

Mercedes Treviño,  
Daniel Navarro,  
Gema Barbeito,  
Paloma Areses,  
Carlos García-Riestra,  
Benito J. Regueiro

## *Proteus mirabilis* productor de AmpC plasmídica en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela: prevalencia y caracterización molecular por rep-PCR y MALDI-TOF MS

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

---

### RESUMEN

**Introducción:** *Proteus mirabilis* es un patógeno de importancia creciente tanto en las infecciones nosocomiales como en las comunitarias. La producción de AmpC plasmídica es un mecanismo de resistencia frente a cefalosporinas de espectro extendido emergente en esta bacteria por lo que se consideró de gran interés estudiar su prevalencia en nuestro Área Sanitaria así como su variabilidad genética, comparando dos métodos recientemente incorporados al mercado: MALDI-TOF y rep-PCR automatizada.

**Métodos:** Entre enero de 2006 y agosto de 2009 se recuperaron 1.396 aislamientos de *P. mirabilis* a partir de los cultivos de rutina realizados en Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. La identificación y el antibiograma se hicieron por Vitek 2. Aquellos aislamientos con sensibilidad reducida a amoxicilina-clavulánico y a cefoxitina, cefotaxima o ceftazidima fueron seleccionados para la detección fenotípica y genotípica de AmpC plasmídica mediante sinergia con doble disco y PCR múltiple, respectivamente. La tipificación molecular se llevó a cabo, comparativamente, mediante rep-PCR automatizada y MALDI-TOF.

**Resultados:** A lo largo de tres años y ocho meses, la prevalencia de *P. mirabilis* productor de AmpC pasó del 0,17% al 4,5%, mayoritariamente asociado a infección urinaria en pacientes ancianos no hospitalizados. En todos los casos, AmpC plasmídica perteneció a la familia LAT/CMY. Se observó una gran variabilidad genética entre los aislamientos tanto por rep-PCR (DiversiLab) como por MALDI-TOF MS.

**Conclusión:** *P. mirabilis* productor de AmpC adquirida es un patógeno emergente. La variabilidad genética de las cepas estudiadas apunta a una dispersión de este mecanismo de resistencia más que a una diseminación clonal. Rep-PCR automatizada y MALDI-TOF se muestran como métodos rápidos y

resolutivos para la tipificación molecular en los laboratorios de microbiología clínica.

**Palabras clave:** *Proteus*, AMPc, MALDI-TOF, DiversiLab

### Plasmid-mediated AMPc producing *Proteus mirabilis* in the Health Care Area of Santiago de Compostela: molecular and epidemiological analysis by rep-PCR and MALDI-TOF

#### ABSTRACT

**Introduction:** *Proteus mirabilis* is an important pathogen isolated from both community-acquired and health-care associated infections. Acquired AmpC-type beta-lactamases represent an important mechanism of resistance to extended-spectrum cephalosporins and are emerging in several European countries. The objective of this work was to know the prevalence of acquired AmpC beta-lactamase producing *P. mirabilis* over the last three years and eight months and their clonal relationships comparing MALDI-TOF and automated rep-PCR results.

**Methods:** *P. mirabilis* isolates (n= 1,396) were obtained from routine cultures at the University Hospital Complex of Santiago de Compostela from January 2006 to August 2009. Identification to the species level and antimicrobial susceptibility testing were achieved with Vitek 2. The isolates showing intermediate or total resistance to amoxicillin-clavulanic and cefoxitin, cefotaxime or ceftazidime were selected for AmpC phenotypic detection by double-disk synergy test, and molecular confirmation by multiplex PCR. Molecular typing of the isolates was performed by automated rep-PCR and MALDI-TOF.

**Results:** For the last three years and eight months, the prevalence of AmpC-producing *P. mirabilis* increased from 0.17% to 4.5%, mainly associated with urinary tract infection in elderly outpatients. In all cases, plasmidic AmpC belonging to LAT/CMY lineage were detected. A high genetic variability was seen with both, rep-PCR and MALDI-TOF MS.

