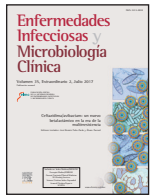




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Resistencia antimicrobiana en bacilos gramnegativos: una amenaza actual y global

Rafael Cantón^{a,b,*} y Germán Bou^{b,c}

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

^bRed Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, España

^cServicio de Microbiología-INIBIC, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, España

RESUMEN

Palabras clave

Resistencia a los antimicrobianos
Multiresistencia
Enterobacteriaceae
Pseudomonas aeruginosa
Acinetobacter baumannii

La resistencia a los antimicrobianos se ha incrementado de manera preocupante en los bacilos gramnegativos. La dispersión de clones de alto riesgo multirresistentes con determinantes genéticos responsables de la producción de betalactamasas de espectro extendido y, más recientemente, de carbapenemas ha reducido notablemente las alternativas terapéuticas. En España es preocupante la dispersión de las enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo OXA-48 y KPC. Se ha notificado el hallazgo de aislados de *Klebsiella pneumoniae* con KPC de clones similares a los descritos en Italia, con resistencia a la colistina por mutaciones en los sistemas que afectan a la estructura del lipopolisacárido. En *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, las tasas de aislados multirresistentes son similares a las de los países de nuestro entorno y se han detectado clones de alto riesgo con carbapenemasas. Recientemente se ha descrito el gen *mcr-1* en *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* asociado a plásmidos que presentan genes de betalactamasas de espectro extendido y de carbapenemasas. También preocupa el posible incremento de la resistencia a la fosfomicina en *E. coli*, que se está produciendo asociado a genes tipo *fosA* ligados a plásmidos y que podrían limitar el uso futuro de este antimicrobiano. El llamamiento de la Organización de las Naciones Unidas a la lucha unificada de los distintos estados miembros frente a la resistencia debe impulsar el desarrollo de nuevos antimicrobianos y la puesta en marcha a nivel local de los planes de contención de la resistencia.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli: a current and global threat

ABSTRACT

Keywords:

Antimicrobial resistance
Multiresistance
Enterobacteriaceae
Pseudomonas aeruginosa
Acinetobacter baumannii

Antimicrobial resistance has dramatically increased in gram-negative bacilli. The dispersion of multiresistant high-risk clones with genetic determinants responsible for the production of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and, more recently, carbapenemases has markedly reduced current therapeutic alternatives. In Spain, the dispersion of OXA-48 and KPC carbapenemase-producing enterobacteria (EPC) is worrisome. KPC producing *Klebsiella pneumoniae* clones with resistance to colistin similar to those described in Italy has been reported in our country. Resistance mechanisms include mutations affecting the lipopolysaccharide structure. In *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* the rates of multiresistant isolates are similar to those in surrounding countries and high-risk clones with carbapenemases within these organisms have been detected. Recently, the *mcr-1* gene has been described in *Escherichia coli* and *K. pneumoniae* associated with plasmids presenting ESBL and carbapenemase genes. Moreover, there is also concern about the potential increase of fosfomicin resistance in *E. coli*. This resistance has been associated with plasmid-mediated *fosA*-like gene and might limit future use of this antimicrobial. The high-level meeting of the United Nations celebrated with the aim that all member states fight against antimicrobial resistance must include promotion of the development of new antimicrobials and the implementation of resistance containment plans at the local level.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rafael.canton@salud.madrid.org (R. Cantón).

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un tema de gran preocupación mundial. Este hecho ha tenido su máxima representación en la declaración del 21 de septiembre de 2016 de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), que insta a los 193 países alineados en este organismo a una lucha común, global y coordinada frente a este grave problema¹. La declaración de la ONU ha estado precedida por numerosas iniciativas, tanto de organismos internacionales públicos como privados, y de planes estratégicos, entre los que ha destacado recientemente el de los gobiernos de Estados Unidos y de Reino Unido^{2,3}. En España, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) ha desarrollado un "Plan Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de Resistencia a los Antibióticos", que plantea numerosas acciones multidisciplinarias con una visión global que atiende tanto la salud humana como animal⁴. En todos estos planes, y como una de las primeras acciones para posteriormente establecer medidas de actuación, se destaca la necesidad de realizar estudios de vigilancia epidemiológica que monitoricen la evolución de las tasas de resistencia ante problemas ya establecidos y que permitan detectar la emergencia de nuevos mecanismos que puedan agravar más la situación actual.

En este artículo revisaremos los problemas actuales de resistencia a los antimicrobianos más relevantes en los principales microorganismos gramnegativos, cuya dimensión epidemiológica indica que, desgraciadamente, ya están establecidos, así como problemas emergentes que suponen una amenaza global y que reducen aún más las opciones terapéuticas y agravan la amenaza de las resistencias. Ante esta situación, se evidencia aún más la necesidad de disponer de nuevas alternativas terapéuticas que soslayan los mecanismos de resistencia ya establecidos y también los descritos más recientemente^{5,6}.

Resistencia y multiresistencia. Clones de alto riesgo

Desde un punto de vista clínico, la multiresistencia (MDR) se ha definido como la pérdida de sensibilidad clínica a al menos 3 o más grupos de antimicrobianos, que son de elección en el tratamiento de

las infecciones producidas por el microorganismo considerado. Una pérdida de sensibilidad a todos los antimicrobianos menos a 2 grupos define el concepto de extremadamente resistente (XDR) y la ausencia de opciones entre las comercializadas define la panresistencia (PDR)⁷.

Microbiológicamente, el incremento del aislamiento de bacterias MDR, XDR y PDR sigue un modelo definido como de "capitalismo genético", mediante el cual las bacterias resistentes tienen mayor probabilidad de adquirir y acumular mecanismos de resistencia⁸⁻¹⁰. Se produce con mayor probabilidad en ambientes en los que existe mayor presión selectiva de antimicrobianos. Con ello, las poblaciones sensibles tienden a desaparecer con persistencia de las más resistentes. Estas últimas se hacen dominantes y adquieren mayor potencialidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Este concepto, desarrollado en los primeros años del siglo XXI, fue seguido del de "clones de alto riesgo"^{11,12}, que define las poblaciones que son capaces de acumular mecanismos de resistencia y tiene una gran relevancia en el incremento y dispersión, tanto a nivel local como mundial, de la resistencia a los antimicrobianos. Es importante resaltar que los clones de alto riesgo no son necesariamente los más virulentos¹³. Se caracterizan, además de por su mayor resistencia, por una mayor capacidad de colonizar diferentes territorios, tanto ambientales como biológicos (p. ej., mucosas), y de persistir en el tiempo, con lo que incrementan aún más las posibilidades de adquirir mecanismos de resistencia, tendiendo así a la PDR. En estos clones se producen además eventos compensatorios que limitan el coste asociado a la resistencia¹⁴. La tabla 1 recoge algunos ejemplos de clones de alto riesgo de microorganismos gramnegativos y algunas de sus características en relación a la resistencia a los antimicrobianos.

