, aunque algunas de ellas son de expresión inducible.

Las cefamicinas plasmídicas causan habitualmente resistencia a penicilinas, combinaciones de  $\beta$ -lactámicos más inhibidores de  $\beta$ -lactamasa, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generaciones. Los carbapenems y las cefalosporinas de cuarta generación (como cefepima) no son hidrolizados de forma eficiente pero si aparecen mutaciones adicionales que causan pérdida de porinas, alteraciones de proteínas que fijan penicilinas (PBP), etc., también se observará resistencia a estos  $\beta$ -lactámicos. Además, la coexistencia en la misma cepa de plásmidos que codifiquen una (o más) BLEE causará resistencia a cefepima. Como en el caso de las cepas que producen BLEE, la multiresistencia es también más frecuente en las enterobacterias que producen cefamicinas plasmídicas, por mecanismos similares a los descritos previamente.

El incremento de la actividad de cefalosporinas de amplio espectro y cefamicinas con derivados del ácido borónico o con altas concentraciones de cloxacilina (250-500 mg/l, ambos inhiben las enzimas tipo AmpC) es muy sugestivo de la presencia de una cefamicinasa plasmídica. Para la confirmación de la presencia de una enzima de este tipo se suele recurrir a la amplificación por PCR multiplex y posterior secuenciación<sup>24</sup>.

Los microorganismos que producen estas  $\beta$ -lactamasas tienen distribución universal, pero son menos frecuentes que los que producen BLEE. En España también son infrecuentes, aunque en un estudio reciente en Barcelona se ha observado un incremento de cepas con estas enzimas desde el 0,06% en 1999 hasta el 1,3% en 2007<sup>25</sup>.

Muchos de los microorganismos productores de AmpC plasmídica se han aislado en pacientes hospitalizados, sometidos a cirugía, con situaciones de base graves (cáncer, inmunosupresión, trasplante, etc.) y que frecuentemente han sido tratados con cefamicinas o carbapenems.

### Resistencia a carbapenems

La resistencia a carbapenems en enterobacterias puede deberse a la producción de carbapenemasas propiamente dichas o a la de enzimas que degradan o bloquean la acción de los carbapenems en asociación con otros mecanismos (fundamentalmente alteraciones de la permeabilidad). Ya se ha comentado esta última opción al hablar de BLEE y de AmpC (cromosómica/plasmídica).

Las carbapenemasas propiamente dichas a veces sólo causan incrementos moderados de las CMI de carbapenems, por lo que, tal vez, su verdadera incidencia esté infravalorada.

Aunque se conocen algunas carbapenemasas de clase A codificadas a nivel cromosómico (Nmc-A, Sme-1, Sme-2, Sme-3 e IMI-1 en *Enterobacter cloacae* o en *S. marcescens*), en los últimos años han adquirido mayor importancia las enzimas codificadas por genes plasmídicos, especialmente las de la familia KPC y, en menor medida, las GES. La especie en la que con mayor frecuencia se están observando es *K. pneumoniae*.

Las carbapenemasas de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) son por el momento, y en la mayoría de países incluido España, menos importantes que en *P. aeruginosa* u otros no fermentadores<sup>26</sup>. Las más frecuentes pertenecen a la familia VIM (v. más adelante). Muchos de estos aislados no son resistentes en sentido estricto (de acuerdo a los puntos de corte del CLSI), pero cuando se usa un inóculo elevado ( $10^8$  cfu/ml) o cuando se expresan en cepas sin porinas, la CMI de los carbapenems alcanzan cifras de hasta  $> 64$  mg/l.

Se han descrito cepas de *K. pneumoniae* que producen OXA-48, una enzima plasmídica de clase D que hidroliza imipenem y en varias cepas de *P. mirabilis* aisladas en Francia se ha descrito la producción de OXA-23 a partir de un gen de origen cromosómico<sup>27</sup>.

### Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

Las tasas de resistencia a quinolonas han crecido durante las últimas 2 décadas en prácticamente todo el mundo. Durante años dicha resistencia se ha relacionado con mutaciones cromosómicas en genes que codifican topoisomerasas de clase II o en los implicados en la permeabilidad o en la expulsión activa.