**Conclusions:** AmpC-producing *P. mirabilis* is an emergent pathogen. The high genetic variability detected suggests

---

Correspondencia:  
Mercedes Treviño Castellano  
Servicio de Microbiología.  
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.  
E-mail: María.Mercedes.Treviño.Castellano@sergas.es

that the spread of the resistance mechanism is more probable than a clone dispersion. Automated rep-PCR and MALDI-TOF MS show as fast and decisive methods for bacterial strain typing in clinical microbiology laboratories.

**Key words:** *Proteus*, AMPc, MALDI-TOF, DiversiLab

## INTRODUCCIÓN

*Proteus mirabilis* es un patógeno frecuente asociado a infecciones tanto en la comunidad como en instituciones sanitarias<sup>1-3</sup>. Las cepas salvajes de esta bacteria son sensibles a  $\beta$ -lactámicos debido a que no expresan la cefalosporinasa cromosómica AmpC<sup>4</sup>. Sin embargo, la producción de beta-lactamasas plasmídicas de tipo AmpC en *Proteus mirabilis* es un mecanismo de resistencia frente a cefalosporinas de espectro ampliado emergente en España y otros países europeos<sup>5-7</sup> derivadas, mayoritariamente del grupo CMY/LAT<sup>8</sup>. Las enterobacterias portadoras de AmpC plasmídica son, habitualmente, multirresistentes lo cual restringe considerablemente las opciones terapéuticas<sup>9,10</sup>.

Debido a la creciente importancia clínica de este patógeno, el uso de métodos de tipificación molecular eficientes es de gran interés desde el punto de vista de la vigilancia y control epidemiológico. La implementación de este tipo de estudios en un laboratorio de microbiología clínica convencional es ahora más fácil gracias al desarrollo de nuevas técnicas rápidas, sencillas y poco laboriosas tal como rep-PCR automatizada (Sistema DiversiLab) y MALDI-TOF MS. La utilidad epidemiológica de estas técnicas ha sido objeto de estudio en los últimos años<sup>11-14</sup>.

En este contexto se ha planteado el presente trabajo en el que, en primer lugar, se ha estudiado la evolución de la prevalencia de *P. mirabilis* productor de AmpC plasmídica en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela a lo largo de tres años y ocho meses (enero de 2006 a agosto de 2009) y, en segundo lugar, se ha realizado la tipificación molecular de estos aislamientos mediante dos técnicas moleculares de reciente incorporación al mercado y de fácil implementación en el laboratorio de microbiología: rep-PCR automatizada y MALDI-TOF MS.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Periodo de estudio y aislamientos bacterianos.** Durante tres años y ocho meses (enero 2006 a agosto 2009), en el Servicio de Microbiología del Complejo Universitario de Santiago de Compostela se recuperaron un total de 1396 aislamientos de *P. mirabilis* a partir de muestras clínicas de pacientes, tanto ingresados como ambulatorios, procedentes de todo el Área Sanitaria.

**Estudio fenotípico.** La identificación a nivel de especie y el antibiograma se realizaron con el Sistema Vitek 2 (BioMérieux, Francia). La interpretación de este último se basó en los criterios propuestos por el CLSI<sup>15</sup>. Aquellos aislamientos con sensibilidad disminuida a amoxicilina-clavulánico y cefoxitina y/o cefotaxima y/o ceftazidima fueron seleccionados para

el estudio fenotípico y molecular de la presencia de AmpC. La detección fenotípica se llevó a cabo mediante el método de sinergia por aproximación de discos utilizando ácido borónico, cloxacilina, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima de acuerdo con protocolos desarrollados previamente<sup>16,17</sup>.

