

Cristina Seral^{1,2},
M^a José Gude¹,
F. Javier Castillo^{1,2}

Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas

¹Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", Zaragoza

²Dpto de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Las β -lactamasas AmpC pueden hidrolizar penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactams, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. Los genes *bla*_{AmpC} que se encuentran en el cromosoma de algunos bacilos gramnegativos, se han integrado en elementos genéticos transferibles, lo que ha permitido su difusión a microorganismos que carecen de forma natural de *ampC* cromosómico o lo expresan a bajo nivel. La prevalencia de las infecciones causadas por bacterias productoras de AmpC plasmídica (pAmpC) varía en función del tipo de enzima y la localización geográfica, siendo *bla*_{CMY-2} la enzima de distribución más universal. Los aislados clínicos productores de pAmpC son con frecuencia resistentes a otros antimicrobianos, lo que reduce de manera importante las opciones terapéuticas. Se describen los métodos fenotípicos y genotípicos que permiten su detección y se analiza el papel que pueden desempeñar diferentes antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones que producen. Este mecanismo emergente de resistencia requiere detectar y vigilar su evolución en los aislados clínicos y evaluar la sensibilidad *in vitro* y la eficacia clínica de otras opciones terapéuticas.

Palabras clave: β -lactamasas AmpC plasmídicas, pAmpC, cefamicinasas, gen *ampC*, CMY-2.

Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options

ABSTRACT

AmpC β -lactamasas can hydrolyze penicillins, oxyimino-, 7- α -methoxycephalosporins and monobactams. Susceptibility

to cefepime or cefpirome is little affected and is unchanged for carbapenems. Originally such genes are thought to have been mobilized to mobile genetic elements from the chromosomal *ampC* genes from members of *Enterobacteriaceae* facilitating their spread and now they can appear in bacterial lacking or poorly expressing a chromosomal *ampC* gene. The prevalence of infection by plasmid mediated AmpC (pAmpC) varies depending on the type of enzyme and geographical location and *bla*_{CMY-2} is the most frequently detected worldwide. Typically, pAmpC producing isolates are associated with resistance to multiple antibiotics making the selection of an effective antibiotic difficult. Phenotypic and molecular methods to detect pAmpC are described and the role of different antibiotics in the treatment of these infections is examined. Surveillance studies about the evolution of this emerging resistant mechanism are important in clinical isolates. Evaluate the *in vitro* susceptibility of these isolates and the clinical efficacy of other therapeutic options is required.

Keywords: Plasmid mediated AmpC β -lactamasas, pAmpC, cephalosporinas, *ampC* gene, CMY-2

Introducción

El mecanismo principal de resistencia a β -lactámicos en enterobacterias es la producción de enzimas hidrolíticas denominadas β -lactamasas. Muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* poseen β -lactamasas cromosómicas naturales, probablemente derivadas de las propias proteínas fijadoras de penicilina (PBP, del inglés *penicillin binding protein*), con las que tienen analogía secuencial y estructural. Las β -lactamasas AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros y a la clase C de la clasificación estructural de Ambler. Se caracterizan por ser activas frente penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefotaxima y cefotetan), oximinocefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactams (aztreonam) con la excepción de cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y carbapenémicos. Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a la combinación de β -lactámico con inhibidores de β -lactamasas, con la posible excepción de piperacilina-tazobactam¹. Este espectro de hidrólisis puede verse ampliado (subgrupo 1e) y afectar a las cefalosporinas de

Correspondencia:
F. Javier Castillo.
Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa".
Avda San Juan Bosco 15. 50009 Zaragoza.
Tfno: 976556400.ext 164319.
E mail: fcastillo@salud.aragon.es

cuarta generación como resultado de sustituciones, inserciones o deleciones aminoacídicas en seis regiones de la enzima, son las llamadas AmpC de espectro extendido, ESAC²⁻⁴.

Regulación de *ampC*. En la mayoría de enterobacterias que lo poseen, el gen *ampC* se encuentran en el cromosoma bacteriano y su expresión es de bajo nivel e inducible como respuesta a la exposición a ciertos β -lactámicos como amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, imipenem y ácido clavulánico². El fenómeno de inducción está regulado por un operon *amp* que requiere la presencia del β -lactámico y al menos cinco genes (*ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG*, *ampE*) y está íntimamente relacionado con el reciclaje del peptidoglicano. El mecanismo de inducción de la β -lactamasa AmpC depende del gen *ampR*, que actúa como activador durante el proceso de inducción y como represor en condiciones normales. Los genes *ampC* y *ampE* codifican la síntesis de proteínas de membrana (AmpC y AmpE, respectivamente) y *ampD* da lugar a una proteína soluble (AmpD) que se libera en el citoplasma. En presencia de un agente inductor, AmpG actúa como una permeasa y facilita la entrada en el citoplasma de los productos de degradación del peptidoglicano que se están produciendo como consecuencia de la actuación del β -lactámico. Estos productos participan en la conversión de *ampR* de represor a activador del gen *ampC*. Asimismo, AmpD metaboliza los productos de degradación que se están produciendo en el citoplasma limitando la cantidad de producto inductor y favoreciendo el reciclaje de la pared, ya que los metabolitos resultantes se reutilizan en la formación del propio peptidoglicano. En ausencia de β -lactámico, no se liberan los productos de degradación del peptidoglicano lo que impide la activación de *ampR*. La participación de AmpE en este proceso no está suficientemente definida⁵⁻⁸.

A diferencia de otras enterobacterias, en *Escherichia coli*, *bla*_{AmpC} se expresa de forma constitutiva, ya que este gen está regulado por fenómenos dependientes de mecanismos de atenuación y no por fenómenos de inducción, debido a la ausencia de *ampR* en su dotación genética sin producirse activación del gen en presencia de antibióticos inductores^{9,10}.

Origen de pAmpC y familias de enzimas. En 1976, Bobrowski et al. describieron una β -lactamasa plasmídica indistinguible de la enzima AmpC de *E. coli* en un cepa de *Proteus mirabilis*, pero el plásmido original se perdió y los estudios moleculares no se pudieron realizar¹¹. En 1989, Bauernfeind et al. describieron una cepa, originaria de Corea del Sur, que podía transferir resistencia a cefoxitina, cefotetán, penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactams desde *Klebsiella pneumoniae* a *E. coli*¹². La enzima fue denominada *bla*_{CMY-1} por su actividad cefamicinasa, tenía un punto isoelectrónico de 8.0 y era más sensible a la acción del sulbactam que a la del ácido clavulánico, lo que sugería que se podría tratar de un enzima de clase C. Sin embargo, la primera AmpC de localización plasmídica (pAmpC) fue documentada por Papanicolau et al. que describieron la resistencia transmisibile a α -metoxi y oximino- β -lactámicos mediada por una enzima, *bla*_{MIR-1}, con propiedades químicas propias de β -lactamasas tipo 1 y con una homología del 90% con el gen *ampC* de *Enterobacter cloacae*¹³.