Amenazas globales en bacilos gramnegativos

El panorama actual de las resistencias a los antimicrobianos se ha ensombrecido enormemente, particularmente entre los microorganismos gramnegativos. A los problemas establecidos en el siglo XX, como la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro mediada por las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) o las plasmídicas de tipo AmpC, la resistencia a las fluoroquinolonas ligada a mu-

Tabla 1
Ejemplos de clones de alto riesgo en microorganismos gramnegativos y características relevantes

Microorganismo	Clon	Mecanismo de resistencia	Relevancia clínica y otros mecanismos de resistencia
<i>Escherichia coli</i>	ST131	BLEE (CTX-M-15) ligada a plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFII ^{80,81}	Patógeno extraintestinal asociado mayoritariamente a infecciones urinarias. Se ha descrito también asociado a betalactamasas plasmídicas de tipo AmpC (CMY) y carbapenemasas (OXA-48, IMP, KPC, NDM)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST11, ST15	BLEE (CTX-M-15) y resistencia a fluoroquinolonas por mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i> y de naturaleza plasmídica (<i>aac[6]-Ib-cr</i>) ⁸²	Asociados a epidemias y endemias hospitalarias. Ligados más recientemente a otras BLEE (SFO-1), betalactamasas plasmídicas de tipo AmpC (DHA-1), carbapenemasas (VIM, NDM, OXA-48), resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (<i>qnr</i> , <i>qepA</i>), resistencia a aminoglucósidos por metilasas (ArmA, RmtB) y resistencia a colistina (mutaciones en <i>pmrB</i>)
	ST258	Carbapenemasa (KPC-1) ⁸³	Emergencia en Estados Unidos y dispersión posterior en Europa (Grecia) e Israel. Ligado a epidemias y endemias hospitalarias. Se ha descrito también asociado a resistencia a otros antimicrobianos, incluyendo colistina
	ST405	Carbapenemasa OXA-48 ⁸⁴	Epidemias en hospitales con acumulación de otros mecanismos de resistencia (p. ej., CTX-M-15)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ST175	Mutirresistencia ^{85,86}	Asociado a la resistencia a carbapenémicos mediada por carbapenemasas (VIM-2, IMP-1) en hospitales
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ST2	Mutirresistencia, incluyendo resistencia a carbapenémicos por producción de carbapenemasa (OXA-23) ⁸⁷	También denominado clon europeo II. Se ha identificado también asociado a otras carbapenemasas (OXA-24, OXA-58 y NDM-1) y resistencia a aminoglucósidos por enzimas modificantes de aminoglucósidos (AAC[3]-Ia, AADA, ANT[2"]-I, APH[3"]-VI, etc.) y metilasas (ArmA)

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

taciones en las topoisomerasas o por genes plasmídicos tipo *qnr* y la resistencia a los aminoglucósidos por enzimas modificantes de aminoglicósidos, se ha añadido el incremento de aislados productores de carbapenemasas^{9,15}. Más recientemente, y con enorme preocupación, se ha producido también la descripción de resistencia mediada por plásmidos a antibióticos clásicos como fosfomicina o colistina¹⁶⁻¹⁸.

Resistencia en *Enterobacteriaceae* mediada por carbapenemasas

En los últimos años, la aparición y diseminación de las enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos (ERC) ha supuesto un problema importante en numerosos centros sanitarios y están experimentando un gran incremento en todo el mundo. En la gran mayoría de los casos, el fenotipo de resistencia de las ERC se asocia a la presencia de betalactamasas de tipo carbapenemasas. Estas enzimas tienen un gran espectro hidrolítico sobre distintos antibióticos betalactámicos (incluyendo los carbapenémicos). La clasificación de las betalactamasas de Ambler¹⁹ establece 4 clases moleculares distintas (A, B, C y D). Las carbapenemasas se encuentran únicamente en las clases A, B y D (tabla 1).

Las carbapenemasas de clase A incluyen los grupos KPC, GES, Nmc-A, IMI, SME, SFC y BIC²⁰. Exceptuando las del grupo KPC, y en algunas áreas geográficas las GES, el aislamiento clínico de las otras carbapenemasas es limitado. La primera identificación de la enzima KPC se produjo en 1966 en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en Estados Unidos²¹. Hasta la fecha se han descrito 24 variantes alélicas, aunque la mayoría de los aislamientos corresponde a las enzimas KPC-2 y KPC-3. En la actualidad, la mayoría de las ERC en Estados Unidos e Israel se atribuye a la expresión de KPC mediada por plásmidos; también es endémica en Grecia e Italia. Las KPC son también las enzimas más prevalentes asociadas a resistencia a carbapenémicos en América Latina²². Desde un punto de vista bioquímico hidrolizan todos los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos y, al igual que otras muchas enzimas, no son inhibidas por los inhibidores clásicos. Se han identificado enzimas KPC en *Enterobacteriaceae* así como en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Acinetobacter* spp.²².

Las carbapenemasas de clase B (metalobetalactamasas, MBL) requieren zinc para su actividad, por lo que su actividad catalítica es inhibida en presencia de agentes quelantes de metales como el EDTA. Su expresión genera un amplio patrón de resistencia a la práctica totalidad de los betalactámicos, con la excepción del aztreonam. No se inhiben por los inhibidores comercializados en la actualidad. Las MBL más prevalentes son las del tipo VIM, IMP y NDM. Inicialmente identificados los genes responsables de su codificación en el cromosoma de algunas bacterias, la preocupación real llegó en los años noventa del pasado siglo, cuando se descubrieron asociadas a elementos genéticos móviles, y es notorio su creciente aislamiento en *Enterobacteriaceae*²³.

