Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

81. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF)

Editores

Maria Isabel Sánchez Romero
Jordi Vila Estapé

Coordinador

Antonio Oliver Palomo

Autores

Antonio Oliver Palomo
Felipe Fernández Cuenca
María Díez Aguilar
María Eugenia Portillo Bordonabe
Luis Martínez Martínez

ISBN: 978-84-09-94136-0

EDITORES:

Maria Isabel Sánchez Romero. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Jordi Vila Estapé. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic de Barcelona, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona e Instituto de Salud Global de Barcelona. Barcelona.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Oliver Palomo A, Fernández Cuenca F, Díez Aguilar M, Portillo Bordonabe ME, Martínez Martínez L; Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF). 2026. xx. Antonio Oliver Palomo (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Sánchez-Romero MI, Vila Estapé, J (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2026.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, trasmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrase en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:
Maria Isabel Sánchez Romero
Jordi Vila Estapé

81. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF)

Coordinador:
Antonio Oliver Palomo[1]

Autores:
Antonio Oliver Palomo[1]
Felipe Fernández Cuenca[2]
María Díez Aguilar[3]
María Eugenia Portillo Bordonabe[4]
Luis Martínez Martínez[5]

[1] Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, IdISBa, CIBERINFEC, Palma; [2] Servicio de Microbiología, Hospital Virgen Macarena, Sevilla; [3]Servicio de Microbiología, Hospital La Princesa, Madrid; [4]Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Navarra IdISNa, CIBERESP; [5]Unidad de gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología, Universidad de Córdoba. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). IBIS, CIBERINFEC.

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. INTRODUCCIÓN....6
1.1. Justificación....6
1.2. Objetivo....6
1.3 Alcance....6
2. PANELES DE ANTIBIÓTICOS Y MÉTODOS DE ESTUDIO SENSIBILIDAD....7
3. PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA ESPERADA Y DEFINICIONES DE MULTIRRESISTENCIA..11
4. LECTURA INTERPRETADA DE LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN BGNNF..14
4.1 *Pseudomonas aeruginosa*....14
4.1.1.Mecanismos de resistencia intrínseca a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*....14
4.1.2.Mecanismos de resistencia a betalactámicos antipseudomónicos clásicos mediados por mutaciones cromosómicas....15
4.1.3.Mecanismos de resistencia a betalactámicos mediados por betalactamasas transferibles....16
4.1.4.Resistencia emergente a los nuevos betalactámicos mediados por mutación del centro activo de AmpC....16
4.1.5.Resistencia emergente a los nuevos betalactámicos mediados por mutación del centro activo de betalactamasas transferibles....17
4.1.6.Modificación de la diana (PBPs) como mecanismo de resistencia emergente a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*....17
4.1.7. Otros mecanismos emergentes de resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*....18
4.1.8.Ensayos complementarios para la detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*....18
4.1.9. Información de los resultados e interpretación clínica....19
4.2.A*cinetobacter baumannii*....22
4.2.1. Mecanismos de resistencia intrínseca a betalactámicos....22
4.2.2. Mecanismos de resistencia a betalactámicos mediados por betalactamasas transferibles.22
4.2.3. Mecanismos de resistencia no enzimáticos a betalactámicos....23
4.2.4.Mecanismos de resistencia a nuevos betalactámicos y combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (cefiderocol y sulbactam-durlobactam)....23
4.2.5. Métodos fenotípicos y moleculares de detección de betalactamasas....24
4.2.6. Información de resultados e interpretación clínica....24
4.3.*Stenotrophomonas maltophilia*....27
4.3.1.Estudios de sensibilidad antibiótica, información de resultados e interpretación clínica....29
4.4.*Achromobacter xylosoxidans*....29
4.4.1.Estudios de sensibilidad antibiótica, información de resultados e interpretación clínica....31
5. LECTURA INTERPRETADA FENOTIPOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS 32
5.1.Información de resultados e interpretación clínica....34

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

6. LECTURA INTERPRETADA FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS.....34
6.1.Información de resultados e interpretación clínica.....37
7. LECTURA INTERPRETADA FENOTIPOS DE RESISTENCIA A POLIMIXINAS, TETRACICLINAS, COTRIMOXAZOL Y OTROS ANTIBIÓTICOS DE INTERÉS CLÍNICO.....37
7.1.Información de resultados e interpretación clínica.....39
8. REGLAS BÁSICAS DE GESTIÓN DEL ANTIBIOGRAMA.....40
8.1.Notificación selectiva de antibióticos e informe en cascada.....40
8.2.Inclusión de antibióticos de reserva según criterios clínicos y epidemiológicos.....41
8.3.Comentarios interpretativos en el informe de sensibilidad.....41
9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....42
10. BIBLIOGRAFÍA CLAVE.....42

DOCUMENTO TÉCNICO

- PNT-1. Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa.* Algoritmo recomendado.
- PNT-2. Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *A. baumannii*. Algoritmo recomendado.
- PNT-3. Lectura interpretada de la resistencia antibiótica en *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans*. Algoritmo recomendado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN

La lectura interpretada del antibiograma (LIA) y la detección fenotípica de los mecanismos de resistencia continúan siendo herramientas de elevado valor y utilidad para la microbiología clínica. El procedimiento SEIMC nº 38, "Detección fenotípica de los mecanismos de resistencia en gramnegativos" publicado en 2011, coordinado por el Dr. Ferran Navarro, ha sido de referencia durante los últimos 15 años (1). No obstante, la introducción en la última década de múltiples nuevos antibióticos, particularmente dentro de la familia de los betalactámicos, junto con la creciente variedad y complejidad de mecanismos de resistencia emergentes, y la mayor disponibilidad y diversidad de técnicas rápidas, hacen necesaria una actualización de los procedimientos SEIMC relacionados con la LIA y la detección fenotípica de la resistencia, particularmente en bacterias gramnegativas. A través de la iniciativa de GEMARA y COESANT se propuso la realización de dos documentos, uno para Enterobacterales y el otro para bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF). Los coordinadores propuestos, Dres. Nieves Larrosa y Antonio Oliver, respectivamente, acordaron de forma conjunta el alcance, estructura y contenido de sendos procedimientos, para dotarlos de una suficiente homogeneidad. Estos procedimientos responden a la necesidad de disponer de herramientas fenotípicas rápidas y fiables para confirmar los mecanismos de resistencia inferidos y guiar el tratamiento, adaptables en función del nivel y de los recursos asistenciales. Entre los BGNNF se centra por su frecuencia, relevancia clínica e impacto de los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii, Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans*. Quedan por tanto fuera del alcance de este procedimiento otros BGNNF aislados con menor frecuencia de muestras clínicas y con menor conocimiento de fenotipos y mecanismos de resistencia, pero que también pueden tener relevancia clínica tales como *Burkholderia cepacia* complex o *Elizabethkingia* spp.

1.2. OBJETIVO

Guiar la detección fenotípica, estandarizada y práctica de los principales mecanismos de resistencia en los BGNNF de mayor relevancia clínica. Desde el punto de vista de la interpretación fenotípica de los mecanismos de resistencia, se han tenido en cuenta de forma primaria criterios microbiológicos equiparando la "S" (sensible exposición estándar) y la "I" (sensible exposición incrementada) del Comité europeo del antibiograma (European Committee on Antimicrobial Susceptibillity Testing, EUCAST) cuando aplican a poblaciones silvestres (ejm la I de betalactámicos como ceftazidima o piperacilina/tazobactam en *P. aeruginosa*) y utilizando la "r" para definir condiciones de sensibilidad disminuida respecto a las cepas con fenotipo silvestre pero por debajo de los puntos de corte de resistencia clínica (R).

1.3. ALCANCE

Estudios de sensibilidad fenotípica de los principales BGNNF clínicamente relevantes, a partir de colonia o aislados directamente del hemocultivo incluyendo el *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing* (RAST) de EUCAST.

Queda fuera, por tanto, del alcance de este procedimiento la aplicación de técnicas fenotípicas, moleculares o genómicas directamente sobre muestra clínica. Si bien la aplicación de técnicas moleculares o la secuenciación genómica sobre colonias aisladas queda fuera del alcance principal del procedimiento, sí se contextualiza su aplicación y relevancia como herramientas complementarias en la LIA.

2. PANELES DE ANTIBIÓTICOS Y MÉTODOS DE ESTUDIO SENSIBILIDAD

La mayoría de los equipos comerciales (semi)automáticos para la realización de antibiogramas determinan la CMI con una metodología basada en la microdilución convencional, aunque en algún caso, la CMI se infiere comparando las curvas de crecimiento del microorganismo estudiado en ausencia de antimicrobiano o en presencia de concentraciones predefinidas del compuesto de que se trate. La incorporación en estos equipos de programas informáticos con reglas expertas de interpretación de resultados de sensibilidad facilita la LIA y, además, la información obtenida (valores de CMI, categorías clínicas) permite la preparación de informes basados en datos acumulados de antibiograma (2,3).

Sin embargo, los diversos tipos de paneles disponibles para estos sistemas no contienen los mismos antimicrobianos ni las mismas concentraciones de los compuestos incluidos en cada caso. El número de pocillos disponibles en los paneles es limitado (habitualmente de 64 a 136) y el número de antimicrobianos de interés clínico es creciente, por lo que el rango de concentraciones del panel es, con frecuencia, limitado. Por ello, cada proveedor valora las combinaciones antimicrobianos-concentraciones que incluye en sus paneles. En ocasiones, para cubrir todas las necesidades del antibiograma requerido para algunos aislados (p. ej. en caso de bacterias multirresistentes), se debe usar más de un panel, lo que añade complejidad en el trabajo diario y encarece el proceso. Además, el estudio *in vitro* de la actividad de algunos antimicrobianos requiere condiciones metodológicas que limitan la realización del antibiograma con equipos (semi)automáticos. En el caso del cefiderocol, se requiere un medio con muy baja concentración de hierro, diferente al empleado para el resto de los compuestos del panel, en consecuencia, y por el momento, este antimicrobiano no se incluye en los paneles comerciales. En estas circunstancias, lo ideal sería realizar microdilución de referencia con el medio indicado, pero ello no es práctico en el trabajo diario, por lo que una solución alternativa es utilizar la difusión con disco y disponer al menos de la categoría clínica, y para obtener la CMI pueden usarse de forma complementaria métodos de microdilución comercial o, en algún caso, en función del microorganismo considerado, tiras de gradiente (cuya fiabilidad varía de unos a otros estudios). En el caso de la fosfomicina, el método de referencia para la determinación de la CMI no es la microdilución, sino la dilución en agar y los valores de CMI de fosfomicina obtenidos con paneles comerciales tienen una fiabilidad limitada; EUCAST no ha definido puntos de corte para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y desaconseja el estudio de la sensibilidad a este compuesto para esos dos microorganismos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el Comité Español del Antibiograma (COESANT) publicó en 2020 un documento con recomendaciones para la selección de antimicrobianos y sus concentraciones para realización de antibiograma con métodos automáticos (4). En la **Tabla 1** se hace una actualización de dicho documento en relación con BGNNF. Las categorías recogidas en la tabla se corresponden con los siguientes criterios:

A. Antimicrobianos que deben estudiarse e informarse de forma habitual.
B. Antimicrobianos que deben estudiarse de forma habitual e informarse de forma selectiva.
C. Antimicrobianos que deben estudiarse de forma selectiva e informarse en función del tipo de paciente, del tipo de infección o del mecanismo de resistencia inferido.
D. Antimicrobianos que deben estudiarse e informarse de forma habitual para aislados de muestras de orina.
E. Antimicrobianos que no deben informarse; son útiles para la detección de mecanismos de resistencia o la interpretación de reglas expertas.

Existen aproximaciones similares realizadas por otros comités. El Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (CA-SFM) establece una lista estándar y una lista complementaria de antibióticos a estudiar e informar. El CLSI establece cuatro niveles (Tier 1, antibióticos para estudiar en informar de rutina; Tier 2, antibióticos para estudiar de rutina e informar en cascada según normas de cada institución; Tier 3, igual a tier 2, pero aplicado al caso de microorganismos multirresistentes y Tier 4, antibióticos para estudiar e informar bajo petición clínica cuando los previos no sean efectivos por diferentes motivos) (5,6). Para la notificación selectiva, también sería recomendable tener en cuenta la clasificación de antibióticos AWaRe de la OMS (7).

Las concentraciones de cada compuesto indicadas en la **Tabla 1** se han seleccionado tomando como referencia los puntos de corte de EUCAST de 2026 y, cuando estos no están disponibles, valores definidos por COESANT, considerando los criterios que se indican detalladamente en Cantón y cols. (4).

El COESANT también ha publicado recomendaciones para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los antimicrobianos mediante la técnica de difusión con disco (8). Este método es más barato que la microdilución (incluyendo las variantes comerciales), con la gran ventaja de su flexibilidad; cada centro puede decidir qué antimicrobianos se estudian para cada microorganismo y se pueden incorporar nuevos antimicrobianos al antibiograma con mayor facilidad que en el caso de los paneles comerciales. Así mismo permite observar sinergias y antagonismos entre diferentes antibióticos facilitando la interpretación del antibiograma. Su principal limitación es que no proporciona valores de CMI, sino solamente categorías clínicas. Por otra parte, tanto su preparación como la lectura requiere mayor dedicación de personal que con los métodos automatizados de determinación de la CMI, a pesar de disponer de sistemas semiautomáticos de lectura de halos de inhibición (que también incorporan sistemas expertos de interpretación y permiten la exportación de datos), e incluso de sistemas que automatizan completamente el proceso al incorporarlo a equipos de automatización integral de la siembra, incubación y lectura digitalizada. En el referido documento de COESANT (8), los antimicrobianos a evaluar (y sus categorías de inclusión-informe) mediante la técnica difusión con disco son, prácticamente, los mismos que los que se indican en la **Tabla 1** de antimicrobianos para paneles comerciales. Adicionalmente, pueden emplearse discos de antimicrobianos para la detección de mecanismos de resistencia, como el estudio de sinergia cloxacilina-ceftazidima para la detección de la hiperproducción de AmpC en *P. aeruginosa* o el uso de discos combinados o el test de sinergia entre EDTA/ácido dipicolínico y carbapenémicos para la detección de metalo-betalactamasas (MBL). El documento recoge también una propuesta para la distribución de discos sobre una placa de cultivo que se emplearían para el antibiograma de *Pseudomonas* spp. (8).

Un avance muy relevante en la aplicación de la técnica de difusión con disco ha sido la estandarización de un método para lectura rápida para aislados crecidos en frascos de hemocultivo (RAST). La estandarización promovida por EUCAST permite la lectura a las 4, 6 y 8 h., y también a las 16-20 h. En relación con los BG-NNF, el método permite estudiar *P. aeruginosa* y *A. baumannii*; en su versión más reciente (2026) (accesible en: https://www.eucast.org/bacteria/rapid-ast-in-blood-culture/breakpoints-for-rapid-ast/) los antimicrobianos que pueden evaluarse incluyen los indicados en la **Tabla 2**.

Tabla 1: Antibióticos en paneles comerciales para bacilos gramnegativos no fermentadores (actualizado de ref 2).

	ESPECIES[a]					Puntos de Corte Clínicos[b]		ECOFF[c]		
Antimicrobiano	**Paer**	**Abau**	**Smal**	**Axyl**	**Concentraciones[d]**	**Paer**	**Abau**	**Paer**	**Abau**	**Smal**
Piperacilina	E	-	-	-	4-8-**16-32**-64	0,001-16		16	(64)	64
Piperacilina/tazobactam[e]	A	B	-	A	4-8-**16-32**-64	0,001-16		16		
Ampicilina/sulbactam[e]	-	B	-	-	4-8-**16-32**		0,001-8[f]			
Ceftazidima	A	B	-	A	1-**2-4-8-16**-32	0,001-8		8	16	8
Cefepima	A	-	-		1-**2-4-8-16**-32	0,001-8		8		
Ceftolozano/tazobactam[e]	B	-	-	-	0.25-0.5-**1-2-4-8**-16	4-4		4		
Ceftazidima/avibactam[e]	B	-	-	B	0.5-1-**2-4-8-16**-32	8-8		8		
Cefiderocol	C[g]	C	C	C	0,06-**0,125-0,25-0,5-1-2**-4-8	2-2		1	0,5	0,125
Aztreonam	A	-	-	-	1-**2-4-8-16**-32	0,001-16		16		
Aztreonam/avibactam[e]	C	-	C	-	0,5-**1-2-4-8**-16			16		(8)
Imipenem	A	A	E	A	0,5-**1-2-4-8**-16	0,001-4	2-4	8	2	
Meropenem	A	A	-	A	0,25-0,5-**1-2-4-8**-16	2-8[h]	2-8	4		
Imipenem/relebactam[e]	C	-	-	-	0,25-0,5-**1-2-4-8**-16	2-2			2	
Meropenem/vaborbactam[e]	C	-	-	C	**0,125-0,25-0,5-1-2**-4-8-16	8-8				
Gentamicina	E	A	-	-	**1.2-4-8**		(4)-(4)	8	2	
Tobramicina	A	A	-	-	**1-2-4-8**	(2)-(2)[i]	(4)-(4)	2	4	
Amikacina	A	A	-	-	2-4-**8-16-32**	(16)-(16)	(8)-(8)	16	8	
Ciprofloxacino	A	A	-	A	0,125-**0,25-0,5-1-2**-4	0,001-0,5	0,001-1	0,5	1	16
Levofloxacino	A	A	A	A	0,25-0,5-**1-2-4**-8	0,001-2	0,5-1	2	(0,5)	4
Colistina	C	B	-	C	0,5-1-2-**4-8**	(4)-(4)	(2)-(2)	4	(2)	
Cotrimoxazol[j]	-	B	A	A[k]	**0,5-1-2**-4		2-4		0,5	2/38
Doxiciclina	-	A			**2-4-8**-16					
Minociclina	-	A	A	A	**1-2-4-8**-16					2
Tigeciclina	-	A			0,25-**0,5-1-2-4**					4
Rifampicina	-	C	-	-	**2-4-8**					

[a]Paer: *Pseudomonas aeruginosa*; Abau: *Acinetobacter baumannii*; Smal: *Stenotrophomonas maltophilia*; Axyl: *Achromobacter xylosoxidans*.

[b]Cuando no se indican puntos de corte clínicos concretos, la interpretación se hará de acuerdo con los criterios de EUCAST para esta circunstancia (https://www.eucast.org/bacteria/guidance-documents; última versión al redactar este documento: 29 de febrero de 2024) y a los que se indicaron por COESANT en el documento de Cantón y cols. (4).

[c]ECOFF: Puntos de corte epidemiológicos. Los valores tentativos de ECOFF se indican entre paréntesis. EUCAST no ha definido ECOFF para *A. xylosoxidans*.

[d]Los valores en negrilla indican el número mínimo de concentraciones que se recomienda incluir en el panel.

[e]La tabla recoge las concentraciones del betalactámico de referencia. Los inhibidores de betalactamasas se usan a concentración de 4 mg/L, excepto vaborbactam (8 mg/L) y sulbactam (concentraciones de ampicilina y sulbactam en proporción 2:1).
[f]Dado el interés clínico de esta combinación, se indica el punto de corte del CA-SAFM, alineado con los principios de EUCAST.
[g]Puede considerarse la categoría "B" en centros con alta prevalencia de *P. aeruginosa* productoras de metalo-betalactamasas.
[h]Punto de corte para infecciones diferentes a meningitis; para meningitis: 2-2.
[i]Para información sobre puntos de corte entre paréntesis, véase el correspondiente documento de EUCAST (accesible en: https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/.
[j]Proporción de trimetoprim/sulfametoxazol: 1/19. En la tabla se indica el valor para trimetoprim.
[k]EUCAST define el punto de corte de sensibilidad de trimetoprim/sulfametoxazol para *A. xylosoxidans* en 0.125 mg/L. Dada la menor frecuencia de aislamiento de esta especie en muestras clínicas, parece poco oportuno incluir concentraciones tan bajas en un panel comercial solo para esta situación.

Tabla 2. Antimicrobianos a evaluar en estudios de RAST.

Antimicrobiano	*P. aeruginosa*	*A. baumannii*
Piperacilina-tazobactam	X	
Cefepima	X	
Ceftazidima	X	
Ceftazidima-avibactam	X	
Ceftolozano-tazobactam	X	
Imipenem	X	X
Imipenem-relebactam	X	
Meropenem	X	X
Meropenem-vaborbactam	X	
Ciprofloxacino	X	X
Levofloxacino	X	X
Amikacina	X	X
Tobramicina	X	X
Gentamicina		X
Cotrimoxazol		X

3. PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA ESPERADA Y DEFINICIONES DE MULTIRRESISTENCIA

De acuerdo a las definiciones de EUCAST, el fenotipo resistente esperado (anteriormente categorizado como "resistencia intrínseca") hace referencia a cuando más del 90 % de todos los aislados, independientemente de su origen, presentan un mecanismo de resistencia característico o valores de CMI superiores al punto de corte clínico que figura en las tablas de EUCAST. Un resultado sensible debe considerarse con cautela. Normalmente, se deben evitar las pruebas de sensibilidad y se espera que los laboratorios no informen ningún resultado o, si desean hacerlo, que informen el aislado como resistente. Se debe advertir de la no utilización del agente antimicrobiano para la especie en cuestión. En las tablas, donde aparece una "R", cualquier otro resultado es inesperado.

El propósito de las tablas de perfiles fenotípicos de resistencia es servir como herramienta para la validación de la identificación de especies, así como evitar pruebas de sensibilidad innecesarias. La presencia de un fenotipo inesperado indica que el laboratorio debe verificar la identificación de la especie, los resultados de las pruebas de sensibilidad o ambos. En la **Tabla 3** se recogen los fenotipos de resistencia esperados definidos por EUCAST para los principales BGNNF de interés clínico (Expected Resistant Phenotypes. EUCAST. Version 1.2 January 2023).

Tabla 3. Perfiles fenotípicos de resistencia esperados en BGNNF.

Mecanismo de resistencia	AMX	AMC	SAM	TIC	TCC	PIP	PTZ	CTX	CAZ	FEP	ATM	ETP	IMP	MER	CIP	CLR	AMG	TRM	FOS	TET	TIG	COL
Acinetobacter baumannii, *A. pittii*, *A. nosocomialis*	R	R	Nota[1]					R			R	R						R	R	R[2]	Nota[2]	
Achromobacter xylosoxidans	R							R			R	R										
Burkholderia cepacia complex[3]	R	R	R	R	R	R	R	R			R	R			R	R	R[4]	R	R			R
Elizabethkingia meningoseptica	R	R	R	R	R			R	R	R	R	R	R	R								R
Elizabethkingia anophelis	R	R	R	R	R			R	R	R	R	R	R	R								
Ochrobactrum anthropi	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R										
Pseudomonas aeruginosa	R	R	R					R				R				R	Nota[5]	R		R	R	
Stenotrophomonas maltophilia	R	R	R	R		R	R	R			R	R	R	R			R[4]	R[6]	R	R[7]		
Chryseobacterium spp.	R	R	R	R	R			R	R		R	R	R	R			R					R

AMX, amoxicilina; AMC, amoxicilina/clavulánico; SAM, ampicilina/sulbactam; TIC, ticarcilina; TCC, ticarcilina/clavulánico; PIP, piperacilina; PTZ, piperacilina/tazobactam, CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; ATM, aztreonam; ETP, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; CIP, ciprofloxacino; CHR, cloranfenicol; AMG, aminoglicósidos; TRM, trimetoprim; FOS, fosfomicina; TET, tetraciclina; TIG, tigeciclina, COL, colistina.

[1] *A. baumannii* puede parecer sensible a la ampicilina-sulbactam debido a la actividad del sulbactam en esta especie.

[2] *Acinetobacter* es resistente a la tetraciclina y a la doxiciclina, pero en menor grado a la minociclina y a la tigeciclina. Los resultados clínicos son variables.

[3] El complejo *Burkholderia cepacia* incluye diferentes especies. Algunas cepas pueden parecer sensibles a algunos betalactámicos *in vitro,* pero son clínicamente resistentes

[4] Se espera que *B. cepacia* y *S. maltophilia* sean resistentes a todos los aminoglucósidos. La resistencia se atribuye a una baja permeabilidad y a bombas de expulsión. Además, la mayoría de las *S. maltophilia* producen enzimas modificadoras de aminoglicósidos como por ejemplo AAC(6')Iz.

[5] *P. aeruginosa* es resistente a la kanamicina y a la neomicina debido a la baja actividad de la APH(3')-IIb.

[6] *S. maltophilia* suele ser sensible a trimetoprim-sulfametoxazol, pero resistente a trimetoprim solo.

[7] *S. maltophilia* es resistente a tetraciclina, mientras que su sensibilidad a doxiciclina, minociclina y tigeciclina es variable. Los resultados clínicos son variables.

Si se comparan las resistencias esperadas por EUCAST con las aportadas por la Sociedad Francesa de Microbiología (SFM), la primera incluye también cefotaxima/cefriaxona y ertapenem como resistencias comunes para todos lo BGNNF. En el caso de *A. xylosoxidans*, EUCAST marca resistencia a ampicilina, cefotaxima, aztreonam y ertapenem. La evidencia disponible, muestra que la resistencia a ertapenem en *A. xylosoxidans* se relaciona con la presencia de múltiples bombas de expulsión activa y betalactamasas como AxyXY-OprZ y blaAXC, que están ampliamente conservados en la especie. Sin embargo, existen infor-mes de sensibilidad a ertapenem *in vitro* en la literatura.

De acuerdo a los criterios del Centro Europeo para el control de Enfermedades (European Center for Disease Control, ECDC) (9) los perfiles de resistencia adquirida se ajustan a las definiciones de cepas multirresistentes (MDR), con resistencia extensa (XDR) y panresistentes (PDR).

MDR: El aislado es resistente a al menos 1 antibiótico en >=3 categorías de antimicrobianos relevantes para el tratamiento de la bacteria.
XDR: El aislado es resistente a al menos 1 antibiótico en todas las categorías de antimicrobianos excepto 1 o 2.
PDR: El aislado es resistente a todos los antibióticos en todas las categorías de antimicrobianos relevantes para el tratamiento de la bacteria.

Para patógenos como *P. aeruginosa* y *A. baumannii,* estos criterios se aplican considerando perfiles de sensibilidad específicos (**Tabla 4**). Para otros BGNNF como *S. maltophilia* o *A. xylosoxidans* no se han definido estos perfiles de resistencia adquirida, en parte debido a que de forma natural ya son resistentes a la mayoría de las categorías de antibióticos contempladas. Aunque útil desde el punto de vista epidemiológico, la valoración dentro de estas definiciones puede resultar difícil, ya que no siempre se estudian de forma rutinaria todos los antibióticos incluidos en la definición, algunos no tienen puntos de corte actualmente y/o son de dudosa implicación clínica. Existen otras definiciones de multirresistencia menos utilizadas como la de la Sociedad Alemana, también del 2012, para *Enterobacterales, P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Se basa en la evaluación de cuatro grupos de antibióticos con efecto bactericida: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas. Si solo es sensible a uno o ninguno de los cuatro grupos de antibióticos enumerados o de sus antimicrobianos principales, el patógeno se clasifica como multirresistente. Esta definición no es válida para otros patógenos gramnegativos, como *S. maltophilia*, y presenta las mismas limitaciones que la de Magoriakos et al. ya que no incluye los nuevos antimicrobianos. Un enfoque más clínico y práctico es la resistencia difícil de tratar (DTR). Esta definición propuesta por la IDSA (10) se centra en la resistencia que limita el tratamiento de todos los agentes antimicrobianos de pri-mera línea, es decir, resistencia a todos los betalactámicos (incluidas las cefalosporinas, monobactámicos, los carbapenémicos, y las combinaciones de inhibidores de betalactamasas clásicos) y a las quinolonas. A efectos prácticos el perfil DTR para *P. aeruginosa* en nuestro medio actualmente implicaría resistencia a piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem y ciprofloxacino. Respecto a las definiciones MDR/XDR conviene señalar que hay varios agentes antimicrobianos incluidos que no deben considerarse. Determinados antibióticos comercializados en España como la fosfomicina o la gentamicina, carecen de puntos de corte clínicos establecidos, por lo que no es posible su categorización SIR (en el caso de la gentamicina, para *Pseudomonas* spp). En el caso de *A. baumannii*, a pesar de que están incluidos en el documento de Magiorakos que define los perfiles MDR y XDR, varios antimicrobianos (netilmicina, cefalosporinas, penicilinas con inhibidores de betalactamasas y tetraciclinas) no tienen puntos de corte establecidos, por lo que resulta imposible su categorización SIR. Del mismo modo, tampoco tiene sentido considerar aquellos antibióticos para los que sí existen puntos de corte pero que no se encuentran actualmente comercializados en nuestro país, como netilmicina, doripenem, ticarcilina/ác.clavulánico o po-limixina B). Cabe destacar, no obstante que ni las definiciones del ECDC (MDR/XDR/DTR) ni la de la IDSA (DTR) tienen en consideración la creciente lista de “nuevos” betalactámicos disponibles (actualmente, ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, imipenem/relebactam, meropenem/vaborbactam, cefiderocol y aztreonam/avibactam). Estás definiciones deben por tanto actualizarse para integrar el creciente número de nuevas moléculas y la derivada complejidad de nuevas categorías antibióticas a considerar (11).

Tabla 4. Categorías agentes antimicrobianos utilizados para definir los perfiles MDR y XDR en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (9).

Categoría antimicrobiano	Agente antimicrobiano	*P. aeruginosa*	*A. baumannii*
Aminoglucósidos	Gentamicina	X	X
	Tobramicina	X	X
	Amikacina	X	X
	Netilmicina	X	X
Carbapenémicos	Imipenem	X	X
	Meropenem	X	X
	Doripenem	X	X
Cefalosporinas	Ceftazidima	X	X
	Cefepima	X	X
	Cefotaxima	No aplica	X
	Ceftriaxona	No aplica	X
Quinolonas	Ciprofloxacino	X	X
	Levofloxacino	X	X
Penicilinas antipseudomónicas +inhibidores de betalactamasa	Ticarcilina/ ác. clavulánico	X	X
	Piperacilina/tazobactam	X	X
Penicilinas+inhibidores de betalactamasa	Ampicilina/sulbactam	No aplica	X
Monobactámicos	Aztreonam	X	No aplica
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina	X	No aplica
Polimixinas	Colistina	X	X
	Polimixina B	X	X
Inhibidores folato	Trimetoprim/sulfametoxazol	No aplica	X
Tetraciclinas	Tetraciclina	No aplica	X
	Doxicilina	No aplica	X
	Minociclina	No aplica	X

4. LECTURA INTERPRETADA DE LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN BGNNF

4. 1. *Pseudomonas aeruginosa*

En la **Tabla 5** se recogen los perfiles de sensibilidad asociados a los principales mecanismos de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa*. Se incluyen tanto los mecanismos de resistencia cromosómicos como transferibles, de forma individual y combinada, así como su efecto sobre la actividad de los betalactámicos antipseudomonicos clásicos, los de más reciente comercialización y aquellos en fases avanzadas de desarrollo clínico. En los apartados posteriores se detallan su naturaleza, características, epidemiología, prevalencia, impacto y detección en el laboratorio de microbiología clínica.