Estudios de la secuencia nucleotídica sugieren que los genes que codifican estas enzimas plasmídicas derivan de genes *ampC* cromosómicos que poseen algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Aeromonas* spp, los cuales han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando su difusión a diferentes microorganismos^{7,14,15}. Pequeñas diferencias en la secuencia aminoacídica de estas enzimas plasmídicas han dado lugar a 6 familias: CIT (derivadas de *bla*_{AmpC} de *Citrobacter freundii*) incluye los grupos CMY y LAT; DHA (derivadas de *bla*_{AmpC} de *Morganella morganii*); ACC (derivada de *bla*_{AmpC} de *Hafnia alvei*); FOX (derivada de *bla*_{AmpC} de *Aeromonas media*); MOX (se cree que son derivadas de AmpC cromosómica de *Aeromonas caviae*), EBC (derivadas de *bla*_{AmpC} de *E. cloacae* y/o *Enterobacter asburiae*) incluye ACT y MIR (<http://www.lahey.org/Studies>). Nakano et al. describen posteriormente una nueva variante, CFE-1, derivada de *bla*_{AmpC} de *C. freundii*⁵.

La relación entre las β -lactamasas AmpC cromosómicas y plasmídicas es muy estrecha, existiendo una homología cercana al 100% dentro de las variantes derivadas de las AmpC de *M. morganii* y *H. alvei* de más del 94% con las derivadas de la AmpC de *C. freundii*. Las enzimas CIT tienen dos orígenes diferentes. Tres de sus variantes (CMY-1,-8,-9) están relacionadas con *ampC* cromosómica de *Aeromonas* spp., mientras que el resto de variedades (incluida la CMY-2, pAmpC más prevalente en todo el mundo) están relacionados con *ampC* cromosómica de *C. freundii*⁷. Las variantes de LAT tienen un origen similar, pero de las cuatro enzimas originales, las secuencias revelaron que LAT-2 era idéntica a CMY-2, LAT-3 era idéntica a CMY-6, y que LAT-4 era idéntica a LAT-1. ACT-1 y MIR-1 muestran entre ellas una homología del 91,4% pero sólo un 85-87% con el resto de las AmpC derivadas de *E. cloacae* (MIR-2,-3,-4,-5 y ACT-2,-3,-4,-5,-7,-8,-9)¹. Las enzimas FOX tienen un 95% de similitud dentro de su grupo y CMY-1,-8,-9 muestran una similitud aminoacídica de más del 97% entre ellas¹. DHA-1,-2, CMY-13 y ACT-1 están ligadas al gen *ampR* y son inducibles. El resto de pAmpC no están ligadas a *ampR* y se expresan constitutivamente^{1,7}.

En la actualidad, en el GenBank hay descritas 72 variantes de CMY, 8 variantes de MOX, 8 variantes de DHA, 9 variantes de ACT, 4 variantes de ACC, 10 variantes de FOX, 1 variante de LAT y 5 variantes de MIR (<http://www.lahey.org/Studies>) (última entrada septiembre 2011).

Elementos genéticos implicados en la diseminación de pAmpC. Diversos elementos genéticos están implicados en la movilización de genes *ampC* a plásmidos. La forma en que esto ocurre se ve favorecida por la presencia de secuencias de inserción como *ISEcp1* (asociada a CMY-2, -3, -4, -5, -7, -12, -14, -15, -16, -21, -23, -31, -36, ACC-1 y ACC-4), que se ha relacionado también con la transposición de genes de β -lactamasas tipo CTX-M como vía inicial de su propagación^{7,16}. Otra secuencia de inserción con papel importante en el acúmulo de genes de resistencias antimicrobianas en plásmidos es la *ISCR1*, involucrada en la movilización de genes en integrones de clase 1 (asociada principalmente a CMY-1, -8, -9, -10,-11,-19, DHA-1 y MOX-1)^{7,17}. También se ha visto

involucrada la secuencia de inserción IS26 en la movilización de la variante CMY-1^{37,18-20}. Se ha demostrado que genes *bla*_{CMY-2} están localizados en plásmidos de los grupos IncI I y IncA/C, plásmidos que cotransfieren además resistencia a cotrimoxazol¹⁸.

Prevalencia de pAmpC

Las pAmpC han sido descritas en todo el mundo^{1,7, 19-21}. No se dispone de datos exactos de prevalencia de pAmpC debido, principalmente, a la falta de un método estandarizado para su detección, existiendo diferentes rangos de prevalencia según el tipo de enzima y la localización geográfica.

América. La primera referencia de pAmpC, MIR-1, data de 1989¹³. ACT-1 y FOX-5 fueron detectadas por primera vez en *K. pneumoniae* en New York en 1994 y 2001, respectivamente, observándose una expansión territorial al ser detectadas posteriormente en hospitales de todo el país²². Coudron et al. indicaron un aumento del 1,1% al 2,6% de *K. pneumoniae* productoras de pAmpC en la misma institución sanitaria en un periodo de cinco años^{22,23}. Los datos obtenidos del estudio SENTRY 2004 en el que participaron 30 hospitales norteamericanos mostraron un 1,2% de *E. coli* productores de pAmpC siendo CMY-2 y FOX-5 las enzimas predominantes²⁴. Un estudio multicéntrico llevado a cabo entre 1992 y 2000 en 70 hospitales de 25 estados norteamericanos reveló que, de 752 *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a oximinocefalosporinas, el 7,5% de *K. pneumoniae* y 4% de *E. coli* producían pAmpC²⁵. En el 2005, Hanson et al. estudiaron la prevalencia de pAmpC en pacientes no hospitalizados encontrando una prevalencia global en *E. coli* y *K. pneumoniae* del 0,6% y 0,5%, respectivamente, siendo CMY-2 la única variante encontrada²⁰. En el caso de *Salmonella* spp., la variante CMY-2 ha sido la principal responsable del aumento de resistencia a ceftriaxona y otros oximino β -lactámicos en Estados Unidos atribuible a pAmpC²⁶.