La resistencia causada por plásmidos en cepas clínicas se documentó en 1998 en *K. pneumoniae*<sup>28</sup>. La proteína implicada (QnrA1), perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos, protege a las topoisomerasas de clase II de la acción de las quinolonas, causando un incremento (normalmente moderado) de la resistencia, aunque si se expresa junto con otros mecanismos la resistencia puede sobrepasar los puntos de corte establecidos por el CLSI o el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>29</sup>. QnrA1 favorece la aparición de mutantes que por otros mecanismos presentan alto nivel de resistencia a quinolonas. En un modelo de neumonía en ratones, la expresión de QnrA1 se relaciona con el fracaso terapéutico de ciprofloxacino y de otras fluoroquinolonas<sup>30</sup>.

Desde 2004 se conocen nuevas familias de proteínas Qnr (QnrB, QnrC, QnrD, QnrS)<sup>31</sup>. Estas proteínas son más frecuentes en enterobacterias, aunque también se han descrito en *Aeromonas* spp. Se han descubierto variantes codificadas por genes cromosómicos de bacterias gramnegativas y grampositivas. Puede encontrarse una puesta al día en la nomenclatura de las familias y variantes de proteínas Qnr en <http://www.lahey.org/qnrStudies/>.

En 2005 se demostró la modificación enzimática de algunas quinolonas mediante una acetiltransferasa (originalmente de aminoglu-

cósidos) codificada por el gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr*. Más recientemente, se ha descubierto el mecanismo de expulsión activa de algunas quinolonas por QepA (se conocen 2 variantes).

Las proteínas Qnr y la acetiltransferasa se han identificado en prácticamente todos los países en que se han buscado, con variaciones (desde menos del 1 hasta el 40% de las cepas estudiadas) en el predominio de los distintos genes en función de la zona geográfica, el microorganismo considerado y en el fenotipo de resistencia de éste<sup>31</sup>. En España, diversos estudios han documentado la presencia de enterobacterias con genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *aac(6')-Ib-cr*<sup>32,33</sup>. QepA parece ser, por el momento, mucho menos frecuente.

No hay marcadores fenotípicos claros para reconocer este mecanismo de resistencia, que puede estar presente tanto en cepas sensibles como resistentes, por lo que la detección de los genes debe hacerse por métodos moleculares. En los últimos años se han observado (también en estudios españoles)<sup>34</sup> enterobacterias que presentan un fenotipo de sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas y sensibilidad completa a ácido nalidíxico, lo que en muchos casos se ha relacionado con la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas.

### Multiresistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* es uno de los paradigmas de patógeno con resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos. Esta resistencia está causada por la producción de una enzima AmpC inducible, una baja permeabilidad de su membrana externa y varios sistemas de expulsión activa<sup>35</sup>. De estos últimos los más relevantes, desde el punto de vista de la resistencia, son MexAB-OprM y MexXY-OprM y, en menor medida, MexCD-OprJ y MexEF-OprN. Además, *P. aeruginosa* desarrolla mutaciones cromosómicas y adquiere material genético exógeno con gran facilidad, lo que le confiere resistencia a compuestos habitualmente activos.

Se han hecho notables avances en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos de regulación de AmpC. También recientemente se ha observado que las variaciones estructurales de AmpC pueden favorecer la hidrólisis de los carbapenems, contribuyendo a la resistencia a estos compuestos<sup>36</sup>.

Los resultados de varios estudios multinacionales indican que las tasas de resistencia pueden variar enormemente de unos centros a otros. En un estudio multicéntrico español (1.014 cepas, 136 hospitales), las tasas de resistencia fueron: piperacilina-tazobactam, 7%; meropenem, 8%; amikacina, 9%; tobramicina, 10%; imipenem: 14%; ceftazidima, 15%; cefepima, 17%; aztreonam y ciprofloxacino, 23%, y gentamicina, 31%<sup>37</sup>.

El mayor problema terapéutico en esta especie es la resistencia a carbapenems. Las cepas resistentes a carbapenems del estudio multicéntrico español antes indicado eran más resistentes a otros  $\beta$ -lactámicos y a otros grupos de antimicrobianos que las sensibles, existiendo entre ellas una amplia diversidad clonal<sup>38</sup>.