4.1.1. Mecanismos de resistencia intrínseca a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa está genéticamente dotada de una excepcional maquinaria intrínseca de resistencia a los antibióticos. La producción de la cefalosporinasa inducible AmpC (también denominada *Pseudomonas Derived Cephalosporinase*, PDC), la expresión constitutiva (MexAB-OprM) o inducible (MexXY) de bombas de expulsión activa y la menor permeabilidad de su membrana externa son probablemente los mecanismos que tienen

un mayor impacto en la menor sensibilidad basal de *P. aeruginosa* a los antibióticos en comparación con otros patógenos gramnegativos, como Enterobacterales. La expresión inducible de AmpC desempeña un papel fundamental en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a las aminopenicilinas y a la mayoría de las cefalosporinas (en particular, a las cefamicinas como la cefoxitina), ya que estas moléculas son potentes inductores de la expresión y son hidrolizadas eficientemente por esta enzima. Además, la AmpC inducible desempeña un papel importante en el nivel de resistencia basal de *P. aeruginosa* al carbapenémico imipenem, ya que la relativa estabilidad de esta molécula frente a la hidrólisis por la cefalosporinasa se ve comprometida en cierta medida por su elevada potencia inductora. La posible contribución de otras dos betalactamasas intrínsecas, la oxacilinanasa OXA-50 y la imipenemasa PIB-1, a los niveles basales de sensibilidad a los betalactámicos es menos evidente. Además, la expresión constitutiva de la bomba de expulsión activa MexAB-OprM desempeña un papel importante en los niveles basales de sensibilidad reducida de *P. aeruginosa* a casi todos los betalactámicos, con excepción del imipenem. Entre los betalactámicos con actividad antipseudomónica más afectados por MexAB-OprM cabe destacar el aztreonam, cuyo ECOFF (16 mg/L) se sitúa en el límite de lo tratable y por tanto de lo considerable como resistencia intrínseca (www.eucast.org).

4.1.2. Mecanismos de resistencia a betalactámicos antipseudomónicos clásicos mediados por mutaciones cromosómicas

El mecanismo de resistencia mediado por mutaciones cromosómicas más frecuente a las penicilinas antipseudomonas clásicas (como la piperacilina con y sin tazobactam), cefalosporinas (como la ceftazidima o la cefepima) o monobactámicos (aztreonam) es la desrepresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC, que implica un amplio repertorio de genes que pertenecen a vías reguladoras del reciclaje de la pared celular (12) (**Tabla 5**). Entre las principales mutaciones que causan desrepresión del gen *ampC* cabe destacar las que determinan la inactivación del gen *dacB*, que codifica la proteína fijadora de penicilina [PBP] no esencial PBP4, o del gen *ampD*, que codifica una N-acetil-muramil-L-alanina amidasa. Además, se han observado mutaciones puntuales específicas (como D135N o G154R) que causan un cambio conformacional en el regulador transcripcional AmpR, lo que lleva a la sobreexpresión del gen *amp*C y a la resistencia a betalactámicos de amplio espectro en cepas clínicas. También se ha demostrado que las mutaciones de varios otros genes, incluyendo los que codifican amidasas (AmpDh2 y AmpDh3), otras PBP (como PBP5 y PBP7), transglicosilasas líticas (como SltB1 y MltB), MPL (UDP-N-acetilmuramato:L-alanil-γ-D-glutamil-meso-diaminopimelato ligasa) o NuoN (cadena N de la NADH deshidrogenasa I), aumentan la expresión del gen *ampC*, ya sea sola o en combinación con otras mutaciones; sin embargo, su impacto en la resistencia a betalactámicos entre aislados clínicos aún necesita ser analizado en mayor detalle (12).

La inactivación mutacional de la porina OprD es el mecanismo de resistencia a carbapenemas más frecuente en *P. aeruginosa*. La inactivación de OprD está típicamente causada por indels o codones de terminación prematura, pero algunas sustituciones de aminoácidos también se han asociado con la resistencia, particularmente en el contexto de la fibrosis quística. Además, la resistencia al imipenem también puede resultar de la represión de la expresión del gen *oprD* causada por mutaciones en los reguladores de la bomba de expulsión activa MexEF-OprN (*mexS/T*) o el sistema de dos componentes ParRS (13). La sobreexpresión de MexAB-OprM, causada por la mutación de genes implicados en su regulación (*mexR, nalC* o *nalD*) aumenta las CMI de la mayoría de los betalactámicos, incluyendo meropenem pero no imipenem. De hecho la resistencia de alto nivel a meropenen está frecuente causada por la combinación de la inactivación de OprD con la hiperproducción de la bomba MexAB-OprM. Por otro lado, la sobreexpresión de MexXY (ejm mutaciones en el gen *mexZ*) está particularmente implicada en la resistencia a cefepima.

En términos generales, las nuevas combinaciones de betalactámicos +/- inhibidores de betalactamasas tales como ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, imipenem/relebactam y cefiderocol permanecen relativamente estables frente a estos mecanismos de resistencia mutacionales clásicos (14) (**Tabla 5)**. La excepción sería aztreonam/avibactam ya que su actividad se ve muy comprometida por la hiperexpresión de MexAB-OprM. De igual forma, la combinación con vaborbactam

no aporta actividad relevante frente al principal mecanismo de resistencia a meropenem (OprD + hiperproducción de MexAB-OprM). Además, las combinaciones de los mecanismos mutacionales clásicos pueden llegar a limitar la actividad del resto de los nuevos betalactámicos en cierta medida, particularmente para ceftazidima/avibactam (hiperproducción de AmpC+ MexAB-OprM) y en menor medida para imipenem/relebactam (inactivación de OprD + hiperproducción de MexAB-OprM). Este efecto viene determinado por el hecho de que los diazabiciclooctanos (avibactam y relebactam) son sustratos de la bomba MexAB-OprM.

4.1.3. Mecanismos de resistencia a betalactámicos mediados por betalactamasas transferibles

Los genes de betalactamasas adquiridos horizontalmente son, sin duda, una fuente creciente de resistencia en *P. aeruginosa,* incluyendo los nuevos betalactámicos +/- inhibidores de betalactamasas. Posiblemente las betalactamasas adquiridas más frecuentes en *P. aeruginosa* son las de tipo OXA, particularmente OXA-2 y OXA-1 (15). Si bien su perfil de resistencia suele incluir únicamente las penicilinas (incluyendo frecuentemente la combinación piperacilna/tazobactam), de ellas derivan las denominadas OXAs de espectro extendido que confieren resistencia a las cefalosporinas antipseudomónicas ceftazidima y cefepima. Otras betalac-tamasas de espectro extendido (BLEE) con relevancia en *P. aeruginosa* son las PER, GES o las VEB, particularmente prevalentes en el este de Europa y Asia. La actividad de los betalactámicos frente a las cepas productoras de BLEE es variable y dependiente de la presencia de otros mecanismos concomitantes; imipenem/relebactam suele ser sensible y ceftolozano/tazobactam resistente, mientras que la actividad de ceftazidima/avibactam y cefiderocol es más variable.

No obstante, sin duda, las betalactamasas adquiridas con mayor impacto en *P. aeruginosa* son las carbapenemasas. Su frecuencia ha aumentado notablemente en los últimos años a nivel mundial, pero se documenta una elevada variabilidad geográfica en su prevalencia, que va desde el 2 % de los aislados resistentes a meropenem en Norteamérica hasta casi el 70 % en Centroamérica y Sudamérica (16). Las carbapenemasas implicadas son también variables a nivel global, siendo las de clase A de tipo KPC las más frecuentes en Latinoamérica y China, y dentro de las de clase B, las NDM en la India y Australia y las VIM en Europa. La prevalencia de producción de carbapenemasas en España se sitúa en el 2-3% del total de cepas en los últimos años, siendo la MBL VIM-2 y la carbapenemasa de clase A GES-5 las más frecuentes (17). Si bien no se ha demostrado un aumento significativo de su prevalencia, sí que se ha constatado un claro aumento de la proporción de cepas en las que la resistencia a meropenem está mediada por la producción de una carbapenemasa, pasando del 18,1% en 2017 al 29,4% en 2022 (17). Respecto a la actividad de los nuevos betalactámicos disponibles, ceftolozano/tazobactam e imipenem/relebactam presentan actividad muy limitada, mientras que ceftazidima/avibactam suele ser activa frente a las cepas productoras de carbapenemasas de clase A y el cefiderocol, además, también frente a las MBL. No obstante, la actividad de este último es menor frente a las NDM, particularmente frente a determinadas variantes (18). Una alternativa potencial frente a las cepas productoras de MBL sería aztreonam +/- avibactam, aunque como se ha comentado ya, su actividad está limitada por la expresión de la bomba MexAB-OprM. Entre las nuevas combinaciones todavía en desarrollo, cefepima/zidebactam y cefepima/taniborbactam también muestran actividad frente a cepas productoras de MBL. El mecanismo subyacente para la actividad de cefepima/zidebactam contra estas cepas se basa en que zidebactam tiene actividad antipseudomónica directa al inhibir la PBP2 y, por lo tanto, proporciona sinergia con betalactámicos inhibidores de PBP3, como las cefalosporinas (19). Por otro lado, la actividad de cefepima/taniborbactam depende del hecho de que taniborbactam inhibe la actividad hidrolítica de MBL, excepto para las de tipo IMP.

4.1.4. Resistencia emergente a los nuevos betalactámicos mediados por mutación del centro activo de AmpC

Afortunadamente, como se ha mencionado anteriormente, tanto el ceftolozano/tazobactam como la ceftazidi-ma/avibactam siguen siendo activos frente a las cepas hiperproductoras de AmpC. Sin embargo, incluso antes de la introducción del ceftolozano/tazobactam en la práctica clínica, experimentos de evolución *in vitro* revelaron que se podía lograr una alta resistencia a este nuevo agente mediante la combinación de mutaciones que conducen a la sobreexpresión de la betalactamasa con mutaciones que modifican el centro

catalítico (principalmente el bucle Ω) de AmpC (20) Además, tras la introducción de ceftolozano/tazobactam (y ceftazidima/avibactam) en la práctica clínica (principalmente para el tratamiento de cepas DTR de *P. aeruginosa*, que normalmente ya hiperproducen AmpC), se documentó el desarrollo de resistencia, debido a la adquisición de las mismas mutaciones de AmpC, en el 10-15% de los pacientes tratados (14). Estudios bioquímicos han revelado que estas mutaciones del bucle Ω suelen aumentar la eficiencia catalítica de AmpC hacia ceftolozano y ceftazidima, a la vez que reducen en cierta medida, y de forma dependiente de la variante, su inhibición por avibactam. Además, las cepas que producen estas variantes del bucle Ω de AmpC resistentes a ceftolozano/tazobactam muestran sensibilidad colateral al imipenem (CMI reducida). Más allá del interés académico, estos hallazgos abren la posi-bilidad de usar imipenem como terapia de rescate para estos casos de desarrollo de resistencia a ceftolozano/ta-zobactam o ceftazidima/avibactam mediada por la selección de mutantes de bucle Ω de AmpC. Sin embargo, el riesgo de reseleccionar las variantes parentales resistentes a imipenem (AmpC de tipo salvaje) exige prudencia en ausencia de experiencia clínica. Por otro lado, imipenem/relebactam podría ser eventualmente el tratamiento de elección en estos casos, ya que permanece activo contra la cepa parental sensible a ceftolozano/tazobactam resistente a imipenem y muestra una mayor potencia contra el mutante evolucionado resistente a ceftolozano/tazobactam sensible a imipenem.

Más recientemente, ensayos de evolución *in vitro* con cefiderocol revelaron la frecuente selección de una mutación específica de AmpC (L32P) que determina un impacto importante en las CMI de esta nueva cefalosporina sin afectar significativamente a ceftolozano/tazobactam o ceftazidima/avibactam (21). La mutación L32P se localiza en el bucle R2 de AmpC y ya se había descrito asociada con resistencia de alto nivel a cefepima en algunas cepas clínicas mucho antes de la introducción de cefiderocol. El efecto de estas mutaciones en la actividad de cefepima combinada con los nuevos inhibidores taniborbactam o zidebactam ha sido todavía poco explorado.

4.1.5. Resistencia emergente a los nuevos betalactámicos mediados por mutación del centro activo de betalactamasas transferibles

Más allá de las mutaciones en AmpC, varios estudios han demostrado que la selección de variantes BLEE es una causa frecuente del desarrollo de resistencia a ceftolozano/tazobactam o ceftazidima/avibactam durante el tratamiento de infecciones por cepas de *P. aeruginosa* productoras de OXA-2 u OXA-10 (14). Estas variantes pueden además mostrar sensibilidad reducida a cefiderocol. Un aspecto positivo potencial de las BLEE OXA seleccionadas es que típicamente muestran una resistencia reducida al meropenem en comparación con las enzimas parentales, que se asemeja a lo documentado con las variantes del bucle Ω de AmpC con imipenem. Por el contrario, los derivados de OXA-198, que confieren resistencia a los carbapenémicos, pero sensibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido, también se han reportado en cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Más recientemente se ha descrito el desarrollo de resistencia a ceftazidima/avibactam durante el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* productora de la carbapenemasa GES-5, mediante la adquisición de mutaciones adicionales, como las que afectan al residuo P162 (22). Estas mutaciones conllevan la restauración del fenotipo BLEE, aumentando considerablemente las CMI de las cefalosporinas antipseudomónicas (así como las de ceftazidima/avibactam) y reduciendo las de los carbapenémicos. De hecho, estas variantes mutantes suelen ser sensibles a imipenem/relebactam, pero pueden presentar resistencia a cefiderocol. Un fenómeno muy similar se observa en cepas productoras de KPC, como la selección de la sustitución D179Y, descrita con frecuencia también en *K. pneumoniae*. Estos mutantes del bucle Ω de KPC también suelen mostrar una mayor sensibilidad a los carbapenémicos, aunque se ha informado de la coexistencia de copias de KPC de tipo salvaje y mutantes, que por lo tanto muestran resistencia tanto a ceftazidima/avibactam como a carbapenémicos.

4.1.6. Modificación de la diana (PBPs) como mecanismo de resistencia emergente a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*

Cada vez hay más evidencia del papel importante de la modificación de las PBP en la resistencia de *P. aeruginosa* a betalactámicos. De particular relevancia son las mutaciones en el gen *ftsI* (PBP3), siendo las más frecuentes en cepas clínicas, las que tiene lugar en los codones que afectan R504C/H y F533L (14). Estudios recientes han demostrado el efecto individual de las mutaciones de PBP3 en las CMI de betalactámicos *in vitro* utilizando cepas isogénicas modificadas genéticamente (23). Además, las mutaciones de PBP3 confieren un amplio efecto sobre la resistencia a los betalactámicos más recientes, incluyendo las

combinaciones con nuevos inhibidores de betalacmasa y el cefiderocol. Por otro lado, también se han descrito mutaciones específicas de PBP2 implicadas en la resistencia a zidebactam (24).

4.1.7. Otros mecanismos de resistencia a betalactámicos emergentes en *Pseudomonas aeruginosa*

Más allá de la ya comentada sobreexpresión, otro mecanismo más novedoso en el papel de las bombas de expulsión activa en la resistencia mutacional es la modificación del reconocimiento del sustrato. De hecho, si bien ceftolozano/tazobactam ha demostrado ser bastante estable frente a los mecanismos de expulsión activa, se ha demostrado que mutaciones que modifican el dominio de reconocimiento del sustrato de MexD determinan el desarrollo de resistencia a este antibiótico *in vivo* (25). Asimismo, se ha documentado que mutaciones específicas del gen *mexB*, que potencialmente modifican la especificidad del sustrato de MexAB-OprM, están implicadas en el desarrollo de resistencia o en el aumento de las CMI a ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam e imipenem/relebactam (14). Otro mecanismo mutacional de resistencia a betalactámicos poten-cialmente relevante es la selección de grandes deleciones [hasta 6 kb] que afectan partes específicas del cromosoma. Estos mutantes se observan con mayor frecuencia en el contexto de infecciones crónicas y pueden reconocerse por un pigmento marrón característico (piomelanina) causado por la deleción de uno de los genes incluidos, *hmgA*, que codifica una homogentisato-1,2-dioxigenasa. Sin embargo, el fenotipo de resistencia está vinculado a la deleción de otro de los genes afectados, *galU*, que codifica la UDP-glucosa pirofosforilasa implicada en la síntesis del LPS. Otras mutaciones de resistencia emergentes notables incluyen aquellas en el regulador de dos componentes del estrés de la envoltura CpxRS. Por último, los mecanismos específicos de desarrollo de resistencia al cefiderocol implican la selección de mutaciones en los sistemas de captación de hierro, particularmente en los receptores dependientes de TonB, como PiuA/PiuC y PirA/PirR (21). Las mutaciones en estos sistemas de captación de hierro, particularmente aquellas en PiuA/D/C, causan un aumento notable de la CMI de cefiderocol (cercano a los puntos de corte) de tal forma que al combinarse con betalalactamasas con actividad cefalosporinasa potente (incluyendo gran parte de las BLEE, carbapenemasas y mutaciones en AmpC) ocasionan resistencia clínica (26).

4.1.8. Ensayos complementarios para la detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa.*

De particular relevancia clínica y epidemiológica en *P. aeruginosa* es la diferenciación de los mecanismos de resistencia mutacionales de la producción de betalactamasas (BLEE y/o carbapenemasas) transferi-bles. Tal como se evidencia en la **Tabla 5**, el perfil del antibiograma ya nos puede orientar en este sentido, particularmente el ceftolozano/tazobactam, ya que suele permanecer activo frente a los mecanismos cromosómicos pero no frente a BLEE o carbapenemasas y por tanto podría ser utilizado como indicador (ver algoritmo PNT-1). Otra aproximación fenotípica como técnica de cribado para la detección de beta-lactamasas adquiridas es el test de inhibición por cloxacilina; un test positivo de cloxacilina indicaría que la única betalactamasa implicada en la resistencia es AmpC mientras que un test negativo sugeriría la presencia de betalactamasas transferibles (**Figuras 1-5**). No obstante, es importante tener en cuenta que las mutaciones en el bucle Ω de AmpC implicadas en la resistencia a las nuevas combinaciones generalmente determinan que el test de inhibición por cloxacilina sea negativo para ceftazidima, pudiendo conducir de forma errónea a sospecha de BLEE, si bien la marcada hipersensibilidad a imipenem de estos mutantes puede ayudar en la interpretación correcta del fenotipo (**Figura 2**). El empleo de otros inhibidores de betalactamasas como el clavulánico (inhibidor de betalactamasas de clase A), avibactam (inhibidor de betalactamasas de clases A y C) y EDTA (inhibidorde betalactamasas de clase B) serían de utilidad para la clasificación posterior de las potenciales betalactamasas transferibles al igual que en Enterobacterales (**Figuras 3-5**). No obstante, la frecuente presencia concomitante de mecanismos de resistencia cromosómicos puede dificultar su interpretación en *P. aeruginosa.* De igual forma, las técnicas bioquímicas, basadas en la detección de la hidrólisis, como el carbapenémicos NP o el método de inactivación de carbapenemas (*carbapenem inactivation method*, CIM), pueden resultar de utilidad para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* al igual que en enterobacterales, tal como recomienda el CLSI (5). Asimismo, se ha utilizado con éxito el MALDI-TOF para la detección de carbapenemasas utilizando la hidrólisis de imipenem +/- relebactam como indicador (27). Al igual que en Enterobacterales, pueden resultar de utilidad las técnicas moleculares como la PCR o las inmunocromatografías. Aun así, estas técnicas tienen limitaciones, algunas de ellas comunes (p. ej. detección y diferenciación de betalactamasas tipo GES) y otras más específicas de *P. aeruginosa*, determinadas

por la posible presencia de betalactamasas sistemas, no incluidas en estos incluyendo diversas carbapenemasas y BLEE presentes en esta especie típicas de determinadas localizaciones geográficas pero que, ocasionalmente, pueden encontrarse en nuestro medio de forma puntual o incluso generando brotes epidémicos. Por otro lado, una aproximación indirecta para detectar cepas resistentes de *P. aeruginosa* es la detección de los clones XDR de alto riesgo como el ST175 o el ST235 utilizando técnicas como el serotipado, el MALDI-TOF o la PCR (28,29). Finalmente, cabe destacar el creciente desarrollo del antibiograma genómico (análisis del resistoma mediante la secuenciación del genoma completo) como herramienta de utilidad para predecir los fenotipos de resistencia en *P. aeruginosa* (30-32).

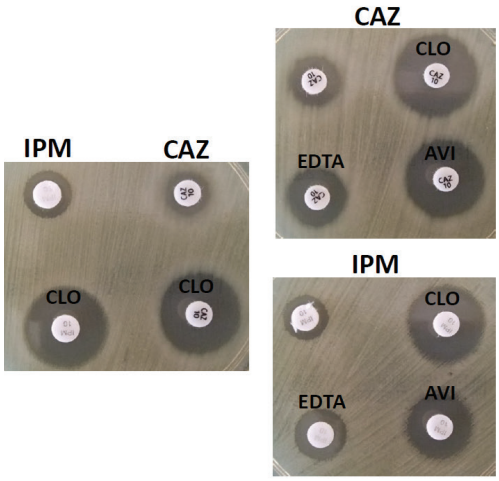


Figura 1. *P. aeruginosa* ST175 OprD-, AmpR G154R (AmpC desreprimida). Ensayos de inhibición de resistencia a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IPM) con cloxacilina 4000 µg (CLO), avibactam 10 µg (AVI) o EDTA 750 µg. Izquierda, ensayo de cribado inicial con cloxacilina para IPM y CAZ; derecha, ensayo ampliado incluyendo también el resto de inhibidores.

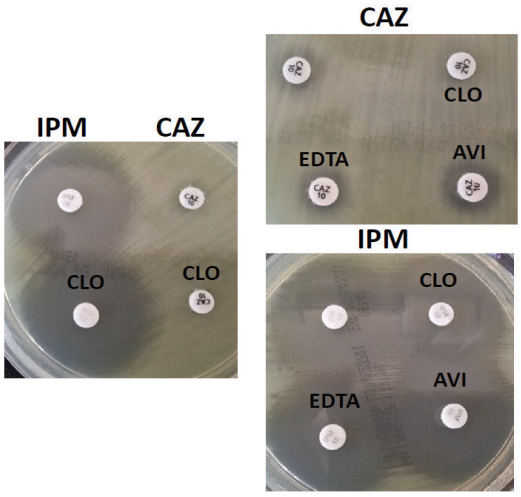


Figura 2. *P. aeruginosa* ST175 OprD-, AmpR G154R (AmpC desreprimida), AmpC E247K (mutación bucle Ω). Ensayos de inhibición de resistencia a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IPM) con cloxacilina 4000 µg (CLO), avibactam 10 µg (AVI) o EDTA 750 µg. Izquierda, ensayo de cribado inicial con cloxacilina para IPM y CAZ; derecha, ensayo ampliado incluyendo también el resto de inhibidores.

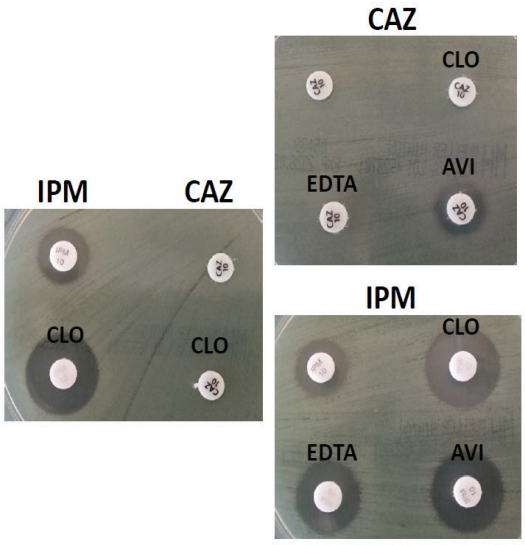


Figura 3. ST235 BLEE PER-1 (+OprD-). Ensayos de inhibición de resistencia a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IPM) con cloxacilina 4000 µg (CLO), avibactam 10 µg (AVI) o EDTA 750 µg. Izquierda, ensayo de cribado inicial con cloxacilina para IPM y CAZ; derecha, ensayo ampliado incluyendo también el resto de inhibidores.

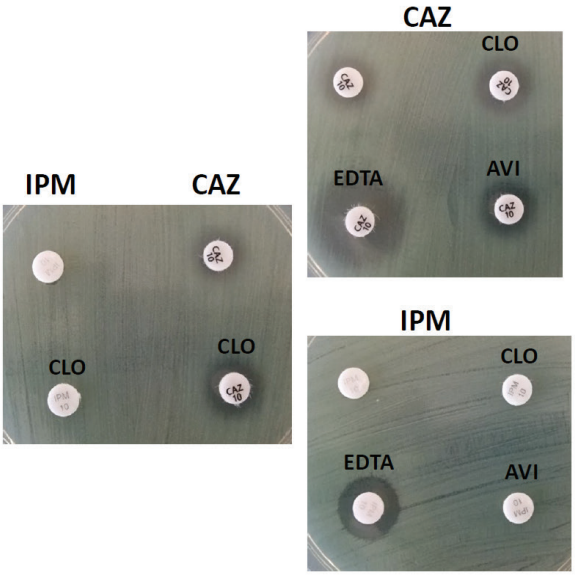


Figura 4. ST235 MBL VIM-2 (+OprD-). Ensayos de inhibición de resistencia a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IPM) con cloxacilina 4000 µg (CLO), avibactam 10 µg (AVI) o EDTA 750 µg. Izquierda, ensayo de cribado inicial con cloxacilina para IPM y CAZ; derecha, ensayo ampliado incluyendo también el resto de inhibidores.

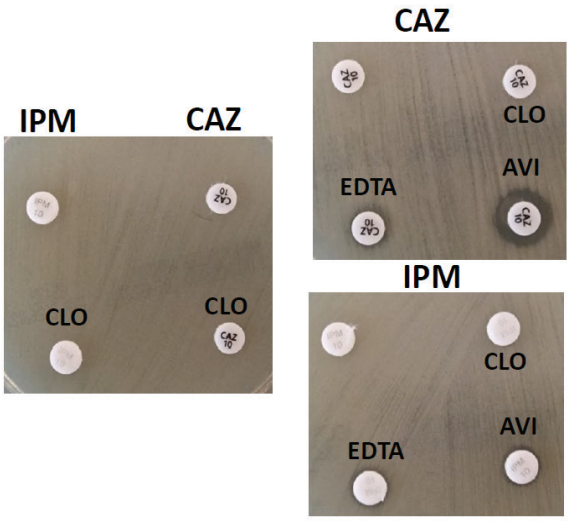


Figura 5. ST235 carbapenemasa clase A KPC-2 (+OprD-). Ensayos de inhibición de resistencia a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IPM) con cloxacilina 4000 µg (CLO), avibactam 10 µg (AVI) o EDTA 750 µg. Izquierda, ensayo de cribado inicial con cloxacilina para IPM y CAZ; derecha, ensayo ampliado incluyendo también el resto de inhibidores.

4.1.9. Información de los resultados e interpretación clínica

Tal como se ha comentado anteriormente, en la actualidad disponemos de un amplio repertorio de betalactámicos con actividad antipseudomónica que deberán estudiarse e informarse de forma selectiva en función del caso clínico y los perfiles de sensibilidad. En el **PNT-1** se describe un posible algoritmo en este sentido. Para cada antibiótico debe informarse la categoría clínica SIR y, en caso de estar disponibles, las CMI. Dada la relevancia terapéutica y para el PROA, en el caso de *P. aeruginosa* es particularmente importante indicar de forma clara las implicaciones de la I (sensible exposición incrementada), añadiendo si fuera necesario notas específicas. Más allá del propio antibiograma, se recomienda añadir información complementaria relevante como el perfil de resistencia (perfil MDR o quizás con mayor utilidad actual XDR o DTR) y/o de los mecanismos de resistencia (particularmente la producción de carbapenemasas) de cara al establecimiento de las correspondientes medidas de aislamiento y optimización de los tratamientos.

Tabla 5. Perfiles fenotípicos de sensibilidad asociados a los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa.*

Mecanismo de resistencia	**PTZ**	**CAZ**	**FEP**	**CAV**	**CTZ**	**FDC**	**ATM**	**AAV**	**IMP**	**MER**	**IMR**	**MEV**	**FZD**	**FTB**
Fenotipo silvestre	S	S	S	S	S	S	r	r	S	S	S	S	S	S
Hiperproducción AmpC	R	R	R	S	S	S	R	r	S	S	S	S	S	S
Pérdida OprD	S	S	S	S	S	S	r	r	R	r	S	r	S	S
Hiperproducción MexAB-OprM	r	r	r/R	r	S	S	R	R	S	r	S	r	r	r/R
Pérdida OprD+ Hiperproducción AmpC	R	R	R	S	S	S	R	r	R	r/R	S	r	S	S
Pérdida OprD+ Hiperproducción MexAB-OprM	r	r	r/R	r	S	S	R	R	R	R	r	R	r	r/R
Hiperproducción AmpC + MexAB-OprM	R	R	R	R	r	S	R	R	S	r	S	r	r	r/R
Hiperproducción + mutación bucle Ω AmpC	r/R	R	r/R	R	R	r	r/R	r/R	S	S	S	S	S/r	S/r
Mutación PBP3	r	r	r	r	r	r	R	R	S	r	S	r	r	r
Mutación captación hierro	S	S	S	S	S	r	r	r	S	S	S	S	S	S
BLEE (ejm PER-1)	r/R	R	R	r/R	r/R	r	R	r/R	S	S	S	S	S/r	S/r
OXA BLEE	R	R	R	R	R	r	R	R	S	S	S	S	r	r
Carbapenemasa clase A	R	R	R	S	R	S	r/R	r/R	R	R	r/R	r/R	S	S
Carbapenemasa clase A mutación bucle Ω	R	R	R	R	R	r	r/R	r/R	S	S	S	S	r	r/R
Carbapenemasa clase B	R	R	R	R	R	r	r	r	R	R	R	R	r	r/R

PTZ, piperacilina/tazobactam, CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CAV, ceftazidima/avibactam; CTZ, ceftolozano/tazobactam; FDC, cefiderocol; ATM, aztreonam; AAV, aztreonam/avibactam; IMP, imipenem; MER, meropenem; IMR, imipenem/relebactam; MEV, meropenem vaborbactam; FZD, cefepima/zidebactam; FTB, cefepima/taniborbactam
Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST: S: Sensibilidad silvestre, tratable con dosificación recomendada para *Pseudomonas* (sería categoría clínica I para PTZ, CAZ, FEP, IMP) según puntos de corte EUCAST; r: Sensibilidad disminuida de forma adquirida o, en el caso de AT y AAV, de forma natural.; R: Resistente de acuerdo con los puntos de corte clínicos EUCAST. Para cefepima/zidebactam y cefepima/taniborbactam no existen puntos de corte EUCAST actualmente y se han tenido en cuenta los de cefepima.