**Detección molecular de AmpC.** Se utilizó una PCR múltiple para confirmar molecularmente la presencia de genes ampC siguiendo el protocolo desarrollado por FJ Pérez-Pérez y ND Hanson<sup>18</sup>. En los casos en los que no se obtuvo amplificación en la PCR múltiple pero la prueba fenotípica fue positiva, se utilizó Check-MDR (Check-points, Holanda) para la detección específica de genes de ESBL, AmpC, KPC y NDM-1 basada en tecnología de "microarrays" que utiliza como marcadores diferentes polimorfismos puntuales (SNP's) específicos de cada familia de enzimas. Como controles positivos se utilizaron cepas previamente caracterizadas (*Klebsiella pneumoniae* productor de FOX-5, *Escherichia coli* hiperproductor de AmpC y *E. coli* productor de CMY-2).

**Tipificación molecular de los aislamientos.** La caracterización mediante rep-PCR se llevó a cabo mediante el Sistema DiversiLab (BioMérieux, Francia) basado en la amplificación de elementos repetitivos no codificadores intergénicos presentes en el cromosoma bacteriano. Las condiciones del ensayo fueron las propuestas por el fabricante. Se usó el coeficiente de Pearson para generar la matriz de distancias y el algoritmo matemático UPGMA para crear los dendrogramas. Las relaciones clonales se establecieron de la siguiente manera: indistinguible si la similitud es superior al 97% y no hay diferencias en el patrón de bandas, similares si la similitud es superior al 95% y sólo hay 1-2 bandas diferentes y, distintas, si la similitud es inferior al 95% y hay 3 ó más bandas distintas<sup>12</sup>.

Los espectros de masa para cada aislamiento se obtuvieron mediante MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry) utilizando el espectrómetro MS AXIMA (Shimadzu, Japón) acoplado a la base de datos SARAMIS (BioMérieux, France). Los espectros se obtuvieron a partir de colonias crecidas en agar sangre en las condiciones descritas por otros autores<sup>14</sup> utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) como matriz (BioMérieux, France). Se calibró con la cepa de referencia *E. coli* CCGU10979 proporcionada por el fabricante. La comparación de los espectros de las distintas bacterias fue analizada por el algoritmo SARAMIS<sup>TM</sup>. Se compararon los agrupamientos obtenidos por MALDI-TOF MS y DiversiLab.

## RESULTADOS

**Prevalencia de *P. mirabilis* productor de beta-lactamasas plasmídicas de tipo AmpC (PMAP).** Durante los tres años y ocho meses que duró el estudio se recuperaron un total de 1396 aislamientos de *P. mirabilis* de los que 34 fueron PMAP (sólo se consideró un aislamiento por paciente). En la tabla 1 se muestra el número de aislamientos y prevalencia en cada uno de los años. Los aislamientos fueron recuperados de orina (n=17), úlceras y heridas (n=14), muestra respi-