En Canadá, la prevalencia de pAmpC ha ido aumentando desde 1999 siendo el gen predominante *bla*_{CMY-2}. Durante 2005, el grupo de Mulvey et al. realizaron un estudio en 12 hospitales en el que se observó que el 11% de los *E. coli* resistentes a cefoxitina producían pAmpC (0,8% del total de *E. coli* aislados)²⁷. Años más tarde, Pitout et al. observaron que los *E. coli* resistentes a cefoxitina alcanzaba ya el 30,5%, detectándose principalmente en muestras urinarias procedentes de la comunidad²¹. En otro estudio realizado en unidades de cuidados intensivos de hospitales de todo el país, se señaló como el principal mecanismo de resistencia a cefoxitina en *E. coli* la adquisición de pAmpC²⁸. El análisis de aguas de bebida y playas fluviales mostró un 77,5% de pAmpC en *E. coli* resistentes a cefoxitina²⁹. De los datos obtenidos del estudio CANWARD 2007-2009, se evidenció un aumento de *E. coli* productores de pAmpC del 0,8% al 2,7%³⁰.

En Argentina, Rapoport et al. presentaron un porcentaje menor al 0,1% de enterobacterias productoras de variantes de CIT, mientras que en el trabajo de Jure et al., el porcentaje fue del 0,55%^{31,32}.

Asia. Desde la primera referencia de pAmpC en Corea en 1989¹², diferentes microorganismos productores de variantes pAmpC han sido detectados por todo el continente^{33,34}. En Taiwán, en un estudio multicéntrico llevado a cabo en el 2003, el 43,6% de *E. coli* y 14,5% de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de espectro extendido eran productores de pAmpC³⁵. En un hospital de Seúl, el 2,9% de *K. pneumoniae*, el 2,5% de *K. oxytoca* y el 0,8% de *P. mirabilis* producían pAmpC siendo DHA-1 la variante detectada con más frecuencia, a pesar de ser CMY-2 la de mayor distribución mundial³⁶. En cinco hospitales infantiles chinos, Ding et al. observaron una prevalencia de pAmpC del 2,6% en infecciones causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli*, siendo DHA-1 la principal variante encontrada³⁷. Sin embargo, en un estudio multicéntrico dirigido por Yamasaki et al. en Japón, se encontró una prevalencia mucho menor (0,13%) a la observada años atrás en Corea (3,1%)³⁶ o en China (2,8%)³⁸ pero la presencia de estas enzimas se notificó en el 76% de los hospitales participantes, lo que sugería una expansión de pAmpC por prácticamente todo el país³⁹. En un estudio realizado por el grupo de Yoo et al. durante 2008 y 2009 en centros relacionados con la prestación de cuidados sanitarios se observó que el 3,1% de *E. coli* y el 39,1% de *K. pneumoniae* eran productores de DHA-1, CMY-2 y CMY-6, valores similares a los encontrados en infecciones nosocomiales, poniendo de manifiesto la presencia de este mecanismo de resistencia fuera del entorno hospitalario⁴⁰.

Europa. Desde el año 2000, se ha constatado un aumento en el porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* como muestran los últimos datos obtenidos del European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (última entrada 2011-09-06). En tres centros hospitalarios del Reino Unido, en el año 2004, tras un screening inicial de aislados resistentes a cefoxitina, el 49% de *E. coli* y el 55% de *K. pneumoniae* seleccionados eran productores de pAmpC⁴¹. En Irlanda, dos años más tarde, Roche et al. publicaron que el 48% de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación producían pAmpC⁴². En Francia, en un estudio llevado a cabo entre el 2004 y el 2008, el 0,09% del total de *E. coli* estudiados y el 6% de los resistentes a cefoxitina eran portadores de *bla*_{CMY-2}⁴³, rangos de prevalencia que no difieren mucho de los encontrados en otros países europeos⁴⁴⁻⁴⁶. En el estudio realizado por Luzzaro et al., en el que se analizaba la difusión de *P. mirabilis* multiresistentes en Italia, se confirmó la propagación de un único clon productor de la variante plasmídica CMY-16 entre los años 2004 y 2006, observándose un aumento de la prevalencia del 0,3% al 4,6% aislándose en pacientes hospitalizados y no hospitalizados¹⁴.

Bou et al. describen la primera AmpC plasmídica en España en el año 2000. Se trata de una cepa de *E. coli* productora de FOX-4⁴⁷. En un estudio llevado a cabo en dos hospitales distanciados geográficamente en nuestro país, la prevalencia de pAmpC fue del 0,17%. La única AmpC plasmídica encontrada fue CMY-2 en el 0,41% de cepas de *K. oxytoca*, 0,18% de *E. coli*, 0,14% de *K. pneumoniae*, 0,21% de *Salmonella* spp. y 0,07% de *P. mirabilis*⁴⁸. Aunque su frecuencia

aún sigue siendo relativamente baja, Mata et al. describieron un aumento de la prevalencia y diversidad de pAmpC durante el periodo 1999-2007 en Barcelona con una prevalencia global del 0,43%, detectándose la enzima CMY-2 en el 70% de las cepas. Estos resultados reflejaban un aumento de la prevalencia en *E. coli* del 0,04% en 1999 a un 1,2% en 2007, en *K. pneumoniae* de un 0,4% en 2000 a un 1,52% en 2007 y en *P. mirabilis* de un 0,7% en 2000 a un 2,6% en 2007⁴⁹. González-Sanz et al. refieren la aparición de cepas de *Salmonella* spp. productoras de pAmpC durante el período 2001-2005⁵⁰.

En un reciente estudio multicéntrico realizado en nuestro país, la prevalencia nacional de pAmpC fue del 0,6%, siendo Cataluña y Asturias las comunidades con mayor prevalencia y Baleares la de menor, con un 0,35%⁵¹. Al igual que en el resto de Europa, la variante plasmídica CMY-2 fue la enzima encontrada con mayor frecuencia en este estudio (66,7%) seguida de DHA-1 (25,6%). En Aragón, entre Junio de 2008 y Junio de 2009, la prevalencia global de pAmpC fue de 0,66%, observándose en *E. coli* el 0,57%, el 0,25% en *K. pneumoniae* y el 0,43% en *P. mirabilis* siendo CMY-2 y DHA-1 las únicas variantes encontradas⁵².

La prevalencia de pAmpC entre diferentes estudios difiere considerablemente de una zona geográfica a otra, de la especie estudiada y del periodo de tiempo, en lo que posiblemente pueden influir los diferentes criterios de selección utilizados en cada estudio⁴⁹.