4. 2. *Acinetobacter baumannii*

La interpretación de los fenotipos de resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter baumannii* es más compleja que en Enterobacterales, debido a la elevada resistencia intrínseca y a la facilidad para adquirir múltiples determinantes de resistencia a betalactámicos. Además, los mecanismos de resistencia están menos caracterizados que en Enterobacterales o *P. aeruginosa.* Los principales perfiles de resistencia a betalactámicos en *A. baumannii* se recogen en la **Tabla 6.**

4.2.1. Mecanismos de resistencia intrínseca a betalactámicos

A. baumannii presenta resistencia intrínseca a la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas (excepto ceftazidima), aztreonam, ertapenem y amoxicilina-ácido clavulánico. Esta resistencia se debe a la baja permeabilidad de la membrana externa de *A. baumannii,* que es 10-100 veces inferior a la de *Escherichia coli,* debido a que *A. baumannii* posee menos porinas no específicas cuyo diámetro efectivo es más pequeño (Omp33-36, DcaP, OmpW y OmpA). Otros mecanismos intrínsecos que contribuyen a reducir la concentración de betalactámicos en el periplasma son las bombas de expulsión de expresión constitutiva, como por ejemplo AdeIJK, y dos betalactamasas cromosómicas; una de tipo AmpC de expresión no inducible denominada ADC (*Acinetobacter-Derived Cephalosporinase-like*), con más de 300 variantes alélicas asignadas, y otra de clase D denominada OXA-51-like, con más de 400 variantes.

Otras especies del complejo *A. baumannii*, como *A. nosocomialis* y *A. pittii,* son intrínsecamente más sensibles a betalactámicos que *A. baumannii*. La permeabilidad de la membrana externa de estas especies es mayor que la de *A. baumannii* y se relaciona con la presencia de porinas homólogas a las de *A. baumannii.* Las bombas de expulsión, también homólogas a las de *A. baumannii,* son menos frecuentes y presentan menor tendencia a la desregulación. Estas especies no tienen OXA-51 pero producen otros grupos de oxacilinasas intrínsecas, características para cada especie, como OXA-134-like en *A. nosocomialis* y OXA-213-like en *A. pittii*. Las enzimas de tipo AmpC tienen una menor expresión basal que en *A. baumannii*.

4.2.2. Mecanismos de resistencia a betalactámicos mediados por betalactamasas transferibles

El mecanismo de resistencia adquirida a betalactámicos más frecuente y más relevante es la producción de carbapenemasas transferibles de tipo OXA (OXA-CP). Las OXA-CP adquiridas más frecuentes son OXA-23-like, OXA-24/40-like y OXA-58-like (34). OXA-23 es la variante más diseminada mundialmente (66.9%en Europa y Asia Central y 92.2% en Oriente Medio y Norte de África, frecuentemente asociada al clon in-ternacional 2 (IC 2). Las variantes de OXA-24/40-like tienen una distribución más limitada (Europa, Medite-rráneo y Oriente Medio). OXA-58 tiene una distribución más heterogénea, y es menos prevalente que OXA-23 (35). Estas carbapenemasas tienen una actividad hidrolítica débil que no comprometen la actividad de los carbapenémicos, excepto cuando se hiperproducen por la presencia de promotores fuertes asociados a secuencias de inserción (IS) como ISA*ba1* e ISA*ba3,* situadas aguas arriba de los genes de OXA-CP (36).

La prevalencia y la distribución global de las MBL son muy heterogéneas (36). Predominan las NDM (5.5%; Asia, Oriente Medio y América Latina), VIM (0.05%; Europa, Mediterráneo y Américas), KPC (0.04%; América del Sur, Brasil) e IMP (0.01%; Asia oriental: Japón, China, Taiwan y Corea de Sur). Los genes de NDM suelen ir asociados con ISAba125 en transposones de clase 1. ADC se expresa basalmente sin afectar significativamente la actividad de CAZ, SAM ni PTZ (**Tabla 6**). I SA*ba1* p uede s ituarse d elante d el g en de *bla*ADC-like, aumentando su expresión y las CMIs hasta niveles de resistencia clínica, sobre todo en presencia de otros mecanismos de resistencia **(Tabla 6).** OXA-51-like también se expresa a bajo nivel en condiciones basales sin generar resistencia significativa a carbapenémicos, a no ser que se produzca su sobreexpresión inducida por ISA*ba1* u otras ISs, y sobre todo cuando actúa sinérgicamente con otros mecanismos como alteraciones en porinas, bombas de expulsión o PBPs **(Tabla 6)**.

Las BLEE son infrecuentes. Entre ellas, PER-1 es la BLEE más prevalente y de mayor relevancia epidemiológica, asociada frecuentemente al clon IC2 (36).

Los mecanismos de resistencia adquirida en *A. nosocomialis* y *A. pitti* se diferencian de los de *A. baumannii* en su menor frecuencia, estabilidad y expresión de los mismos, más que en el tipo de determinante de re-sistencia. Las carbapenemasas adquiridas de clase D son mucho menos frecuentes que en *A. baumannii.* Las carbapenemasas más frecuentes son de clase B. Las secuencias de inserción son menos frecuentes que en *A. baumannii* y se asocian con una menor expresión génica.

4.2.3. Mecanismos de resistencia no enzimáticos a betalactámicos

Los mecanismos de resistencia no enzimáticos más comunes son cromosómicos e incluyen pérdida o modificación de porinas, sobreexpresión de bombas de expulsión y disminución de la afinidad de las PBPs por los betalactámicos (37). Estos mecanismos actúan sinérgicamente para aumentar la CMI a niveles de resistencia clínica **(Tabla 6).** Las porinas CarO (canal de entrada para carbapenémicos), OmpA, OmpW y Omp33-36, así como las bombas de expulsión AdeABC, AdeFGH pueden tener un papel relevante en el desarrollo de resistencia a betalactámicos en *A. baumannii* (38,39). La inactivación de genes estructurales de porinas y bombas de expulsión, así como de los genes reguladores que controlan su expresión, por ejemplo, *adeRS,* suele estar mediada por mutaciones o por la inserción de ISs, como IS*Aba1* o IS*Aba125*. Estas alteraciones pueden dar lugar a porinas truncadas o con un diámetro de poro reducido, a una menor producción de porinas y, simultáneamente, a un aumento en la expresión de bombas de expulsión. La resistencia suele ser de bajo nivel, aunque puede potenciarse por hiperproducción de OXA-CP, ADC y/o OXA-51-like. El papel de las PBPs está menos estudiado en *A. baumannii* (40). Se han descrito mutaciones puntuales y reordenamientos estructurales en regiones catalíticas de *mrdA* (PBP2) y *ftsI* (PBP3) que reducen su afinidad por betalactámicos, produciendo aumentos modestos en las CMIs que pueden ser clínicamente relevantes cuando hay sinergia con otros mecanismos **(Tabla 6).**

El fenotipo de resistencia a ceftazidima y sensibilidad a carbapenémicos no es muy frecuente (5-15% si está mediado por la ADC y <5% si lo está por BLEE). La resistencia a piperacilina/tazobactam y ampicilina/sulbactam depende del nivel de hiperproducción de la ADC y de la presencia de otros mecanismos de resistencia que actúan simultáneamente. Los aislados suelen ser más sensibles a ampicilina/sulbactam que a piperacilina/tazobactam, por la actividad intrínseca de sulbactam, que inhibe fuertemente la PBP3. El fenotipo de resistencia a carbapenémicos por OXA-CP, frecuentemente asociado con la hiperproducción de ADC, es el fenotipo de resistencia más prevalente y con mayor impacto clínico y epidemiológico. La frecuencia de este fenotipo es muy variable, predominando en Asia y países del Sur y Sudeste de Europa, donde se han descrito tasas de resistencia a carbapenémicos de hasta el 90%. En España, en un estudio publicado en 2024, la resistencia a carbapenémicos fue del 56.8% para imipenem y del 57.6% para meropenem (41).

4.2.4. Mecanismos de resistencia a nuevos betalactámicos y combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (cefiderocol y sulbactam-durlobactam)

Cefiderocol puede ser una alternativa en aislados OXA-CP no productores de MBL. Se une principalmente a PBP3, pero también tiene afinidad por PBP1 y PBP2. El 4.9-15.2 % de *A. baumannii* son no sensibles a FDC. Este porcentaje se incrementa hasta un 7,8 - 21,5 % en aislados resistentes a carbapenémicos (42). La resistencia a cefiderocol es multifactorial. Uno de los mecanismos más frecuentes y relevantes son las mutaciones en los sistemas de captación de hierro, como receptores de sideróforos (BauA) y proteínas de transporte asociadas a catecolatos y enterobactina, dependientes de TonB (43 44). La resistencia a cefiderocol se ha relacionado también con determinadas variantes de betalactamasas como ADC-33, OXA-23 y PER-1, alteraciones en porinas, sobreexpresión de bombas y mutaciones en PBP3 (H370Y±K235N) (43, 44). La resistencia clínica a cefiderocol surge principalmente de la acción sinérgica de estos mecanismos. La heterorresistencia a cefiderocol es elevada, hasta del 40-60% en algunos estudios (45), aunque su importancia clínica es controvertida.

Sulbactam/durlobactam es otra alternativa específica para aislados OXA-CP que no producen MBL. Durlobactam es un nuevo inhibidor de betalactamasas de tipo diazabiciclooctano (DBO) que bloquea eficazmente las OXA-CP y las betalactamasas de clase A, C y D, protegiendo a sulbactam de la degradación enzimática. La resistencia a sulbactam/durlobactam es baja (<2.5%) y suele estar mediada por mutaciones o la sobre-expresión de betalactamasas con menor afinidad por durlobactam (como algunas variantes de OXA-23 y OXA-58), alteraciones en PBPs que reducen la unión de sulbactam, pérdida o modificación de porinas, y la sobreexpresión de bombas de expulsión (46). El fenotipo de resistencia con peor pronóstico es el productor de MBL, que se caracterizan porque hidrolizan prácticamente todos los betalactámicos, excepto aztreonam, y no se inhiben por avibactam, relebactam, vaborbactam y durlobactam.

4.2.5. Métodos fenotípicos y moleculares de detección de betalactamasas

En la detección de betalactamasas pueden utilizarse, al igual que en enterobacterales, métodos fenotípicos y moleculares (47). La detección fenotípica de resistencia a ceftazidima y sensibilidad a carbapenémicos (fenotipo ADC/BLEE) es difícil. El estudio de la sinergia entre ceftazidima ± cloxacilina y ceftazidima ± ácido borónico podría ser útil para la detección del fenotipo hiperproductor de ADC. Sin embargo, ni EUCAST ni CLSI recomiendan actualmente su empleo, debido a que se han descrito *variantes in vitro* de algunas ADC, como ADC-30 y ADC-33, que se inhiben con cloxacilina, pero no con ácido borónico, y viceversa. La detec-ción de sinergia entre ceftazidima y ácido clavulánico puede ser poco rentable para la detección de BLEE, sobre todo en cepas que hiperproducen ADC y/o OXA-CP o en cepas en las que el ácido clavulánico tenga actividad intrínseca, en cuyo caso cabe la posibilidad de falsa detección de BLEE. El fenotipo productor de carbapenemasas (OXA-CP y MBL) puede sospecharse fácilmente cuando el aislado es I o R a carbapenémicos (PNT-2). Se recomienda usar el método de microdilución y la difusión en agar con discos o tiras de gradiente. Se han descrito discrepancias entre la microdilución y la difusión en agar, por lo que es importante usar siempre los dos métodos. Estas diferencias son evidentes en aislados heterorresistentes a carbapenémicos y especialmente en los productores de OXA-58. En un estudio reciente realizado en Turquía se han descrito tasas de heterorresistencia del 24.1% para imipenem y del 30% para meropenem (48).

Los métodos fenotípicos no son útiles para detectar OXA-CP en *A. baumannii.* La detección fenotípica de MBL puede realizarse mediante la utilización de métodos fenotípicos basados en la hidrólisis de carbapenémicos (Carba NP modificado para *Acinetobacter,* Blue-Carba), la inhibición de la enzima, como el mCIM (modified *Carbapenem Inactivation Method*) y su versión simplificada sCIM o las inmunocromatografías (49,50). Estos métodos son especialmente rentables en aislados no productores de OXA-CP. Los métodos moleculares suelen basarse en una PCR múltiple o una amplificación isotérmica de tipo LAMP (50). La identificación de variantes de carbapenemasas requiere el uso de la secuenciación de ácidos nucleicos (Sanger o secuenciación masiva).

.2.6. Información de resultados e interpretación clínica

En *A. baumannii,* los betalactámicos a informar de forma primaria deben limitarse a los que tienen relevancia terapéutica, como ampicilina/sulbactam, imipenem y meropenem (4). Cefiderocol resulta esencial por su eficacia frente a aislados multirresistentes productores de OXA-CP o ADC. Si bien EUCAST no ha establecido puntos de corte clínicos por por falta de evidencia, ofrece recomendaciones específicas para la interpretación de la CMI en base a la esperable ausencia/presencia de mecanismos de resistencia **(Tabla 6).** Otros betalactámicos, como ceftazidima o piperacilina/tazobactam pueden informarse en aislados no productores de carbapenemasas con bajo nivel de hiperproducción de ADC. Combinaciones con inhibidores como avibactam, vaborbactam o relebactam no deben informarse por su falta de actividad frente a *A. baumannii.* Entre las limitaciones de sulbactam/durlobactam destacan la ausencia de puntos de corte clínicos y puntos de corte PK-PD definidos por EUCAST y la ausencia de aprobación por parte de la Unión Europea para su uso clínico. La situación clínica con peor pronóstico sucede con aislados productores de MBL dado que estas carbapenemasas inactivan la mayoría de los

betalactámicos y no se inhiben por clavulánico, sulbactam ni tazobactam. La situación clínica más frecuente y con mal pronóstico ocurre con aislados OXA-CP que hiperproducen ADC. Estas enzimas no se inhiben por sulbactam, tazobactam ni clavulánico. Cefiderocol puede ser una buena alternativa, aunque es conveniente vigilar la aparición de resistencia. Sulbactam/durlobactam es posiblemente la mejor opción, incluso en aislados deficientes en porinas o que sobreexpresan bombas de expulsión, ya que estas enzimas sí son inhibidas por durlobactam. La hiperproducción de ADC es una de las situaciones clínicas menos frecuente, pero con mejor pronóstico. Puede considerarse el uso de ampicilina/sulbactam en aislados con bajo nivel de hiperproducción de ADC-like.

Tabla 6. Perfiles de resistencia a betalactámicos asociados a los principales mecanismos de resistencia en *A. baumannii.*

Fenotipo	SAM	PTZ	CAZ	FDC	IMP	MER	SUL-DUR
Fenotipo salvaje	S	r	r	S	S	S	S
Hiperproducción ADC (bajo nivel)	S/r	r/R	r/R	S	S	S	S
Hiperproducción ADC (alto nivel)	R	R	R	S/r	S	S	r
Hiperproducción OXA-51	R	r	R	S	r	r	S
BLEE (PER-1/ VEB-1/GES-11)	r/R	R	R	S	S	S	S
Hperproducción ADC+OXA-51	R	R	R	S/r	r/R	r/R	S
Hiperproducción OXA-CP	R	R	r/R	S	R	R	S
Hiperproducción OXA-CP+ADC+OXA-51	R	R	R	r/R	R	R	r
MBL	R	R	R	R	R	R	R
Porinas	S/r	r	R	S	r	r	S/r
Bombas de expulsion	S/r	r	R	S	r	r	S/r
Porinas+bombas de expulsión+hiperproducción ADC	R	R	R	S/r	r/R	r/R	r
Porinas+bombas de expulsión +hiperproducción OXA-51	r/R	R	r/R	S	r/R	r/R	S/r
Porinas+/bombas de expulsión+ hiperproducción (ADC+OXA-51+OXA-CP)	R	R	R	S/r	R	R	r/R
Alteración PBPs (PBP2/PBP3)	r/R	r/R	r/R	S/r	S/r	S/r	S/r
Alteración PBPs+hiperproducción ADC	R	R	R	S/r	S/r	S/r	r/R
Alteración PBPs+ hiperproducción (ADC+OXA-CP)	R	R	R	r/R	R	R	r/R
Alteración PBPs+porinas+bombas de expulsión	R	R	R	r/R	R	R	r

SAM: ampicilina-sulbactam, PTZ: piperacilina-tazobactam, CAZ: ceftazidima, FDC: cefiderocol, IMP: imipenem, MER: meropenem y SUL-DUR: sulbactam-durlobactam.
ADC: *Acinetobacter-derived cephalosporinase.* OXA-CP: carbapenemasas de tipo OXA transferible (OXA-23; OXA-24/40; OXA-58). BLEE: betalactamasa de espectro extendido.
PBP: proteínas fijadoras de penicilina.
Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST. Para SAM, PTZ, CAZ, FDC y SUL-DUR no existen puntos de corte clínicos EUCAST:
S: Sensibilidad silvestre, tratable con la dosificación recomendada de IMP o MER en *A. baumannii* según puntos de corte EUCAST. Para FDC se ha tenido en cuenta el punto de ≤0.5 mg/L sugerido por EUCAST para cepas desprovistas de mecanismos de resistencia adquiridos, y para SUL-DUR el punto de corte clínico de <4/4 mg/L propuesto por CLSI en *Acinetobacter* spp.
r: Sensibilidad disminuida de forma adquirida o natural. r podría ser equivalente a I para IMP (EUCAST; 4 mg/L) MER (EUCAST; 4-8 mg/L) y SUL-DUR (CLSI; 8/8 mg/L). Para FDC r se correspondería con valores de 1-2 mg/L sugeridos por EUCAST para indicar presencia de algún mecanismo de resistencia adquirida pero todavía potencialmente tratables.
R: Resistente clínicamente a IMP o MER según EUCAST. Para FDC R se correspondería con el punto de corte general de resistencia clínica (>2 mg/L) de EUCAST para BGNNF y para SUL-DUR R con el punto de corte clínico ≥16/4 mg/L de CLSI. Para SAM, PTZ y CAZ, R indica presencia de mecanismos de resistencia adquirida que se asocian con valores de CMI superiores a los de r y que debieran asociarse con resistencia clínica a pesar de no existir puntos de corte.

4.3. *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia es un patógeno de creciente relevancia, especialmente en pacientes con factores de riesgo como inmunodepresión, enfermedades subyacentes, neoplasias o fibrosis quística. Este microorganismo puede causar múltiples tipos de infecciones, siendo las respiratorias las más frecuentes. Las opciones terapéuticas son limitadas debido a su resistencia intrínseca a numerosos antimicrobianos (51). La **Tabla 7** recoge los principales fenotipos de resistencia a betalactámicos en *S. maltophia*.

Tabla 7. Perfiles resistencia asociados a los principales mecanismos de resistencia en *S. maltophilia*.

Mecanismo de resistencia	**PTZ**	**CAZ**	**CAV**	**FDC**	**ATM**	**AAV**	**IMP**	**MER**
Fenotipo silvestre	R	R	r	S	R	S	R	R
Hiperproducción de L1	R	R	R	S	R	r	R	R
Hiperproducción de L2	R	R	r/R	S	R	S/r	R	R
Hiperproducción bomba SmeGH	R	R	R	S	R	S	R	R
Mutación *smeT* (regulador bomba SmeDEF)	R	R	R	R	R	r	R	R
Mutación captación hierro	R	R	r	R	R	S	R	R
Carbapenemasa clase B adquirida (ej IMP/NDM)	R	R	R	S/r	R	S	R	R

PTZ, piperacilina/tazobactam, CAZ, ceftazidima; CAV, ceftazidima/avibactam; FDC, cefiderocol; ATM, aztreonam; AAV, aztreonam/avibactam; IMP, imipenem; MER, meropenem;
R: resistente, r: CMI elevada o reducción en el halo de inhibición, S: Sensible.
BLEE: betalactamasa de expectro extendido
Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST. EUCAST no proporciona puntos de corte para ningún betalactámico en *S. maltophilia*. *S. maltophila* se considera intrínsecamente resistente a PTZ, CAZ, ATM, IMP y MER. Para FDC y AAV, S "Sensibilidad silvestre potencialmente tratable con las dosis apropiadas; r: Sensibilidad disminuida"

La **resistencia esperada** a antibióticos betalactámicos en *S. maltophilia* viene principalmente determinada por la expresión de dos betalactamasas inducibles:

- L1: es una metalo-betalactamasa (MBL) de clase B3 dependiente de Zn^{2}+
- L2: es una cefalosporinasa de clase A.

La enzima MBL L1 hidroliza prácticamente todos los antibióticos betalactámicos incluidos los carbapenémicos. Una excepción es el aztreonam que no se ve afectado por este tipo de enzimas. Es sensible a la acción de agentes quelantes como el EDTA, pero no a la de los inhibidores habituales de betalactamasas. La enzima L2 es una cefalosporinasa que contiene serina en su centro activo, confiere resistencia de alto grado a penicilinas y cefalosporinas, no hidrolizando apenas los carbapenémicos. Es sensible a la acción de los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y el avibactam.

La expresión de L1 y L2 está regulada por AmpR, de forma similar a AmpC en *P. aeruginosa* y relacionada con el reciclaje del peptidoglicano, en el que, además, están implicados AmpG-AmpN, NagZ y AmpD. *blaL*1

y *blaL2* están controlados por el regulador AmpR que actúa de forma diferente en ambos genes. Sin un inductor betalactámico, AmpR mantiene la expresión de L1, pero suprime la de L2. Sin embargo, cuando hay un inductor, AmpR promueve la expresión de ambos genes.

Los productos de degradación del peptidoglicano (GlcNAc-1,6-anhidro-MurNAc-péptidos) entran al citosol por la permeasa AmpG-AmpN. NagZ los transforma a 1,6-anhidro-MurNAc-péptidos o ligandos de activación y AmpD los degrada a ligandos represores. Durante la inducción, los ligandos de activación saturan a AmpD, lo que determina un aumento de su concentración con respecto a la de los ligandos represores derivados del anabolismo y el reciclaje y finalmente, desplazan a estos últimos de la unión de AmpR. El complejo AmpR más los ligandos de activación promoverían la expresión de L1 y L2.

Aparte de estas 2 betalactamasas, la resistencia esperada a betalactámicos viene determinada por bombas de expulsión activa de la familia RND como SmeGH (52).

La resistencia adquirida se podría producir por una hiperexpresión estable de las betalactamasas debido a mutaciones inactivantes en AmpDI. Así mismo, se puede deber a mutaciones que provoquen un aumento en la expresión de bombas de expulsión:

- Mutaciones en el transportador de la bomba de expulsión SmeGH se relacionan con la resistencia a ceftazidima.

- La bomba de expulsión SmeABC cuando se expresa a nivel basal no parece ser un elemento relevante en la resistencia intrínseca a los antibióticos, sin embargo, su sobreexpresión contribuye a la resistencia adquirida a los aminoglucósidos, betalactámicos y fluoroquinolonas. Además, se ha descrito que las cepas que presentan una mayor expresión de SmeABC también presentan una mayor actividad de la betalactamasa L2, lo que sugiere una corregulación entre la bomba de expulsión y esta betalactamasa.

- En un estudio se demostró que la resistencia a cefiderocol en *S. maltophilia* está relacionada con mutaciones en el promotor de *sme*T que provocaría una disminución en la expresión de SmeDEF e indirectamente causaría resistencia a este antibiótico de forma aún no estudiada. Así mismo, los aislados resistentes a cefiderocol presentaron mutaciones en *smf-1* (que codifica una proteína fimbrial), *tolQ* (un transportador transmembrana) y *tonB* (transportador de hierro) (53). Mutaciones en estos mismos genes (*tonB*, *tolQ* y *smeT*) se describen en aislados clínicos y ambientales resistentes a cefiderocol, previamente no expuestos a este antimicrobiano, todos pertenecientes al genogrupo 4 (54). Así mismo, mutaciones en *smeT* están descritas en una cepa resistente a la combinación de ceftazidima-avibactam y aztreonam (55).

Un estudio *in vitro* indicó que la hiperproducción de L1 pueden ocasionar una mayor actividad hidrolítica hacia el avibactam, reduciendo la inhibición de L2 y observándose por tanto un aumento de CMI de aztreonam-avibactam (56). Actualmente, la caracterización de los mecanismos de resistencia a la combinación aztreonam-avibactam en *S. maltophilia* ha sido escasamente documentada, incluyendo también el posible papel de la hiperproducción de L2 en la sensibildidad disminuida a esta combinación.

La resistencia adquirida en *S. maltophilia* puede transmitirse de manera horizontal por medio de elementos genéticos móviles. Se ha descrito la presencia de carbapenemasas adquiridas tipo metalo-betalactamasas tales como IMP-8 y NDM-1 en este microorganismo. Así mismo, un trabajo desmostró la presencia de plásmidos portadores de una amplia gama de genes de resistencia, incluidos *qnrA*, *qnrB, qnrS*, *oqxA*, *oqxB*, *blaSHV*, *blaCTX-M-Gp1*, *blaPER, blaOXA-1-like*, *blaOXA-48-like* y *sul1* en aislados ambientales de *S. maltophilia*. Más allá del impacto clínico, la importancia de estos hallazgos radicaría en el papel de este microorganismo como reservorio de estas resistencias (52).

4.3.1. Estudios de sensibilidad antibiótica, información de resultados e interpretación clínica

El método de referencia para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a *S. maltophilia* es la microdilución en caldo según la ISO 20776-1. Sin embargo, se han descrito discrepancias entre metodologías en cuanto a la precisión y reproducibilidad de las pruebas de sensibilidad in vitro utilizados en los laboratorios tales como, la difusión con discos o con las tiras en gradiente de concentración y la microdilución con métodos automatizados (51). La dificultad inherente a la determinación de la actividad *in vitro* se ve agravada por la limitada disponibilidad de puntos de corte clínicos definidos en los distintos comités, lo que dificulta la estandarización e interpretación del antibiograma para este microorganismo.

Actualmente EUCAST únicamente define un punto de corte clínico para cotrimoxazol (S ≤0,001 mg/L y R >2mg/L), enfatizando la necesidad de la utilización de exposición incrementada para este antimicrobiano. También se describen ECOFFs para la mayoría de alternativas de tratamiento recomendadas para este microorganismo (minociclina, tigeciclina, levofloxacino), así como para los nuevos betalactámicos como cefiderocol (0,125 mg/L) y aztreonam-avibactam (8 mg/L). CLSI ha establecido puntos de corte clínico para ticarcilina/clavulánico, cefiderocol, minociclina, levofloxacino, cotrimoxazol y cloranfenicol.

EUCAST publicó recientemente un documento guía en el que se exponen las incertidumbres respecto a los tratamientos actualmente disponibles para este microorganismo (Guidance Document on S*tenotrophomonas maltophilia*). En este documento se presenta un estudio que demostró que, con la excepción del cefiderocol, para el resto de los antimicrobianos evaluados (cotrimoxazol, aztreonam/avibactam, minociclina, tigeciclina y levofloxacino), los puntos de corte PK/PD observados —definidos como el valor de CMI más alto asociado con una alta probabilidad de éxito terapéutico— fueron inferiores a los ECOFF. Cuando se calculó la fracción de respuesta acumulada (CFR, probabilidad de éxito terapéutico de un régimen de dosificación cuando no se conoce el valor de CMI), cefiderocol y aztreonam-avibactam consiguieron valores de CFR >90%, mientras que minociclina y tigeciclina lo alcanzaron únicamente a dosis incrementadas. Para levofloxacino y cotrimoxazol, sin embargo, los CFR fueron <90% incluso a dosis incrementadas (57).

Estos datos situarían a cefiderocol y aztreonam-avibactam como dos alternativas prometedoras frente a este microorganismo. Su inclusión en el informe del antibiograma está recomendado sobre todo en pacien-tes críticos con riesgo moderado-alto de rápida progresión clínica (58) **(PNT-3).** La betalactamasa L1 no hidroliza aztreonam y aunque es hidrolizado por la betalactamasa L2, ésta es inhibida por el avibactam. Así aztreonam podría actuar frente a las PBPs de *S. maltophilia*. Cefiderocol es estable frente a la acción de las metalo-betalactamasas. Varios trabajos destacan la actividad *in vitro* de estos dos nuevos betalactámicos frente a este microorganismo. En una colección de *S. maltophilia* resistentes a levofloxacino o a cotrimoxazol, la $CMI_{50/90}$ fue de ≤0.06/0.25 y 4/8 mg/L para cefiderocol y aztreonam, respectivamente. Cefiderocol inhibió el 97,9% de *S. maltophilia* a una concentración ≤1 mg/L, mientras que aztreonam/avibactam inhibió el 93.6% (44/47) a una concentración ≤8 mg/L (59). En otro trabajo se obtuvo un rango de CMIs para cefiderocol de 0.016–0.125 mg/L, y de 0.25–8 mg/L para aztreonam/avibactam (60).

A pesar de que se han documentado casos en los que estos antibióticos se han utilizado para el tratamiento de infecciones graves causadas por este microorganismo, la evidencia clínica disponible continúa siendo escasa.

4.4. *Achromobacter xylosoxidans*

A. xylosoxidans se asocia con diferentes tipos de infecciones nosocomiales, siendo las más frecuentes las respiratorias y urinarias. Así mismo, este microorganismo se aísla cada vez con más frecuencia en muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística. La **Tabla 8** recoge los principales fenotipos de resistencia a betalactámicos en *A. xylosoxydans*.