Hasta hace poco tiempo, la resistencia a carbapenems se ha relacionado con la pérdida de la porina OprD (implicada en el transporte de imipenem y otros carbapenems) asociada a la producción de AmpC (resistencia fundamentalmente a imipenem) o la expresión de MexAB-OprM (resistencia a meropenem)<sup>39</sup>. Algunas cepas con sensibilidad disminuida a imipenem (CMI de 2 a 8  $\mu$ g/ml) sí expresan OprD en mucha menor cantidad que las cepas habitualmente sensibles. El tratamiento con imipenem de infecciones por *P. aeruginosa* se relaciona con la selección in vivo, en un 15-20% de los casos, de mutantes deficientes en OprD, lo que desemboca en un fracaso terapéutico. Entre 1988 y 1992 se identificaron en Japón varias cepas con un plásmido que codifica una carbapenemasa del tipo MBL (probablemente se trataba de IMP-1). Las cepas eran resistentes a imipenem, pero sólo aparecían altos niveles de resistencia en cepas deficientes en OprD. Tras conocerse IMP-1 se han descrito otras IMP, y otros grupos de carbapenemasas, de los que VIM es el más relevante.

En España se han descrito cepas que producen VIM-2 en varios hospitales, aunque por el momento el número total de aislados es pequeño<sup>38,40</sup>.

La detección de carbapenemasas se puede realizar con métodos fenotípicos o genotípicos. Los primeros son técnicas de difusión o de dilución en las que se demuestra un incremento de la actividad de los carbapenems en presencia de ácido clavulánico (carbapenemasas de clase A) o de quelantes del cinc (como EDTA para MBL). La detección genotípica de los genes que codifican estas enzimas se realiza por PCR con cebadores específicos y secuenciación del amplicón obtenido.

Muchas cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos son también resistentes a aminoglucósidos. Los 2 mecanismos más importantes son la producción de EMA y el sistema de expulsión activa MexXY-OprM. Las EMA más habituales en *P. aeruginosa* modifican gentamicina y/o tobramicina [ANT (2'')-I, AAC(3')-II, AAC(6')-II, y en menor medida AAC-(3)-I y AAC(3)-III]; con menor frecuencia se aíslan cepas con resistencia a amikacina [por APH(3')-VI y AAC(6')-I]. También es habitual que las cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* sean resistentes a las quinolonas, lo que depende de las ya citadas bombas de expulsión y de alteraciones en las topoisomerasas. La tasa de resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa* ha aumentado en los últimos años, tanto en Estados Unidos como en diversos países europeos, incluido España<sup>40</sup>.

El análisis de los factores de riesgo para la aparición de multirresistencia en *P. aeruginosa* es muy complejo, dada la diversidad de mecanismos implicados y la variabilidad de las bases genéticas que los sustentan. De forma genérica, se incluyen la gravedad de la infección, el uso de dispositivos invasivos, la hospitalización prolongada y la exposición previa a antimicrobianos, en particular  $\beta$ -lactámicos y quinolonas. Por desgracia, en muy pocos estudios se ha tenido en cuenta la interrelación entre actividad in vitro de los antimicrobianos, mecanismos de resistencia, epidemiología molecular y aspectos clínicos.

Dado el creciente problema derivado de la multirresistencia en *P. aeruginosa*, se ha incrementado el uso de colistina para el tratamiento de las infecciones causadas por estas cepas. Aunque la gran mayoría de aislados clínicos son sensibles a esta polimixina, ya se han descrito cepas resistentes, a veces epidémicas, en pacientes que habían recibido previamente colistina. Las causas de la resistencia a colistina son mal conocidas, y se han relacionado con alteraciones en la proteína reguladora PmrA o en la proteína de membrana externa OprH<sup>41</sup>.

### **Multirresistencia en *Acinetobacter baumannii***

La especie de mayor importancia clínica del género *Acinetobacter* es *A. baumannii*. Las cepas multirresistentes de esta especie se aíslan fundamentalmente en el medio hospitalario, donde constituyen un grave problema. Su aparición se relaciona con la resistencia intrínseca del microorganismo, su facilidad para adquirir elementos móviles con genes de resistencia y su capacidad para sobrevivir en reservorios humanos y ambientales<sup>42</sup>.

Los porcentajes de sensibilidad a distintos antimicrobianos en 211 aislados de *A. baumannii* obtenidos en un estudio español del año 2000<sup>43</sup>, en el que participaron 25 centros, fueron: polimixina B, 100%; minociclina, 66%; imipenem, 52%; rifampicina, 49%; sulbactam, 47%; meropenem, 43%; amikacina, 35%; doxiciclina, 32%; tobramicina, 21%, y para ampicilina, piperacilina, cefazolina, cefoxitina, ceftazidima, cefepima, gentamicina, cotrimoxazol, tetraciclina, ciprofloxacino y gemifloxacino la sensibilidad fue inferior al 20%. El patrón de multirresistencia más frecuente incluía, entre otros, resistencia a imipenem, sulbactam, ceftazidima, gentamicina, amikacina, ciprofloxacino y doxiciclina.