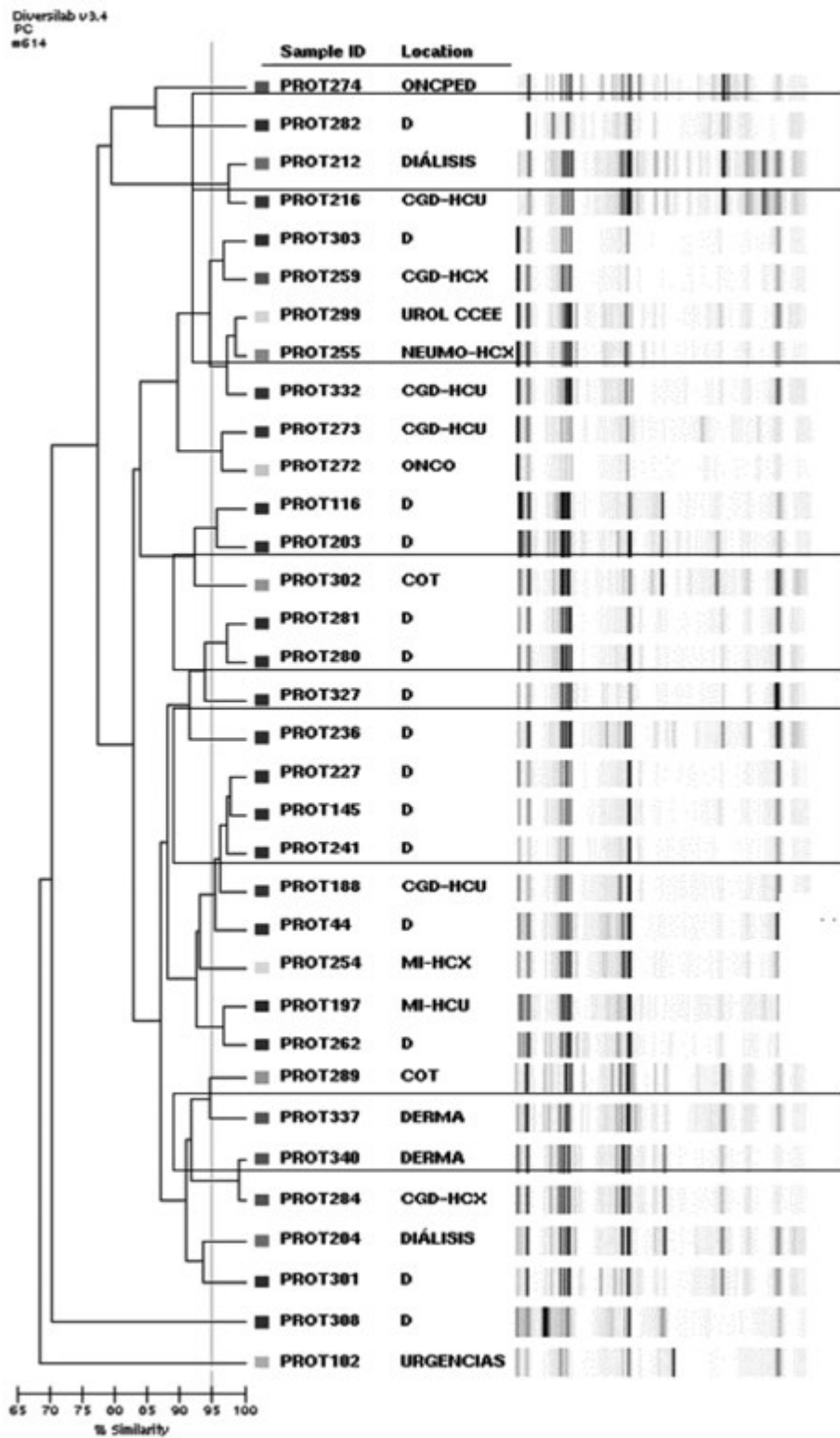
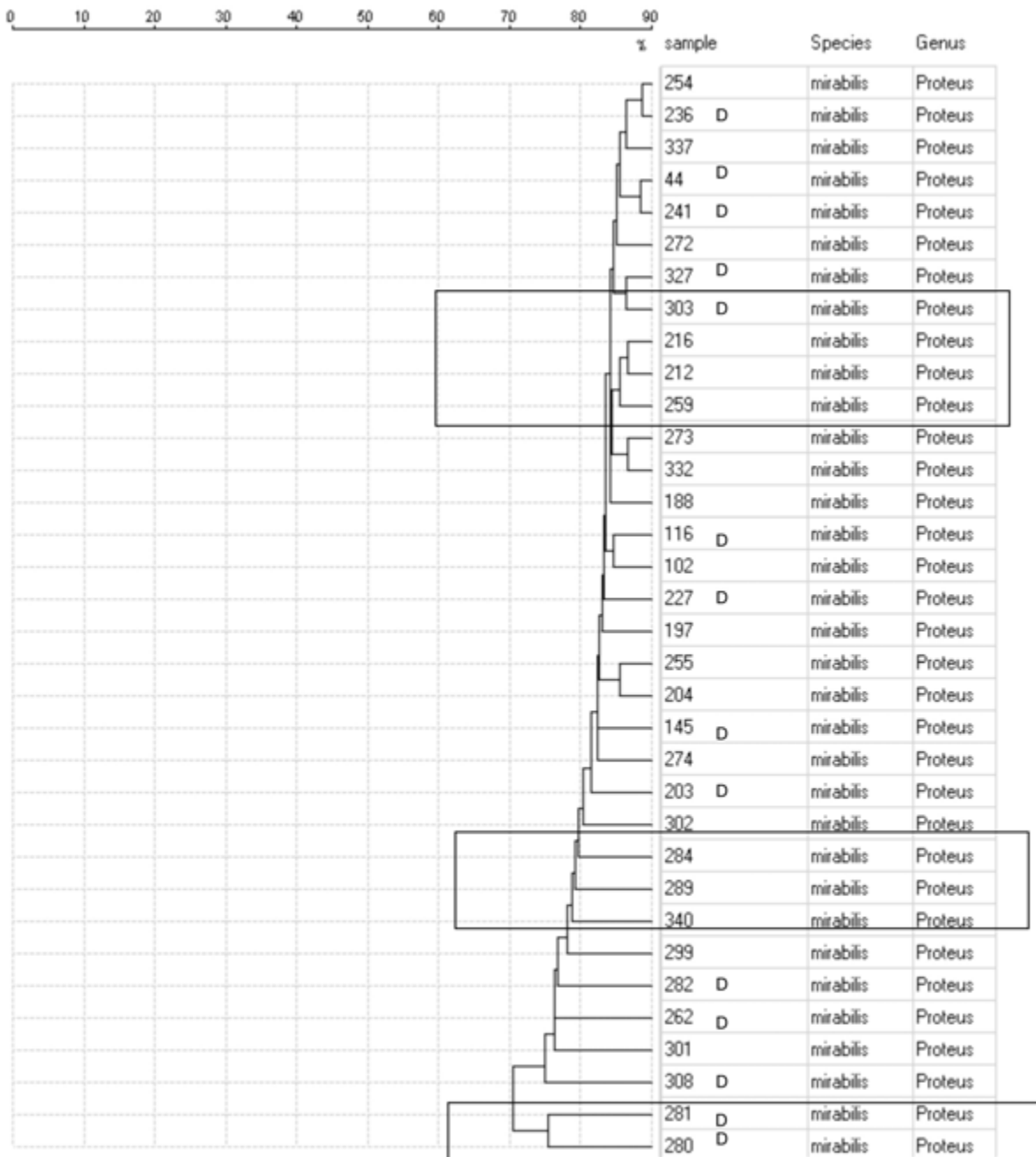