Epidemiología de pAmpC

En España, se ha constatado una gran diversidad genética entre *E. coli* productores de CMY-2. La mayoría de las cepas estudiadas (51,4%) por Oteo et al. pertenecían al grupo filogenético D, que se asocia generalmente con virulencia. Mediante MLST, estas 21 cepas pertenecían a 8 secuencias tipo (ST) diferentes encontrándose aislamientos pertenecientes a ST57, ST354 y ST38, entre otros. ST38, ha sido descrito recientemente asociado a la producción de CMY-2 en Noruega. Además, se encontraron 3 aislados de *E. coli* productores de CMY-2 pertenecientes al clon O25b/ST131/B2. Este hallazgo ha sido descrito también en otros países europeos como Reino Unido, Irlanda y Noruega^{41,53,54}. La propagación de la variante CMY-2 en el clon O25b/ST131/B2 podría ser en los próximos años un problema de interés en salud pública por el carácter internacional de este clon y su demostrado capitalismo genético y capacidad de difusión.

Detección de β -lactamasas plasmídicas de tipo AmpC

La detección en el laboratorio de β -lactamasas AmpC plasmídicas es importante para interpretar adecuadamente los estudios de sensibilidad, porque son enzimas que hidrolizan cefaloporias de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas y, en menor medida las de tercera generación, mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación y los

carbapenémicos^{7,55}. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando los aislamientos presenten un patrón de resistencia a β -lactámicos diferente al de su fenotipo salvaje, o de resistencia natural, siendo buenos marcadores iniciales la resistencia a cefoxitina y/o sensibilidad disminuida a amoxicilina/ácido clavulánico y/o resistencia a una o más cefalosporinas de tercera generación, con ciertas limitaciones. La resistencia a oximino- β -lactámicos y a amoxicilina-ácido clavulánico podría deberse también a ciertas CMT (*complex mutant TEM*)⁵⁶, a BLEEs tipo OXA, a carbapenemasas, e incluso a hiperproducción de β -lactamasas TEM-1, SHV-1, o K1^{7,57}. Con la excepción de *Yersinia enterocolitica*, que es intrínsecamente resistente a cefamicinas⁴, la resistencia a cefoxitina y a oximinocefalosporinas podría ser un marcador inicial de AmpC, aunque poco específico porque la resistencia a cefoxitina podría deberse también a la producción de ciertas carbapenemasas, algunas β -lactamasas de clase A (GES-4) y a la alteración en la producción de porinas en *K. pneumoniae* y *E. coli*^{58,59}. En cualquier caso, ante la posible sospecha de la presencia de una AmpC plasmídica, habría que realizar un test de confirmación.

Los métodos de laboratorio para confirmar la existencia de una AmpC plasmídica pueden ser fenotípicos o genotípicos. Los **métodos fenotípicos** son sencillos y asequibles. No obstante, Conejo et al. señalaban en 2008 que, de los hospitales españoles que participaron en un estudio multicéntrico, sólo el 47,4% de los laboratorios fue capaz de detectar *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de AmpC plasmídica⁶⁰. Esta limitación pudo ser muy dependiente de la inexistencia entonces de métodos estandarizados para su detección, propugnados por algún comité u organización de expertos (CLSI, EUCAST, CASFM, MENSURA,...).

De manera general, los métodos de detección fenotípica se pueden clasificar en 2 categorías: A) aquéllos que detectan la actividad AmpC sobre extractos enzimáticos y B) aquéllos que evalúan los efectos producidos por los inhibidores de AmpC, como son cloxacilina, ácido borónico y sus derivados y otros inhibidores con estructura β -lactámica.

A. Los métodos más utilizados que detectan la **actividad AmpC sobre extractos enzimáticos** son dos:

A.1. Test AmpC⁶¹ documentado por diversos autores como un test enzimático de gran utilidad, está basado en el uso de Tris-EDTA para permeabilizar la pared celular de la bacteria y liberar así la β -lactamasa al medio. Los discos de AmpC son preparados en el laboratorio utilizando discos de papel conteniendo 20 μ l de Tris-EDTA/solución salina en proporción 1:1. Colonias de la bacteria a estudiar son aplicadas sobre estos discos (previamente rehidratados), que se colocan de forma invertida sobre una placa de Müller-Hinton, que se ha inoculado antes con una cepa sensible a cefoxitina (*E. coli* ATCC 25922), y situando el disco inoculado adyacente a un disco de cefoxitina 30 μ g. Después de la incubación a 35°C, la aparición de una distorsión del halo de inhibición de cefoxitina se considerará como indicativo de inactivación enzimática de la cefoxitina, es decir, presencia de la enzima AmpC. Se

han encontrado resultados falsos positivos con este test en aislamientos que producen carbapenemasas tipo KPC-2⁶¹.

A.2. Test tridimensional (3D)²³, es una adaptación del test modificado de Hodge, recomendado por primera vez por el CLSI en el año 2009 como test fenotípico de confirmación de presencia de carbapenemasas. Se coloca en una placa de Müller-Hinton agar inoculada con la cepa ATCC 25922 un disco de cefoxitina 30 μ g. Se realiza un corte con bisturí sobre el agar de manera que se haga una rendija de unos 5 mm desde el borde del antibiótico hacia el exterior en dirección radial. Se depositan 30 μ l de la suspensión bacteriana con pipeta en la rendija. Se incuba 24h a 35°C. Con este método podría perderse la detección de algunas enzimas tipo CMY-2 y DHA-1⁶². Nasim et al. estudiaron el uso del medio de agar cefoxitina con una concentración de 4 mg/L como test fenotípico para detección de AmpC. La metodología y resultados fueron similares a los obtenidos con el test tridimensional⁶³.

B. Diversas moléculas han sido estudiadas como **inhibidores de β -lactamasas de clase C**. Básicamente, hay moléculas con estructura β -lactámica, como **cloxacilina** y Ln-2-128, Ro 48-1220 o Syn 2190 (no disponibles de forma comercial)^{57,64,65}, y moléculas con estructura no β -lactámica como los derivados del **ácido borónico**. La cloxacilina y el ácido borónico, y sus derivados, son los inhibidores de AmpC más utilizados.

B.1. Los métodos fenotípicos que utilizan **cloxacilina** como inhibidor de AmpC se basan en: a) métodos de sinergia de doble disco usando discos de cloxacilina 500 μ g y discos de cefotaxima o ceftazidima evaluando la distorsión de la zona de inhibición entre los discos; b) métodos de discos combinados con inhibidores⁶⁶; c) método de E-test con una tira que contiene cefotetán/cefotetán más cloxacilina, considerando el test positivo con una reducción de al menos tres diluciones de la MIC en presencia de cloxacilina⁷.