Tabla 8. Perfiles resistencia asociados

Mecanismo de resistencia	PTZ	CAZ	CAV	FDC	ATM	AAV	IMP	MER
Fenotipo silvestre	S	R	R	S	R	R	S	S
Hiperproducción de AxyXY-OprZ	S	R	R	S	R	R	S	S
Hiperproducción de AxyABM	S	R	R	r	R	R	S	R
BLEE (ej: CTX-M, VEB-1)	S	R	R	S	R	R	S	S
AmpC plasmídica (ej: CMY-2)	S	R	R	S	R	R	S	S
Carbapenemasa clase B (ej: IMP, VIM, TMB, NDM-1)	R	R	R	S/r	R	R	R	R

BLEE: betalactamasa de expectro extendido
PTZ, piperacilina/tazobactam, CAZ, ceftazidima; CEP: cefepima CAV, ceftazidima/avibactam; FDC, cefiderocol; ATM, aztreonam; AAV, aztreonam/avibactam; IMP, imipenem; MER, meropenem;
Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST. EUCAST únicamente proporciona puntos de corte para PTZ y MER. *A. xylosoxidans* se considera intrínsecamente resistente a CAZ, CAV, ATM, y AAV. S Sensibilidad silvestre, potencialmente tratable con las dosis apropiadas; r: Sensibilidad disminuida

R: resistente, r: CMI elevada o reducción en el halo de inhibición, S: Sensible

La resistencia esperada a antibióticos betalactámicos en *A. xylosoxidans* viene principalmente determinada por la presencia de dos bombas de expulsión de fármacos de la familia RND: AxyABM y AxyXY-OprZ y por la betalactamasa de clase D no inducible codificada cromosómicamente, OXA-114 (61).

AxyABM se relaciona con la expulsión de la mayoría de cefalosporinas (exceptuando cefuroxima y cefepima) y aztreonam, mientras que AxyXY-OprZ tiene la capacidad de expulsar carbapenémicos y cefepima. OXA-114 es una enzima de espectro reducido que presenta actividad hidrolítica frente a penicilina, piperacilina, ticarcilina y cefalosporinas de primera y segunda generación. Mientras que no hidroliza ceftazidima, cefotaxima ni cefepima. Imipenem es hidrolizado muy débilmente por esta enzima. OXA-114 hidroliza eficazmente piperacilina *in vitro*, sin embargo, la mayoría de aislados de *A. xylosoxidans* son sensibles a piperacilina.

Estos mecanismos intrínsecos en *A. xylosoxidans* hacen que la población silvestre presente un perfil general de resistencia esperada a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Mientras que puede presentar sensibilidad a ceftazidima, cefepima, piperacilina, meropenem e imipenem. Aunque tradicionalmente se ha considerado a este microorganismo resistente a ertapenem, según los fenotipos de resistencia esperada de las tablas EUCAST, diversos estudios sugieren que este antibiótico mantiene actividad *in vitro,* con valores de CMI50 de 0,125 mg/L (62).

Los mecanismos de resistencia adquiridos pueden ser debidos a una sobreexpresión de las bombas de expulsión o a la adquisición de elementos genéticos externos.

Sustituciones en AxyZ, que es el regulador negativo de AxyXY-OprZ, dan lugar a CMIs elevadas a cefepima mediante la sobreexpresión de dicha bomba. Mientras que la hiperproducción de AxyABM juega un papel importante en la resistencia a meropenem y ceftazidima (aislados meropenem-R imipenem-S). Así mismo, podría llegar a aumentar las CMIs de cefiderocol (63).

A. xylosoxidans posee una gran capacidad de captación genes de resistencia horizontales portadores de resistencias a betalactámicos. Se han descrito hasta la fecha numerosas betalactamasas adquiridas tales como betalactamasas de espectro reducido (PSE-1 y TEM-1), betalactamasas de espectro extendido (CTX-M y VEB-1), AmpCs plasmídicas (CMY-2) y carbapenemasas (clase B: IMP, VIM, TMB, NDM-1, clase A: AXC, clase D: OXA21) (61).

Aunque la enzima de clase AAXC-1 se ha asociado con resistencia a carbapenémicos, no se han realizado estudios cinéticos para confirmar que estos antibióticos sean un sustrato adecuado de esta enzima.

4.4.1. Estudios de sensibilidad antibiótica, información de resultados e interpretación clínica

Los datos sobre la epidemiología y la detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos en este microorganismo son muy escasos como para sacar conclusiones. Se recomienda, en aquellos aislados con CMIs altas a carbapenémicos, estudiar la posible presencia de carbapenemasas, teniendo en cuenta, sin embargo, que la resistencia a estos antibióticos puede ser debida a otros mecanismos como la sobreexpresión de bombas de expulsión. El porcentaje de productores de carbapenemasa entre los aislados resistentes a carbapenémicos se ha descrito en un 15%. El método modificado de inactivación de carbapenémicos ha demostrado una sensibilidad del 100% y una especificidad del 87%, por lo que se sugiere que podría utilizarse como método de cribado para detección de carbapenemasas, con la necesidad de una confirmación con otro método ante resultados positivos (64). Así mismo, una carbapenemasa de tipo VIM-1 se detectó correctamente con inmunocromotografía NG-Test Carba 5. El método de sinergia de doble disco utilizando la combinación de ceftazidima y ácido clavulánico detectó correctamente la producción de una BLEE (65).

Actualmente EUCAST incluye puntos de corte para *A. xylosoxidans* para meropenem (S < 1; R > 4 mg/L), piperacilina-tazobactam (S < 4; R > 4 mg/L) y cotrimoxazol (S ≤ 0.125; R > 0.125 mg/L). CLSI no incluye puntos de corte específicos para este microorganismo y si se utilizara la tabla del grupo no-enterobacterias incluida en esta guía, se deberían tener en cuenta los antibióticos para los cuales este microorganismo presenta resistencia esperada para no categorizarlos erróneamente como sensibles, aunque las CMIs *in vitro* aparecieran bajas. CLSI ha publicado unos puntos de corte provisionales para el género *Achromobacter* para meropenem, imipenem, piperacilina-tazobactam y cotrimoxazol (64). A pesar de que clínicamente se han utilizado ceftazidima, minociclina y las fluoroquinolonas para el tratamiento de este microorganismo, las CMIs para la mayoría de la población silvestre están por encima de las CMIs para las cuales se pueden alcanzar concentraciones adecuadas con las dosificaciones de los antimicrobianos para microorganismos similares, indicando una insuficiente actividad y desaconsejando por tanto su categorización (SIR) en el informe del antibiograma.

Respecto a los nuevos antimicrobianos tales como ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam y meropenem-vaborbactam, el beneficio de la combinación con el inhibidor de beta-lactamasa respecto al betalactámico en solitario parece ser limitado. Esto puede ser debido al tipo de resistencia que afecta a este microorganismo, en su mayoría bombas de expulsión y carbapenemasas de tipo MBL, frente a los cuales estos antibióticos no son activos.

La Sociedad Francesa de Microbiología incluye meropenem-vaborbactam dentro de la lista complementaria de antibióticos a probar en *A. xylosoxidans*. En un estudio se demostró que la CMI de meropenem-vaborbactam fue 4 veces menor que la de meropenem en solitario en el 28,3 % de los aislados (66).

Ceftazidima-avibactam ha demostrado ser bactericida frente a aislados procedentes de muestras respiratorias de personas con fibrosis quística, así como sinérgico con otros antibióticos como colistina, meropenem o ciprofloxacino. Los valores de CIM90 de ceftazidima/avibactam demostraron una actividad cuatro veces superior a la de la ceftazidima (67).

Aztreonam-avibactam no ha demostrado buena actividad *in vitro* (68). Por el contrario, el cefiderocol ha demostrado buena actividad *in vitro* con datos publicados de $CMI_{50/90}$ de 0.015 mg/L y 0.5 mg/L, respectivamente. Se ha descrito que el 99,1% de los aislados presentaron una CMI igual o menor a 2 mg/L (punto de corte de EUCAST para *Pseudomonas* y otros BGNNF), valor que fue del 96,2% en el subgrupo de aquellos resistentes a meropenem (69). En otra colección de aislados resistentes a carbapenémicos, la $CMI_{50/90}$ fue de 0,5 mg/L y 4 mg/L, respectivamente. Cefiderocol inhibió el 92,3% de estos aislados a una concentración de 4 mg/L (70).

La experiencia clínica sobre el uso de cefiderocol para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo es limitada. En el estudio PERSEUS se trataron con cefiderocol 5 pacientes con aislamientos con *Achromobacter* spp. obteniendo una tasa de curación clínica del 80% (71). Así mismo cefiderocol se uti-lizó para el tratamiento de 5 pacientes con infecciones diversas causadas por especies de *Achromobacter* portador de VIM, con un fracaso clínico a día 14 en 1 de ellos (72).

5. LECTURA INTERPRETADA FENOTIPOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

La baja permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* (en comparación con *E. coli*, por ejemplo) no implica resistencia intrínseca a las fluoroquinolonas. Por otra parte, la expresión basal de MexAB-OprM contribuye a la sensibilidad basal reducida a estos compuestos.

La resistencia adquirida (**Tabla 9** se debe fundamentalmente a alteraciones en las dianas ocasionadas por mutaciones en las regiones QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) de los genes *gyrA* (codifica la subunidad A de la DNA-girasa) y *parC* (codifica la subunidad A de la topoisomerasa IV) (73). Las mutaciones en los genes que codifican las subunidades B de estas enzimas (*gyrB*, *parE*) son menos relevantes en aislados clínicos. Una mutación en *gyrA* causa resistencia de bajo nivel y mutaciones simultáneas en *gyrA* y *parC* determinan un mayor grado de resistencia. Las mutaciones más frecuentes corresponden a aquellas que generan sustituciones en Thr83Ile en GyrA y Ser87Leu en ParC.

Muchas de las múltiples bombas de expulsión activa de *P. aeruginosa* son capaces de eliminar fluoroquinolonas, y la hiperexpresión MexAB-OprM o de MexXY-OprM contribuye a incrementar la resistencia mediada por otros mecanismos de forma frecuente en cepas clínicas. En la mayoría de aislados resistentes a quinolonas, hay resistencia simultánea a ciprofloxacino y levofloxacino, pero se han descrito cepas que de forma aislada hiperexpresan MexAB-OprM que son resistentes a levofloxacino pero no a ciprofloxacino (74). Por otro lado, la hiperexpresión de las bombas MexCD-OprJ o MexEF-OprN generalmente se asocia con resistencia clínica a ambas fluoroquinolonas (75). Si bien su frecuencia en cepas clínicas es baja, esta aumenta de forma notable en infecciones crónicas. Desde el punto de vista de la LIA, la hiperexpresión de bombas puede reconocerse fenotípicamente porque lleva asociada dismunición de la sensibilidad a otros antibióticos además de las quinolonas: MexAB-OprM, la mayoría de los betalactámicos; MexCD-OprJ, parti-cularmente cefepima; MexXY-OprM, cefepima y aminoglucósidos y MexEF-OprN, imipenem, por corregu-lación con OprD.

La (hiper)expresión de la acetilasa AAC(6')-Ib-cr (codificada con frecuencia por genes plasmídicos; implicada también en la resistencia a aminoglucósidos), conlleva una disminución de la sensibilidad o bajo nivel de resistencia. Varios estudios han demotrado también la presencia en aislados clínicos de *P. aeruginosa* de genes de la familia *qnr*, implicados en la resistencia de bajo nivel a quinolonas. Es controvertido si algunas variantes de la proteína CrpP (que modifica ciprofloxacino por fosforilación) contribuyen a la resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa*.

Tabla 9. Fenotipos de resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa*

Ciprofloxacino	Levofloxacino	Mecanismos de resistencia de referencia
S[a]	S	Fenotipo silvestre
r	R	Sobreexpresión de MexAB-OprM[b,c]
r/R	S	Sobreexpresión de AAC(6')-Ib-cr
R	r/R	Mutación en *gyrA*
r/R	r/R	Sobreexpresión de sistemas de expulsión activa (MexCD-OprJ, MexEF-OprN)[c]
R	R	Mutación en *gyrA* y en *parC* ± expulsión activa

[a] Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST: S: Sensibilidad silvestre, tratable con dosificación recomendada para *Pseudomonas* spp. según puntos de corte EUCAST; r: Sensibilidad disminuida de forma adquirida; R: Resistente de acuerdo con puntos de corte clínicos EUCAST.

[b]El fenotipo S/R indicado se ha relacionado con la sobreexpresión de MexAB-OprM, por mutaciones/deleciones en el regulador *mexR,* pero aún hay muy pocos estudios que confirmen esta observación.

[c] la sobreexpresión de bombas de expulsión conlleva generalmente disminución de la sensibilidad a otros antibióticos facilitando su reconocimiento fenotípico.

La baja permeabilidad de *A. baumannii* (en comparación con *E. coli* y otras enterobacterales) contribuye a disminuir la actividad de las quinolonas frente a esta especie. De entre los varios sistemas de expulsión activa, AdeIJK se expresa de forma basal y también contribuye a la resistencia a quinolonas.

La resistencia adquirida a quinolonas (**Tabla 10**) en *A. baumannii* (considerando los puntos de corte clínicos) se debe fundamentalmente a mutaciones en las regiones QRDR de *gyrA* y *parC*. Habitualmente, en las cepas resistentes, se observan mutaciones en el gen *gyrA* (Ser83Leu entre otras, que causan bajo nivel de resistencia) o en combinación con mutaciones en el gen *parC* (Ser80Leu, Glu84Lys; alto nivel de resistencia). Como en *P. aeruginosa*, las mutaciones *gyrB* y *parE* son de poca relevancia en aislados clínicos. Finalmente, las bombas de expulsión activa AdeABC y AdeM también contribuyen a aumentar la resistencia a quinolonas.

Tabla 10. Fenotipos de resistencia a quinolonas en *A. baumannii*

Ciprofloxacino	Levofloxacino	Mecanismos de resistencia de referencia
S[a]	S	Fenotipo silvestre
r/R	r	Mutación en *gyrA* ± Expulsión activa
R	R	Mutación en *gyrA* y en *parC* ± Expulsión activa

[a] Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST: S: Sensibilidad silvestre, tratable con dosificación recomendada para *Pseudomonas* spp. según puntos de corte EUCAST; r: Sensibilidad disminuida de forma adquirida; R: Resistente de acuerdo con puntos de corte clínicos EUCAST.

S. maltophilia contiene un gen intrínseco de la familia Qnr (Sm*qnr,* del que se conocen múltiples alelos) que protege las dianas de las quinolonas y contribuye a un bajo nivel de resistencia basal a quinolonas, aunque no llega a aumentar la CMI de levofloxacino (el compuesto más habitualmente usado en clínica para este microorganismo) por encima del punto de corte clínico. El sistema de expulsión activa SmeDEF también confiere resistencia a estos compuestos. Su sobreexpresión o la de SmQnr pueden causar resistencia de relevancia clínica. La RNasa G regula la expresión de la respuesta al choque térmico en *S. maltophilia*, implicado en el aumento de la resistencia a quinolonas en esta especie.

Un aspecto particular de esta especie es que las mutaciones en los genes que codifican las subunidades de las topoisomerasas de tipo II (DNA-girasa, topoisomerasa IV) son de mínima relevancia, a diferencia de lo observado en muchos otros BGNNF o en Enterobacterales. No es infrecuente encontrar en *S. maltophilia* aislados sensibles a ácido nalidíxico y resistentes a fluoroquinolonas (fenotipo que en enterobacterales se

relaciona con la producción de proteínas Qnr).

Aunque se conocen cepas con resistencia adquirida a quinolonas (bajo nivel) causada por la adquisición de un plásmido que codifica la acetilasa AAC(6')Ib-cr, el papel de otros genes plasmídicos de resistencia a quinolonas (como los de la familia *qnr*) no parece importante en *S. maltophilia.*

EUCAST no ha definido puntos de corte clínicos para quinolonas frente a *A. xylosoxidans*. Los dos sistemas de expulsión activa principales de esta especie, AxyABM y AxyXY-OprZ eliminan estos compuestos. En esta especie también se ha descrito la adquisición de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas (*aac-(6´)-Ib-cr, qnrA, oqxA, oqxB*) y la aparición de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* en cepas resistentes a estos compuestos (76).

5. 1. Información de resultados e interpretación clínica

En *P. aeruginosa*, los actuales puntos de corte clínicos de EUCAST para ciprofloxacino y levofloxacino no permiten reconocer la categoría clínica "sensible (S)" para cepas con fenotipo silvestre, sino la de "sensible cuando se incrementa la exposición (I)". Dadas las diferencias en la actividad intrínseca de las dos quinolonas y su desigual afectación por algunos mecanismos de resistencia en esta especie, es aconsejable incluir ambos compuestos en el informe de antibiograma. En *P. aeruginosa*, aún no se han establecido puntos de corte para otras fluoroquinolonas de posible interés clínico, incluyendo delafloxacino (para la que sí se ha definido un ECOFF de 2 mg/L). Orientativamente, la FDA (https://www.fda.gov/drugs/development-resources/delafloxacin-injection-and-oral-products) marca puntos de corte para delafloxacino en *P. aeruginosa* de <=0.5 mg/l (sensibilidad) y >=2 mg/L (resistencia).

Para *A. baumannii,* EUCAST considera que solo cabe la categoría "sensible cuando se incrementa la exposición (I)" para ciprofloxacino, pero que sí es posible definir la categria "sensible (S")" para levofloxacino. Por esta razón es adecuado informar ambos compuestos. Para otras quinolonas, no hay puntos de corte clínicos.

Aunque EUCAST no ha definido puntos de corte de quinolonas para *S. maltophilia*, estos compuestos (sobre todo levofloxacino) se han usado -con frecuencia en combinación- para el tratamiento de las infecciones por este microorganismo. Como referencia, puede tenerse en cuenta el ECOFF de levofloxacino para reconocer cepas con mecanismos de resistencia adquiridos (**Tabla 1**).

Finalmente, en *A. xylosoxidans*, al no haberse establecido aún por EUCAST puntos de corte de EUCAST (ni clínicos, ni ECOFF), la interpretación de los valores de CMI de ciprofloxacino y levofloxacino debe guiarse por el documento específico para esta situación (When there are no breakpoints in breakpoint tables; https://www.eucast.org/bacteria/guidance-documents).

6. LECTURA INTERPRETADA FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

La resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* puede deberse a múltiples causas que, frecuentemente, coinciden en un mismo aislado. Los mecanismos implicados incluyen: (a) la disminución de la acumulación intracelular del antimicrobiano, especialmente en relación con la (hiper)expresión de la bomba de expulsión activa MexXY-OprM, (b) la producción de enzimas que modifican grupos OH o NH_2 de los aminoglucósidos (enzimas modificadoras de aminoglucósidos, EMAs) y (c) la metilación del rRNA 16S por diversas metiltransferasas (metilasas) (76).

La resistencia adquirida en *P. aeruginosa* (T**abla 11**) se debe, más frecuentemente, a la producción de EMAs. De las tres grandes familias de este tipo de enzimas [acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas o

nucleotidiltransferasas (AAD o ANT) y fosfotransferasas (APH)], en *P. aeruginosa*, los EMAs más comunes pertenecen a la familia de las acetiltransferasas y las más infrecuentes (en la mayoría de estudios) son las fosfotransferasas. En la **Tabla 11** se recogen los fenotipos más frecuentes de sensibilidad/resistencia considerando solamente tobramicina, amikacina y gentamicina y las enzimas que primariamente los causan (gentamicina es de escaso interés terapéutico para *P. aeruginosa*, pero es de ayuda para inferir mecanismos de resistencia en esta especie). Existe una doble nomenclatura para las EMAs. La primera hace referencia a la proteína (AAC, AAD/ANT, APH), la posición de la molécula de aminoglucósido donde se produce la modificación (número arábigo, seguido de uno o dos apóstrofes dependiendo del núcleo del aminoglucósido afectado), el fenotipo al que ello conduce (número romano) y la variante concreta de que se trate [letra(s) minúscula (s)]. La segunda consiste en nombrar directamente el gen que codifica el enzima en cuestión, con el código de tres letras minúsculas y una mayúscula empleado en denominación génica. No es infrecuente que en un mismo estudio se identifiquen unas EMAs haciendo referencia a la proteína y otras haciendo referencia al gen correspondiente. Para mayor confusión, las bases de datos no están adecuadamente depuradas y, en ocasiones, para una misma secuencia de aminoácidos o nucleótidos se han acuñado nombres diferentes.

Las metilasas añaden un grupo -CH_3 a residuos específicos del sitio A del 16S rRNA y causan resistencia de alto nivel (habitualmente mayor que el debido a EMAs) a tobramicina, amikacina y gentamicina (y a muchos otros aminoglucósidos con el núcleo 2-deoxyestreptamina, 2-DOS). Estas enzimas están codificadas por genes *armA*, *rmt* (múltiples alelos A, B, C, D, EF, G, H) y *nmp* (alelos A y B). ArmA y las proteínas de la familia Rmt metilan el residuo G1405 del rRNA 16S y causan resistencia a compuestos con una doble sustitución 4,6 en 2-DOS (gentamicina, tobramicina, amikacina, entre otros). NmpA y NmpB metilan el residuo G1408 del rRNA 16S y causan resistencia a compuestos tipo 2-DOS con una doble sustitución en las posiciones 4 y 6 o en las posiciones 4 y 5 (neomicina) o que tienen una única sustitución en 2-DOS (apramicina). La estreptomicina (que no es un derivado 2-DOS) no se afecta por estas enzimas. En *P. aeruginosa,* las metilasas más frecuentes son las de la familia Rmt (en particular RmtD), pero también se ha descrito ArmA y NmpA.

MexXY-OprM se expresa de forma basal e inducible (contribuyendo a la resistencia intrínseca a aminoglucósidos), pero diversas mutaciones en reguladores de este sistema de expulsión activa conducen a su hiperexpresión, lo que incrementa el nivel de resistencia, afectando más a amikacina que a tobramicina. Otro mecanismo de resistencia mutacional a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* de más reciente descripción es la modificación de la diana por mutación del gen *fusA1* que codica el factor de elongación G (74).

La resistencia adquirida en *A. baumannii* a aminoglucósidos (**Tabla 11**) también se debe más habitualmente a la producción de EMAs, siendo más frecuentes en esta especie las fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas que las acetilasas. Un fenotipo relevante en esta especie es la resistencia a amikacina no acompañada de resistencia a tobramicina y gentamicina (fenotipo mucho menos frecuente en otros BGNNF), que se suele deber a la presencia de una fosfotransferasa (**Tabla 11**).

Las metilasas causan resistencia de alto nivel a tobramicina, amikacina y gentamicina y los fenotipos derivados de su expresión cumplen lo indicado previamente para *P. aeruginosa.* La enzima más relevante en *A. baumannii* es ArmA. Menos frecuentes son las metilasas de la familia Rmt.

La sobreexpresión del sistema de expulsión activa AdeABC se ha relacionado con un aumento de la CMI de diversos aminoglucósidos, siendo el efecto más marcado con gentamicina (y netilmicina) que con tobramicina o amikacina (77). La sobreexpresión también afecta a las fluoroquinolonas.

La resistencia a aminoglucósidos en *S. maltophilia* se ha relacionado principalmente con bombas de expulsión activa y con EMAs; también se ha dado especial importancia a los trastornos de la permeabilidad relacionados con cambios en el lipopolisacárido o en proteínas de membrana externa. Las proteasas intrínsecas ClpA y HtxP se hiperexpresan en presencia de aminoglucósidos.

El sistema SmeDEF afecta a aminoglucósidos y quinolonas, así como a algunos betalactámicos. Ciertas

mutaciones en *rplA* (gen que codifica una proteína de la subunidad 50S del ribosoma) conducen a la hiperexpresión del sistema SmeYZ, lo que causa resistencia a los aminoglucósidos (78).

S. maltophilia puede contener EMAs intrínsecas. Las más frecuentes son las fosfotransferasas y las acetilasas. AAC(6')-Iz, AAC(6')-Iak y AAC(6')-Im contribuyen a la resistencia natural a tobramicina y amikacina. Muchas cepas también producen APH (3')-IIc, pero este enzima no afecta a gentamicina, tobramicina o amikacina (aunque sí a otros sustratos de poca relevancia clínica). Se han identificado cepas con resistencia adquirida en relación con AAC (6`)-Ib-cr.

Se considera que el principal determinante de resistencia intrínseca de alto nivel a aminoglucósidos en *A. xylosoxidans* es AxyXY-OprZ, que también elimina fluoroquinolonas. Hay poca información sobre la importancia de otros mecanismos.

Existen varios factores que limitan una lectura interpretada del antibiograma de aminoglucósidos frente a bacilos gramnegativos no fermentadores: diferentes grupos de EMAs, y de enzimas concretos dentro de cada grupo, pueden causar el mismo fenotipo de resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina; además, en un mismo aislado pueden existir varias EMAs (acompañadas, a veces, de mecanismos de resistencia adicionales), por lo que es muy difícil inferir a partir del fenotipo el o los enzimas responsables del mismo. El análisis fenotípico podría completarse con otros muchos aminoglucósidos que raramente se estudian en el laboratorio clínico (y, menos aún, se utilizan para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos).

Por todo ello, en la actualidad, se prefiere la detección del gen o los genes que contenga un determinado aislado bacteriano, ya sea usando PCR múltiple -dirigida a las EMAs/metilasas más frecuentes- o mediante secuenciación del genoma completo. Al emplear estas aproximaciones genéticas, conviene recordar que las bases de datos disponibles arrastran los problemas de nomenclatura que se han señalado previamente. La demostración de la hiperexpresión de MexXY-OprM requiere estudios más complejos, como la cuantificación de *mexXY* mediante RT-PCR, difícilmente aplicables en el trabajo diario.

Tabla 11. Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* y en *A. baumannii.*

Gentamicina	Tobramicina	Amikacina	Mecanismos de resistencia[a]
S[b]	S	S	Fenotipo silvestre
S	S	R	APH(3')-VI
R	S	S	AAC(3)-I
S (r)	R	R	AAC(6')-I
R	R	S	AAC(3)-II AAC(3)-IV AAC(6')-II ANT(2'')-I
r/R	r/R	r/R	Sobreexpresión de bomba(s) de expulsión activa[c]
R	R	R	Metilasas EMA[d]+Expulsión activa[c]+Permeabilidad

[a]Se indica el grupo de enzimas responsables por sí mismas del fenotipo correspondiente; dentro de este grupo pueden existir múltiples variantes concretas de enzima que no se especifican en la tabla.

[b] Las abreviaturas de la Tabla no se corresponden necesariamente con las categorías clínicas de EUCAST: S: Sensibilidad silvestre, tratable con dosificación recomendada para *Pseudomonas* spp. según puntos de corte EUCAST; r: Sensibilidad disminuida de forma adquirida; R: Resistente de acuerdo con puntos de corte clínicos EUCAST.

[c]Fundamentalmente, MexXY-OprM (*P. aeruginosa*) y AdeABC (*A. baumannii*).

[d]EMA: Enzima modificadora de aminoglucósidos.

6. 1. Información de resultados e interpretación clínica

EUCAST hizo público en 2020 un documento sobre implementación y uso de los puntos de corte revisados para aminoglucósidos (accesible en https://www.eucast.org/bacteria/ guidance-documents), en el que se abordan detalladamente aspectos claves de la interpretación del antibiograma y el uso en la práctica clínica de estos compuestos.

Para infecciones con origen en el tracto urinario, se informan los resultados de tobramicina y amikacina para *P. aeruginosa* y de gentamicina, tobramicina y amikacina para *A. baumannii*, empleando los puntos de corte clínicos de EUCAST para esta circunstancia. Para otro tipo de infecciones causadas por ambos microorganismos, se han establecido puntos de corte entre paréntesis para estos compuestos, y su valoración se recoge detalladamente en un documento de EUCAST (EUCAST breakpoints in Brackets; https://www.eucast.org/bacteria/ guidance-documents). Los puntos de corte entre paréntesis se aplican a compuestos para los que habitualmente se carece de pruebas de su utilidad en monoterapia, aunque su uso puede ser de interés en combinación con otros antimicrobianos; estos puntos de corte representan, en última instancia, valores de ECOFF que diferencian aislados con/sin mecanismos de resistencia adquiridos.

Gentamicina no es de interés práctico para *P. aeruginosa* (ECOFF de 8 mg/L, frente al ECOFF de 2 mg/L de tobramicina), pero los valores (elevados) de CMI de este compuesto pueden ser de alguna utilidad en la interpretación de los fenotipos de resistencia de esta especie, como se recoge en la **Tabla 1**.

En ausencia de puntos de corte clínicos o EOCFF de EUCAST para aminoglucósidos y *S. maltophilia* o *A. xylosoxidans*, si en alguna circunstancia fuera necesaria la interpretación de los valores de CMI de estos compuestos (no aconsejada explícitamente), esta debe guiarse por el documento específico para esta situación (When there are no breakpoints in breakpoint tables; https://www.eucast.org/bacteria/guidance-documents).

7. LECTURA INTERPRETADA FENOTIPOS DE RESISTENCIA A POLIMIXINAS, TETRACICLINAS, COTRIMOXAZOL Y OTROS ANTIBIÓTICOS DE INTERÉS CLÍNICO

La **Tabla 12** recoge los principales mecanismos de resistencia a polimixinas, tetraciclinas, cotrimoxazol en *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans*.

El desarrollo de resistencia a polimixinas en *P. aeruginosa* generalmente implica la modificación del LPS mediada por mutaciones en los sistemas de dos componentes PmrAB, PhoPQ o ParRS. Además de la resistencia a polimixinas las mutaciones en ParRS pueden generar fenotipos de multirresistencia ya que también regula la porina OprD y la bomba MexXY. La resistencia transferible a polimixinas se da por la adquisición horizontal de genes plasmídicos, siendo el más frecuente el *mcr*-1, que codifica una enzima fosfoetanolamina transferasa que también modifica el lípido A del LPS reduciendo la afinidad de las polimixinas. Aunque más común en enterobacterales, hay preocupación creciente por su posible diseminación a *P. aeruginosa.* La resistencia a polimixinas en *P. aeruginosa* sigue siendo relativamente baja (<10%), pero está aumentando, especialmente en entornos hospitalarios con uso frecuente de esta opción terapéutica de último recurso.
Las polimixinas son activas contra la mayoría de los aislados de *A. baumannii*, pero se han descrito aislados resistentes a la colistina. Hasta la fecha, se han descrito dos mecanismos principales que proporcionan resistencia a la colistina en *A. baumannii*:

- Mutaciones en *pmrA*/*pmrB* que adicionan fosfoetanolamina al lípido A del lipopolisacárido (LPS) modificándolo. Esto proporciona una carga positiva al LPS, impidiendo la unión de la colistina. Es el mecanismo más común.
- Pérdida completa del LPS causada por mutaciones o por la inactivación insercional de los genes de biosíntesis del lípido A (*lpxA*, *lpxC* y *lpxD*). Este mecanismo confiere una alta resistencia a la colistina (CMI > 128 mg/L).