Figura 1

Dendrograma obtenido por rep-PCR semiautomatizada (sistema DiversiLab). Se recuadran los grupos de aislamientos indistinguibles/similares.



**Filter:**  
 Error (%): 0.08  
 Absolute Intensity >= 0  
 Relative Intensity >= 0  
 Massrange from 2000 to 20000  
 Select Exclusion list: Sheep blood AGAR

Figura 2

Dendrograma obtenido por comparación de los espectros generados por MALDI-TOF MS. (Los aislamientos marcados con la letra D son de pacientes no hospitalizados, los restantes son nosocomiales). Se recuadran los agrupamientos coincidentes con rep-PCR.

**Tabla 1** Prevalencia de *P. mirabilis* productor de AmpC desde enero de 2006 a agosto de 2009.

AÑO	Nº total PM	Nº PMAP	%
2006	580	1	0,17
2007	307	8	2,6
2008	310	16	5,2
2009*	199	9	4,5

PM = *P. mirabilis*, PMAP = *P. mirabilis* productor de AMPc plasmídica

\* Primeros 8 meses del año

ratoria (n=1), catéter (n=1) y sangre (n=1). El 57% del total de los pacientes afectados fueron mujeres. La edad media de los pacientes fue de 60 años (mediana 63 años). El 59% de los pacientes eran de origen comunitario. Dentro del grupo de pacientes de origen comunitario, en el 87% de los casos, el aislamiento de se PMAP se asocia a infección del tracto urinario. En dos casos se asoció a infección de piel y partes blandas. En cuanto a los aislamientos nosocomiales, la mayoría de ellos (47%) se asociaron con infección de herida quirúrgica, principalmente en relación con cirugía abdominal. El resto de los casos se asocian con infección urinaria, úlceras e infección de origen abdominal.