B.2. La detección de AmpC también puede llevarse a cabo mediante estos dos métodos utilizando **ácido borónico** y sus derivados. Se han probado diversos derivados del ácido borónico, siendo el más descrito en la literatura el que utiliza discos de cefoxitina y cefotetán (30 μ g) solos y suplementados con 20 μ l de una solución de ácido fenil-borónico (400 μ g), valorando la ampliación del halo en, al menos, 5 mm^{7,67-73}. El inconveniente del ácido borónico es que no es específico de AmpC, ya que este compuesto es conocido por inhibir también KPC, ciertas BLEEs y OXA-12^{71,72,74,75}.

La detección de AmpC en el caso de *Klebsiella* spp., *Salmonella enterica*, *Citrobacter koseri* y *Proteus mirabilis* es confirmatoria de enzima plasmídica porque estos microorganismos carecen, de forma natural, de *ampC* cromosómico.

La baja especificidad encontrada en algunos estudios para los test fenotípicos aplicados a cepas de *E. coli* podría deberse a mutaciones localizadas en la región promotor/atenuador, normalmente asociadas con hiperproducción de AmpC^{66,76}. Así, en el caso de *E. coli* y el genéticamente indistinguible género *Shigella*, que de forma natural tiene *ampC* cromosómico,

aunque lo expresa constitutivamente a muy bajo nivel, también serían válidos los test fenotípicos descritos. Si bien, cuando el gen *ampC* se expresa de forma constitutiva pero a niveles muy superiores a los basales por sobreexpresión de *bla*_{AmpC} mediada por mutaciones en el promotor y/o atenuador de *bla*_{AmpC} o por la adquisición de promotores fuertes para la expresión de *bla*_{AmpC} que hacen producir cantidades elevadas de AmpC (hiperproducción de AmpC), ningún test de los descritos servirían para detectar ni diferenciar en *E. coli* una AmpC plasmídica de la hiperproducción de la AmpC cromosómica. En el caso concreto de *E. coli*, el método de inducción de AmpC podría resultar útil para la detección de la adquisición de una AmpC plasmídica inducible; específicamente, DHA-1,-2, CMY-13, CFE-1 y ACT-1 están ligadas al gen *ampR* y son inducibles^{7,55}. El método de sinergia de doble disco utilizando cefoxitina en el centro entre ceftazidima y cefotaxima produciría sinergia sólo en el caso de ACC-1 y veríamos el aplanamiento provocado por enzimas AmpC plasmídicas inducibles, como, por ejemplo, DHA-1⁵⁵. Otro potente inductor que podría utilizarse sería el imipenem. El resto de pAmpC descritas, que se expresan constitutivamente, no podrían diferenciarse de las cepas hiperproductoras de AmpC cromosómica¹⁷. Mirelis et al. han propuesto, para poder diferenciar las AmpC plasmídicas de las cromosómicas, un método visual basado en la presencia de colonias dispersas localizadas en la proximidad del borde de los halos de inhibición de los discos de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, que solamente surgirían en cepas productoras de enzimas plasmídicas⁶⁶.

La detección de AmpC plasmídicas en el caso de bacterias que además producen AmpC cromosómica, como *E. cloacae*, *M. morgani*, *H. alvei*, *C. freundii*, *A. caviae* o *A. hydrophila* es más difícil. En estas especies, el gen *bla*_{AmpC} se expresa de forma inducible, y su expresión puede estar desreprimida establemente de forma parcial o total dando lugar a la producción estable de grandes cantidades de AmpC (hiperproducción parcial o total de AmpC). En estos casos, no es posible diferenciar fenotípicamente si además la bacteria ha podido adquirir una AmpC plasmídica.

La detección de AmpC plasmídicas en el caso de bacterias en las que coexisten otros mecanismos de resistencia a β -lactámicos, como la presencia de BLEE y/o carbapenemasa es difícil, si bien se ha propuesto el uso de métodos de difusión con discos comerciales que combinan dobles moléculas para optimizar la detección simultánea de diferentes mecanismos de resistencia (ácido borónico y cloxacilina, cloxacilina + ácido clavulánico)^{55,75}.

Como limitaciones más destacables de los test fenotípicos descritos figura que no permiten distinguir entre las diferentes familias de pAmpC y tampoco son capaces de detectar ESAC, como CMY-10,-19,-37, que sólo son detectables por el momento mediante métodos moleculares⁷.

El procedimiento considerado como "gold standard" para la detección de pAmpC utiliza **métodos moleculares**, concretamente la PCR multiplex descrita por Pérez-Pérez et al. que es capaz de identificar las seis familias de genes *ampC* (CIT,

DHA, MOX, FOX, ACC, EBC) y detectar pAmpC en organismos con *ampC* cromosómico expresado a bajo nivel¹⁵. Un nuevo gen, *bla*_{CFE-1}, se ha incorporado posteriormente⁵. Brolum et al. proponen una mejora del método de Pérez-Pérez et al., diseñando una PCR en tiempo real con modificación de los primers para detectar los nuevos genotipos recientemente descritos⁷⁷. La PCR multiplex tiene la limitación de no poder realizarse en los géneros de donde provienen las AmpC plasmídicas (*E. cloacae*, *M. morgani*, *H. alvei*, *C. freundii*, *A. caviae*) por la gran homología existente con sus propias AmpC cromosómicas. También ha sido ya comercializado un ELISA que utiliza anticuerpos policlonales frente a CMY-2, la pAmpC más común y de mayor expansión⁷⁸.

Informe de los resultados

No existen criterios unificados sobre cómo informar los aislados en los que se ha detectado la producción de pAmpC, tanto si éstos carecen de *ampC* cromosómico, tal es el caso de *Klebsiella* spp., *S. enterica* y *P. mirabilis*, como si lo tienen pero expresado a bajo nivel y no inducible, como ocurre en *E. coli*. Se podrían informar los resultados de sensibilidad obtenidos *in vitro*, sin que sea necesaria la realización de una lectura interpretada de los mismos, aunque es aconsejable recomendar el uso de antimicrobianos alternativos a las cefalosporinas de tercera generación^{4,55}. En caso de que las cefamicinasas plasmídicas encontradas fueran inducibles, como DHA-1,-2, CMY-13, CFE-1 y ACT-1, sería prudente informar la posibilidad de que se produzca un fracaso terapéutico si el tratamiento se realiza con cefalosporinas de tercera generación, por la selección de mutantes AmpC establemente desreprimidos, como se recomienda en aislados clínicos de géneros portadores de AmpC cromosómica.