Se ha sugerido que otros mecanismos como la modificación de la distribución de los lípidos en la membrana externa o bombas de expulsión pueden estar también implicadas en el fenotipo de resistencia a la colistina en *A. baumannii*. La transferencia horizontal de resistencia a polimixinas parece poco relevante hasta ahora en este patógeno.

El mecanismo de resistencia más relevante a polimixinas en *S. maltophilia* son las bombas de expulsión, destacando *macABCsm* y *smeGH*. La resistencia a polimixinas en *A. xylosoxidans* es un fenómeno prevalente y suele deberse a modificaciones del lípido A del LPS y a bombas de expulsión, especialmente sistemas RND más que a transferencia horizontal de resistencia.

El principal mecanismo de resistencia a tetraciclinas en *A. baumannii* es la hiperproducción de bombas de expulsión mediadas por el cromosoma (AdeABC, AdeIJK o AdeDE). Otros mecanismos, como la presencia de TetA o TetB (bombas de expulsión), TetX (monoxigenasa), o TetM (protección ribosoma), o las mutaciones en los genes *trm* (metiltransferasa) o *plsC* (aciltransferasa), pueden estar también implicados de una manera más minoritaria en la resistencia a tigeciclina en este patógeno.

El mecanismo de resistencia a tetraciclinas en *S. maltophilia* más importante son las bombas de expulsión RND, principalmente SmeDEF y SmeIJK, cuya sobreexpresión disminuye la concentración intracelular de tetraciclinas. En *A. xylosoxidans* son las bombas de expulsión RND, particularmente *Axy XY-Oprz*.

El trimetoprim/sulfametoxazol ha sido considerado históricamente el tratamiento de elección de las infecciones por *S. maltophilia* y, por ello, es de particular relevancia la vigilancia de su resistencia. Los principales mecanismos implicados en su resistencia son (79,80):

- Desarrollo de variantes de colonia pequeñas (*small colony variants*, SCV), principalmente en infecciones crónicas como fibrosis quística, ligadas a deficiencias en la vía de la dihidrofolato reductasa y auxotrofías para hemina, metionina o timidina.
- La hiperproducción de bombas de expulsión SmeVWX y/o SmeDEF.
- La transferencia horizontal de genes, integrones, elemento de inserción región común 2 (ISCR2), transposones o plásmidos con genes *sul1*, *sul2* y *dfrA*

La resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol en *A. xylosoxidans* puede estar mediada por elementos móviles como *sul1*, *sul2* o *sul3* y variantes del gen *dfr.*

Tabla 12. Principales mecanismos de resistencia adquiridos a polimixinas, tetraciclinas, cotrimoxazol en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. maltophilia*.

Antimicrobiano	**Patógeno**	**Mecanismo de resistencia**	**Genes implicados**
Polimixinas	*P. aeruginosa*	Modificación LPS	*pmrAB/phoPQ/ParRS*
	A. baumannii	Modificación LPS	*pmrAB*
		Pérdida LPS	*lpxA, lpxC*, *lpxD*
	S. maltophilia	Bomba expulsión RND, ABC	*macABCsm, smeGH*
	A. xylosoxidans	Bombas expulsión RND Modificación LPS	*axyXY-oprZ/axyABM*
Tetraciclinas	*A. baumannii*	Bombas expulsión RND, MSF	*adeABC, adeIJK, adeDE, tetA/tetB*
	S. maltophilia	Bomba expulsión RND, ABC	*sme*IJK, *sme*DEF
	A. xylosoxidans	Bombas expulsión RND	*axyXY-oprZ*
Trimetoprim/sulfametoxazol	*S. maltophilia*	Bomba expulsión RND	*sme*VWX, *sme*YZ
		Variantes colonia pequeña	*dhfr*
		Transferencia horizontal	*sul*1, *sul*2 y *dfr*A
	A. xylosoxidans		*sul*1, *sul*2 y *sul3* *dfr*

7. 1.Información de resultados e interpretación clínica

La sensibilidad de colistina debe determinarse mediante microdilución en caldo, no por tiras de gradiente de antibiótico ni por disco difusión. En los últimos años, los puntos de corte de la colistina han sido objeto de debate ya que parece que es difícil alcanzar una exposición adecuada al fármaco sin aumentar el riesgo de nefrotoxicidad. CLSI decidió clasificar los microorganismos silvestres como “intermedios” a la colistina. Esto no se ajustaba a las definiciones de EUCAST S/I/R, ya que esta “categoría I” no se puede controlar mediante una exposición incrementada del fármaco. Recientemente, EUCAST ha introducido el uso de paréntesis en los puntos de corte de colistina. En esencia, significa que los puntos de corte se pueden utilizar para distinguir entre bacterias con y sin mecanismos de resistencia adquirida, pero que la colistina no debe utilizarse en monoterapia a menos que se utilice en infecciones en las que se pueda lograr una alta exposición en el sitio de la infección (infecciones del tracto urinario).

El trimetoprim/sulfametoxazol es el único antimicrobiano para el cual se dispone de puntos de corte de EUCAST en *S. maltophilia*, tanto para técnica de disco difusión como para la de microdilución en caldo. Cuando se realiza el disco difusión puede observarse un ligero crecimiento dentro de la zona de inhibición que debe ignorarse, por lo que se debe medir el diámetro del halo exterior. Como la resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol es poco frecuente (<10%), debe confirmarse mediante determinación de CMI. El punto de corte de resistencia ha disminuido de 4 a 2 mg/L en 2025. Para el resto de alternativas de antimicrobianos (cefiderocol, aztreonam/avibactam, quinolonas y tetraciclinas) existen puntos de corte ECOFF para excluir mecanismos de resistencia adquiridos.

Actualmente no existen puntos de corte clínicos EUCAST para informar la sensibilidad a minociclina o tigeciclina en *A. baumannii* por evidencia insuficiente. De igual forma la rifampicina no se recomienda como tratamiento de primera línea de infecciones por *A. baumannii*. A pesar de que estudios *in vitro* y experimentales han mostrado actividad bactericida y sinergia de rifampicina en combinación con otros antibióticos (como colistina, imipenem, sulbactam o tigeciclina), estos resultados no se han traducido en beneficios clínicos consistentes. Además, el uso de rifampicina está limitado por su perfil de toxicidad y potenciales interacciones. Por lo tanto, su uso solo podría considerarse en situaciones excepcionales y siempre en combinación.

8. REGLAS BÁSICAS DE GESTIÓN DEL ANTIBIOGRAMA

La información proporcionada por el antibiograma tiene gran importancia tanto clínica como epidemiológica, ya que condiciona la elección del tratamiento más adecuado y constituye un elemento fundamental en los programas PROA y en el control de la resistencia bacteriana. La selección de los antibióticos a informar, así como la inclusión de comentarios interpretativos deberían ser consensuados en cada centro en el seno de los equipos PROA, con el fin de adaptar el informe de antibiograma a las necesidades y particularidades clínicas de cada hospital y área sanitaria. La notificación selectiva de antibióticos, el informe en cascada, la inclusión de antibióticos de reserva, así como la incorporación de comentarios interpretativos constituyen herramientas fundamentales para una correcta gestión del antibiograma. Algunos softwares de sistemas automatizados de sensibilidad antibiótica, así como algunos SIL permiten la configuración predefinida de filtros de antibióticos.

8. 1. Notificación selectiva de antibióticos e informe en cascada

La notificación selectiva consiste en informar únicamente aquellos antimicrobianos que son apropiados como opciones terapéuticas de primera o segunda línea para el microorganismo aislado, el tipo de infección y el paciente. Este principio busca dirigir el tratamiento más adecuado, disminuir el uso de antibióticos de amplio espectro y/o prescripciones inapropiadas, reduciendo el impacto ecológico y el riesgo de aparición de resistencias (81, 82). La notificación selectiva debe adaptarse al contexto local y a las guías terapéuticas vigentes.

En nuestro entorno, y como referencia, se pueden considerar las categorías A-B-C-D (esta no tiene interés en BGNNF) y E del COESANT que se mencionan en el apartado 2 de este documento.

En la notificación selectiva se puede tener en cuenta, además:

• Tipo de infección: adaptar los antibióticos a informar según la localización de la infección; no informar antibióticos de uso exclusivo oral en infecciones graves como bacteriemias o meningitis; obviar antibióticos con baja biodisponibilidad o inactivación en el lugar de la infección, p. ej. tetraciclinas en foco urinario).

• Paciente: informar los antibióticos de uso oral en pacientes ambulantes; adecuar el informe a población pediátrica, etc.

Al margen de la notificación selectiva e informe en cascada, se recomienda informar los resultados de antibióticos resistentes (p.ej., resistencia a carbapenémicos con otros betalactámicos sensibles) así como los empleados en el tratamiento del paciente si se conoce. También puede ser útil informar, además de los antibióticos de elección adecuados, las resistencias intrínsecas a los antibióticos de uso más difundido, ya sea como "resistente" en el antibiograma o mediante comentario. En el caso de muestras polimicrobianas, es aconsejable intentar informar los resultados de manera que se puede elegir una opción adecuada común para los microorganismos informados.

8. 2.Inclusión de antibióticos de reserva según criterios clínicos y epidemiológicos

Los antibióticos de reserva o "antimicrobianos de último recurso" (como colistina, ceftazidima–avibactam, aztreonam-avibactam, tigeciclina, cefiderocol, imipenem-relebactam, meropenem-vaborbactam, entre otros) deben incluirse en el antibiograma de manera controlada, en base a criterios clínicos o epidemiológicos justificados y teniendo en cuenta los informes de posicionamiento terapéutico emitidos por la Agencia Española del Medicamento o las agencias autonómicas. Como criterios clínicos para su inclusión se pueden considerar la gravedad de la infección (bacteriemias, meningitis, neumonía intrahospitalaria o sepsis grave pueden requerir un espectro ampliado), el fracaso terapéutico documentado, alergia o contraindicación, o presencia de microorganismos multirresistentes o resistentes a los antibióticos de primera línea. La detección de brotes o incrementos locales de resistencia (donde la disponibilidad de nuevos antibióticos resulta crucial para el control), la vigilancia de resistencia emergente o la adaptación a patrones locales de resistencia serían criterios epidemiológicos a tener también en cuenta. CLSI recomienda solo testar e informar bajo petición clínica motivada estos antibióticos, aunque también puede resultar práctico, para conocer la epidemiología local y conocer la respuesta frente a nuevos antibióticos, testar de rutina en casos seleccionados, e informar únicamente bajo petición o consenso previo con el equipo PROA.

8. 3.Comentarios interpretativos en el informe de sensibilidad

Los comentarios interpretativos cumplen un papel formativo y clínico esencial. Estos mensajes aclaratorios tienen diferentes funciones como orientar al prescriptor en la selección del tratamiento adecuado, informar los mecanismos de resistencia detectados o advertir sobre resistencias relevantes o resistencias cruzadas, entre otros. El uso de comentarios interpretativos mejora la comunicación entre el laboratorio de Microbiología y el profesional clínico a cargo del paciente, favorece la prescripción adecuada y reduce la variabilidad entre profesionales.

Los comentarios pueden corresponder a diferentes circunstancias:

1. Comentarios interpretativos (explican el significado del resultado): ayudan a entender por qué un resultado debe interpretarse de cierta manera, p.ej., "Sensible exposición incrementada: se requieren dosis altas o ajuste del régimen de dosificación para incrementar la exposición a este antibiótico".
2.Comentarios informativos sobre un mecanismo de resistencia detectado, posibles resistencias cruzadas, o resistencias naturales: p.ej., "Cepa productora de BLEE o carbapenemasa".
3.Comentarios relacionados con la multirresistencia. En el caso de *P. aeruginosa,* se puede hacer referencia a los perfiles de multirresistencia (MDR), resistencia extensa (XDR) o resistencia con difícil tratamiento (DTR).
4.Comentarios orientativos de tratamiento: hacen sugerencias explícitas para favorecer el uso de antibióticos más apropiados.
5.Comentarios sobre limitaciones técnicas del análisis: aclaraciones cuando existen particularidades del

método o del microorganismo, áreas de incertidumbre técnica, ausencia de puntos de corte interpretativos.
6.Comentarios relacionados con la muestra o el sitio anatómico: ayudan a contextualizar el resultado según el tipo de infección, p.ej., en relación con los puntos de corte de meropenem para *P. aeruginosa* en función de si se trata de meningitis o de otro tipo de infección.
7.Comentarios relacionados con los antibióticos o propiedades PK/PD: p.ej., uso combinado en el caso de aminoglucósidos o colistina.
8. Comentarios sobre antibióticos no informados: cuando se aplica la notificación selectiva y el informe en cascada, se debe aclarar por qué ciertos antibióticos no se muestran o cuándo pueden solicitarse.

9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este procedimiento es de utilidad para evaluar la sensibilidad a los antibióticos e interpretar los antibiogramas de los principales BGNNF. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que sólo se pueden obtener datos fiables si las técnicas de estudio de la sensibilidad antibiótica han sido realizadas mediante procedimientos estandarizados y con sistemas que garanticen la fiabilidad y calidad de los mismos.

Este procedimiento no hace referencia a antibiogramas de muestra directa ni a la predicción de resistencias basados en técnicas de secuenciación masiva.

Este documento recoge los mecanismos de resistencia y la interpretación del antibiograma de los BGNNF más habituales y relevantes clínicamente, pero quedan fuera del alcance muchas otras especies aisladas con menor frecuencia y/o con menor impacto clínico. Dada la notable diversidad fenotípica y genética de las diferentes especies clasificadas tradicionalmente como BGNNF, no es posible extrapolar los fenotipos y mecanismos a otras no incluidas en el procedimiento.

Una limitación importante es la posible falta de disponibilidad de los nuevos antibióticos en los paneles comerciales y/o la falta de concentraciones adecuadas para la categorización SIR.

Los test fenotípicos presentan limitaciones debido a la falta de estandarización metodológica. Adicionalmente, estos métodos resultan inadecuados para la detección de las carbapenemasas tipo OXA. Las inmunocromatografías habitualmente empleadas para la detección de carbapenemasas no detectan las OXA-CP de *A. baumannii.* Las técnicas moleculares comerciales también tienen limitaciones, como la detección y diferenciación de betalactamasas tipo GES.

La evidencia disponible sobre algunos mecanismos de resistencia antimicrobiana emergente es limitada. Además, dado que la resistencia a los antimicrobianos evoluciona continuamente, es posible la aparición de nuevos mecanismos de resistencia que no estén contemplados en este procedimiento.

10. BIBLIOGRAFÍA CLAVE

1. J. Calvo, R. Cantón, F. Fernánzez-Cuenca, B. Miralles, F. Navarro. Procedimiento nº 38. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia. Procedimientos de Microbiología Clinica SEIMC (R. Cantón y E. Cercenado Eds). 2011.
2. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. Diagnostics (Basel). 2019 May 3;9(2):49. doi:10.3390/diagnostics9020049. PMID: 31058811; PMCID: PMC6627445.
3. Richter, S.S.; Ferraro, M.J. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In Manual of Clinical Microbiology, 10th ed.; American Society of Microbiology: Sterling, VA, USA, 2011; pp. 1144–1154.
4. Cantón R, Oliver A, Alós JI, de Benito N, Bou G, Campos J, Calvo J, Canut A, Castillo J, Cercenado E, Domínguez MÁ, Fernández-Cuenca F, Guinea J, Larrosa N, Liñares J, López-Cerero L, López-Navas A, Marco F, Mirelis B,

Moreno-Romo MÁ, Morosini MI, Navarro F, Oteo J, Pascual Á, Pérez-Trallero E, Pérez-Vázquez M, Soriano A, Torres C, Vila J, Martínez-Martínez L. Recommendations of the Spanish Antibiogram Committee (COESANT) for selecting antimicrobial agents and concentrations for in vitro susceptibility studies using automated systems. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2020 Apr;38(4):182-187. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2019.01.017. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30878313.

5. CLSI. Performance S*tandards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 35th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2025.

6. CA-SFM / EUCAST: Société Française de Microbiologie Ed ; 2025 v1.1 juillet 2025.

7. The WHO AWaRe (Access, Watch, Reserve) antibiotic book. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

8. Rivera A, Viñado B, Benito N, Docobo-Pérez F, Fernández-Cuenca F, Fernández-Domínguez J, Guinea J, López-Navas A, Moreno MÁ, Larrosa MN, Oliver A, Navarro F. Recommendations of the Spanish Antibiogram Committee (COESANT) for in vitro susceptibility testing of antimicrobial agents by disk diffusion. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2023 Nov;41(9):571-576. doi:10.1016/j.eimce.2022.12.009. Epub 2023 Jan 5. PMID: 36610835.

9. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

10.Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, Spaulding AB, Ricotta E, Prevots DR, Palmore TN, Rhee C, Klompas M, Dekker JP, Powers JH 3rd, Suffredini AF, Hooper DC, Fridkin S, Danner RL; National Institutes of Health Antimicrobial Resistance Outcomes Research Initiative (NIH–ARORI). Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-line Agents. Clin Infect Dis. 2018 Nov 28;67(12):1803-1814. doi: 10.1093/cid/ciy378.

11. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, Beşli Y, Bogaerts P, Cantón R, Cimen C, Croughs PD, Denis O, Giske CG, Graells T, Daniel Huang TD, Iorga BI, Karatuna O, Kocsis B, Kronenberg A, López-Causapé C, Malhotra-Kumar S, Martínez LM, Mazzariol A, Meyer S, Naas T, Notermans DW, Oteo-Iglesias J, Pedersen T, Pirš M, Poeta P, Poirel L, Pournaras S, Sundsfjord A, Szabó D, Tambić-Andrašević A, Vatcheva-Dobrevska R, Vitkauskienė A, Jeannot K; ESGARS-ISARPAE members. Pseudomonas aeruginosa antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. Clin Microbiol Infect. 2024 Apr;30(4):469-480.

12. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β-lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. FEMS Microbiol Rev. 2017;41:781-815. doi: 10.1093/femsre/fux043.

13. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2015 Apr;28(2):337-418.

14.Oliver A, Arca-Suárez J, Gomis-Font MA, González-Pinto L, López-Causapé C Emerging resistance mechanisms to newer β-lactams in Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect. 2025 Nov;31(11):1790-1796

15. Mack AR, Hujer AM, Mojica MF, Taracila MA, Feldgarden M, Haft DH, Klimke W, Prasad AB, Bonomo RA. β-Lactamase diversity in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2025 Mar 5;69(3):e0078524. doi: 10.1128/aac.00785-24. Epub 2025 Feb 10. PMID: 39927781.

16. Reyes J, Komarow L, Chen L, Ge L, Hanson BM, Cober E, Herc E, Alenazi T, Kaye KS, Garcia-Diaz J, Li L, Kanj SS, Liu Z, Oñate JM, Salata RA, Marimuthu K, Gao H, Zong Z, Valderrama-Beltrán SL, Yu Y, Tambyah P, Weston G, Salcedo S, Abbo LM, Xie Q, Ordoñez K, Wang M, Stryjewski ME, Munita JM, Paterson DL, Evans S, Hill C, Baum K, Bonomo RA, Kreiswirth BN, Villegas MV, Patel R, Arias CA, Chambers HF, Fowler VG Jr, Doi Y, van Duin D, Satlin MJ; Antibacterial Resistance Leadership Group and Multi-Drug Resistant Organism Network Investigators. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and associated carbapenemases (POP): a prospective cohort study. Lancet Microbe. 2023 Mar;4(3):e159-e170. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00329-9. Epub 2023 Feb 9. PMID: 36774938

17. Sastre-Femenia MÀ, Fernández-Muñoz A, Gomis-Font MA, Taltavull B, López-Causapé C, Arca-Suárez J, Martínez-Martínez L, Cantón R, Larrosa N, Oteo-Iglesias J, Zamorano L, Oliver A; GEMARA-SEIMC/CIBERINFEC Pseu-

domonas study Group. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility profiles, genomic epidemiology and resistance mechanisms: a nation-wide five-year time lapse analysis. Lancet Reg Health Eur. 2023 Sep 19;34:100736. doi: 10.1016/j.lanepe.2023.100736. eCollection 2023 Nov. PMID: 37753216

18. Warecki BA, Tamma PD, Bonomo RA, Vila AJ. NDM-driven cefiderocol resistance: ef-fect and therapeutic considerations. Lancet Infect Dis. 2025 Oct;25(10):1068-1069. doi: 10.1016/S1473-3099(25)00477-3. Epub 2025 Aug 11. PMID: 40812339

19. Moya B, Barcelo IM, Bhagwat S, Patel M, Bou G, Papp-Wallace KM, Bonomo RA, Oli-ver A. WCK 5107 (Zidebactam) and WCK 5153 Are Novel Inhibitors of PBP2 Showing Potent "beta-Lactam Enhancer" Activity against Pseudomonas aeruginosa, Including Multidrug-Resistant Metallo-beta-Lactamase-Producing High-Risk Clones. Antimicrob Agents Chemother. 2017 May 24;61(6):e02529-16

20. Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Haussler S, Oliver A. Pseudomonas aeruginosa ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of AmpC. Anti-microb Agents Chemother. 2014 Jun;58(6):3091-9.

21. Gomis-Font MA, Sastre-Femenia MÀ, Taltavull B, Cabot G, Oliver A. In vitro dynamics and mechanisms of cefiderocol resistance development in wild-type, mutator and XDR Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2023 Jul 5;78(7):1785-1794.

22. Herrera C, Gomis-Font MA, López-Causapé C, Díez-Aguilar M, Fraile-Ribot PA, Cardeñoso LM, Oliver A. Mechanisms leading to in vivo ceftazidime/avibactam resistance development during treatment of GES-5-producing Pseudomonas aeruginosa infections. Antimicrob Agents Chemother. 2024 Nov 6;68(11):e0116424.

23. Glen KA, Lamont IL. Penicillin-binding protein 3 sequence variations reduce susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to beta-lactams but inhibit cell division. J Antimicrob Chemother. 2024 Sep 3;79(9):2170-2178

24. Barceló I, Cabot G, Palwe S, Joshi P, Takalkar S, Periasamy H, Cortés-Lara S, Zamorano L, Sánchez-Diener I, Moya B, Bhagwat S, Patel M, Oliver A. In vitro evolution of cefepime/zidebactam (WCK 5222) resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: dynamics, mechanisms, fitness trade-off and impact on in vivo efficacy. J Antimicrob Chemother. 2021 Sep 15;76(10):2546-2557

25. Gomis-Font MA, Pitart C, Del Barrio-Tofiño E, Zboromyrska Y, Cortes-Lara S, Mulet X, Marco F, Vila J, López-Causapé C, Oliver A. Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin-β-Lactamase Inhibitor Combinations through the Modification of the Pseudomonas aeruginosa MexCD-OprJ Efflux Pump. Antimicrob Agents Chemother. 2021 Jul 16;65(8):e0008921.

26. González-Pinto L, Blanco-Martín T, Alonso-García I, Rodríguez-Pallares S, Outeda-García M, Gomis-Font MA, Fraile-Ribot PA, Vázquez-Ucha JC, González-Bello C, Beceiro A, Oliver A, Bou G, Arca-Suárez J. Impact of transferable β-lactamases and intrinsic AmpC amino acid substitutions on the activity of cefiderocol against wild-type and iron uptake-deficient mutants of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2024 Nov 4;79(11):3023-3028.

27.Candela A, Fernández-Billón M, Aja-Macaya P, González-Pinto L, Fraile-Ribot PA, Viedma E, Alonso-García I, Blanco-Martín T, Estévez-Alfaya R, Fernández-González A, Beceiro A, López-Causapé C, Oviaño M, Bou G, Oliver A, Arca-Suárez J. Rapid prediction of carbapenemases in Pseudomonas aeruginosa by imipenem/relebactam and MALDI-TOF MS. J Clin Microbiol. 2025 May 14;63(5):e0110524.

28. Mulet X, García R, Gayá M, Oliver A. O-antigen serotyping and MALDI-TOF, potentially useful tools for optimizing semi-empiric antipseudomonal treatments through the early detection of high-risk clones. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Mar;38(3):541-544

29.Cabot G, Lara-Esbrí P, Mulet X, Oliver A. Whole-genome sequence-guided PCR for the rapid identification of the Pseudomonas aeruginosa ST175 high-risk clone directly from clinical samples. J Antimicrob Chemother. 2021 Mar 12;76(4):945-949.

30.Cortes-Lara S, Barrio-Tofiño ED, López-Causapé C, Oliver A; GEMARA-SEIMC/REIPI Pseudomonas study Group. Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. Clin Microbiol Infect. 2021 Nov;27(11):1631-1637.

31.Samuelsen Ø, López-Causapé C, Aarestrup FM, Bortolaia V, Brouwer MSM, Cantón R, Egli A, Grad YH, Hamprecht A, Haussler S, Holt KE, Hopkins KL, Howden BP, Jeannot K, Kahlmeter G, Köser CU, Mathers AJ, Naas T, Pournaras S, Ruppé E, Schön T, Stoesser N, Turnidge J, Werner G, Wright GD, Giske CG, Oliver A. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility prediction of bacteria: 2025 update from the EUCAST Subcommittee. Clin

Microbiol Infect. 2026 May 15:S1198-743X(26)00248-X. doi: 10.1016/j.cmi.2026.05.012.
32.López-Causapé C, Bonet M, Taltavull B, Medina-Retiga P, Sastre-Femenía MA, Cortés-Lara S, Gomis-Font MA, Gomez-Romano F, Oliver A. PaREx: an open-source pipeline for the automated analysis of *Pseudomonas aeruginosa* resistomes from whole-genome sequences. Antimicrob Agents Chemother. 2026 Apr;70(4):e0132625. doi: 10.1128/aac.01326-25
33.Bou Arévalo, G.; Chaves Sánchez, F.; Oliver Palomo, A.; Oteo Iglesias, J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. Procedimiento en Microbiología Clínica nº 55. Coordinador: J. Oteo Iglesias. En: Cercenado Mansilla, E.; Cantón Moreno, R. (eds.) Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). ISBN 978-84-608-5435-7. SEIMC, 2015.
34.Mack AR, Hujer AM, Mojica MF, Taracila MA, Feldgarden M, Haft DH, Klimke W, Prasad AB, Bonomo RA. β-Lactamase diversity in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2025 Mar 5;69(3):e0078424.
35.Müller C, Reuter S, Wille J, Xanthopoulou K, Stefanik D, Grundmann H, Higgins PG, Seifert H. A global view on carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. mBio. 2023 Dec 19;14(6):e0226023.
36.Xie F, Wang L, Li S, Hu L, Wen Y, Li X, Ye K, Duan Z, Wang Q, Guan Y, Zhang Y, Shi Q, Yang J, Xia H, Xie L. Large-scale genomic analysis reveals significant role of insertion sequences in antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii. mBio. 2025 Mar 12;16(3):e0285224.
37.Castanheira M, Mendes RE, Gales AC. Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex. Clin Infect Dis. 2023 May 1;76(Suppl 2):S166-S178.
38.Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Bou G, Tomás M; Spanish Group of Nosocomial Infections and Mechanisms of Action and Resistance to Antimicrobials (GEIH-GEMARA); Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC); Spanish Network for Research in Infectious Diseases(REIPI). Contribution of efflux pumps, porins, and β-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Nov;57(11):5247-57.
39.Zack KM, Sorenson T, Joshi SG. Types and Mechanisms of Efflux Pump Systems and the Potential of Efflux Pump Inhibitors in the Restoration of Antimicrobial Susceptibility, with a Special Reference to Acinetobacter baumannii. Pathogens. 2024 Feb 23;13(3):197
40.Toth M., Lee M., Stewart N. K., Vakulenko S. B. (2022). Effects of inactivation of d,d-Transpeptidases of Acinetobacter baumannii on bacterial growth and susceptibility to β-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 66:e0172921.
41.Lasarte-Monterrubio C, Guijarro-Sánchez P, Alonso-Garcia I, Outeda M, Maceiras R, González-Pinto L, Martínez-Guitián M, Fernández-Lozano C, Vázquez-Ucha JC, Bou G, Arca-Suárez J, Beceiro A. Epidemiology, resistance genomics and susceptibility of Acinetobacter species: results from the 2020 Spanish nationwide surveillance study. Euro Surveill. 2024 Apr;29(15):2300352.
42.Karakonstantis S, Rousaki M, Vassilopoulou L, Kritsotakis EI. Global prevalence of cefiderocol non-susceptibility in Enterobacterales, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, and Stenotrophomonas maltophilia: a systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2024 Feb;30(2):178-188.
43.Malik S, Kaminski M, Landman D, Quale J. Cefiderocol Resistance in Acinetobacter baumannii: Roles of β-Lactamases, Siderophore Receptors, and Penicillin Binding Protein 3. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Oct 20;64(11):e01221-20.
44.Bianco G, Boattini M, Cricca M, Diella L, Gatti M, Rossi L, Bartoletti M, Sambri V, Signoretto C, Fonnesu R, Comini S, Gaibani P. Updates on the Activity, Efficacy and Emerging Mechanisms of Resistance to Cefiderocol. Curr Issues Mol Biol. 2024 Dec 14;46(12):14132-14153.
45.Shields, R. K.; Dorazio, A. J.; Tiseo, G.; Squires, K. M.; Leonildi, A.; Giordano, C.; Kline, E. G.; Barnini, S.; Iovleva, A.; Griffith, M. P.; Van Tyne, D.; Doi, Y.; Falcone, M. (2024). Frequency of cefiderocol heteroresistance among patients treated with cefiderocol for carbapenem resistant Acinetobacter baumannii infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 79(6): 1493–1500.
46.Xu Q, Liu X, Liu H, Yang S, Lei T, Hua X, Yu Y. In vitro activity and resistance mechanisms of sulbactam/durlobactam against Acinetobacter baumannii clinical isolates in China (2019-2020). Clin Microbiol Infect. 2025 Sep 26:S1198-743X(25)00466-5.
47.EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemio-