La mayor carga epidemiológica se localiza en Asia, especialmente por la enzima NDM, de gran preocupación en India, Pakistán y Bangladesh. En Europa, la mayor prevalencia se encuentra en Rumanía, Polonia y Dinamarca (nivel epidemiológico 4 según el European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC])²⁴. Sin embargo, la MBL que predomina en España, Hungría e Italia es la del tipo VIM, con un nivel 4 de alerta epidemiológica²⁴. En Estados Unidos y Canadá, aunque infrecuentes, se han empezado a identificar *K. pneumoniae* con NDM, siendo IMP o VIM mucho más infrecuentes. En América Latina destacan las productoras de VIM en México y de NDM-1 en Venezuela y Brasil. En un estudio observacional multinacional de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) asociadas a bacteriemia en 7 países distintos de América Latina, el 9 y el 8% de las EPC producían VIM y NDM, respectivamente²⁴.

Las betalactamasas de clase D u oxacilinasas comprenden un grupo muy heterogéneo de enzimas, con más de 500 variantes alélicas descritas hasta la fecha. Son inhibidas *in vitro* por NaCl, aunque la mayoría son refractarias a la inhibición por los inhibidores clásicos

de las betalactamasas²³. Solo una minoría demuestran capacidad de hidrolizar antibióticos carbapenémicos, aislándose principalmente en *Acinetobacter* spp., aunque destaca el incremento de enzimas del grupo OXA-48 en *Enterobacteriaceae*. OXA-48 se identificó inicialmente en un aislamiento de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos en Turquía²⁵ (actualmente con epidemia o nivel 5 de alerta epidemiológica), aunque es notoria su capacidad de diseminación posterior a Oriente Medio (Arabia Saudí, Líbano, Israel), norte de África (Libia, Egipto, Argelia, Marruecos), Asia (Rusia, India, China, Taiwán), América Latina (Argentina, Brasil, Colombia), Europa y recientemente Estados Unidos²²⁻²⁴. Se han identificado distintas variantes de OXA-48 (-162, -163, -181, -204, -232), la más prevalente es OXA-48. Contrariamente a las carbapenemasas de clase A (KPC) y B (NDM) que se han asociado a una gran variedad de plásmidos, el gen de OXA-48 está ubicado en un único plásmido autoconjugativo del tipo IncI/M, que es capaz de diseminarse en distintos géneros de *Enterobacteriaceae*²². Su moderada capacidad de hidrolizar los carbapenémicos conlleva una dificultad en su detección, por lo que la incidencia de EPC productoras de OXA-48 podría estar subestimada. Si bien los inhibidores clásicos muestran una gran incapacidad para inhibir las carbapenemasas de clase A, B y D, el nuevo inhibidor avibactam muestra una buena capacidad de inhibición sobre las carbapenemasas de clase A y algunas de clase D, no mostrando esta actividad inhibitoria sobre las enzimas de clase B o MBL²⁶.

Como se ha comentado, la actividad de las carbapenemasas sobre los carbapenémicos es muy variable. Así, mientras que algunas de estas enzimas hidrolizan carbapenémicos de manera muy eficiente, otras muestran una actividad débil frente a estos. Sin embargo, estas diferencias bioquímicas no explicarían la propagación exitosa de algunas de estas enzimas en países o áreas específicos. Para intentar entender este tremendo éxito evolutivo en la dispersión y en la epidemiología de las carbapenemasas deberíamos observar lo acaecido con las betalactamasas del tipo CTX-M²⁷. Estas enzimas se consideran un paradigma en la evolución de un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos. Las razones que pueden justificar su expansión en tan breve período podrían ser una combinación de eventos donde diferentes unidades de movilización genética, como secuencias de inserción (*ISEcp1* o *ISCR1*), asociadas a los genes *bla* y la posterior incorporación de estas en estructuras jerárquicas que contienen a su vez otras estructuras genéticas, como integrones de clase 1 y transposones localizados en plásmidos, podrían haber favorecido la selección y diseminación posterior. En este proceso, la fuerza selectiva de determinados betalactámicos, como cefotaxima o ceftazidima, habría ejercido un papel relevante. La integración de estas complejas estructuras genéticas en clones de alto riesgo, con marcadores de resistencia y/o virulencia determinados, habría facilitado aún más su selección y diseminación²⁷. Un proceso similar podrá explicar lo acaecido con las EPC.

Plataformas genéticas de los genes codificantes para las carbapenemasas. Las EPC son reconocidas actualmente como agentes causantes de infecciones, tanto en el hospital como en la comunidad, y pueden diseminarse fácilmente entre humanos o animales a través de materiales, contactos, alimentos o agua; de esta manera pueden intercambiar material genético por transferencia horizontal, principalmente a través de plásmidos y transposones. No obstante, algunas de las carbapenemasas no seguirían este comportamiento debido a su codificación cromosómica.

Las carbapenemasas de tipo KPC están codificadas en plásmidos. La primera enzima de este tipo, KPC-1, se identificó en Estados Unidos; poco tiempo después se identificó una variante, KPC-2, que en la actualidad es la enzima de este tipo más prevalente en gramnegativos a lo largo del mundo. Su asociación al clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST258 y al transposón Tn4401 (relacionado con Tn3), con alta capacidad de transposición, ha favorecido su diseminación mundial²⁸.

Respecto a las carbapenemasas de clase D en Enterobacteriaceae, y como se ha mencionado, el gen *bla*_{OXA-48} se encuentra ubicado en un plásmido autoconjugativo, donde se ha integrado a través de la adquisición de un transposón compuesto Tn1999. El gen de OXA-48 se asocia con la secuencia de inserción IS1999¹⁰. Variantes de este transposón que incluyen la presencia de la secuencia de inserción IS1 localizada adyacentemente al gen, así como en Tn2015, dan lugar a 4 distintas variantes del Tn1999.

En relación con las MBL, los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} se encuentran mayoritariamente localizados en integrones de clase I, que se caracterizan por una integrasa, codificada por el gen *intl1*, asociada a una transposasa, codificada por *tnpA* localizado en el extremo 5' del integrón²⁸. Habitualmente, estos integrones albergan otros genes de resistencia, tanto a antibióticos (aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol) como a antisépticos (*qac*), los cuales pueden encontrarse en plásmidos (integrones móviles) como integrones más grandes o superintegrones, localizados en el cromosoma. Respecto al gen *bla*, inicialmente fue descubierto en un plásmido de 4,3 kb incorporado a un integrón de clase I. En *Acinetobacter baumannii*, *bla*_{NDM-1} está a menudo rodeado por 2 copias de la secuencia de inserción IS*Aba125*, localizada en el transposón Tn125. En Enterobacteriaceae, *bla*_{NDM-1} se asocia con IS*Aba125* completo o truncado. Además, el gen de resistencia a bleomicina (*ble*_{MBL}) está siempre acoplado con *bla*_{NDM-1}, el cual se piensa que regula la tasa de mutación dependiente de RecA y podría actuar estabilizando la presencia de *bla*_{NDM-1}.