Alternativas terapéuticas

La presencia de pAmpC en aislados clínicos significativos reduce de manera importante las opciones terapéuticas, haciendo más difícil la elección de una terapia antibiótica eficaz. La presencia de estas enzimas confiere resistencia a penicilinas de amplio espectro, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, incluido el grupo de las cefamicinas, monobactams y combinación de betalactámicos e inhibidores de β -lactamasas^{1,7,19}. Además, los genes que codifican estas enzimas se encuentran localizados en plásmidos, en los que no es extraño que se acumulen genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos como quinolonas, cotrimoxazol o aminoglucósidos^{21,30,54,79-81}. Sin embargo, y a pesar de que cada vez son más los aislamientos productores de pAmpC detectados en enterobacterias, son escasos los estudios que evalúan el éxito o fracaso clínico del tratamiento de infecciones producidas por estas cepas^{19,80,82,83}.

Cefepima, cefalosporina de cuarta generación, es un inductor débil de las β -lactamasas AmpC debido a su rápida penetración a través de la membrana externa de las bacterias

gramnegativas y a su elevada afinidad por las PBPs esenciales. Son diversos los estudios que han demostrado su actividad *in vitro* de modo que serían más eficaces que las cefalosporinas de tercera generación, incluso cuando éstas pudiesen aparecer como sensibles en los estudios de sensibilidad^{7,19,30}. Debido a la existencia de variantes de pAmpC de espectro extendido, ESAC, el espectro típico de las enzimas AmpC puede verse ampliado, hidrolizando también a cefepima. Se ha señalado que el efecto inóculo reduce considerablemente la actividad de cefepima en cepas de *K. pneumoniae* productoras de pAmpC, lo que limitaría su indicación en infecciones graves en las que suelen alcanzarse inóculos altos, como infecciones intraabdominales, osteomielitis o neumonías⁸⁴.

Los **carbapenémicos** son antibióticos que combinan una excelente actividad intrínseca con una gran estabilidad a la mayoría de β -lactamasas. Teniendo en cuenta la gran actividad mostrada por los carbapenémicos frente a aislados productores de pAmpC se consideran fármacos de primera línea en el tratamiento de infecciones producidas por estos microorganismos, excepto en las producidas por cepas portadoras de la variante *bla*_{CMY-10}, que se caracteriza por hidrolizar los carbapenémicos^{1,7,85,86}. Sin embargo, alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa pueden modificar considerablemente el perfil típico de sensibilidad conferido por pAmpC y ser responsables de la aparición de resistencia a carbapenémicos en estos aislados^{58, 59}. Son varios los estudios que han descrito resistencia a carbapenémicos debida a la modificación de la permeabilidad de las proteínas de membrana en aislados productores de *bla*_{ACT-1, CMY-4, CMY-2, DHA-1}^{37,87-91}. Hernández et al. observaron cómo los aislados con pAmpC que expresaban porinas eran sensibles a imipenem, ertapenem y cefepima (100% de sensibilidad) mientras que la sensibilidad disminuía al 89, 50 y 55%, respectivamente, en cepas deficientes en porinas que no expresaban OmpK35 ni OmpK36⁸⁵. Kaczmarek et al. describieron un aislado de *K. pneumoniae* resistente a imipenem y a meropenem debido a la presencia de la variante ACT-1 en combinación con pérdida de porinas debida a inserciones en los genes *OmpK35* y *OmpK36*, que producirían su inactivación⁹². En el caso de los carbapenémicos, existe controversia entre los autores sobre si el efecto inóculo afecta por igual a todos los antibióticos de este grupo. Hernández et al. documentaron un aumento de la resistencia a imipenem y a ertapenem con inóculo elevado, afectando al imipenem en mayor grado que al ertapenem. Sin embargo en el estudio de Kang et al., el efecto inóculo no fue tan evidente con el imipenem^{45,85}.

En otros países ha sido estudiada y evaluada la **temocilina**, derivado α -metoxi de la ticarcilina no comercializado en España, considerándola como una opción terapéutica para el tratamiento de ITU complicadas y de otras infecciones producidas por bacterias portadoras de AmpC^{93,94}.

Como ya se ha comentado, el efecto inóculo y las alteraciones de las porinas son factores que limitan considerablemente el uso de β -lactámicos activos en infecciones por bacterias productoras de pAmpC, sin olvidar la alta prevalencia de co-resistencia a otros antimicrobianos que lleva a considerarlos como microorganismos multiresistentes que pueden precisar tratamientos alternativos a los convencionales.

En los últimos años han sido muy pocos los antimicrobianos nuevos activos frente a gran negativos introducidos en la práctica clínica. Uno de los recientemente incorporados es **tigeciclina**. Su espectro de actividad incluye a las enterobacterias productoras de algunas de las β -lactamasas más potentes como BLEE, cefalosporinas derivadas de *ampC* y carbapenemasas. En el estudio llevado a cabo por Hope et al., la tigeciclina fue activa frente al 99% de *E. coli* hiperproductores de AmpC, por lo que podría considerarse como una potencial alternativa terapéutica a los carbapenémicos⁹⁵.

En el estudio de Conejo et al., la tigeciclina mostró un 100% de actividad frente a cepas productoras de pAmpC, independientemente de la alteración de porinas⁶⁰. La tigeciclina tiene un volumen de distribución elevado y, principalmente, excreción biliar, lo que limitaría su indicación en infecciones urinarias debido a la baja concentración de fármaco alcanzado⁷⁹, este inconveniente es relevante porque muchos de los aislados proceden de pacientes con infecciones del tracto urinario^{1,21}. Como es sabido, quedarían excluidas de su espectro de actividad las cepas de *Proteus*, *Morganella* o *Providencia* productoras o no de pAmpC.

Numerosos estudios han señalado a **colimicina** como opción terapéutica para el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes, incluyendo neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, con unos rangos de respuesta que variaban desde el 58 al 78%⁹⁶⁻⁹⁸. Actualmente la resistencia a colimicina es rara, existiendo casos aislados descritos en la literatura asociados a alteraciones de la membrana bacteriana^{99,100}. No obstante, el estrecho margen terapéutico de este fármaco limita de modo notable su utilización clínica.

Debido a la importante frecuencia con que las enterobacterias productoras de pAmpC se han aislado de muestras clínicas de orina, cabe mencionar algunos antibióticos que se utilizan preferentemente en infecciones del tracto urinario. La **fosfomicina**, podría ser eficaz en el tratamiento de infecciones por enterobacterias productoras de pAmpC y se ha documentado una actividad superior al 90% sobre microorganismos multirresistentes¹⁰¹. Falagas et al. proponen a fosfomicina como alternativa terapéutica en infecciones urinarias no complicadas de la comunidad producidas por enterobacterias multirresistentes, concretamente por *E. coli*¹⁰². En infecciones graves de otras localizaciones, la utilidad de fosfomicina en monoterapia es más problemático, siendo más aconsejable su uso en terapia combinada.