**Características fenotípicas.** Los porcentajes de sensibilidad frente a los antibióticos estudiados en el conjunto de los aislamientos de *P. mirabilis* no mostraron diferencias significativas entre los distintos años. En la tabla 2 se comparan estos

**Tabla 2** Porcentaje de sensibilidad *in vitro* de los aislamientos de *P. mirabilis*.

Antibiótico	% Sensibilidad	
	Global 2006 a 2009	PMAP
Amoxicilina-clavulánico	92	0
Cefoxitina	95	24*
Cefotaxima	97	3**
Ceftazidima	97	85***
Cefepima	98	94
Meropenem	100	100
Gentamicina	86	89
Amikacina	100	100
Ciprofloxacino	80	36
Cotrimoxazol	60	43

\*CMI<sub>90</sub> = 32 mg/L, \*\*CMI<sub>90</sub> = 4 mg/L, \*\*\* CMI<sub>90</sub> = 8 mg/L.

PMAP = *P. mirabilis* productor AmpC plasmídica

resultados con los correspondientes al grupo de aislamientos productores de AmpC. Se observa mayor nivel de resistencia a ciprofloxacino y cotrimoxazol en PMAP que en el conjunto de los aislamientos.

**Detección molecular de AmpC.** Tras la PCR múltiple, todos los aislamientos de PMAP excepto 2, dieron lugar a un amplificado de 462 pb correspondiente a la diana que engloba las secuencias de las familias LAT (1-4), CMY (2-7) y BIL-1 de AmpC. Los dos aislamientos negativos en la PCR múltiple fueron estudiados por Check-MDR (Check-points, Holanda) dando resultados positivos para AmpC de tipo CMY-2.

**Tipificación molecular.** El análisis de los resultados obtenidos con rep-PCR (DiversiLab) mostró gran variabilidad en los patrones de bandas. Se identificaron 5 tipos de perfiles que se repetían entre algunos aislamientos (n=16). El resto fueron diferentes (figura 1). Los aislamientos con patrones de banda indistinguibles o similares corresponden a pacientes que, mayoritariamente tienen la misma procedencia (comunidad / hospital).

La figura 2 presenta los datos del análisis basado en la comparación de los espectrogramas obtenidos por MALDI-TOF MS. Tres de los cinco grupos definidos por rep-PCR también pueden observarse en el análisis con MALDI-TOF, aunque incluyen menor número de aislamientos. También en este análisis tienden a agruparse por separado, los aislamientos de origen nosocomial y los comunitarios.

Considerando todos los aislamientos conjuntamente, la similitud entre ellos se encuentra alrededor del 70% tanto por rep-PCR como por MALDI-TOF.

## DISCUSIÓN

A los largo de los años estudiados, se observa un incremento progresivo del número de aislamientos de PMAP. Esta elevada prevalencia ha sido, también, comunicada por otros autores en España y en Europa afectando mayoritariamente, al igual que en nuestro estudio, a pacientes de edad avanzada y/o con comorbilidades<sup>5,19</sup>.