Situación de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España. En España, como en la mayoría de los países, la prevalencia de EPC ha experimentado un enorme aumento. En 2009, en el seno de un estudio multicéntrico que englobó 35 hospitales españoles, se analizaron 100.132 aislamientos de Enterobacteriaceae. Solo se detectaron las carbapenemasas VIM-1, IMP-22 e IMP-28, y no se detectó OXA-48 o KPC²⁹. Tan solo 3 años después, en 2012, y dentro del programa de vigilancia de la resistencia a los antibióticos en nuestro país, se detectó un incremento importante de las EPC, siendo OXA-48 la carbapenemasa emergente³⁰. En 2013, en el seno de otro estudio multicéntrico con 83 hospitales (cerca de 40.000 camas), se detectaron 379 EPC, y las carbapenemasas más frecuentes fueron OXA-48 (71,5%) y VIM-1 (25,3%). *K. pneumoniae* (74,4%), *Enterobacter cloacae* (10,3%) y *Escherichia coli* (8,4%) fueron las especies más afectadas. Respecto a los tipos de secuencia (ST) más prevalentes, estos fueron ST11/OXA-48, ST15/OXA-48, ST405/OXA-48 y ST11/VIM-1, y se observó una amplia diseminación interregional de EPC en nuestro país. Actualmente, la diseminación de OXA-48 en *E. coli* de naturaleza policlonal es un nuevo motivo de preocupación de salud pública en España³¹.

Respecto al resto de Europa, un estudio reciente ha puesto de manifiesto la amplia dispersión de las EPC, ya que en 2015 13 de 38 países describieron diseminación interregional o una situación endémica de EPC. Esa cifra contrasta con la de 2013, cuando solo 6 de 38 países tenían esa situación. En 2015, las enzimas más prevalentes fueron OXA-48 y NDM. Es de resaltar que en 2015 solo 3 países no notificaron casos de EPC³².

Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

La resistencia en *P. aeruginosa* se ha incrementado de manera notoria en las últimas décadas. Conocer la base molecular de esta resistencia, así como su prevalencia, es importante para optimizar el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno. De naturaleza ubicua y oportunista, es capaz de generar infecciones graves, que llegan a comprometer la vida de los pacientes, especialmente los inmunocomprometidos³³. Debido a su diversidad ecológica es capaz de aislarse en diversos ambientes, como el medio ambiente (suelo, materia orgánica, agua, plantas, etc.), muestras clínicas, así como en equipos médicos. Su peligrasidad radica en el gran número

de factores de virulencia que, junto con su resistencia intrínseca o adquirida a los antimicrobianos, contribuyen de manera sinérgica a su patogénesis.

La resistencia en *P. aeruginosa* se produce por la combinación de diferentes factores que actúan de manera sinérgica, entre los cuales destaca la baja permeabilidad de su envoltura celular, la expresión de una amplia gama de mecanismos de resistencia intrínsecos a partir de mutaciones cromosómicas (hiperexpresión de la ceftalosporinasa cromosómica, expresión de bombas de extrusión multifármaco o la pérdida en la expresión de OprD), así como la adquisición de genes de resistencia por transferencia génica horizontal vía plásmidos, transposones o bacteriófagos³⁴.

Tasas globales de resistencia en Pseudomonas aeruginosa. La resistencia a los antimicrobianos es una característica notable de *P. aeruginosa*. Los agentes antipseudomónicos aceptados y utilizados para tratar las infecciones causadas por esta bacteria son los betalactámicos, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas. Su uso inadecuado ha contribuido al desarrollo de cepas MDR. Recientemente, se ha comercializado ceftolozano/tazobactam, que incluye entre sus indicaciones el tratamiento de infecciones urinarias y abdominales complicadas causadas por *P. aeruginosa*³⁵. También se dispone de ceftazidima/avibactam, que además se puede usar para tratar la neumonía nosocomial, incluyendo la asociada a ventilación mecánica.

Para ceftazidima y cefepima, las tasas de resistencia se encuentran en distintos países entre el 10 y el 50% de los aislados, con una tendencia creciente³⁶. Este hecho es también claro en relación a los carbapenémicos, posiblemente debido a su amplio uso³⁶. Respecto a los aminoglucósidos, la resistencia es bastante frecuente. Para tobramicina y amikacina varía en función del estudio y puede oscilar entre un 2 y un 50%. En el caso de gentamicina puede ser incluso > 50%¹⁸. De igual manera, la resistencia a las quinolonas antipseudomonas (especialmente ciprofloxacino) se ha incrementado. Con esta situación, el uso de polimixinas (polimixina B y E-colistina) ha emergido como opción en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*, antibióticos que tampoco están escapando, aunque en mucha menor medida, al desarrollo de resistencias paralelamente a su uso continuado³⁷.

Uno de los mayores problemas en *P. aeruginosa* es la aparición de cepas MDR, XDR o PDR, que limitan de manera preocupante las opciones terapéuticas. Este problema se incrementa cuando se añaden características especiales de virulencia y/o persistencia, situación que acontece con los clones de alto riesgo. Algunos ejemplos serían los genotipos ST111, ST175 o ST235, responsables de epidemias nosocomiales causadas por cepas MDR o XDR a lo largo del mundo³⁸.

Situación de la resistencia a los antimicrobianos de Pseudomonas aeruginosa en España. Según el ECDC, las tasas de resistencia a ceftazidima, carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *P. aeruginosa* procedentes de infecciones invasivas, se sitúan en un 10, 20, 20 y 25%, respectivamente³⁹.