Las **fluoroquinolonas** podrían ser tratamiento de elección en infecciones complicadas del tracto urinario en las cepas sensibles. Sin embargo, la coexistencia en elementos móviles de genes de resistencia a quinolonas (*qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*) con *bla*_{AmpC} podría limitar el uso de quinolonas en el futuro¹⁰³.

Conclusiones

La presencia de pAmpC está adquiriendo cada vez mayor relevancia clínica y, más aún, cuando se asocia a otros mecanismos

de resistencia. Se han descrito diversos métodos de detección fenotípica basados en la actividad AmpC sobre extractos enzimáticos o los basados en efectos producidos por los inhibidores como cloxacilina y ácido bórico. Estos test tienen una alta sensibilidad pero baja especificidad que, junto a la falta de métodos estandarizados por organismos oficiales, hacen que la prevalencia real de pAmpC sea mal conocida. Existen pocos estudios en lo que se refiere a epidemiología de pAmpC en España y los datos disponibles reflejan una prevalencia entorno al 0,6. Debido a su espectro de hidrólisis, las opciones terapéuticas son limitadas, siendo carbapenémicos y cefepima tratamientos de elección en infecciones por bacterias productoras de pAmpC, aunque su sensibilidad puede verse afectada en algunos microorganismos debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana o por el efecto inóculo. Sin duda, estamos ante un mecanismo emergente de resistencia que obligará a diseñar estudios de sensibilidad *in vitro* y de eficacia terapéutica que ayuden a perfilar mejor la indicación de antimicrobianos potencialmente útiles frente a cepas productoras de pAmpC y, muy especialmente, para aquéllas que expresan mecanismos de resistencia adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
2. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
3. Mammeri H, Eb F, Berkani A, Nordmann P. Molecular characterization of AmpC producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 498-503.
4. Navarro F, Miro E, Mirelis B. Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28: 638-45.
5. Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, et al. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1151-8.
6. Yu W, Bing L, Zhenhua L. AmpC promoter and attenuator mutations affect function of three *Escherichia coli* strains. *Curr Microbiol* 2009; 59: 244-7.
7. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 161-82.
8. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 371-9.
9. Jaurin B, Grundstrom T, Normark S. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO J* 1982; 1: 875-81.
10. Olsson O, Bergstrom S, Lindberg FP, Normark S. *ampC* beta-lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 7556-60.
11. Bobrowski MM, Matthew M, Barth PT, Datta N, Grinter NJ, Jacob AE, et al. Plasmid-determined beta-lactamase indistinguishable from the chromosomal beta-lactamase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1976; 125: 149-57.

12. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17: 316-21.
13. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2200-9.
14. Luzzaro F, Brigante G, D'Andrea MM, Pini B, Giani T, Mantengoli E, et al. Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 328-33.
15. Perez-Perez 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.
16. Haldorsen B, Aasnaes B, Dahl KH, Hanssen AM, Simonsen GS, Walsh TR, et al. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISE-cp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 694-702.
17. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrowka A, Fiett J, Sadowy E, et al. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2449-54.
18. Hopkins KL, Batchelor MJ, Liebana E, Deheer-Graham AP, Threlfall EJ. Characterisation of CTX-M and AmpC genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 180-92.
19. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3720-8.
20. Hanson ND, Moland ES, Hong SG, Propst K, Novak DJ, Cavalieri SJ. Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3814-6.
21. Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 443-8.
22. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 772-7.
23. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1791-6.
24. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence of plasmidic AmpC type beta-lactamase-mediated resistance in *Escherichia coli*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2004). *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 578-81.
25. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 533-7.
26. Folster JP, Pecic G, Bolcen S, Theobald L, Hise K, Carattoli A, et al. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans in the United States. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 181-7.
27. Mulvey MR, Bryce E, Boyd DA, Ofner-Agostini M, Land AM, Simor AE, et al. Molecular characterization of ceftaxime-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 358-65.
28. Baudry PJ, Mataseje L, Zhanel GG, Hoban DJ, Mulvey MR. Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC beta-lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 379-83.
29. Mataseje LF, Neumann N, Crago B, Baudry P, Zhanel GG, Louie M, et al. Characterization of ceftaxime-resistant *Escherichia coli* isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3126-30.
30. Simner PJ, Zhanel GG, Pitout J, Taylor F, McCracken M, Mulvey MR, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 326-34.
31. Rapoport M, Monzani V, Pasteran F, Morvay L, Faccone D, Petroni A, et al. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 385-7.
32. Jure MA, Presti C, Cudmani NM, Grellet LM, Lopez C, Musa EH, et al. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC betalactamases emerging in Tucuman, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43: 24-7.
33. Singtohin S, Chanawong A, Lulitanond A, Sribenjalux P, Auncharoen A, Kaewkes W, et al. CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 271-7.
34. Yum JH, Kim S, Lee H, Yong D, Lee K, Cho SN, et al. Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2- and DHA-1-type AmpC beta-lactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 961-5.
35. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Shyr JM, Wan JH, et al. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1861-4.
36. Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeong SH, Park MJ, et al. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 219-24.
37. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 915-21.