De acuerdo con los datos de sensibilidad frente a los antibióticos, el uso de penicilinas y cefalosporinas para el tratamiento de las infecciones producidas por PMAP debe excluirse. De entre las drogas efectivas "in vitro", amikacina y carbapenemas se consideran los tratamientos de elección mientras que piperacilina/tazobactam se ha mostrado inefectiva en algunos casos<sup>20</sup>. El uso de carbapenemas debería quedar reservado para el tratamiento de infecciones graves. Debemos tener presente que meropenem es la mejor elección ya que *P. mirabilis* frecuentemente presenta altos valores de CMI frente a imipenem debido a mecanismos de impermeabilidad<sup>21</sup>. Por otro lado, se ha descrito resistencia ertapenem en enterobacterias productoras de altos niveles de AmpC en asociación con pérdida de porinas<sup>22</sup> por lo que esta puede ser una opción arriesgada en pacientes graves infectados por este tipo de cepas. En el caso del tipo de infección mayoritariamente asociada a PMAP, la infección urinaria, amikacina puede ser una opción útil. La



dificultad para detectar la expresión conjunta de AmpC y beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) por métodos fenotípicos podría, en algunos casos, dar lugar a una interpretación errónea de sensibilidad a cefepima ya que el valor de CMI para este antibiótico no siempre supera el punto de corte (>8 mg/L) en las cepas productoras de BLEE. Otros antibióticos como cotrimoxazol o quinolonas, como puede observarse a la vista de nuestros resultados y los de otros estudios, suelen ser frecuentemente inactivos frente a este tipo de cepas<sup>20</sup>.

Desde un punto de vista microbiológico, es necesario establecer criterios que permitan detectar e informar la producción de AmpC. En sintonía con los resultados expuestos por otros autores<sup>20,23</sup>, la resistencia conjunta de amoxicilina-clavulánico y cefotaxima y/o cefoxitina es un indicador fiable de la presencia de AmpC plasmídica en *P. mirabilis*.

Actualmente se conocen diferentes familias de genes productores de enzimas de tipo AmpC (CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX, DHA) siendo la más frecuente en *P. mirabilis* CMY/LAT<sup>24</sup>. En nuestro caso, todos los aislamientos menos 2 amplificaron con los iniciadores específicos del grupo LAT1 a 4/CMY-2 a 7, BIL-1. Dos de los aislamientos (cepas 307 y 337) no amplificaron en la PCR múltiple, pero se demostró que eran portadoras del gen CMY-2 mediante PCR e hibridación específica. Este evento, ya constatado por otros autores<sup>23</sup> sugiere que la variabilidad genética de AmpC continúa aumentando. En nuestro caso, podría haber afectado a las zonas reconocidas por los iniciadores de la PCR.

La diseminación de este tipo de cepas con resistencia múltiple es un tema preocupante desde un punto de vista clínico, ya que restringe enormemente los antibióticos útiles obligando a tratar con antibióticos de amplio espectro cuyo uso debería reservarse lo máximo posible. Con fines de prevención y control es necesario conocer las relaciones genéticas de estos aislamientos diferenciando entre la diseminación de un clon, ya descrita por otros autores<sup>20</sup> o del mecanismo de resistencia.

La elevada presión asistencial en muchos de los laboratorios de microbiología clínica dificulta, en ocasiones, la incorporación de los estudios epidemiológicos en la rutina diaria. Por esta razón, las técnicas de tipificación molecular poco laboriosas y no excesivamente caras, pueden favorecer la realización de este tipo de estudios dentro de la actividad ordinaria del laboratorio. Rep-PCR automatizada (Sistema DiversiLab) y MALDI-TOF MS son dos tecnologías de reciente incorporación al mercado que podrían cumplir tales expectativas. Dado que analizan distintos aspectos de la bacteria (genotipo y fenotipo), consideramos que la comparación de los resultados obtenidos con ambas técnicas es una cuestión interesante.

Los resultados con rep-PCR automatizada demuestran gran variabilidad genética tanto entre las cepas nosocomiales como entre las comunitarias. Aunque el análisis por DiversiLab tiende a organizar las cepas de origen comunitario en grupos distintos a las nosocomiales, no puede decirse que se observen patrones comunitarios y nosocomiales definitorios de cada uno de estos grupos. Esta situación es razonable te-

niendo en cuenta que muchos pacientes de origen comunitario son ancianos, en muchos casos, sometidos a cuidados asociados a instituciones sanitarias y posibles ingresos hospitalarios previos.