En otros estudios, se han descrito cepas que son resistentes a colistina.

Se ha sugerido la utilidad de tigeciclina para el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii*. Varios estudios indican una buena actividad in vitro de este compuesto, aunque ya se han dado a conocer cepas resistentes, en ocasiones obtenidas de pacientes que han sido tratados con tigeciclina. La importancia clínica de la resistencia a este compuesto en *A. baumannii* es un tema controvertido, pues no hay acuerdo en los puntos de corte a usar y, además, dependiendo del medio de cultivo empleado para determinar la sensibilidad (en particular de su concentración de manganeso) pueden obtenerse falsas resistencias<sup>44</sup>.

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos se relaciona con producción de diversas  $\beta$ -lactamasas (AmpC, oxacilinasas, carbapenemasas) asociada a alteraciones de la producción de porinas (CarO, proteína 33-36 kDa, OprD-like), de PBP o de bombas de expulsión<sup>45</sup>. Estas últimas están relacionadas, a su vez, con la resistencia a aminoglucósidos y a quinolonas, entre otros compuestos. La hiperproducción de AmpC cromosómica causa resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluidas las de amplio espectro, pero no parece ser un factor importante para la resistencia a carbapenems. La hiperproducción se relaciona con una secuencia de inserción por delante del gen estructural *ampC*. Este mismo mecanismo genético también explica la hiperexpresión de OXA-51, una oxacilina intrínseca en *A. baumannii*<sup>42</sup>.

Muchas cepas resistentes a carbapenems producen oxacilinasas, enzimas que hidrolizan débilmente a los carbapenems. Prácticamente todas estas oxacilinasas forman parte de integrones de tipo 1, que pueden arrastrar genes de resistencia a otras familias de antimicrobianos. En un trabajo en el que se evaluaron 69 cepas de *A. baumannii* procedentes del estudio multicéntrico español<sup>43</sup> se detectaron integrones en 19 (27,5%) de las cepas, de las que 15 contenían un alelo *aadB*, reconociéndose también alelos *aacA* y (en una cepa) *bla<sub>OXA-20</sub>*<sup>45</sup>. También se han descrito carbapenemasas tipo MBL en *A. baumannii*, en particular de la familia IMP. Más infrecuentes son las carbapenemasas de clase A, como ARI-2 y abRC-1, de las que aún se tiene muy poca información.

En cepas clínicas de *A. baumannii* se ha demostrado que la ausencia de PBP2a se relaciona con una disminución de la sensibilidad a imipenem y meropenem, y la ausencia adicional de PBP2b con resistencia de bajo nivel a ambos compuestos<sup>46</sup>.

Los clones multirresistentes de *A. baumannii* pueden hacerse endémicos y persistir en un centro determinado durante años. En la mayoría de los centros predomina un clon, con el que pueden coexistir otros clones esporádicos. La diseminación de cepas de *A. baumannii* multirresistentes es consecuencia de la transmisión paciente a paciente. Como en otros patógenos multirresistentes, los principales factores de riesgo relacionados con la adquisición de *A. baumannii* incluyen una estancia hospitalaria prolongada (sobre todo en unidades de cuidados intensivos), empleo de maniobras invasivas, enfermedad de base grave y uso previo de antimicrobianos. En un estudio de cohortes llevado cabo en España<sup>47</sup>, se observó que los factores de riesgo para la adquisición de *A. baumannii* resistente a carbapenems incluían: hospitalización en centros con más de 500 camas, tratamiento antimicrobiano previo, intervención quirúrgica previa y uso de sonda urinaria.

### **Multirresistencia en *Stenotrophomonas maltophilia* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores**

Prácticamente todas las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas en muestras clínicas presentan resistencia intrínseca a cefalosporinas de amplio espectro, carbapenems, aminoglucósidos y quinolonas. Esta resistencia es multifactorial, y se relaciona con: producción de una metaloenzima (L1) y de una  $\beta$ -lactamasa inhibida por ácido clavulánico (L2), baja permeabilidad de la membrana externa y expresión de bombas de expulsión activa y presencia de un gen similar a QnrB<sup>48</sup>. Aunque muchas cepas son sensibles a cotrimoxazol, algunos estudios han recogido cifras de resistencia a este

compuesto que llegan a alcanzar casi el 30%. Los factores relacionados con la adquisición de *S. maltophilia* son muy similares a los observados para otros bacilos gramnegativos no fermentadores<sup>49</sup>.