Los estudios nacionales, con colecciones de cepas recogidas de bacteriemias en 10 hospitales, muestran tasas de resistencia similares a las descritas por el ECDC. Cuando se analizan los mecanismos moleculares subyacentes, se pone de manifiesto que la resistencia mediada por mutaciones es frecuente en estos aislados. El principal mecanismo de resistencia a las penicilinas o ceftalosporinas es la selección de mutantes con hiperproducción constitutiva (desrepresión) de la ceftalosporinasa cromosómica inducible AmpC⁴⁰. Entre los mecanismos de resistencia mutacionales destaca también la inactivación de la porina OprD, que confiere resistencia a imipenem y sensibilidad disminuida a meropenem. Finalmente, la hiperexpresión de alguna de las múltiples bombas de expulsión, principalmente MexAB-OprM y MexXY-OprM, contribuye de forma notable a los fenotipos de resistencia⁴⁰. Aunque proporcionalmente es mucho menos común que la resistencia mutacional, cada vez es más frecuente

la detección de elementos genéticos transferibles portadores de genes de carbapenemasas o BLEE. Estudios recientes también demuestran que la mayoría de las cepas productoras de carbapenemasas o BLEE pertenecen a los denominados clones de alto riesgo, principalmente los ST235, ST111 o ST175⁴¹.

Particularmente relevantes son las MBL, cuya prevalencia en España aumentó más de 10 veces (del 0,08 al 1%) en 5 años (2003-2008) y han sido responsables de importantes brotes epidémicos⁴². Las MBL descritas en *P. aeruginosa* incluyen las VIM, IMP, SPM, GIM, SIM, NDM, AIM y FIM⁴². La MBL detectada con mayor frecuencia en *P. aeruginosa* en España es, con gran diferencia, VIM-2. Entre las carbapenemasas de clase A destacan las GES y, entre las BLEE, las OXA⁴³.

Resistencia en *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii es un patógeno oportunista, normalmente hospitalario, implicado entre otras en infecciones de piel y partes blandas, urinarias, neumonía asociada a ventilación mecánica y endocarditis. Estas infecciones se producen en pacientes con cierto grado de inmunosupresión y/o sometidos a procesos invasivos y, sobre todo, en aquellos ingresados en las unidades de cuidados intensivos.

Mecanismos de resistencia en *Acinetobacter* spp. El género *Acinetobacter* se compone de 30 especies con un nombre asociado y 9 especies genómicas definidas a través de estudios de hibridación ADN-ADN. Entre todas las especies sobresale con gran diferencia *A. baumannii*, debido a su resistencia intrínseca a diferentes antimicrobianos y a su extraordinaria capacidad para adquirir mecanismos de resistencia a la práctica totalidad de los antimicrobianos a los que inicialmente es sensible. Entre los mecanismos intrínsecos destacan la cefalosporinasa AmpC cromosómica, la betalactamasa OXA-51, la reducida permeabilidad de la membrana externa al compararlo con otros patógenos, así como la presencia de bombas de expulsión, principalmente de la familia RND, como AdeABC, AdeIJK y AdeFGH, que contribuyen en mayor o menor grado a su resistencia intrínseca, especialmente cuando se hiperexpresan (notable este hecho para tigeclina)⁴⁴. Dentro de los mecanismos de resistencia adquiridos, los más importantes por su diseminación, prevalencia e impacto clínico son las carbapenemasas de clase D (OXA-23, -24, -58, -143 y -235)⁴². La presencia de estas enzimas, junto a algunos de los mecanismos intrínsecos detallados, contribuye en gran medida a su resistencia a los carbapenémicos⁴³. Las betalactamasas de clase B o MBL, aunque también se han descrito en *Acinetobacter*, no constituyen, por el momento, un problema clínico o epidemiológico, pues su presencia es muy minoritaria respecto a las betalactamasas de clase D u oxacilinasas. También es destacable en *A. baumannii* la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos y cloranfenicol, metilasas y las modificaciones del sitio de interacción de la diana, como es el caso de las fluoroquinolonas⁴⁴. Respecto a las polimixinas (colistina), es notable el hecho del incremento en su uso debido a la escasez de opciones terapéuticas disponibles. Aunque no es muy habitual, se están detectando cada vez con mayor frecuencia aislados de *A. baumannii* resistentes a colistina. La resistencia se produce por la modificación del lípido A del lipopolisacárido (LPS) bacteriano a través de un sistema regulatorio de 2 componentes⁴⁵. Otro mecanismo, que se asocia con altos niveles de resistencia a colistina, está producido por la pérdida del LPS, aunque debido al amplio coste biológico asociado, su emergencia en cepas clínicas es prácticamente anecdótica y de menor relevancia.

Situación de la resistencia de *Acinetobacter baumannii* en España y resto del mundo. En España, como en el resto del mundo, se está produciendo un incremento de la resistencia a los antimicrobianos en *A. baumannii*. Destaca el estudio de Mera et al⁴⁶, que describe un incremento en la resistencia a los carbapenémicos en *A. baumannii* en 6 años en Estados Unidos (2002-2008), desde un 22 hasta un 52%, tras

un análisis de más de 22.000 cepas. En España, en el último estudio multicéntrico nacional (proyecto GEIH-GEMARA-REIPI-Ab2010)⁴⁷, donde se incluyeron 446 aislados de *A. baumannii* procedentes de 43 hospitales, se detectó una alta prevalencia de pérdida de sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos: > 94% en ceftazidima, piperacilina y ciprofloxacino; 82-86% en carbapenémicos y tetraciclina, y 60-70% en tobramicina, sulbactam, gentamicina y doxiciclina. En comparación con los datos obtenidos en un estudio previo realizado en 2000⁴⁸, estos aislados fueron más resistentes a ceftazidima, carbapenémicos, doxiciclina, sulbactam y colistina; la mayoría fueron MDR o XDR. Este estudio puso de manifiesto que la tasa de incidencia de colonización o infección por *A. baumannii* se incrementó significativamente desde el 0,14 en 2000 al 0,52 en 2010 ($p < 0,001$). Además, el estudio epidemiológico a través de MLST (tipificación multilocus de secuencias) puso de manifiesto un incremento del grupo clonal ST2 en 2010, el cual mostró mayor resistencia a imipenem y se asoció a un mayor riesgo de sepsis⁴⁹.

Los factores epidemiológicos implicados en la adquisición hospitalaria de *Acinetobacter* spp. son bien conocidos. Su implicación en brotes hospitalarios se ve favorecida por su capacidad de resistir a la desecación, transmitirse de paciente a paciente a través de las manos del personal y contaminar el ambiente hospitalario. En España se han descrito brotes por *A. baumannii* portadores de las carbapenemasas OXA-23, OXA-24 y OXA-58^{50,51}.