logical Importance (versión 2.01, julio 2017).
48.Kırbaş E, Sancak B. Carbapenem heteroresistance in Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa blood isolates from a Turkish tertiary hospital: a comprehensive study. J Appl Microbiol. 2025 Sep 1;136(9):lxaf204.
49.Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Kanathum P, Chitsombat K, Chomnawang MT. Comparative study of phenotypic-based detection assays for carbap2024nemase-producing Acinetobacter baumannii with a proposed algorithm in resource-limited settings. PLoS One. 2021 Nov 4;16(11):e0259686.
50.Lawrence J, O'Hare D, van Batenburg-Sherwood J, Sutton M, Holmes A, Rawson TM. Innovative approaches in phenotypic beta-lactamase detection for personalised infection management. Nat Commun. 2024 Oct 21;15(1):9070.
51. Mojica, M. F., Humphries, R., Lipuma, J. J., Mathers, A. J., Rao, G. G., Shelburne, S. A., Fouts, D. E., Van Duin, D., & Bonomo, R. A. (2022). Clinical challenges treating Stenotrophomonas maltophilia infections: An update. In JAC-Antimicrobial Resistance (Vol. 4, Issue 3). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac040
52.Gil-Gil, T., Martínez, J. L., & Blanco, P. (2020). Mechanisms of antimicrobial resistance in Stenotrophomonas maltophilia: a review of current knowledge. *In Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 18, Issue 4, pp. 335–347). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1730178
53.Werth, B. J., Ashford, N. K., Penewit, K., Waalkes, A., Holmes, E. A., Bryan, A., & Salipante, S. J. (2022). Evolution of cefiderocol resistance in Stenotrophomonas maltophilia using in vitro serial passage techniques. *JAC-Antimicrobial Resistance,* 4(1). https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac011
54.Sakr, C., Danjean, M., Cizeau, F., Ducellier, D., Debi, M. N., Royer, G., Poirel, L., & Decousser, J. W. (2025). Unexpected natural cefiderocol resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* associated to the genogroup 4 genetic background. *Clinical Microbiology and Infection*, 31(10), 1691–1696. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.07.001
55.Sakoh, T,, Komori, K., Harada S., Yamada K., Araoka, H. (2025). Draft genome sequence of Stenotrophomonas maltophilia strain TUM26315, a bloodstream isolate resistant to cefiderocol and to aztreonam combined with ceftazidime-avibactam. Microbiol Resour Announc, 2025 Oct 30;14(12):e00949-25. doi: 10.1128/mra.00949-25
56.Calvopiña, K., Hinchliffe, P., Brem, J., Heesom, KJ., Johnson, S., Cain, R., Lohans, CT., Fishwick, C., Schofield, C., Spencer, J., Avison M. (2017). Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical β-lactamase inhibitors against extensively drug resistant Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates. Molecular Microbiology (2017) 106(3), 492–504. DOI: 10.1111/mmi.13831
57.Barrasa, H., Morán, M. A., Fernández-Ciriza, L., Isla, A., Solinís, M. Á., Canut-Blasco, A., & Rodríguez-Gascón, A. (2024). Optimizing Antibiotic Therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* Infections in Critically Ill Patients: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Approach. *Antibiotics*, 13(6). https://doi.org/10.3390/antibiotics13060553
58.Monardo, R., Mojica, M., Ripa, M., Aitken, S., Bonomo, R. A., van Duin . (2025). How do I manage a patient with Stenotrophomonas maltophilia infection?. Clinical Microbiology and Infection 31 (2025) 1291-1297. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.04.031
59.Huang, Y. S., Chuang, Y. C., Chen, P. Y., Chou, P. C., & Wang, J. T. (2024). In vitro activity of cefiderocol and comparator antibiotics against multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli. JAC-Antimicrobial Resistance, 6(1). https://doi.org/10.1093/jacamr/dlae006
60.Závora, J., Adámková, V., Studená, A., & Kroneislová, G. (2025). In Vitro Activity of Cefiderocol and Aztreonam/Avibactam Against Gram-Negative Non-Fermenting Bacteria: A New Strategy Against Highly Antibiotic-Resistant Infectious Agents. Antibiotics, 14(8). https://doi.org/10.3390/antibiotics14080762
61.Mahoney, M. V., Hirsch, E. B., & Wright, W. F. (2024). AMRrounds: Achromobacter xylosoxidans susceptibility - so it goes. JAC-Antimicrobial Resistance, 6(5). https://doi.org/10.1093/jacamr/dlae134
62.Almuzara, M., Limansky, A., Ballerini, V., Galanternik, L., Famiglietti, A., Vay, C. (2010). In vitro susceptibility of Achromobacter spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. International Journal of Antimicrobial Agents. 35(1):68-71. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.08.015
63.Magallon, A., Amoureux, L., Garrigos, T., Sonois, M., Varin, V., Neuwirth, C., & Bador, J. (2022). Role of AxyABM overexpression in acquired resistance in Achromobacter xylosoxidans. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 77(4), 926–929. https://doi.org/10.1093/jac/dkab479
64.Harris, H., Stambaugh, H., Jacobs, E., Bhalodi, A., Chandrasekaran, S., Cole, N. C., Lu, J., Tekle, T., Humphries, R., & Simner, P. J. (2025). Defining antimicrobial susceptibility testing methods and breakpoints among Achromobacter

species. Journal of Clinical Microbiology, 63(6). https://doi.org/10.1128/jcm.00264-25.
65.Neuwirth, C., Freby, C., Ogier-Desserrey, A., Perez-Martin, S., Houzel, A., Péchinot, A., Duez, J.-M., Huet, F., & Siebor, E. (n.d.). VEB-1 in Achromobacter xylosoxidans from Cystic Fibrosis Patient, France. www.cdc.gov/eid
66.Farfour, E., Ruffier d'Epenoux, L., Muggeo, A., Alauzet, C., Crémet, L., Moussalih, S., Roux, A., de Verdière, S. C., Bosphore, A., Corvec, S., Guillard, T., & Vasse, M. (2022). In vitro susceptibility of nonfermenting Gram-negative rods to meropenem–vaborbactam and delafloxacin. Antimicrobials, 1(1), 1-10. https://doi.org/10.3390/antimicrobials1010001
67.Mataracı-Kara, E., Damar-Çelik, D., & Özbek-Çelik, B. (2020). The in vitro synergistic and antibiofilm activity of ceftazidime/avibactam against Achromobacter species recovered from respiratory samples of cystic fibrosis patients. Archives of Microbiology, 202(9), 2411-2419. https://doi.org/10.1007/s00430-020-00662-3
68.Mathy, V., Grohs, P., & Compain, F. (2018). In vitro activity of β-lactams in combination with avibactam against multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa, stenotrophomonas maltophilia and achromobacter xylosoxidans isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Medical Microbiology*, 67(9), 1217–1220. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000801
69.Jean-Pierre V, Sorlin P, Pantel A, Chiron R, Lavigne JP, Jeannot K, Marchandin H; Collaborative study group on antimicrobial resistance of *Achromobacter* spp..Cefiderocol susceptibility of *Achromobacter* spp.: study of an accurately identified collection of 230 strains. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2024 Jun 17;23(1):54. doi: 10.1186/s12941-024-00709-z
70.Takemura, M., Nakamura, R., Ota, M., Nakai, R., Sahm, D. F., Hackel, M. A., & Yamano, Y. (2023). In vitro and in vivo activity of cefiderocol against Achromobacter spp. and Burkholderia cepacia complex, including carbapenem-non-susceptible isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(12). https://doi.org/10.1128/aac.00346-23
71.Torre-Cisneros, J., Ferrer, R., Martos, C. D. L. F., Sarda, J., Gonzalez Calvo, A. J., Verardi, S., Karas, A., & Soriano, A. (2025). Cefiderocol treatment for patients infected by Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia complex and Achromobacter spp.: subgroup analysis from the PERSEUS study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 44(6), 1367–1374. https://doi.org/10.1007/s10096-025-05109-5
72.Kirkegaard-Biosca, C., del Barrio-Tofiño, E., Villamarín, M., Larrosa, N., Campany, D., González-López, J. J., Ferrer, R., Viñado, B., Doménech, L., Sellarès-Nadal, J., Escolà-Vergé, L., Fernández-Hidalgo, N., & Los-Arcos, I. (2024). Cefiderocol for the Treatment of Infections by VIM-Type-Producing Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 13(9). https://doi.org/10.3390/antibiotics13090874
73.Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa: new approaches to an old problem. J Med Microbiol. 2019 Jan;68(1):1-10. doi: 10.1099/jmm.0.000873. PMID: 30605076.
74.Robert M, Ruffier d'Epenoux L, Paquin A, Boutoille D, Guillouzouic A, Corvec S. Ciprofloxacin-susceptible but levofloxacin-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical strains with Vitek®2: which mechanism involved and consequences in case of fluoroquinolone treatment? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2025 Mar;44(3):549-558. doi: 10.1007/s10096-024-05006-3. Epub 2024 Dec 20. PMID: 39704919.
75.López-Causapé C, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa.* Front Microbiol. 2018 Apr 6;9:685. doi: 10.3389/fmicb.2018.00685
76.Lilić B, Filipić B, Malešević M, Novović K, Vasiljević Z, Kojić M, Jovčić B. Fluoroquinolone-resistant Achromobacter xylosoxidans clinical isolates from Serbia: high prevalence of the aac-(6')-Ib-cr gene among resistant isolates. Folia Microbiol (Praha). 2019 Mar;64(2):153-159. doi: 10.1007/s12223-018-0639-7. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30105450.
77.Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ, Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu le TA, Son NT, Kirikae T. Emergence of 16S rRNA methylase-producing Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginos*a isolates in hospitals in Vietnam. BMC Infect Dis. 2013 May 30;13:251. doi: 10.1186/1471-2334-13-251. PMID: 23721359; PMCID: PMC3680199.
78.Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, Dé E, Grillot-Courvalin C. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in Acinetobacter baumannii. mBio. 2015 Mar 24;6(2):e00309-15. doi: 10.1128/mBio.00309-15. PMID: 25805730; PMCID:PMC4453527.
79.Calvopiña K, Dulyayangkul P, Avison MB. Mutations in Ribosomal Protein RplA or Treatment with Ribosomal Acting Antibiotics Activates Production of Aminoglycoside Efflux Pump SmeYZ in Stenotrophomonas maltophilia. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Jan 27;64(2):e01524-19. doi: 10.1128/AAC.01524-19. PMID:31712205; PMCID:

PMC6985731.
80.MB Sánchez MB et al. Overexpression of the Efflux Pumps SmeVWX and SmeDEF Is a Major Cause of Resistance to Co-trimoxazole in Stenotrophomonas maltophilia. Anti-microb Agents Chemother.2018.
81.MA Toleman MA et al. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in Stenotrophomonas maltophilia mediated by acquisition of sul genes. Emerg Infect Dis. 2007 Emerg Infect Dis. 2007
82.Pierce VM, Bhowmick T, Simner PJ. Guiding antimicrobial stewardship through thoughtful antimicrobial susceptibility testing and reporting strategies: an updated approach in 2023. J Clin Microbiol. 2023 Nov 21;61(11):e0007422. doi: 10.1128/jcm.00074-22. Epub 2023 Sep 28. PMID: 37768094; PMCID: PMC10662363.
83.Kuti JL, Lutgring JD, Simner PJ, Naccache SN, Heil EL. Point-Counterpoint: Cascade reporting-useful tool to support antimicrobial stewardship, or dangerously misleading. J Clin Microbiol. 2025 Jul 9;63(7):e0170824. doi: 10.1128/jcm.01708-24. Epub 2025 Jun 17. PMID: 40526395; PMCID: PMC12279290.

PNTs

- PNT-1. Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa.* Algoritmo recomendado.
- PNT-2. Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *A. baumannii*. Algoritmo recomendado.
- PNT-3. Lectura interpretada de la resistencia antibiótica en *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans*. Algoritmo recomendado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*	PNT-1	
		Edición Nº 01	Página 1 de 11

PNT-1

Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro…….....….
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*	PNT-1	
		Edición Nº 01	Página 2 de 11

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento del algoritmo para la lectura interpretada de la resistencia a antibióticos betalactámicos en *P. aeruginosa*.

El alcance de este documento es el estudio de la sensibilidad fenotípica de *P. aeruginosa*, a partir de colonia o directamente del hemocultivo positivo en el que se detecta crecimiento de este microorganismo (RAST). Queda fuera, por tanto, del alcance de este procedimiento la aplicación de técnicas fenotípicas, moleculares o genómicas directamente sobre muestra clínica.

2. FUNDAMENTO

Guiar la detección fenotípica, estandarizada y práctica, de los principales mecanismos de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa*. La creciente diversidad de nuevos betalactámicos unida a la creciente diversidad y complejidad de mecanismos de resistencia emergentes, hace necesario disponer de recomendaciones actualizadas para interpretación de los antibiogramas de *P. aeruginosa*. Desde el punto de vista de la interpretación fenotípica de los mecanismos de resistencia, se han tenido en cuenta de forma primaria criterios microbiológicos equiparando la “S” (sensible exposición estándar) y la “I” (sensible exposición incrementada) de EUCAST cuando aplican a poblaciones silvestres y utilizando la “r” para definir condiciones de sensibilidad disminuida, pero por debajo de los puntos de corte de resistencia clínica (R).

P. aeruginosa está genéticamente dotada de una excepcional maquinaria intrínseca de resistencia a los antibióticos. La producción de la cefalosporinasa inducible AmpC (PDC), la expresión constitutiva (MexAB-OprM) o inducible (MexXY) de bombas de expulsión activa y la menor permeabilidad de su membrana externa, son probablemente los mecanismos que tienen un mayor impacto en la menor sensibilidad basal de *P. aeruginosa*. En términos generales, las nuevas combinaciones de betalactámicos +/- inhibidores de betalactamasas tales como el ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, imipenem/relebactam y cefiderocol permanecen relativamente estables frente a estos mecanismos de resistencia mutacionales clásicos. La excepción sería aztreonam/avibactam ya que su actividad se ve muy comprometida por la hiperproducción de MexAB-OprM. De igual forma, la combinación con vaborbactam no aporta actividad relevante frente al principal mecanismo de resistencia a meropenem (OprD + hiperproducción de MexAB-OprM). Entre los mecanismos de resistencia mutacionales emergentes a los nuevos betalactámicos cabe destacar las mutaciones en el bucle omega de AmpC, mutaciones en la PBP3 y, en el caso particular del cefiderocol, mutaciones en los sistemas de transporte de hierro.

Los genes de betalactamasas adquiridos horizontalmente son una fuente creciente de resistencia en *P. aeruginosa*, incluyendo los nuevos betalactámicos +/- inhibidores de beta-lactamasas. Las betalactamasas adquiridas más frecuentes en *P. aeruginosa* son las de tipo OXA, particularmente OXA-2 y OXA-10 de las que derivan las denominadas OXAs de espectro extendido que confieren resistencia a las cefalosporinas antipseudomónicas ceftazidima y cefepima. Otras betalactamasas de espectro extendido (BLEE) con relevancia en *P. aeruginosa* son las PER, GES o las VEB. No obstante, sin duda, las betalactamasas adquiridas con mayor impacto en *P. aeruginosa* son las carbapenemasas. Respecto a la actividad de los nuevos betalactámicos disponibles, ceftolozano/tazobactam e imipenem/relebactam presentan actividad muy limitada, mientras que ceftazidima/avibactam suele ser activa frente a las cepas productoras de carbapenemasas de clase A y el cefiderocol, además, también frente a las MBL. No obstante, la actividad de este último es

es menor frente a las NDM, particularmente frente a determinadas variantes. Una alternativa potencial frente a las cepas productoras de MBL sería aztreonam +/- avibactam, aunque como se ha comentado ya, su actividad está limitada por la expresión de la bomba MexAB-OprM.

3.DOCUMENTOS DE CONSULTA

Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica no 38. SEIMC 2011. Disponible en:
http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia38.pdf

Fenotipos esperados de resistencia, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/expert_rules/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf

Oteo Iglesias J (Coordinador). Bou Arévalo G, Chaves Sánchez, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes
Disponible en:
https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf

Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en www.eucast.org.

Documento guía para determinación del CMI del cefiderocol, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Cefiderocol_MIC_testing_EUCAST_guidance_document_January_2024.pdf

Documento guía de qué hacer cuando no hay puntos de corte, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/When_there_are_no_breakpoints_2024-09-03.pdf

Documento guía de Área de Incertidumbre Técnica. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Area_of_Technical_Uncertainty_-_guidance_v4_2024.pdf

Documento para el control de calidad de la determinación de CMI y disco difusión, EUCAST. Disponible en:
https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/

Guías EUCAST para la detección de mecanismos de resistencia de importancia epidemiológica. Disponible en:
https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/eucast_guidelines/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

4.1. CONDICIONES TÉCNICAS GENERALES

La determinación de la sensibilidad *in vitro* a *P. aeruginosa* puede realizarse por microdilución en caldo según la Norma UNE-EN ISO 20776-1 o mediante técnica de disco difusión siguiendo el método estandarizado recomendado de EUCAST.

La determinación de la CMI del cefiderocol por microdilución en caldo debe realizarse en caldo Mueller-Hinton con deficiencia de hierro y deben seguirse las instrucciones de lectura específicas.

Los antibióticos a estudiar frente a *P. aeruginosa* se recogen en la **Tabla 1** del documento científico siguiendo las recomendaciones del COESANT e incluyen piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacino, tobramicina y amikacina en categoría A; ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam en categoría B; cefiderocol, imipenem/relebactam, meropenem/vaborbactam, levofloxacino y colistina en categoría C y piperacilina y gentamicina en categoría E.

4.2. CONFIRMACION DE IDENTIFICACION Y CALIDAD

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Reactivos necesarios para la determinación de sensibilidad:

- Placa de agar Mueller-Hinton.
- Discos de antibióticos.
- Sistemas comerciales de determinación de sensibilidad a antimicrobianos (equipo y fungibles).

Control de calidad.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para obtener información sobre los agentes no cubiertos por esta cepa y para el control de los inhibidores de betalactámicos, consulte las tablas de control de calidad de EUCAST.

5. APARATOS Y MATERIAL

En función del tipo de determinación de sensibilidad, difusión en disco, tiras de gradiente o microdilución, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes

5.1. APARATOS

Disco difusión y tiras de gradiente:

- Estufa de 35ºC.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4ºC.
- Congelador (-20ºC).
- Posibilidad de lector semiautomático.

Microdilución:

- Estufa de 35ºC.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4ºC.
- Equipo de lectura semiautomática

5.2. MATERIAL

Disco difusión y tiras de gradiente:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidisco o pinzas.
- Escala del 0,5 de McFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.
- Discos y tiras de gradiente
- Placas de agar Mueller Hinton

Microdilución:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores en función del equipo de lectura.
- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.
- Paneles-tarjetas en función del equipo de lectura.
- Placas de agar para control de crecimiento de los paneles-tarjetas.

El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

6. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

- **Ensayos de sinergia con inhibidores de betalactamasa (cloxacilina, clavulánico, avibactam y/o EDTA):**

Este método está disponible comercialmente por diferentes fabricantes o también puede hacerse mediante la adición de inhibidores a discos de carbapenémicos y/o cefalosporinas (generalmente ceftazidima). El ácido clavulánico, el avibactam y el ácido borónico inhiben las carbapenemasas de clase A (aunque los datos de otras carbapenemasas de clase A diferentes a la KPC son escasos), y el ácido dipicolínico y el etilendiaminotetracético (EDTA) inhiben carbapenemas de clase B. La cloxacilina, que inhibe las beta-lactamasas AmpC, se añade a los tests para diferenciar entre hiperproducción de AmpC más pérdida de porinas y producción de carbapenemasas. La concentración de cloxacilina necesaria en *P. aeruginosa* es

superior a la requerida en Enterobacterales (por la elevada contribución de las bombas de expulsión) siendo de 4.000 µg cuando se utilizan discos y de 500-1.000 µg/ml cuando se añade la cloxacilina al medio. La mayor desventaja de estos métodos es que hay que esperar unas 18h (periodo de incubación de las placas) para obtener resultados.

Los procedimientos detallados están disponibles en:

- Calvo J, Canton R, Fernandez-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica no 38. SEIMC 2011. Disponible en: http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia38.pdf

Oteo Iglesias J (Coordinador). Bou Arevalo G, Chaves Sánchez, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes Disponible en: https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf

- Protocolos Red de Laboratorio para la Vigilancia de los microorganismos Resistentes (RedLabRA): Detección fenotípica de enterobacterias productoras de carbapenemasas y pruebas de hidrólisis antibiótica (carbapenémico) e inmunocromatográficas. Disponible en: https://www.isciii.es/documents/20119/dd37fc5a-5cbc-5654-bc75-3f67a2c034c8

- **Ensayos de hidrólisis (carba NP o Carbapenem Inactivation Method CIM):**

El test CarbaNP es un test rápido (< 2h) para la detección de la hidrólisis de carbapenémicos, por un cambio de pH que hace virar del color rojo al amarillo en una solución de rojo fenol. Esta prueba se ha validado para colonias bacterianas crecidas en Mueller-Hinton, agar sangre y agar tripticasa de soja, pero no en Drigalski ni MacConkey. Varios estudios han informado de una buena sensibilidad y especificidad, pero también se han observado problemas de sensibilidad en cepas mucosas. Se ha observado un 3-5% de resultados no interpretables (cambio de color dudoso) en la versión comercial del test CarbaNP. Existen otros métodos derivados del test CarbaNP como el test rápido Azul-Carba o el betaCARBA test (se han observado falsos positivos en detección de carbapenemasas de clase A).

El método de inactivación por un carbapenémico (m-CIM-test) consiste en la detección de hidrólisis enzimática al incubar un antibiótico carbapenémico con una suspensión bacteriana, utilizando discos antibióticos como sustrato. Después de 4h de incubación de una suspensión bacteriana (asa de siembre llena) con un disco de meropenem, el disco se coloca en una placa de agar inoculada con *Escherichia coli* ATCC 25922. La presencia de una carbapenemasa habrá hidrolizado el carbapenémico del disco y por tanto evitará la formación de halo de inhibición, aunque la cepa de *E. coli* usada es sensible al meropenem. La falta de actividad de la carbapenemasa dará lugar a un halo de inhibición, pues el meropenem presente en el disco no habrá sido hidrolizado. Su efectividad es variable, y al igual que el método de combinación de discos de inhibidores requiere de 18 h de incubación.

Finalmente, se ha utilizado el MALDI-TOF como método rápido para predecir la presencia de carbapenemasas

en *P. aeruginosa* mediante la hidrólisis de imipenem, y evaluación del efecto adicional de relebactam para diferenciar mecanismos de resistencia. El sistema ha mostrado una sensibilidad del 98%, aunque con menor rendimiento para enzimas GES.

Los procedimientos detallados están disponibles en:

- Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2013;51:3097-101.

- Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:4578-80.

- Vdan der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 2015;10(3):e0123690.

- **Inmunocromatografías para la detección de carbapenemasas.**

Estos métodos están basados en la captura inmunológica de epítopos de las diferentes carbapenemasas, utilizando nanopartículas de oro coloidales unidas a una membrana de nitrocelulosa dentro de un dispositivo con flujo lateral. Este método está disponible por diferentes casas comerciales, generalmente detectan carbapenemasas tipo VIM, NDM, IMP, KPC y OXA-48. El procedimiento de trabajo a seguir es el recomendado por el proveedor.

- **PCR para la detección de betalactamasas adquiridas:**

La detección molecular mediante PCR de BLEE y carbapenemasas es una herramienta de diagnóstico rápido y preciso para identificar mecanismos de resistencia. Pueden utilizarse métodos "*in house*" o bien PCR multiplex que detectan simultáneamente las carbapenemasas/BLEE más frecuentes. En el caso de carbapenemasas existen paneles comerciales que detectan KPC, NDM, VM, IMP y OXA-48. La detección de carbapenemasas de tipo GES requiere PCR específica seguida de secuenciación, ya que en función de la variante el fenotipo será de BLEE o carbapenamasa de clase A. En el caso de BLEE, existen paneles comerciales que detectan CTX-M, TEM y SHV. Las TEM y SHV requieren secuenciación posterior para diferenciar el genotipo BLEE del parental de amplio espectro (TEM-1/SHV-1). En cualquier caso, no existen paneles comerciales para la detección de las BLEE más frecuentes en *P. aeruginosa* y otros BGNNF (PER, VEB, OXAs de espectro extendido).

- **Secuenciación WGS:**

La secuenciación masiva permite la detección simultánea de múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos mediante el análisis del genoma completo (WGS) o paneles dirigidos. Identifica genes de resistencia adquiridos y mutaciones cromosómicas, superando las limitaciones de los métodos fenotípicos

tradicionales al ofrecer información epidemiológica y de transmisión precisa.

El procedimiento queda descrito en: Carla López Causapé, Fernando González Candelas, María Tomás Carmona y Antonio Oliver Palomo. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica no 71. SEIMC 2021. Disponible en: https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimiento71.pdf. Actualmente existen herramientas bioinformáticas (PaREx) para el análisis completo del resistoma de *P. aeruginosa* (https://github.com/ARPBIGIDISBA/PaREx)

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS, INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Se hace una suspensión bacteriana ajustada 0.5 McFarland con un asa de siembra y se descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa.
5. La siembra para un antibiograma (técnica de Kirby-Bauer) se realiza mediante inóculo en césped utilizando un hisopo estéril. Se empapa el hisopo en la suspensión bacteriana ajustada previamente preparada y se extiende por toda la superficie de un agar Mueller-Hinton en tres direcciones, rotando la placa 60°, para asegurar un crecimiento uniforme. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35+-1ºC.
6. En el caso de optar por un método de microdilución en caldo semiautomático, se seguirán las instrucciones según las normas de cada fabricante.
7. Realizar lectura a las 18+-2 horas de incubación. Si la lectura está automatizada (disco difusión o microdilución), seguir las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.
8. Aplicación del algoritmo de interpretación de fenotipos de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa*

7.2. CONTROL DE CALIDAD DEL ANTIBIOGRAMA

En cualquier antibiograma debe confirmarse que el cultivo es puro.

En caso de contaminación o dudas de la identificación, se confirmará por MALDI-TOF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana y/ o se repetirá el antibiograma.

Además, tal y como recomienda las guías de EUCAST, se hará un control de calidad de los métodos de determinación de sensibilidad del antibiograma.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Existen diferentes métodos comerciales basados en estos mismos principios que utilizan tiras de gradiente de antibiótico o discos de antibióticos. El procedimiento a seguir y la interpretación de los resultados se realizarán según las indicaciones de los fabricantes y guías EUCAST correspondientes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*	PNT-1	
		Edición Nº 01	Página 9 de 11

Este PNT describe un **algoritmo** para el estudio e informe selectivo de betalactámicos con actividad antipseudomónica y la inferencia de los mecanismos de resistencia implicados. Para cada antibiótico debe informarse la categoría clínica SIR y, en caso de estar disponibles, las CMI. Dada la relevancia terapéutica y para el PROA, en el caso de *P. aeruginosa* es particularmente importante indicar de forma clara las implicaciones de la I (sensible exposición incrementada), añadiendo si fuera necesario notas específicas. Más allá del propio antibiograma, se recomienda añadir información complementaria relevante como el perfil de resistencia (perfil MDR o quizás con mayor utilidad actual XDR o DTR) y/o de los mecanismos de resistencia (particularmente la producción de carbapenemasas) de cara al establecimiento de las correspondientes medidas de aislamiento y optimización de los tratamientos.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En general, la presencia de mecanismos mixtos de resistencia a antibióticos dificulta en gran medida la detección fenotípica.

11. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado “Anotaciones al procedimiento”.

Este procedimiento es de utilidad para evaluar la sensibilidad a los betalactámicos e interpretar los antibiogramas de *P. aeruginosa*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta, que sólo se pueden obtener datos fiables si las técnicas de estudio de la sensibilidad antibiótica han sido realizadas mediante procedimientos estandarizados y con sistemas que garanticen la fiabilidad y calidad de los mismos.

Este procedimiento no hace referencia a antibiogramas de muestra directa ni a la predicción de resistencias basados en técnicas de secuenciación masiva.

La evidencia disponible sobre algunos mecanismos de resistencia antimicrobiana emergente es limitada. Además, dado que la resistencia a los antimicrobianos evoluciona continuamente, es posible la aparición de nuevos mecanismos de resistencia que no estén contemplados en este procedimiento.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Oliver A, Arca-Suárez J, Gomis-Font MA, González-Pinto L, López-Causapé C Emerging resistance mechanisms to newer β-lactams in *Pseudomonas aeruginosa.* Clin Microbiol Infect. 2025 Nov;31(11):1790-1796

2. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, Beşli Y, Bogaerts P, Cantón R, Cimen C, Croughs PD, Denis O, Giske CG, Graells T, Daniel Huang TD, Iorga BI, Karatuna O, Kocsis B, Kronenberg A, López-Causapé C, Malhotra-Kumar S, Martínez LM, Mazzariol A, Meyer S, Naas T, Notermans DW, Oteo-Iglesias J, Pedersen T, Pirš M, Poeta P, Poirel L, Pournaras S, Sundsfjord A, Szabó D, Tambić-Andrašević A, Vatcheva-Dobrevska R, Vitkauskienė A, Jeannot K; ESGARS-ISARPAE members. *Pseudomonas aeruginosa antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages:* update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. Clin Microbiol Infect. 2024 Apr;30(4):469-480.

3. Sastre-Femenia MÀ, Fernández-Muñoz A, Gomis-Font MA, Taltavull B, López-Causapé C, Arca-Suárez J, Martínez-Martínez L, Cantón R, Larrosa N, Oteo-Iglesias J, Zamorano L, Oliver A; GEMARA-SEIMC/CIBERINFEC Pseudomonas study Group. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility profiles, genomic epidemiology and resistance mechanisms: a nation-wide five-year time lapse analysis. Lancet Reg Health Eur. 2023 Sep 19;34:100736. doi: 10.1016/j.lanepe.2023.100736. eCollection 2023 Nov. PMID: 37753216

4. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2025

5.Cortes-Lara S, Barrio-Tofiño ED, López-Causapé C, Oliver A; GEMARA-SEIMC/REIPI Pseudomonas study Group. Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. Clin Microbiol Infect. 2021 Nov;27(11):1631-1637.