La técnica MALDI TOF MS permite la identificación rápida de bacterias y está siendo objeto de estudio en lo que se refiere a su capacidad para discriminar entre cepas estrechamente relacionadas en *Enterobacteriaceae*<sup>13,14</sup>. Al igual que los resultados observados con rep-PCR, presenta gran diversidad entre los distintos aislamientos no pudiendo establecerse patrones diferenciales entre cepas de origen nosocomial o comunitario.

Puesto que se ha analizado un número pequeño de cepas, no podemos extraer conclusiones firmes sobre la concordancia entre rep-PCR automatizada y MALDI-TOF para la tipificación molecular de *P. mirabilis*. No obstante, ambos métodos han demostrado una sensibilidad similar a la hora de discriminar la variabilidad existente entre las cepas estudiadas.

En conclusión, *P. mirabilis* con resistencia múltiple debida a la producción de AmpC adquirida es un patógeno emergente tanto en el medio hospitalario como en la comunidad asociado, frecuentemente, a pacientes ancianos. Dada la variabilidad genética de las cepas estudiadas en este trabajo, es poco probable que la dispersión de este mecanismo de resistencia haya sido de tipo clonal. Tanto rep-PCR automatizada (sistema DiversiLab) como MALDI-TOF MS se presentan como dos alternativas muy interesantes para la tipificación molecular en los laboratorios de microbiología clínica dada su capacidad discriminativa y sus ventajas en relación con el manejo y coste.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Bret L, Chanal-Claris C, Sirot D, Chaibi EB, Labia R, Sirot J. Chromosomally encoded AmpC-type beta-lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1110-4.
3. Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G et al. *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* 2005; 49: 2598-605.
4. Park YJ, Lee S, Kim YR, Oh EJ, Woo EJ, Lee K. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Korean isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 57: 156-8.
5. Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 472-6.
6. Bidet P, Verdet C, Gautier V, Bingen E, Arlet G. First description of DHA-1 ampC beta-lactamase in *Proteus mirabilis*. *Clin Microb Infect* 2005; 11: 591-2

7. Literacka E, Empel J, Baraniak A, Sadowy E, Hrniewicz W, Gniadkowski M. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4136-43.
8. Aragón ML, Mirelis B, Miró E, Mata C, Gómez L, Rivera A, Coll P, Navarro F. Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1029-32.
9. 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.
10. Hopkins KL, Batchelor MJ, Liebana E, Deheer-Graham AP, Threlfall EJ. Characterization 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: 180-192.
11. Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, Feierl G, Leitner E, Masoud L et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J Infect* 2010; 60: 44-51.
12. Healy M, Huong L, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 199-207.
13. Siegrist TJ, Anderson PD, Huen WH, Kleinheinz GT, McDermott CM, Sandrin TR. Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J Microbiol Methods* 2007; 68: 554-62.
14. Rezzonico F, Vogel G, Duffy B, Tonolla M. Whole Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry application for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 4497-509.
15. Clinical Laboratory Standards Institute: Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement M100-S20. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA 2010.
16. 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.
17. Ruppe E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler Class C1 AmpC-lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test *J Clin Microbiol* 2006, 44: 4204-7.
18. Pérez-Pérez, ND Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 2153-62.
19. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E et al. and the Beta-PL Study Group. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2449-54.
20. Luzzaro F, Brigante G, D'Andrea MM, Pini B, Giani T, Mantegoli 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.
21. Ferrán Navarro Risueño, Elisenda Miró Cardona y Beatriz Mirelis Otero. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20:225-34.
22. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microb Rev* 2009; 22: 161-82.
23. 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.
24. D'Andrea MM, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavaca R, Vailati F et al. CMY-16, a novel acquired Ampc-type beta-lactamase of CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 618-24.