Nuevas amenazas de resistencia en bacilos gramnegativos

El panorama actual de resistencia a los antimicrobianos ha favorecido el retorno de antimicrobianos clásicos cuyas tasas de resistencia han sido tradicionalmente bajas⁵. Entre ellos destacan la colistina y la fosfomicina. Sin embargo, recientemente se han notificado mecanismos de resistencia de carácter transferible a ambos antimicrobianos en bacilos gramnegativos MDR, lo que constituye una nueva escalada en la preocupación por la dimensión del problema de la resistencia a los antimicrobianos⁵².

Resistencia a la colistina

La colistina fue introducida en terapéutica en los años cincuenta del siglo pasado. Su uso inicial fue muy moderado debido a su nefrotoxicidad; recientemente se ha recuperado su utilización con el aumento de la resistencia a los carbapenémicos, sobre todo en Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, por producción de carbapenemasas¹⁸. Sin embargo, su empleo ha sido muy amplio en veterinaria, situación que podría haber jugado un papel importante en la selección y diseminación de la resistencia mediada por el gen *mcr-1* en plásmidos que confieren resistencia a la colistina en Enterobacteriaceae^{53,54}.

Resistencia cromosómica a la colistina. Con anterioridad a la publicación de la descripción del gen *mcr-1* en 2016, la resistencia conocida a la colistina era de naturaleza cromosómica. Esta se produce por la modificación del lípido A del LPS bacteriano regulado a través de un sistema de 2 componentes⁴⁵. Están implicadas mutaciones o deleciones en diferentes genes, cuyo resultado da lugar a variantes del LPS que dificultan el efecto bactericida que ejerce la colistina por disrupción de la membrana externa⁵⁵. Entre ellos destacan los genes *mgrB* y *pmrB*, que participan en el sistema PhoPQ-PmrAB. En Enterobacteriaceae, la mayoría de los aislados resistentes a colistina con mutaciones en al menos 1 de estos 2 genes se han descrito en *K. pneumoniae* y, en menor medida, en *E. coli*. Otro mecanismo de resistencia de naturaleza cromosómica descrito en *K. pneumoniae* y menos estudiado que los anteriores son los cambios en la cápsula. Estos determinan un atrapamiento de la colistina, lo que da lugar a un incremento en los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI)⁵⁵. Por el contrario, algunas de las mutaciones que afectan a las

bombas de expulsión pueden generar aislados más sensibles a la colistina y, por tanto, con valores de CMI de colistina inferiores a los habituales⁵⁶.

La mayor presencia de diferentes mecanismos de resistencia a colistina en *K. pneumoniae* que en *E. coli* refleja la situación epidemiológica descrita en Europa a través del sistema de vigilancia EARS-net del ECDC. En 2013, entre los países que notificaron los valores de sensibilidad a colistina, el 8,8% de los aislados de *K. pneumoniae* eran resistentes a este antibiótico. Los países más afectados eran Grecia, Italia, Rumanía y Hungría, que concentran la resistencia a la colistina en los aislados productores de carbapenemasas. En *E. coli* esta cifra era < 1%³⁹.

El problema de la resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas ha quedado particularmente documentado en Italia, con la dispersión de clones de alto riesgo asociados a la producción de KPC^{37,58}. Su incidencia es tal que supera el 40% de los aislados. Estos mismos aislados podrían haberse diseminado en España, en particular en Andalucía, asociados al movimiento de pacientes desde Italia a nuestro país^{59,60}.

En *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, los mecanismos de resistencia a la colistina son muy similares a los que acontecen en Enterobacteriaceae e implican mutaciones en genes del sistema de 2 componentes PmrA/PmrB que afectan la estructura del LPS. De forma adicional, en *P. aeruginosa* se produciría por mutaciones que afectan al sistema de 2 componentes PhoP/PhoQ. En ambos casos se han descrito mutaciones compensatorias que hacen que la resistencia a la colistina pueda revertir⁵⁵. También se han descrito aislados de *A. baumannii* con pérdida completa del LPS debida a la inserción de IS*Aba11* en genes que participan en la síntesis del LPS⁶¹. La incidencia de resistencia a la colistina en ambas especies es variable, pero inferior a la que se produce en *K. pneumoniae*. Se ha descrito en mayor medida en aislados MDR y XDR; en el caso de *P. aeruginosa*, en aislados de pacientes con fibrosis quística y en *A. baumannii*, ligados a brotes nosocomiales^{62,63}. En ambos casos, también en clones ligados a la producción de carbapenemasas. En España, la resistencia a la colistina en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* ha sido bien documentada en estudios multicéntricos, y es < 2 y 3%, respectivamente^{47,64}.

Resistencia plasmídica a la colistina mediada por el gen *mcr-1*. La visión que se tenía de la escasa incidencia e importancia de los aislados con resistencia a la colistina, salvo excepciones como en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas, cambió radicalmente con la descripción del gen *mcr-1*. Su hallazgo inicial en *E. coli* y posteriormente en *K. pneumoniae* y otras enterobacterias en China y después en numerosos países, tanto en aislados de origen humano como animal, alertó del problema que podría derivarse de su dispersión. Su asociación en plásmidos (IncI2, IncHI2, IncP, IncFIB e IncX4), que habitualmente pueden contener genes de BLEE y de carbapenemasas (esencialmente NDM), aumentó aún más la preocupación generada tras su descripción inicial^{17,53}. También se ha encontrado ocasionalmente integrado en el cromosoma bacteriano⁶⁴. Se ha comunicado el posible origen de MCR-1 en bacterias productoras de colistina. MCR-1 es una fosfoetanolamina transferasa que cataliza la modificación del lípido A del LPS afectando la actividad de la colistina. Presenta una elevada homología de su secuencia aminoacídica con su enzima homóloga 4'-fosfoetanolamina transferasa del lípido A de *Paenibacillus*, microorganismo productor de polimixina^{65,66}.

La importancia clínica del gen *mcr-1*, por el momento, no se ha estudiado. El incremento en los valores de CMI de colistina en los microorganismos que contienen el gen *mcr-1* (2-8 mg/l) no suele ser tan elevado como el que se produce en los microorganismos que presentan alteración del LPS por mutaciones en genes cromosómicos (2 a > 256 mg/l). Se ha especulado que el amplio uso de la colistina en el ámbito veterinario podría jugar un papel importante en su selección y dispersión. También se ha observado que el gen *mcr-1* puede estar presente en aislados que no tendrían el calificativo de MDR e incluso en cepas sensibles a la colistina (< 2 mg/l)⁶⁷.