Se han descrito también cepas multirresistentes de otras especies de *Pseudomonas* (en particular *P. putida*), *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Flavobacterium* spp., etc., pero, desgraciadamente, la información acerca de estos agentes en relación con los mecanismos de resistencia, la trascendencia clínica y los aspectos epidemiológicos de las infecciones que causan sigue siendo muy limitada.

### Conflicto de intereses

Luis Martínez-Martínez ha sido consultor de Wyeth, ha participado en conferencias patrocinadas por Chiron, Wyeth y GSK, y ha recibido ayudas de investigación de Chiron, Wyeth, GSK, MSD y Pfizer.

Jorge Calvo Montes declara no tener ningún conflicto de intereses.

### Financiación

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (proyecto PI080397) y por la Red Española de Investigación de Enfermedades Infecciosas (REIPI RD06/0008).

### Bibliografía

- Bonnet R.  $\beta$ -lactamines et enterobacteries. En: Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editores. AntibioGramme. Paris: ESKA; 2006. p. 141-62.
- Nelson EC, Elisha BG. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:957-9.
- Tracz DM, Boyd DA, Hizon R, Bryce E, McGeer A, Ofner-Agostini M, et al; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. FEMS Microbiol Lett. 2007;270:265-71.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Amblar G, Biedenbach DJ, Jones RN, Pascual A. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate among clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to cefoxitin. Clin Microbiol Infect. 2006;12:197-8.
- Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. Curr Pharm Des. 1999;5:881-94.
- Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. Ann Intern Med. 1991;115:585-90.
- Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Chen HE, Lee CC, Chuang YC. Institutional spread of clonally related *Serratia marcescens* isolates with a novel AmpC cephalosporinase (S4): a 4-year experience in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;61:460-7.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86.
- Martínez-Martínez L, Hernández-Alles S, Alberti S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:342-8.
- Poirel L, Heritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:755-8.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Alles S, Álvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1669-73.
- Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodríguez MC, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. Int J Antimicrob Agents. 2008;32:534-7.
- Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayeararán JI, Alberti S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. J Clin Microbiol. 2006;44:2831-7.
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Peera E, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol. 2004;42:1089-94.
- Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:77-82.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2122-5.
- Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27:496-502.
- Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, et al. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa. Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26:404-10.
- Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, et al; Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:173-6.
- Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zelman R, González G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. J Antimicrob Chemother. 2003;51:317-21.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo MC, García I, Joyanes P, Domenech-Sánchez A, et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:3926-32.
- Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6:671-83.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2153-62.
- 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 Jun 11. [Epub ahead of print].
- Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? Clin Infect Dis. 2007;45:1171-8.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenems in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002;8:321-31.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 1998;351:797-9.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. J Antimicrob Chemother. 2003;51:1037-9.
- Rodríguez-Martínez JM, Pichardo C, García I, Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, Pascual A, et al. Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. Clin Microbiol Infect. 2008;14:691-7.
- Martínez-Martínez L, Cano ME, Rodríguez-Martínez JM, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6:685-711.
- 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;47:2033-9.
- Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother. 2008;61:291-5.
- Cano ME, Calvo J, Agüero J, Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, Martínez-Martínez L. Plasmid-mediated quinolone resistance among enterobacteria with reduced susceptibility or resistant to ciprofloxacin but susceptible to nalidixic acid. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL. 2007 Sept 17-20. Abstract C2-152.
- Mesáros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect. 2007;13:560-78.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:1766-71.
- Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Díaz MS, Sánchez Romero I, et al; Grupo Español para el estudio de *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa*: a multicenter study in 136 hospitals in Spain. Rev Esp Quimioter. 2003;16:41-52.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:4329-35.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001;47:247-50.
- Oliver A. Impact of dissemination of metallo-beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: present and future. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27:255-6.
- Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev. 2008;21:449-65.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21:538-82.
- Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, et al; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). Clonal diversity and antimicrobial sus-

- ceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:267-71.
44. Fernández-Mazarrasa C, Mazarrasa O, Calvo J, Del Arco A, Martínez-Martínez L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *J Clin Microbiol.* 2009;47:827-9.
45. Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Beceiro A, et al; Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH). Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:364-5.
46. Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:565-74.
47. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, et al. Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH). Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:874-9.
48. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:57-80.
49. Lai CH, Chi CY, Chen HP, Chen TL, Lai CJ, Fung CP, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2004;37:350-8.