6.López-Causapé C, Bonet M, Taltavull B, Medina-Retiga P, Sastre-Femenía MA, Cortés-Lara S, Gomis-Font MA, Gomez-Romano F, Oliver A. PaREx: an open-source pipeline for the automated analysis of *Pseudomonas aeruginosa* resistomes from whole-genome sequences. Antimicrob Agents Chemother. 2026 Apr;70(4):e0132625. doi: 10.1128/aac.01326-25

LIA y detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa*

Sensible a CTZ
Fenotipos convencionales, informar antibiograma primario

CAZ S	CAV S	IMP S	Silvestre
CAZ S	CAV S	IMP R	OprD
CAZ R	CAV S	IMP S	AmpC
CAZ R	CAV S	IMP R	OprD+AmpC
CAZ R	CAV R	IMP S	AmpC+MexAB
CAZ R	CAV R	IMP R	OprD+ AmpC+MexAB

- Además de hiperproducción de AmpC, el fenotipo CAZ R CAV S podría también ser debido a BLEE en función de epidemiología local. En ocasiones este último fenotipo puede asociarse con perfil PTZ S (poco frecuente en el caso de AmpC).
- En estos casos un Test cloxa/avi/clav (sinergia CAZ-cloxa negativa, pero positiva para AVI y/o Clav) sería sugestivo de BLEE (+/- PCR BLEE según epidemiología +/- Secuenciación).
- La inclusión de CTZ y CAV (Categoría B) en el informe del antibiograma puede depender tanto de criterios clínico (ejm gravedad, foco respiratorio) o microbiológicos (ejm R a CAZ y/o carbapenemas.

Resistente a CTZ
Fenotipos que requieren datos/comprobaciones adicionales

CAZ R	CAV S	IMP S	Posible BLEE o mutación AmpC
CAZ R	CAV R	IMP S	Posible BLEE o mutación AmpC
CAZ R	CAV S	IMP R	Posible carba A (o BLEE + OprD)
CAZ R	CAV R	IMP R	Posible MBL (aztreonam S?)

Sensible a IMP

Posible mutación AmpC o BLEE

- Test cloxa/avi/clav (sinergia CAZ-cloxa negativa y positiva para AVI y/o Clav sugestivo BLEE) +/- PCR BLEE según epidemiología +/- Secuenciación (AmpC, BLEE, PBP3…).
- En caso de desarrollo de resistencia durante tratamiento con CTZ o CAV, valorar particularmente mutación AmpC, OXAs o carbas clase A (GES/KPC). Estudiar IMR y/o FDC como posible tratamiento de rescate
- Las mutaciones en AmpC pueden generar sensibilidad colateral a PTZ (además de IMP)

Resistente a IMP

Posible carbapenemasa

Sensible CAV

Posible carbapenemasa A (o BLEE + OprD)

Resistente CAV

Posible carbapenemasa B (MBL)

- Inmuno carbas/PCR carbas +/- Carba NP/CIM +/- Test EDTA+/- Secuenciación
- Evaluar IMR (R en MBL, aunque frecuentemente también en clase A) y FDR (en caso de resistencia a este compuesto valorar análisis específico de mutaciones en sistemas de transporte de hierro). Valorar el estudio de ATM +/-AVI en MBL

Algoritmo de interpretación de fenotipos de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa*. Interpretación de los principales mecanismos de resistencia mutacionales y transferibles a betalactámicos en *P. aeruginosa* utilizando como indicadores primarios ceftazidima (CAZ), ceftazidima/avibactam (CAV), ceftolozano/tazobactam (CTZ) e imipenem (IMP), además de cefiderocol (FDC) e imipenem/relebactam (IMR) a estudiar en segunda línea según fenotipo. Los perfiles de resistencia completos esperados para el resto de betalactámicos de interés clínico, incluyendo piperacilina/tazobactam, cefepima, aztreonam y meropenem se recogen la Tabla 4 del documento científico. El panel completo de antibióticos a estudiar para *P. aeruginosa* (y sus correspondientes categorías A-E) se recogen en la Tabla 1 del documento científico. De igual forma, el panel de antibióticos a considerar para clasificar las cepas como MDR, XDR, DTR o PDR se recoge en la Tabla 3 del documento científico. Finalmente, el algoritmo considera la posibilidad de múltiples técnicas complementarias para la detección de los mecanismos de resistencia, incluyendo los ensayos de sinergia con inhibidores de betalactamasa (cloxacilina, clavulánico, avibactam y/o EDTA), las inmunocromatografías y PCR para la detección de BLEE y carbapenemasas adquiridas, los ensayos de hidrólisis (Carba NP o Carbapenem Inactivation Method CIM) o la secuenciación genómica. Tal como se indica, varias de ellas pueden ser equivalentes o complementarias y su uso dependerá de su disponibilidad e impacto esperable atendiendo a la epidemiología local.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter baumannii*	PNT-2	
		Edición Nº 01	Página 1 de 22

PNT-2

Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter baumannii*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro…….....….
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento del algoritmo para la lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *A. baumannii.* Este procedimiento es igualmente aplicable a otras especies de *Acinetobacter* clínicamente relevantes, como por ejemplo *Acinetobacter nosocomialis* y *Acinetobacter pittii.*

El alcance de este documento es el estudio de la sensibilidad fenotípica y la descripción de los métodos fenotípicos y moleculares más relevantes de detección de betalactamasas, a partir de colonia o de hemocultivos (RAST).

2. FUNDAMENTO

Guiar la detección fenotípica, estandarizada y práctica de los principales mecanismos de resistencia a betalactámicos en *A. baumannii*. Desde el punto de vista de la interpretación fenotípica de los mecanismos de resistencia, se han tenido en cuenta de forma primaria criterios microbiológicos equiparando la “S” (sensible exposición estándar) y la “I” (sensible exposición incrementada) de EUCAST cuando aplican a poblaciones silvestres y utilizando la “r” para definir condiciones de sensibilidad disminuida, pero por debajo de los pun-tos de corte de resistencia clínica (R).

La interpretación de los fenotipos de resistencia a betalactámicos y la detección fenotípica de betalactamasas en *A. baumannii* es considerablemente más compleja que en enterobacterales. Esto se debe a: i) la elevada resistencia intrínseca de *A. baumannii*, asociada a la baja permeabilidad de la membrana externa y a la producción basal de betalactamasas cromosómicas tipo ADC y OXA-51 y ii) la frecuente adquisición de carbapenemasas de clase D (CP-OXA), principales responsables de la resistencia a carbapenémicos en esta especie. Como consecuencia, los métodos fenotípicos presentan menor sensibilidad y una mayor probabilidad de resultados erróneos, incluyendo tanto falsos positivos como falsos negativos. Por ello, se recomienda confirmar los fenotipos de resistencia a betalactámicos mediante métodos moleculares.

3. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica no 38. SEIMC 2011. Disponible en:
http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomi-crobiologia38.pdf.

Fenotipos esperados de resistencia, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/ eucast/pdf/ex-pert_rules/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf

Oteo Iglesias J (Coordinador). Bou Arévalo G, Chaves Sánchez, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes
Disponible en:
https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf

Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en www.eucast.org.

Documento guía para determinación del CMI del cefiderocol, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Cefiderocol_MIC_testing_EUCAST_guidance_document_January_2024.pdf

Documento guía de qué hacer cuando no hay puntos de corte, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/When_there_are_no_breakpoints_2024-09-03.pdf

Documento guía de Área de Incertidumbre Técnica. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Area_of_Technical_Uncertainty_-_guidance_v4_2024.pdf

Documento para el control de calidad de la determinación de CMI y disco difusión, EUCAST. Disponible en: https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/

Guías EUCAST para la detección de mecanismos de resistencia de importancia epidemiológica. Disponible en:
https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/eucast_guidelines/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

4.1. CONSIDERACIONES TÉCNICAS

La determinación de la sensibilidad in vitro a *A. baumannii* puede realizarse por microdilución en caldo según la ISO 20776-1 o disco difusión siguiendo el método estandarizado recomendado de EUCAST.

La determinación de la CMI del cefiderocol por microdilución en caldo debe realizarse en caldo Mueller-Hinton con deficiencia de hierro y deben seguirse las instrucciones de lectura específicas.

Los antibióticos a estudiar frente a *A. baumannii* se recogen en la **Tabla 1** del documento científico siguiendo las recomendaciones del COESANT e incluyen piperacilina/tazobactam, ceftazidima, imipenem, meropenem, ciprofloxacino, tobramicina, amikacina, doxiciclina, minociclina, y tigeciclina en categoría A; colistina y cotrimoxazol en categoría B y levofloxacino, cefiderocol y rifampicina en categoría C. Las nuevas combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas no son útiles o no tienen mayor actividad que el respectivo betalactámico solo, excepto sulbactam-durlobactam, por lo que no se recomienda estudiar su actividad in vitro. Sulbactam-durlobactam aún no está disponible en Europa y además no existen puntos de corte clínicos.

4.2. CONSIDERACIONES TÉCNICAS

La identificación correcta de *A. baumannii* es fundamental para una correcta lectura de los mecanismos de resistencia a betalactámicos.

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Reactivos necesarios para la determinación de sensibilidad:

- Placas de agar Mueller-Hinton y caldo Mueller-Hinton ajustado en cationes.
- Discos de antibióticos: ampicilina-sulbactam (10/10 µg), piperacilina-tazobactam (30/6 µg), ceftazidima (10 µg), imipenem, (10 µg), meropenem (10 µg) y cefiderocol (30 µg).
- Sistemas comerciales de determinación de sensibilidad a antimicrobianos (equipo y fungibles).

Control de calidad:

• *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 se utiliza como cepa control en muchos estudios, aunque EUCAST solo recomienda *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para obtener información sobre los agentes no cubiertos por esta cepa y para el control de los inhibidores de betalactámicos, consulte las tablas de control de calidad de EUCAST.

5. APARATOS Y MATERIAL

En función del tipo de determinación de sensibilidad, difusión en disco, tiras de gradiente o microdilución, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

5.1. APARATOS

Disco difusión y tiras de gradiente:

- Estufa de 35ºC.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4ºC.
- Congelador (-20ºC).
- Posibilidad de lector semiautomático.

Microdilución:

- Estufa de 35ºC.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4ºC.
- Equipo de lectura semiautomática.

5.2. MATERIAL

Disco difusión y tiras de gradiente:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidisco o pinzas.
- Escala de McFarland o cualquier otro sistema fiable de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.
- Discos y tiras de gradiente.
- Placas de agar Mueller-Hinton.

Microdilución:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores en función del equipo de lectura.
- Escala de McFarland o cualquier otro sistema fiable de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.
- Paneles-tarjetas en función del equipo de lectura.
- Placas de agar para control de crecimiento de los paneles-tarjetas.

El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

6. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

En aislados sensibles a carbapenémicos, la hiperproducción de enzimas tipo ADC y la adquisición de BLEE constituyen los mecanismos de resistencia adquirida a betalactámicos más frecuentes. Sin embargo, la identificación de estos mecanismos no está estandarizada ni se recomiendan métodos específicos para tal fin por EUCAST ni CLSI; además tienen, relativamente, escaso interés clínico y epidemiológico. No obstante, en caso de requerirse, la detección fenotípica de hiperproducción de ADC y de BLEE puede realizarse mediante la utilización de métodos fenotípicos de cribado y métodos moleculares confirmatorios, que además permiten detectar hiperproducción de ADC mediada por secuencias de inserción (IS y producción de BLEE.

En aislados resistentes a carbapenémicos, los métodos fenotípicos no son útiles para detectar la hiperproducción de ADC o la presencia de BLEE, debido a la presencia de CP-OXA y/o MBL, por lo que es necesario recurrir a métodos moleculares /genómicos.

Los métodos fenotípicos de detección de betalactamasas en A. baumannii son los ensayos basados en i) la sinergia con inhibidores de betalactamasas, ii) hidrólisis de carbapenémicos y iii) detección por inmunocromatografía lateral. Los métodos moleculares se basan en la secuenciación de ácidos nucleicos y la secuenciación de ADN.

. Ensayos de sinergia con inhibidores de betalactamasas (cloxacilina, ácido clavulánico, ácido borónico y/o EDTA

Este método está disponible comercialmente por diferentes fabricantes o también puede hacerse mediante la adición de inhibidores a discos de ceftazidima o cefotaxima para la detección de hiperproducción de ADC o BLEE, y discos de carbapenémicos, para la detección de producción de carbapenemasas. El ácido clavulánico inhibe las betalactamasas de clase A (BLEE y carbapenemasas, el ácido borónico inhibe las betalactamasas de clase A y C (ADC, el ácido dipicolínico y el etilendiaminotetracético (EDTA inhiben carbapenemasas de clase B. La cloxacilina inhibe las betalactamasas ADC y se añade a los test para diferenciar la hiperproducción de ADC de la producción de BLEE. La mayor desventaja de estos métodos es que hay que esperar unas 18h (periodo de incubación de las placas para obtener resultados.

Detección de hiperproducción de ADC

Los principales métodos fenotípicos de detección de ADC se basan en la utilización de discos con los inhibidores de betalactamasas de tipo AmpC, como ácido borónico y cloxacilina **(Anexo 1**. Entre las limitaciones más relevantes de esta aproximación fenotípica destacan: i ADC es intrínseca en *A. baumannii*, por lo que se detecta su sobreexpresión, ii otros mecanismos de resistencia, como la inactivación de porinas y/o la sobreexpresión de bombas de expulsión, pueden interferir en la detección de hiperproducción de ADC, iii no está estandarizada ni recomendada por EUCAST ni CLSI, iv se recomienda confirmación molecular en casos ambiguos.

Detección de BLEE

Las BLEE son muy infrecuentes en *A. baumannii* y suelen ser distintas de las de tipo CTX-M y SHV más frecuentemente descritas en Enterobacterales. Las de mayor relevancia son las de tipo PER, VEB y GES. Las BLEE se caracterizan por hidrolizar cefalosporinas de tercera/cuarta generación y por su perfil de inhibición, que incluye al ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, así como por los nuevos inhibidores (avibactam, vaborbactam, relebactam, enmetazobactam,…). Estas propiedades pueden explotarse en el laboratorio para la identificación fenotípica de la producción de BLEE **(Anexo 2)**.

Las limitaciones más importantes son: i *A. baumannii* puede expresar múltiples mecanismos simultáneos (OXAs, ADC, alteraciones en porinas, bombas de expulsión, alteraciones en PBPs, lo que suele dificultar la interpretación, ii falsos positivos por la actividad intrínseca del ácido clavulánico en algunas cepas. Para conocer el tipo y la variante de BLEE hay que determinar la secuencia de nucleótidos mediante secuenciación de ADN.

Detección de carbapenemasas

La utilización de métodos fenotípicos de detección de carbapenemasas está condicionada en gran medida por la situación epidemiológica local, la estrategia de vigilancia epidemiológica y por la disponibilidad de recursos económicos y técnicos.

La producción de carbapenemasas adquiridas es el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* y el de mayor relevancia clínica, terapéutica y epidemiológica. Las carbapenemasas más frecuentes en *A. baumannii* son CP-OXA transferibles (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58. También se han descrito MBL (NDM, VIM, IMP, aunque con mucha menor frecuencia que las CP-OXA. Los métodos

fenotípicos más utilizados para detectar carbapenemasas en *A. baumannii* se basan en un cribado inicial con pruebas de sensibilidad a betalactámicos (CMIs y discos de carbapenémicos). La obtención de una CMI de imipenem y/o meropenem superior a la que suele presentar el fenotipo salvaje o BLEE a la que define EUCAST para cepas I o R es el primer marcador indirecto de la presencia de algún mecanismo de resistencia a car-bapenémicos. Después de este cribado inicial pueden usarse otros métodos fenotípicos, como el estudio de inhibidores específicos (EDTA, ácido dipicolínico, ácido clavulánico/tazobactam, ácido borónico) y los métodos m/eCIM, según EUCAST 2026 **(Anexo 3)**.

En los **Anexos 1, 2 y 3** se describen los procedimientos simplificados para detectar hiperproducción de ADC, BLEE y carbapenemasas mediante estudios de sinergia con inhibidores de betalactamasas. Los procedimientos detallados están disponibles en:

- Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología clínica no 38. SEIMC 2011. Disponible en: http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimiento-microbiologia38.pdf.

Oteo Iglesias J (Coordinador. Bou Arévalo G, Chaves Sánchez, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes Disponible en: https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf

- Protocolos Red de Laboratorio para la Vigilancia de los microorganismos Resistentes (RedLabRA: Detección fenotípica de enterobacterias productoras de carbapenemasas y pruebas de hidrólisis antibiótica (carbapenémico e inmunocromatográficas. Disponible en: https://www.isciii.es/documents/20119/dd37fc5a-5cbc-5654-bc75-3f67a2c034c8

. **Ensayos de hidrólisis** (carba NP blue, CarbAcineto NP o variantes del Carbapenem Inactivation Method CIM:

El Carba NP Blue es una variante del Carba NP test diseñada para detectar en < 2h la hidrólisis de carbapenémicos, generalmente imipenem, en bacterias gramnegativas, especialmente útil en *A. baumannii*, donde el Carba NP clásico puede dar resultados débiles o difíciles de interpretar.
Este test es rápido (< 2h e incluye como indicador de pH el azul de bromotimol, en lugar de fenol-rojo usado en el Carba NP clásico. En general, no se recomiendan usar colonias crecidas en medios cromogénicos o medios selectivos porque pueden interferir con el indicador de pH.

El CarbAcineto test es una adaptación específica del Carba NP blue para *A. baumannii* optimizado para la detección de OXA-23, OXA-24/40 y OXA-58. El rendimiento del método Blue-Carba test / CarbAcineto depende bastante del tipo de carbapenemasa y del medio de cultivo utilizado. Los datos más citados muestran aproximadamente una sensibilidad del 89–95%, con un 5-11% de falsos negativos y un 0-5% de resultados no interpretables o dudosos.

En el **anexo 3** se recoge el procedimiento simplificado. Los procedimientos más detallados están disponibles en:

−Pires J, Novais Â, Peixe L. “Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures.” Journal of Clinical Microbiology. 2013;51(12):4281–42.

−Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. “CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp.” Journal of Clinical Microbiology. 2014;52(7):2359–2364.

−Cercenado E, Cantón R (coords.). Métodos microbiológicos para la detección de Acinetobacter baumannii multirresistente en muestras de vigilancia. PNT-MMV-05. Procedimientos en Microbiología Clínica. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; edición nº 01. Disponible en: https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimiento microbiologia 55.pdf

El método de inactivación por un carbapenémico (CIM-test) consiste en la detección de hidrólisis enzimática de meropenem por una suspensión bacteriana. A diferencia del Carba NP o Blue-Carba no detecta cambios de pH, (Anexo 3) sino la pérdida de actividad antibiótica del carbapenémico, y al igual que el método de combinación de discos de inhibidores requiere de 18h de incubación. En *A. baumannii* el CIM clásico tiene más limitaciones que en Enterobacterales porque las CP-OXA hidrolizan carbapenémicos lentamente, la inactivación puede ser incompleta, y porque algunos halos son difíciles de interpretar. En los últimos años se han desarrollado variantes del CIM recomendadas por EUCAST y CLSI y que funcionan mejor que el CIM, como el Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) y el EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method (eCIM), especialmente útil para detectar MBL. Tanto la SEIMC como EUCAST indican que el eCIM tiene valor limitado porque las CP-OXA predominantes no son inhibidas por EDTA. Existen variantes metodológicas adaptadas a *A. baumannii* como el CIMTris / rCIM-A que se caracterizan porque producen mayor liberación enzimática y porque mejoran la sensibilidad para detectar OXA-23, OXA-24/40 y OXA-58. La sensibilidad del CIMTris/rCIM es superior (90–98%) a la del mCIM clásico (70–85%). Las mayores dificultades aparecen con cepas productoras de OXA-58, debido a que se expresión es débil y su hidrólisis lenta.

En el **anexo 3** se recoge el procedimiento simplificado. Los procedimientos detallados están disponibles en:

-Vdan der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 2015;10(3):e0123690.
- Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, Das S, Satlin MJ, Jenkins SG, Westblade LF. “EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae.” Journal of Clinical Microbiology. 2019;57(11):e01757-18.
- Camargo CH, Cayô R, Almeida LM, Streling AP, Nodari CS, Nielsen EI, Gales AC. “Revised Carbapenem Inactivation Method (rCIM-A) for Detection of Carbapenemase-Producing Acinetobacter baumannii Group Strains.” Journal of Clinical Microbiology. 2020;58(9):e00893-20.
- Zhou H, Zhang T, Yu D, Pi B, Yang Q, Zhou J, Hu S, Yu Y. “Comparison of Different Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenemase-Producing Acinetobacter baumannii in China.” Journal of Microbiological Methods. 2018;145:1–6.

• Inmunocromatografías para la detección de carbapenemasas.

Estos métodos están basados en la captura inmunológica de epítopos de las carbapenemasas más relevantes en *A. baumannii*, como OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, KPC y algunas MBL, como las NDM, IMP,

VIM, utilizando nanopartículas de oro coloidales unidas a una membrana de nitrocelulosa dentro de un aparato con flujo lateral. Este método está disponible por diferentes casas comerciales. El procedimiento de trabajo a seguir es el recomendado por el proveedor. En el **Anexo 3** se recoge información adicional de estos test.

• Amplificación de ácidos nucleicos para la detección de mecanismos de resistencia

La detección molecular mediante PCR de hiperproducción de ADC, BLEE y carbapenemasas es una herramienta de diagnóstico rápido y preciso para identificar mecanismos de resistencia. Pueden utilizarse métodos de PCR o amplificación isotérmica de tipo LAMP "i*n house*" o bien PCR multiplex que detectan simultáneamente las carbapenemasas/BLEE más frecuentes.

Hiperproducción de ADC

Las secuencias de inserción (ISs) ubicadas corriente arriba de genes de betalactamasas pueden incrementar su expresión debido a que contienen promotores más fuertes que sus promotores naturales. La detección de estas ISs junto con genes ADC permite caracterizar el mecanismo de resistencia asociado con la hiperproducción de ADC. La detección de genes ADC y sus secuencias de inserción (ISA*ba1*, ISA*ba2*, ISA*ba3*, ISA*ba4*, ISA*ba125*) corriente arriba de ADC pueden detectarse mediante PCR convencional y PCR multiplex. La estrategia consiste en usar un cebador del gen de ADC y un cebador del gen IS. La presencia de IS corriente arriba del gen IS confirma por el tamaño esperado del amplicón y/o secuenciación del amplicón si es necesario. En esta versión se omite el método de confirmación (RT-PCR y cuantificación de expresión). Para conocer la variante de ADC hay que recurrir a la secuenciación de ADN (Sanger o secuenciación masiva). Entre las limitaciones más importantes, destacar que no se cuantifica la expresión génica y que no todas las IS producen sobreexpresión funcional.

Esta aproximación podría aplicarse también a la caracterización del papel en la resistencia de la OXA-51 intrínseca de *A. baumannii.*

Detección de genes de BLEE

La mayoría de métodos moleculares se basan en la amplificación de genes de BLEE de tipo PER, VEB o GES, aunque también resulta útil la secuenciación de ADN dado que permite identificar las variantes BLEE. Entre las limitaciones más relevantes de los métodos de amplificación génica destacan:
• No detecta variantes no cubiertas por los cebadores.
• La presencia de genes no asegura expresión funcional.
• La optimización de multiplex es crítica: interferencia entrecebadores puede generar falsos negativos.
• Para conocer la variante de BLEE hay que determinar la secuencia de nucleótidos.
• Los métodos comercializados van dirigidos principalmente a las del grupo CTX-M y no suelen incluir dianas para PER, VEB o GES.

Existen paneles comerciales que detectan CTX-M, TEM y SHV. Las TEM y SHV requieren secuenciación posterior para diferenciar el genotipo BLEE del parental de amplio espectro (TEM-1/SHV-1). En cualquier caso, no existen paneles comerciales para la detección de las BLEE más frecuentes en *A. baumannii* (PER, VEB, GES).

Detección de carbapenemasas

Se emplean para confirmar los resultados fenotípicos, aunque también pueden usarse directamente sin método fenotípico previo, en cepas resistentes a carbapenémicos, y son muy útiles para estudios epidemiológicos de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. A diferencia de algunos métodos fenotípicos, ofrecen mayor rapidez, sensibilidad y especificidad.

La detección de carbapenemasas en *A. baumannii* mediante la utilización de métodos moleculares se centra en identificar directamente los genes, o parte de ellos, que codifican estas betalactamasas. Los genes dianas más importantes son los que codifican CP-OXA, como las adquiridas OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, y la intrínseca OXA-51 (marcador de la especie *A. baumannii*) y los que codifican MBL, como NDM, VIM e IMP. Los métodos de detección de MBL son los mismos que se usan con Enterobacterales. Existen métodos *in-house* y métodos comercializados (Anexo 3), que se basan en i) la amplificación de ácidos nu-cleicos mediante PCR convencional (end-point PCR) o por amplificación isotérmica (LAMP; Loop-mediated isothermal amplification) con formatos uniplex o multiplex, ii) Microarrays de ADN, iii) con detección basada en CRISPR y secuenciación (Sanger o NGS).

Se han desarrollado paneles moleculares que detectan genes de carbapenemasas clásicas (KPC, NDM, VM, IMP y OXA-48) y genes de BLEE y otros genes sin interés en *A. baumannii* que codifican resistencia a meticilina (mec*A*) o a glucopéptidos (*vanA* y *vanB*). Algunos de estos paneles tienen, además, el interés de que pueden detectar genes de carbapenemasas, además de otros genes de resistencia, directamente de frascos de hemocultivos positivos, muestras clínicas (ej. BAL), y de muestras para estudios epidemiológicos (ej. frotis rectales). En la tabla del **Anexo 3** se recogen algunos de los métodos moleculares comercializados más usados.

La detección de carbapenemasas de tipo GES requiere PCR específica seguida de secuenciación, ya que en función de la variante el fenotipo será de BLEE o carbapenamasa de clase A.

Entre las limitaciones más importantes de los métodos moleculares destacan los intrínsecos a la metodología usada, el no detectar expresión génica, por lo que un gen puede estar presente, pero no se expresa o su expresión es muy débil (falsos negativos) y, sobre todo, que no sustituyen a los métodos fenotípicos.

• Secuenciación WGS:

La secuenciación masiva permite la detección simultánea de múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos mediante el análisis del genoma completo (WGS) o paneles dirigidos. Identifica genes de resistencia adquiridos y mutaciones cromosómicas, superando las limitaciones de los métodos fenotípicos tradicionales al ofrecer información epidemiológica y de transmisión precisa. Además, ofrece información muy relevante para estudiar la diseminación de clones y plásmidos productores de carbapenemasas y BLEE.

El procedimiento queda descrito en: Carla López Causapé, Fernando González Candelas, María Tomás Carmona y Antonio Oliver Palomo. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica no 71. SEIMC 2021. Disponible en: https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimiento71.pdf.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter baumannii*	PNT-2	
		Edición Nº 01	Página 11 de 22

7.PROCEDIMIENTO

7.1. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

7.1.1. CONDICIONES TÉCNICAS GENERALES

Desde el punto de vista clínico/terapéutico y epidemiológico pueden diferenciarse dos fenotipos de resistencia betalactámicos relevantes en *A. baumannii*; el fenotipo sensible a carbapenémicos y el fenotipo resistente a carbapenémicos.

El método de referencia para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a carbapenémicos en *A. baumannii,* así como otros betalactámicos como ceftazidima, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam es la microdilución en caldo según la ISO 20776-1. Sin embargo, con los carbapenémicos se han descrito discrepancias entre este método y otros métodos como el basado en la difusión en agar con discos o tiras de gradiente. Estas discrepancias son especialmente relevantes en aislados productores de OXA-58 que pueden presentar colonias dentro de los halos de inhibición de imipenem y meropenem (heterorresistencia a carbapenémicos). La dificultad inherente a la determinación de la actividad *in vitro* se ve agravada por la limitada disponibilidad de puntos de corte clínicos definidos para ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefiderocol y sulbactam-durlobactam.

La actividad *in vitro* de cefiderocol frente a *A. baumannii* es comparable a la observada en Enterobacterales, aunque no existen suficientes datos clínicos para establecer un punto de corte definitivo. Según EUCAST 2026:
• CMI ≤0,5 mg/L (halo ≥21 mm): generalmente sin mecanismos de resistencia y probablemente sensibles.
• CMI 1–2 mg/L: pueden presentar mecanismos de resistencia; podrían tratarse con cefiderocol si existen pocas alternativas.
• CMI >2 mg/L (halo <17 mm): probablemente resistentes.

7.1.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS, INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso.
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Se hace una suspensión bacteriana ajustada 0.5 McFarland con un asa de siembra y se descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa.
5. La siembra para un antibiograma (técnica de Kirby-Bauer) se realiza mediante inóculo en césped utilizando un hisopo estéril. Se empapa el hisopo en la suspensión bacteriana ajustada previamente preparada y se extiende por toda la superficie de un agar Mueller-Hinton en tres direcciones, rotando la placa 60°, para asegurar un crecimiento uniforme. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35+-1ºC.
6. En el caso de optar por un método de microdilución en caldo semiautomático, se seguirán las instrucciones según las normas de cada fabricante.
7. Realizar lectura a las 18+-2 horas de incubación. Si la lectura está automatizada (disco difusión o microdilución), seguir las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.
8. Aplicación del algoritmo.

7.1.3. CONTROL DE CALIDAD DEL ANTIBIOGRAMA

En cualquier antibiograma debe confirmarse que el cultivo está puro.
En caso de contaminación o dudas de la identificación, se confirmará por MALDI-TOF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana y/ o se repetirá el antibiograma.
Además, tal y como recomienda las guías de EUCAST, se hará un control de calidad de los métodos de determinación sensibilidad del antibiograma.

7.1.4. DOCUMENTO DE CONSULTA

1. Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica no 38. SEIMC 2011.
Disponible en
http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia38.pdf.

2. Detección de mecanismos de resistencia en A. *baumannii,* EUCAST. Disponible en https://aurosan.de/images/mediathek/servicematerial/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms.pdf

7.1.5. DOCUMENTO TÉCNICO

1. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en www.eucast.org.

2. Documento guía de *A. baumannii*, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Stenotrophomonas_maltophilia_guidance_document_v2_20241114.pdf

3. Documento guía de qué hacer cuando no hay puntos de corte, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/When_there_are_no_breakpoints_2024-09-03.pdf

4. Documento para el control de calidad de la determinación de CMI y disco difusión, EUCAST. Disponible en: https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/

5. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 16.0. https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/breakpoints/v_16.0_Breakpoint_Tables.pdf

8.OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Existen diferentes métodos comerciales basados en estos mismos principios que utilizan tiras de gradiente de antibiótico o discos de antibióticos. El procedimiento a seguir y la interpretación de los resultados se realizarán según las indicaciones de los fabricantes y guías EUCAST correspondientes.