En España, el gen *mcr-1* se ha descrito en aislados de *E. coli* de origen humano y animal, así como en *Salmonella enterica* de origen animal^{68,69}. Es de resaltar el trabajo retrospectivo de búsqueda del gen *mcr-1* de Prim et al en un hospital de Barcelona⁶⁸. Encontró *mcr-1* en el 0,5% de los aislados de *E. coli* estudiados, siendo los primeros con esta característica del año 2012. Sin embargo, más sorprendente ha resultado su hallazgo en aislados de los años ochenta del siglo pasado en colecciones conservadas en China procedentes del ámbito veterinario⁷⁰. El incremento en el uso de la colistina en animales y la integración del gen *mcr-1* en plásmidos transferibles en bacterias MDR habría facilitado su dispersión.

Resistencia a la fosfomicina

La fosfomicina, tradicionalmente utilizada en numerosos países para el tratamiento de las infecciones no complicadas del tracto urinario, y en algunos otros en asociación con otros antimicrobianos para otras indicaciones, como la infección respiratoria por *P. aeruginosa*, ha tenido también un resurgimiento por la descripción creciente de las EPC⁶. Actúa como análogo del fosfoenolpiruvato y se puede unir a MurA (UDP-N-acetilglucosamina-3-*o*-enolpiruvil-transferasa), enzima esencial en la síntesis del peptidoglicano. Este mecanismo de acción es único, no confiere resistencia cruzada a otros antimicrobianos y favorece la acción sinérgica con los betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, colistina y otros antibióticos.

En *E. coli*, para que se produzca la interacción del antimicrobiano con MurA, la fosfomicina aprovecha los sistemas de transporte del glicerol 3-fosfato (GlpT) y de la glucosa 6 fosfato (UhpT), mientras que en *P. aeruginosa* se produce por GlpT al carecer del sistema UhpT. En *Acinetobacter*, los sistemas de transporte han sido menos estudiados, al considerarse intrínsecamente resistentes a la fosfomicina⁷¹.

Mecanismos de resistencia a la fosfomicina. La fosfomicina tiene in vitro una tasa de mutación elevada (aproximadamente 10⁻⁶ células por generación), si bien sigue siendo motivo de controversia la falta de correlación in vitro-in vivo de este fenómeno. La resistencia a fosfomicina se produce esencialmente por modificaciones que afectan a su permeabilidad y por modificación enzimática de la molécula. En mucha menor medida se producen alteraciones de la diana de actuación (MurA) que participa en la síntesis del peptidoglicano^{16,72}.

En *E. coli*, las mutaciones en los genes cromosómicos *glpT* y *uhpT* afectan al transporte de la fosfomicina, del glicerol y de determinados carbohidratos. También se han descrito mutaciones en los genes *cyaA* y *ptsI*, que limitan el AMPc y afectan al transporte de la fosfomicina. Sin embargo, el mayor interés en relación con los mecanismos que conducen a la resistencia a la fosfomicina se ha producido con la descripción de las enzimas modificantes de este antimicrobiano. La primera de ellas, FosA, es una metaloproteína (glutathione S-transferasa), cuyo gen codificante (*fosA*) se encuentra en un transposón (Tn2912). Se describió en la década de los ochenta del siglo pasado y está ligada a plásmidos⁷². Desde entonces se han descrito numerosas variantes de *fosA* en plásmidos, que a su vez contienen genes que confieren resistencia a los betalactámicos (genes responsables de la codificación de AmpC, BLEE y carbapenemasas), quinolonas (*qnr*), aminoglucósidos (*rtmB*), sulfonamidas (*sul*) y tetraciclinas (*tet*).

En *P. aeruginosa*, la resistencia a la fosfomicina es debida a FosA o a la inactivación del transportador GlpT. Aunque *A. baumannii* se considera intrínsecamente resistente a la fosfomicina, se han implicado sistemas de transporte en el aumento de los valores de CMI de fosfomicina⁷¹.

Epidemiología de la resistencia a la fosfomicina en bacilos gramnegativos multirresistentes. En una revisión sistemática reciente de la bibliografía de artículos publicados entre 2010 y 2015, Vardakas et al⁷³ indicaron que la sensibilidad a la fosfomicina en *E. coli* productor de BLEE oscilaba entre el 81 y el 100%. Estos valores serían más bajos en

K. pneumoniae productor de BLEE, entre el 15 y el 100%, y en las cepas productoras de carbapenemasas, entre el 39 y el 100%. Los estudios que indicaban menor sensibilidad en *E. coli* se realizaron en Asia y también de forma particular en España^{74,75}. Este aumento podría estar relacionado con el mayor uso de fosfomicina en nuestro país y en la dispersión de clones de alto riesgo (ST131) con resistencia a este antimicrobiano^{76,77}. Idéntica situación podría haberse producido en diferentes países en Asia.

Por otra parte, la pérdida de sensibilidad a fosfomicina en *K. pneumoniae* con carbapenemasas se ha descrito en aislados productores de KPC y de la metilasa RmtB, estando asociada a la presencia del gen *fosA*⁷⁸.

En *P. aeruginosa*, la ausencia de puntos de corte ha impedido una evaluación adecuada de la sensibilidad a la fosfomicina. En España, en un estudio multicéntrico en el que se utilizó el punto de corte epidemiológico (ECOFF \leq 128 mg/l) como criterio de sensibilidad, el 80,6% de los aislados de *P. aeruginosa* fueron sensibles a fosfomicina⁷⁹.

Conclusiones

La resistencia a los antimicrobianos de los microorganismos gramnegativos se ha incrementado de manera importante en los últimos años. Afecta a todas las familias de antimicrobianos comercializadas, por lo que es necesaria la introducción de nuevos fármacos que soslayen los mecanismos de resistencia emergentes (resistencia a la colistina y la fosfomicina) y, aunque relativamente recientes, los ya claramente establecidos (BLEE y carbapenemasas). La asociación de todos estos mecanismos de resistencia es relativamente habitual en los denominados clones de alto riesgo que tienen un carácter MDR o XDR. Su dispersión supone una amenaza actual y global, por lo que deben establecerse estrategias que minimicen los riesgos derivados de su dispersión.

Conflictos de interés

R.C. ha participado en actividades de formación y proyectos de investigación financiados por AZ y MSD.

G.B. ha participado en proyectos de investigación financiados por Pfizer.