38. Lee K, Lee M, Shin JH, Lee MH, Kang SH, Park AJ, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Microb Drug Resist* 2006; 12: 44-9.
39. Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3267-73.
40. Yoo JS, Byeon J, Yang J, Yoo JI, Chung GT, Lee YS. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from long-term care facilities in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 261-5.
41. Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, Hill RL, Hopkins KL, Kaufmann ME, et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 102-5.
42. Roche C, Boo TW, Walsh F, Crowley B. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 616-8.
43. Corvec S, Cremet L, Leprince C, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic beta-lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 277-81.
44. Jorgensen RL, Nielsen JB, Friis-Moller A, Fjeldsoe-Nielsen H, Schonning K. Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* expressing an AmpC phenotype. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 460-4.
45. Adler H, Fenner L, Walter P, Hohler D, Schultheiss E, Oezcan S, et al. Plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 457-8.
46. Husickova V, Chroma M, Kolar M, Hricova K, Stosova T, Kantor L, et al. Analysis of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* at the Department of Neonatology, University Hospital Olomouc. *Curr Microbiol* 2011; 62: 1664-70.
47. Bou G, Oliver A, Ojeda M, Monzon C, Martinez-Beltran J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2549-53.
48. Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 383-9.
49. Mata C, Miro 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* 2010; 16: 472-6.
50. González-Sanz R, Herrera-Leon S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1181-6.
51. Miró E, Agüero J, Bartolomé R, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al. Estudio de la prevalencia de betalactamasas AmpC plasmídicas y carbapenemasas en enterobacterias en España. En: XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); Barcelona; Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2010. Abstract 706.
52. Gude M, Seral C, Arias A, Cebollada R, González M, Salvo S, et al. Prevalencia de AmpC plasmídicas en enterobacterias de origen clínico. En: XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 19-22 Mayo 2010; Barcelona; Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2010. Abstract 508.
53. Oteo J, Cercenado E, Cuevas O, Bautista V, Delgado-Iribarren A, Orden B, et al. AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 270-276.
54. Naseer U, Haldorsen B, Simonsen GS, Sundsfjord A. Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect* 2009; 16: 171-8.
55. Navarro F, Calvo J, Canton R, Fernandez-Cuenca F, Mirelis B. Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 524-534.
56. Robin F, Delmas J, Archambaud M, Schweitzer C, Chanal C, Bonnet R. CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2403-8.
57. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 191-7.
58. Martínez-Martínez L, Conejo MC, Pascual A, Hernández-Alles S, Ballesta S, Ramírez De Arellano-Ramos E, et al. Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2534-6.
59. Martínez-Martínez L, Hernández-Alles S, Alberti S, Tomas 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.
60. Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A. Detection and reporting beta-lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62: 317-25.
61. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3110-3.
62. Lee K, Hong SG, Park YJ, Lee HS, Song W, Jeong J, et al. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 319-323.
63. Nasim K, Elsayed S, Pitout JD, Conly J, Church DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases

- in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4799-802.
64. Buynak JD, Vogeti L, Doppalapudi VR, Solomon GM, Chen H. Cephalosporin-derived inhibitors of beta-lactamase. Part 4: The C3 substituent. Bioorg Med Chem Lett 2002; 12: 1663-6.
65. Richter HG, Angehrn P, Hubschwerlen C, Kania M, Page MG, Specklin JL, et al. Design, synthesis, and evaluation of 2 beta-alkenyl penam sulfone acids as inhibitors of beta- lactamases. J Med Chem 1996; 39: 3712-22.
66. Mirelis B, Rivera A, Miro E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24: 370-2.
67. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4163-7.
68. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S, Endimiani A, et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol 2009; 47: 294-9.
69. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2005; 43: 2551-8.
70. Jeong SH, Song W, Park MJ, Kim JS, Kim HS, Bae IK, et al. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC beta-lactamases. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 467-71.
71. Pitout JD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta- lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 165-70.
72. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2009; 47: 362-7.
73. Upadhyay S, Sen MR, Bhattacharjee A. Diagnostic utility of Boronic acid inhibition with different cephalosporins against *Escherichia coli* producing AmpC beta-lactamases. J Med Microbiol 2011; 87: 116-8.
74. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1319-21.
75. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect 2010; 17: 552-6.
76. Lee W, Jung B, Hong SG, Song W, Jeong SH, Lee K, et al. Comparison of 3 phenotypic- detection methods for identifying plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* strains. Korean J Lab Med 2009; 29: 448-54.
77. Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfstrom L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Methods 2010; 82: 229-33.
78. Hujer AM, Page MG, Helfand MS, Yeiser B, Bonomo RA. Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detecting and quantifying CMY-2 and SHV beta-lactamases. J Clin Microbiol 2002; 40: 1947-57.
79. Pallett A, Hand K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 2010; 65 Suppl 3: iii25-33.
80. Sidjabat HE, Paterson DL, Qureshi ZA, Adams-Haduch JM, O'Keefe A, Pascual A, et al. Clinical features and molecular epidemiology of CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Clin Infect Dis 2009; 48: 739-44.
81. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS. Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. J Clin Microbiol 2006; 44: 3318-24.
82. Park YS, Yoo S, Seo MR, Kim JY, Cho YK, Pai H. Risk factors and clinical features of infections caused by plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agents 2009; 34: 38-43.
83. Ofner-Agostini M, Simor A, Mulvey M, McGeer A, Hirji Z, McCracken M, et al. Risk factors for and outcomes associated with clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species resistant to extended-spectrum cephalosporins among patients admitted to Canadian hospitals. Can J Infect Dis Med Microbiol 2009; 20: e43-8.
84. Kang CI, Pai H, Kim SH, Kim HB, Kim EC, Oh MD, et al. Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type beta- lactamase. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 1130-3.
85. Hernández JR, Conejo Mdel C, Pascual A. Comparative activity of ertapenem against extended-spectrum beta-lactamase-producing or plasmid-mediated AmpC beta-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28: 27-30.
86. Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended- spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53: 257-64.
87. Cao VT, Arlet G, Ericsson BM, Tammelin A, Courvalin P, Lambert T. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 895-900.
88. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 563-9.
89. Stapleton PD, Shannon KP, French GL. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1206-10.

90. Lee K, Yong D, Choi YS, Yum JH, Kim JM, Woodford N, et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamasas co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 201-6.
91. Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1196-202.
92. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoe. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3396-406.
93. Livermore DM, Hope R, Fagan EJ, Warner M, Woodford N, Potz N. Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from south-east England. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1012-4.
94. Glupczynski Y, Huang TD, Berhin C, Claeys G, Delmee M, Ide L, et al. In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamasas producing *Enterobacteriaceae* from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 777-83.
95. Hope R, Warner M, Potz NA, Fagan EJ, James D, Livermore DM. Activity of tigecycline against ESBL-producing and AmpC-hyperproducing *Enterobacteriaceae* from south-east England. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1312-4.
96. Markou N, Apostolakis H, Koumoudiou C, Athanasiou M, Koutsoukou A, Alamanos I, et al. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care* 2003; 7: R78-83.
97. Kallel H, Hergafi L, Bahloul M, Hakim A, Dammak H, Chelly H, et al. Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1162-7.
98. Kallel H, Bahloul M, Hergafi L, Akrouf M, Ketata W, Chelly H, et al. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 366-9.
99. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 786-90.
100. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 535-543.
101. Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Dama-la M, Falagas ME. Intravenous fosfomicin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 184-6.
102. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 43-50.
103. Han C, Yang Y, Wang M, Wang A, Lu Q, Xu X, et al. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among clinical isolates of ESBL or AmpC-producing *Escherichia coli* from Chinese pediatric patients. *Microbiol Immunol* 2010; 54: 123-8.