Bibliografía

- United Nations. Political Declaration of the high-level meeting of the General Assembly on antimicrobial resistance, 2016. Disponible en: <https://documents-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N16/295/92/PDF/N1629592.pdf?OpenElement>
- The White House. National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria, 2015. Disponible en: https://www.whitehouse.gov/sites/default/files/docs/national_action_plan_for_combating_antibiotic-resistant_bacteria.pdf
- UK 5 Year Antimicrobial Resistance Strategy, 2013 to 2018. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/uk-5-year-antimicrobial-resistance-strategy-2013-to-2018>
- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Plan Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de Resistencia a los Antibióticos. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica-plan-estrategico-antibioticos/v2/docs/plan-estrategico-antimicrobianos-AEMPS.pdf>
- Baquero F, Coque TM, Cantón R. Counteracting antibiotic resistance: breaking barriers among antibacterial strategies. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18:851-61.
- Theuretzbacher U, Van Bambeke F, Cantón R, Giske CG, Mouton JW, Nation RL, et al. Reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:2177-81.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-81.
- Baquero, Coque, Cantón. Antibiotic, complexity, and evolution. *ASM News*. 2003;69:547-51.
- Cantón R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16:315-25.
- Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11:477-85.
- Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:510-8.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35:736-55.
- Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:185-230.
- Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:5527-35.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemas among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:413-31.
- Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2013;2:217-36.
- Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:2066-70.
- Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1333-41.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci*. 1980;289:321-31.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:440-58.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Bidle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1151-61.
- Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microb Infect*. 2014;20:821-30.
- Patel G, Bonomo RA. "Stormy water ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:1-17.
- Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2016;11:1-10.
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:15-22.
- Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -lactamase inhibitors in the clinic. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30:441-64.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol*. 2012;3:1-10.
- Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microb Infect*. 2014;20:831-8.
- Miro E, Aguero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:253-9.
- Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernández-Molina JM, Perez-Vazquez M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:6344-7.
- Oteo J, Ortega A, Bartolome R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3406-12.
- Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill*. 2015;20.
- Savoia D. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol*. 2014;11:1298-306.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:582-610.
- Hancock RE. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*. 2000;3:247-55.
- Rhomberg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSITC program report from the United States component. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57:207-15.
- Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:954-7.
- Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, et al. VIM-2 producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerging Infect Dis*. 2012;18:1235-41.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014.
- Cabot G, Acampo-Sosa A, Tubau F, Macía MD, Rodríguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and Efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1906-11.
- García-Castillo M, Del Campo R, Morosini M, Riera E, Cabot G, Willems R, et al. Wide dispersion of ST 175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2905-10.

42. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:568-85.
43. Juan C, Oliver A. Carbapenemas en *Pseudomonas* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:19-28.
44. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:538-82.
45. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengochea JA, Doumith M, Hornssey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agent Chemother.* 2011;55:3370-9.
46. Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahn D. *Acinetobacter baumannii* 2002-2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. *Microbial Drug Resist.* 2010;16:209-15.
47. Fernández-Cuenca F, Tomás M, Cabalero F, Bou G, Martínez L, Vila J, et al. Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIP-Ab2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:4-9.
48. Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, et al. Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:267-71.
49. Villar M, Cano ME, Gato E, Garnacho J, Cisneros JM, Ruiz de Alegria C, et al. Epidemiological and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: A reappraisal. *Medicine (Baltimore).* 2014;93:202-10.
50. Bou G, Cervero G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenemase-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3299-305.
51. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist.* 2014;20:259-63.
52. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:899-905.
53. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:161-8.
54. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Front Microbiol.* 2016;7:1789.
55. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5:643.
56. Srinivasan VB, Singh BB, Priyadarshi N, Chauhan NK, Rajamohan G. Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2014;9:e96288.
57. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, García-Fernández A, Pollini S, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014;19.
58. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L, et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an *mgrB* deletion mutant. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3341-4.
59. López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, et al. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44:538-40.
60. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Ortega A, Zamarrón P, Sáez D, et al. The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:3392-9.
61. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence ISAbA11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:3022-4.
62. Mustafa MH, Chalhoub H, Denis O, Deplano A, Vergison A, Rodríguez-Villalobos H, et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients through Northern Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:6735-41.
63. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42:276-92.
64. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macía MD, et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1703-13.
65. Zurfluh K, Tasara T, Poirel L, Nordmann P, Stephan R. Draft genome sequence of *Escherichia coli* S51, a chicken isolate harboring a chromosomally-encoded *mcr-1* gene. *Genome Announc.* 2016;4:e00796-16.
66. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, et al. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005957.
67. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 2016;21.
68. Prim N, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, Español M, Turbau M, Coll P, et al. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Euro Surveill.* 2016;21.
69. Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Flórez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res Vet Sci.* 2016;105:134-5.
70. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:293.
71. Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhando T, Pathania R. Fosfomicin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-Abaf. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72:68-74.
72. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomicin. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:321-47.
73. Vardakas KZ, Legakis NJ, Triarides N, Falagas ME. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomicin: a systematic review of the literature. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47:269-85.
74. Tena D, González-Praetorius A, González JC, Heredero E, Illescas S, De Baranda CS, et al. Changes in the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from community diagnosed urinary tract infections during the period 2003-2007. Multicentre study in Castilla la Mancha (Spain). *Rev Esp Quimioter.* 2010;23:36-42.
75. Rodríguez-Avil C, Rodríguez-Avil I, Hernández E, Picazo JJ. Increasing prevalence of fosfomicin resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* urinary isolates (2005-2009-2011). *Rev Esp Quimioter.* 2013;26:43-6.
76. Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martínez-Ruiz R, et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:712-7.
77. Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, et al. Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:2459-63.
78. Jiang Y, Shen P, Wei Z, Liu L, He F, Shi K, et al. Dissemination of a clone carrying a *fosA3*-harbouring plasmid mediates high fosfomicin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:66-70.
79. Díez-Aguilar M, Morosini MI, Del Campo R, García-Castillo M, Zamora J, Cantón R. In vitro activity of fosfomicin against a collection of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 16 Spanish hospitals: establishing the validity of standard broth microdilution as susceptibility testing method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5701-3.
80. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:273-81.
81. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:195-200.
82. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:978-85.
83. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-61.
84. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:168-72.
85. Libisch B, Balogh B, Füzi M. Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a countrywide distribution in Hungary. *Curr Microbiol.* 2009;58:111-6.
86. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol.* 2010;161:234-42.
87. Nemeč A, Janda L, Meltzer O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech Republic. *J Med Microbiol.* 1999;48:287-96.