Este PNT describe un algoritmo para el estudio e informe selectivo de betalactámicos con actividad frente a *A. baumannii* y la inferencia de los mecanismos de resistencia implicados. Para cada antibiótico debe informarse la categoría clínica SIR y, en caso de estar disponibles, las CMI. Dada la relevancia terapéutica y para el PROA, en el caso de *A. baumannii* es particularmente importante indicar de forma clara las implicaciones de la I (sensible exposición incrementada), añadiendo si fuera necesario notas específicas. Más allá del propio antibiograma, se recomienda añadir información complementaria relevante como el perfil de resistencia (perfil MDR o quizás con mayor utilidad actual XDR o DTR) y/o de los mecanismos de resistencia (particularmente la producción de carbapenemasas) de cara al establecimiento de las correspondientes medidas de aislamiento y optimización de los tratamientos.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.
El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.
La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En general, la presencia de mecanismos mixtos de resistencia a antibióticos dificulta en gran medida la detección fenotípica.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado “Anotaciones al procedimiento”.

Este procedimiento es de utilidad para evaluar la sensibilidad a los betalactámicos e interpretar los antibiogramas de *A. baumannii*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que sólo se pueden obtener datos fiables si las técnicas de estudio de la sensibilidad antibiótica han sido realizadas mediante procedimientos estandarizados y con sistemas que garanticen la fiabilidad y calidad de los mismos.

Este procedimiento no hace referencia a antibiogramas de muestra directa ni a la predicción de resistencias basados en técnicas de secuenciación masiva.

La evidencia disponible sobre algunos mecanismos de resistencia antimicrobiana emergente es limitada. Además, dado que la resistencia a los antimicrobianos evoluciona continuamente, es posible la aparición de nuevos mecanismos de resistencia que no estén contemplados en este procedimiento.

12. BIBLIOGRAFÍA

1.Al Mamari A.M.K., Balkhair A., Al Hinai J., Al Busaidi I., Al Maskari Z., Al Rawahi B. Evaluation of six commercial and in-house phenotypic tests for AmpC detection. JAC-Antimicrobial Resistance. 2023;5(5):dlad101.

2.Depka D, Bogiel T, Rzepka M, Gospodarek-Komkowska E. Insertion Sequences within Oxacillinases Genes as Molecular Determinants of Acinetobacter baumannii Resistance to Carbapenems-A Pilot Study. Microorganisms. 2024 Oct 12;12(10):2057.

3.Lee K, et al. Evaluation of combined disc tests for detection of extended-spectrum β-lactamases in Acinetobacter spp. J Clin Microbiol. 2003;41: 1290–1293.

• Mottaghiyan Z, Esmaeili D, Ahmadi MH, Niakan. Development of a Multiplex PCR Assay for the Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in Acinetobacter baumannii Isolates in Tehran City, Iran. Indian J Microbiol. 2024 Sep;64(3):910-916.

4. Multiplex PCR for identification and β-lactam resistance gene detection in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Infect Dev Ctries. 2025 May 31;19(5):723–731. doi:10.3855/jidc.20664.

5. Simner PJ, Pitout JDD, Dingle TC. Laboratory detection of carbapenemases among Gram-negative organisms. Clin Microbiol Rev. 2024 Dec 10;37(4):e0005422.

6. Zhang A, Wang X, Liang X, Zhou C, Wang Q, Zhang J, Wang H. Performance Evaluation of Diagnostic Assays for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Organisms. Antibiotics (Basel). 2021 Nov 26;10(12):1457. doi: 10.3390/antibiotics10121457.

7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition, 2023.

8. EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 14.0, 2024.

9. Gautam V, Singhal L, Arora S, Jha C, Ray P. Reliability of Kirby-Bauer disk diffusion method for detecting carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Apr;57(4):2003-4. doi: 10.1128/AAC.01450-12.

10.Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Kanathum P, Chitsombat K, Chomnawang MT. Comparative study of phenotypic-based detection assays for carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii with a proposed algorithm in resource-limited settings. PLoS One. 2021 Nov 4;16(11):e0259686.

11. Novais Â, Brilhante M, Pires J, Peixe L. Evaluation of the Recently Launched Rapid Carb Blue Kit for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. J Clin Microbiol. 2015 Sep;53(9):3105-7. doi: 10.1128/JCM.01170-15. Epub 2015 Jul 15.

12. Zhang A, Wang X, Liang X, Zhou C, Wang Q, Zhang J, Wang H. Performance Evaluation of Diagnostic Assays for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Organisms. Antibiotics (Basel). 2021 Nov 26;10(12):1457. doi: 10.3390/antibiotics10121457

13. Mitteregger D, Wessely J, Barišić I, Bedenić B, Kosak D, Kundi M. A Variant Carbapenem Inactivation Method (CIM) for Acinetobacter baumannii Group with Shortened Time-to-Result: rCIM-A. Pathogens. 2022 Apr 18;11(4):482. doi: 10.3390/pathogens11040482.

14. Zhang S, Mi P, Wang J, Li P, Luo K, Liu S, Al-Shamiri MM, Lei J, Lai S, Han B, Chen Y, Han L, Han S. The optimized carbapenem inactivation method for objective and accurate detection of carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii. Front Microbiol. 2023 Jul 13;14:1185450. doi: 10.3389/fmicb.2023.1185450.

15.Liu M, Song Q, Wu L, Li M, Chen Z, Kang M, Xie Y. Triton X-100 and Increased Volume of Test Bacteria in the Carbapenem Inactivation Method Enhanced the Detection of Carbapenemase-Producing Acinetobacter baumanniiComplex Isolates. J Clin Microbiol. 2018 Feb 22;56(3):e01982-17. doi: 10.1128/JCM.01982-17.

16.Gelmez GA, Can B, Hasdemir U, Soyletir G. Evaluation of two commercial methods for rapid detection of the carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. J Microbiol Methods. 2020 Oct 10;178:106084. doi: 10.1016/j.mimet.2020.106084.

17.Riccobono E, Bogaerts P, Antonelli A, Evrard S, Giani T, Rossolini GM, Glupczynski Y. Evaluation of the OXA-23 K-SeT® immunochromatographic assay for the rapid detection of OXA-23-like carbapenemase-producing Acinetobacter spp. J Antimicrob Chemother. 2019 May 1;74(5):1455-1457. doi: 10.1093/jac/dkz001.

18.Mancini S, Seth-Smith HMB, Kolesnik-Goldmann N, Hinic V, Roloff T, Imkamp F, Egli A. Evaluation of the RESIST ACINETO multiplex immunochromatographic assay for detection of OXA-23-like, OXA-40/58-like and NDM carbapenemase production in Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother. 2023 Nov 6;78(11):2771-2774. doi: 10.1093/jac/dkad253.

19.Mertins S, Higgins PG, Thunissen C, Magein H, Gilleman Q, Mertens P, Rodríguez MG, Maus LM, Seifert H, Krönke M, Klimka A. Development of an immunochromatographic lateral flow assay to rapidly detect OXA-23-, OXA-40-, OXA-58- and NDM-mediated carbapenem resistance determinants in Acinetobacter baumannii. J Med Microbiol. 2023 Apr;72(4). doi: 10.1099/jmm.0.001681.

20. Gelmez GA, Can B, Hasdemir U, Soyletir G. Evaluation of two commercial methods for rapid detection of the carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. J Microbiol Methods. 2020 Oct 10;178:106084. doi: 10.1016/j.mimet.2020.106084.

21. Li J, Li Y, Cao X, Zheng J, Zhang Y, Xie H, Li C, Liu C, Shen H. Genome-wide identification and oxacillinase OXA distribution characteristics of Acinetobacter spp. based on a global database. Front Microbiol. 2023 Jun 1;14:1174200.

22. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Acinetobacter spp. J Clin Microbiol. 2014;52(7):2359–2364.

23. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906–909.

24. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase genes. J Clin Microbiol. 2015;53(2):593–595.

25. Nasrabadi KS, Ahmadi Y, Ghasemi SM, Rahimi S, Karami S, Ghasemi S, et al. Identification of blaOXA-51-23-58, blaVIM, blaNDM, and blaIMP carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii isolates from hospitalized patients. BMC Res Notes. 2024;17:392. doi:10.1186/s13104-024-07047-5.

26. Goudarzi H, Mirsamadi ES, Hashemi A, et al. Rapid detection of blaVIM, blaIMP and blaNDM genes among clinical isolates of Acinetobacter baumannii using multiplex real-time PCR and melting curve analysis. BMC Microbiol. 2019;19:151. doi:10.1186/s12866-019-1510-y

27. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-mediated isothermal amplification for detection of carbapenemase genes. J Microbiol Methods. 2018;145:1–7.

28. Smith M, Diederen BM, Scharringa J, Leversteijn-van Hall MA, Fluit AC, Stuart JC. Rapid and accurate detection of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae with the Cepheid Xpert Carba-R assay. J Med Microbiol. 2016;65(9):951–953. doi:10.1099/jmm.0.000310.

29. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, et al. Multisite evaluation of the Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase genes in rectal swabs and clinical isolates. J Clin Microbiol. 2016;54(7):1814–1819.

30. Park YJ, Yoo IY, Woong H, et al. Comparison of BD MAX Check-Points CPO assay with Cepheid Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms. Diagn Microbiol Infect Dis. 2022;102(2):115716. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2022.115716.

31. Wang Y, Wang Y, Ma AJ, et al. Rapid detection of carbapenemase genes using LAMP and Xpert Carba-R assay: multicenter evaluation. Front Microbiol. 2024;15:1338395.

32. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR and commercial molecular assays for detection of carbapenemases in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2017;30(2):456–501.

Algoritmo para la LIA y detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter baumannii*

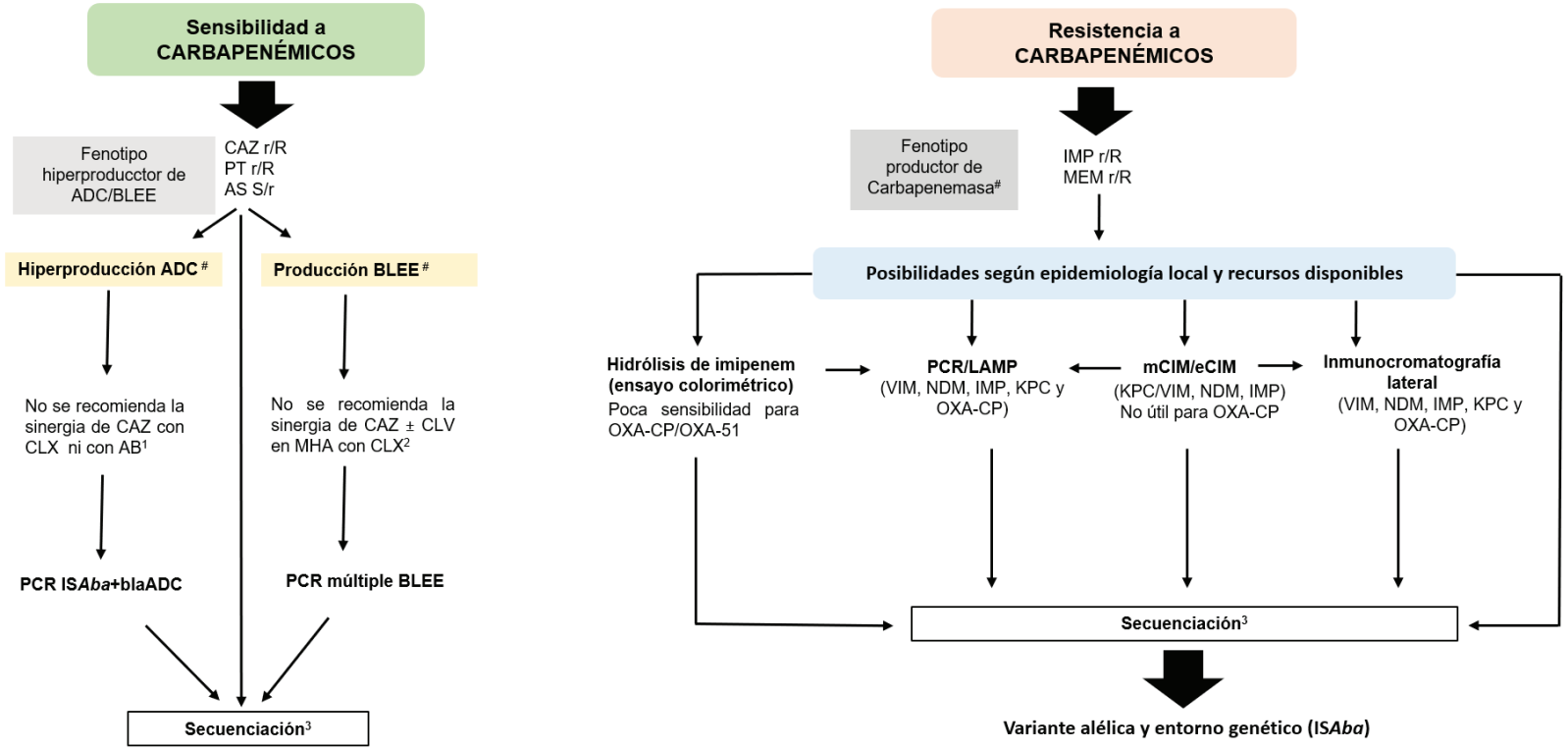


Figura 1. Algoritmo para interpretar los fenotipos de resistencia a beta-lactámicos en *A. baumannii*. IMP: imipenem, MEM: meropenem, CAZ: ceftazidima, PT: piperacilina-tazobactam, AS: ampicilina-sulbactam, AB: ácido borónico, CLX: cloxacilina, CLV: ácido clavulánico, ADP: ácido dipicolínico, OXA-CP: carbapenemasa de clase D (oxacilinasa) , MBL: carbapenemasa de clase B. Mecanismos no enzimáticos: inactivación o expresión reducida de porinas, sobreexpresión de bombas de expulsión, afinidad disminuida por betalactámicos. [1]Ni EUCAST ni CLSI recomienda estudiar la sinergia de CAZ±CLX (200 µg) ni de CAZ±BO (400 µg) para detectar hiperproducción de ADC en *A. baumannii.* Se han descrito *in vitro* mutantes en CDA sensibles a CLX y resistentes a BO así como mutantes en CDA resistentes a CLX y sensibles a BO. [2] Ni EUCAST ni CLSI recomiendan estudiar la sinergia de CAZ (30 µg) ± CLV (10 µg) en MHA con CLX (200 µg) [3] Sanger (amplicones específicos) o secuenciación masiva (genomas completos). # ± Mecanismos no enzimáticos, pérdida o expresión disminuida de porinas y sobreexpresión de bombas de expulsión.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter baumannii*	PNT-2	
		Edición Nº 01	Página 17 de 22

Anexo 1. Métodos fenotípicos de detección de hiperproducción de ADC-like en *A. baumannii* sensible a carbapenémicos

No existen recomendaciones CLSI/EUCAST de detección fenotípica de hiperpoducción de ADC-like. Los principales métodos fenotípicos de detección de hiperproducción de ADC-like se basan en la utilización de discos con los inhibidores de enzimas de tipo AmpC como ácido borónico y cloxacilina.

1. Materiales y reactivos

•Placas de agar Mueller-Hinton (MH), preparadas recientemente (idealmente ≤7 días).
•Discos con ceftazidima (CAZ; 30 µg).
•Discos con cefotaxima (CTX; 30 µg).
•Discos con ácido borónico 400 µg (AB) y CAZ o CTX:
-Preparar solución de ácido borónico a 20 mg/mL en agua destilada estéril
-Añadir 15–20 µL a discos de CAZ o CTX
-Dejar secar en condiciones estériles.
-Conservar a 2–8°C en recipiente hermético y protegido de humedad y luz.
-Usar preferentemente el mismo día. Se acepta hasta una semana.
•Agar MH suplementado con cloxacilina (200–250 µg/mL):
-Fundir agar MH y enfriar a 50–55°C
-Añadir cloxacilina estéril hasta para alcanzar una concentración final de 200-250 µg/mL
-Mezclar y verter en placas
-Conservar a 2–8°C (máx. 1 semana)
•Hisopos estériles
•Tubos estériles
•Solución salina estéril (0.85–0.9%)
•Estándar 0.5 McFarland

2.Controles

•Control positivo: cepa de *A. baumannii* con sobreexpresión conocida de ADC (*Acinetobacter baumannii* BM4454)
•Control negativo: cepa sin sobreexpresión de ADC (*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978

3. Procedimiento, lectura e interpretación

3.1. Preparación del inóculo

• Seleccionar colonias aisladas (18–24 h)
• Suspender en solución salina hasta 0.5 McFarland

3.2. Método con ácido borónico

• Inocular uniformemente una placa MH
• Colocar un disco de CAZ y un disco de CAZ + ácido borónico a una distancia de 20–30 mm (centro a centro).
• Incubar a 35 ± 2°C durante 16–18 h.
• Medir diámetros de inhibición

• Lectura e interpretación:
- Positivo: Incremento ≥ 5 mm del halo con AB
- Negativo: Incremento < 5 mm

3.3. Método con cloxacilina

• Preparar dos placas; una con MHA y otra con MHA + cloxacilina.
• Inocular ambas placas con el mismo inóculo
• Colocar un disco CAZ en MHA y otro disco de CAZ en MHA + cloxacilina
• Incubar a 35 ± 2°C durante16–18 h
• Comparar los diámetros de los halos de inhibición
• Lectura e interpretación:
- Positivo: Incremento ≥ 5 mm en MH + cloxacilina
- Negativo: Incremento < 5 mm

Anexo 2. Métodos de detección de BLEE

No hay un consenso CLSI/EUCAST de detección fenotípica de BLEE como en *E. coli*/*Klebsiella* spp.

1. Detección fenotípica de BLEE

1.1. Materiales y Reactivos

•Agar Mueller-Hinton.
• Discos de:
- Ceftazidima (CAZ, 30 µg)
- Cefotaxima (CTX, 30 µg)
- Ácido clavulánico (CLV, 10 µg) en combinación (p. ej., CAZ-CLV, CTX-CLV) o discos suplementados.

•Hisopos estériles.
•Solución salina 0.85%.
•Patrón McFarland 0.5.

1.2. Controles

Control positivo: BLEE tipo PER/VEB/GES (si disponible):
Control negativo: A. baumannii ATCC 19606.

1.3. Procedimiento

1.3.1 Preparación de la suspensión

•Tomar 3-5 colonias aisladas.
• Ajustar turbidez a 0.5 McFarland.

1.3.2 Difusión en agar con sinergia de inhibidores

• Sembrar placa MH por extensión.

• Colocar discos:
  - o CAZ
  - o CTX
  - o CAZ + CLV
  - o CTX + CLV

• Incubar a 35–37°C por 16–18 h.

1.4. Lectura e interpretación de los resultados

• BLEE positiva: incremento ≥ 5 mm en el halo del disco con clavulánico respecto a su disco correspondiente sin clavulánico.
• BLEE negativa: diferencia < 5 mm.

Anexo 3. Métodos de detección de carbapenemasas

1.Métodos fenotípicos

1.1.Métodos de cribado basados en la determinación de la actividad de los carbapenémicos

1.1.1. Cribado con discos de carbapenémicos (EUCAST)

• Preparar una suspensión bacteriana con un 0.5 McFarland.
• Inocular en placas con agar Mueller-Hinton.
• Colocar discos de meropenem (10 µg) y imipenem (10 µg).
• Incubar 16–18 h a 35–37°C.
• Interpretación EUCAST 2026:

Disco de carbapenémico	Diámetro de halo (mm)	Interpretación
Meropenem 10 µg	≥ 21	S (carbapenemasa improbable)
Meropenem 10 µg	16-20	I (sospecha) → confirmación necesaria
Meropenem 10 µg	<15	R (probable carbapenemasa)
Imipenem 10 µg	≥ 24	S
Imipenem 10 µg	20–23	I
Imipenem 10 µg	<21	R

1.1.2. Métodos automatizados

En los últimos años se han desarrollado sistemas automatizados con paneles que incluyen inhibidores de betalactamasas para detectar la producción de carbapenemasas, como el BD Phoenix CPO Detect Panel. Estos sistemas tienen rendimiento con *A. baumannii* inferior al observado en enterobacterales.

1.2. Métodos colorimétricos rápidos de detección de hidrólisis de imipenem optimizado para *A. baumannii*

Los métodos de hidrólisis de imipenem usados para detectar carbapenemasas, especialmente MBL, en enterobacterias (ej. Carba NP, β-carba) no son útiles para *A. baumannii*. En los últimos años se han desarrollado

nuevos métodos, algunos comerciales optimizados para *A. baumannii,* como el Blue-Carba (o Carba Blue "in-house") y el Rapid Carb Blue Kit® (ROSCO Diagnostica).

Carba-Blue

•Tomar colonias frescas (18-24 h) y suspender en 100–200 µL de agua estéril o NaCl 0.9%. Suspensión densa (≈ McFarland 3–5).
• Preparar un tubo con imipenem (0.3–0.5 mg/mL), azul de bromotimol y buffer (pH ~7.5).
• Añadir 50–100 µL de suspensión bacteriana y mezclar suavemente
• Incubar a 37ºC entre 10 min y hasta 2 h.
• Interpretación:
  - o Azul: negativo (cepa NO productora de carbapenemasa)
  - o Verde/turbio: dudoso o indeterminado
  - o Amarillo: positivo (cepa productora de carbapenemasa). Posiblemente MBL. Este método no detecta bien las CP-OXA, por lo que, por descarte, un resultado positivo indicaría que lo más probable es que la cepa tenga una MBL

Este método se recomienda para un cribado rápido y debe complementarse con otros métodos fenotípicos, como el mCIM/eCIM y confirmarse con métodos moleculares (PCR o secuenciación de ADN). El Carba-Blue no detecta el tipo de carbapenemasa y presenta una sensibilidad variable para detectar CP-OXA, como OXA-23-like, OXA-24/40-like y OXA-58-like, debido a que la hidrólisis es más lenta y pueden obtenerse falsos negativos si se lee demasiado pronto. Entre las ventajas más interesantes de este método destacan no requerir equipamiento, su bajo coste, rapidez (≤30–120 min) y fácil visualización de los resultados.

1.3. Métodos basados en la inmunocromatografía lateral para la detección de carbapenemasas *A. baumannii*

Son métodos con alta sensibilidad y especificidad (>97%), rápidos (15-30 min), sencillos y económicos. En la siguiente tabla se recogen algunas características relevantes de estos tests.

Nombre	Fabricante	Dianas	Comentario
NG-Test CARBA 5	NG Biotech	KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like	No detecta las OXA de *A. baumannii*
O.K.N K-SeT	CorisBioconcept	OXA-48, KPC, NDM	No detecta las OXA de *A. baumannii*
OXA-23 K-SeT	CorisBioconcept	OXA-23	No detecta OXA-24/40 ni OXA-58
OXA-23/40 K-SeT	CorisBioconcept	OXA-23- y OXA-24/40	Sensibilidad variable para OXA-24/40. No detecta OXA-58
LFA multiplex para OXA-23/OXA-40/ OXA-58/NDM	CorisBioconcept	OXA-23/OXA-40/ OXA-58/NDM	Detecta las tres carbapenemasas de tipo OXA más frecuentes en *A. baumannii*

Estos métodos pueden tener un impacto clínico rápido dado que puede permitir el aislamiento temprano de pacientes, ajuste rápido de tratamientos y control de brotes hospitalarios. Es muy útil en la vigilancia epidemiológica de brotes de OXA-23 para el control de clones de *A. baumannii* de alto riesgo como el IC2.

1.4. Métodos basados en la actividad enzimática betalactamasa

mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method)

• Sembrar en césped la cepa indicadora (0.5 McFarland de *E. coli* ATCC 25922) en agar Mueller-Hinton.
• Preparación del inóculo de la cepa problema: tomar 1 µL de colonia fresca (18–24 h) y suspender en 2 mL de caldo tripticasa soja (TSB).
• Introducir disco de meropenem (10 µg).
• Incubar 4 horas a 35 ± 2 °C sin agitación.
• Retirar el disco del tubo y colocarlo sobre la placa con la cepa indicadora.
• Incubar 18–24 h a 35 ± 2 °C
• Medir el halo de inhibición
• Interpretación:
  -≥ 19 mm: cepa NO productora de carbapenemasa
  -16-18 mm: resultado indeterminado
  -≤ 15 mm o presencia de colonias dentro del halo de inhibición: cepa productora de carbapenemasa

eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method)

• Sembrar en césped la cepa indicadora (0.5 McFarland de *E. coli* ATCC 25922) en agar Mueller-Hinton.
• Preparación del inóculo de la cepa problema: tomar 1 µL de colonia fresca (18–24 h) y suspender en 2 mL de caldo tripticasa soja (TSB).
• Añadir al tubo 20 µL de EDTA 0.5 M (pH ~8). Concentración final ≈ 5 mM EDTA
• Introducir disco de meropenem (10 µg).
• Incubar 4 horas a 35 ± 2 °C sin agitación.
• Retirar el disco del tubo y colocarlo sobre la placa con la cepa indicadora.
• Incubar 18–24 h a 35 ± 2 °C
• Medir el halo de inhibición y comparar con el resultado de mCIM (sin EDTA)
• Interpretación:
  -≥ 5 mm más grande que mCIM: cepa productora de MBL
  -≤ 4 mm: cepa no productora de MBL

Recientemente se están desarrollando nuevas variantes del método CIM aún no estandarizadas por EUCAST ni CLSI, como el Triton-CIM o el basado en el uso de meropenem (disco de 10 µg) y triton X-100 al 0.1% – 1% que rompe parcialmente la membrana externa, facilitando la liberación de carbapenemasas periplásmicas y aumentando el contacto enzima–carbapenem.

2. Métodos moleculares

Los métodos moleculares genómicos pueden usarse para confirmar los resultados fenotípicos obtenidos o utilizarse directamente sin uso previo de métodos fenotípicos, dependiendo de la epidemiología local y de los recursos disponibles. Desde el punto de vista técnico se basan en la amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR (convencional y tiempo real) o la amplificación isotérmica LAMP, y en la secuenciación de ácidos nucleicos: Sanger para amplicones y WGS para secuenciación masiva (ej. *short-read:* MiSeq de Illumina y/o *long-read*: minION de Oxford Nanopore). Se pueden usar métodos no comerciales en formato multiplex, lo

que aumenta mucho la flexibilidad metodológica, o en formato uniplex, con y sin secuenciación de ADN. En la siguiente tabla se recogen algunas de las características más relevantes de los métodos más usados.

Tabla. Características relevantes de algunos métodos moleculares comercializados para la detección de carbapenemasas de tipo OXA (CP-OXA) y de metalobetalactamasas en *A. baumannii*

Nombre	Plataforma	Método	Dianas	Limitaciones o Ventajas
Xpert Carba-R	Cepheid (GeneXpert)	RT-PCR multiple	KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48	No detecta CP-OXA típicas de *A. baumannii*
BD MAX Check-Points CPO Assay	BD	RT-PCR multiple	KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48	No detecta CP-OXA típicas de *A. baumannii*
Allplex Entero-DR Assay	Seegene	RT-PCR multiple	KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48	Algunos paneles incluyen OXA-23-like
AmpliSens® MDR MBL-FRT PCR kit	Amplisens	RT-PCR multiple	VIM, NDM, IMP	No detecta CP-OXA típicas de *A. baumannii*
AmpliSens® MDR Acinetobacter-OXA-FL	Amplisens	RT-PCR multiple	OXA-23, OXA24/40, OXA-58 +/- NDM	Detecta las CP-OXA más frecuentes y NDM
Verigene Gram-negative Blood Cultures test	Verigene	RT-PCR múltiple	KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48	Detecta bacterias + genes de resistencia directamente de hemocultivos. No detecta CP-OXA típicas de *A. baumannii*
Eazyplex SuperBug Complete A	AmplexDiagnostics GmbH	LAMP	OXA-23, OXA24/40, OXA-58, NDM, IMP	No detecta VIM
BioFire FilArray BCID2	biomerieux	Microarray	KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48	Detecta bacterias + genes de resistencia directamente de hemocultivos. No detecta CP-OXA típicas de *A. baumannii*
MiSeq/HiSeq	Illumina	NGS	Detecta todas las carbapenemasas	Detecta todas las carbapenemasas conocidas
MinION	Oxford Nanopore	NGS	Detecta todas las carbapenemasas	Detecta todas las carbapenemasas conocidas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	*Lectura interpretada de la resistencia antibiótica en Stenotrophomonas maltophilia y Achromobacter xylosoxidans*	PNT-3	
		Edición Nº 01	Página 1 de 11

PNT-3

Lectura interpretada de la resistencia antibiótica en *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro…….....….
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

1.PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento del algoritmo para la lectura interpretada de la resistencia antibiótica en *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans.*

El alcance de este documento es el estudio de sensibilidad fenotípica de *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans*, a partir de colonia. Queda fuera, por tanto, del alcance de este procedimiento la aplicación de técnicas fenotípicas, moleculares o genómicas directamente sobre muestra clínica.

2.FUNDAMENTO

Guiar la detección fenotípica, estandarizada y práctica de los principales mecanismos de resistencia en *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans.* Desde el punto de vista de la interpretación fenotípica de los mecanismos de resistencia, se han tenido en cuenta de forma primaria criterios microbiológicos equiparando la “S” (sensible exposición estándar) y la “I” (sensible exposición incrementada) de EUCAST cuando aplican a poblaciones silvestres y utilizando la “r” para definir condiciones de sensibilidad disminuida, pero por debajo de los puntos de corte de resistencia clínica (R).

S. maltophilia presenta mecanismos de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos. Está influenciado por dos genes cromosómicos inducibles, L1 (una metalo-beta-lactamasa de clase B3) y L2 (una serina betalactamasa con hidrólisis por cefalosporinasa), que afectan la actividad de todos los betalactámicos, incluidos los carbapenémicos y el aztreonam. Además, *S. maltophilia* presenta la resistencia esperada a los amin*oglucósidos debido a la producción de dos proteasas (ClpA y HtpX),* enzimas modificadoras de aminoglucósidos como la aminoglucósido-fosfotransferasa (APH-3’-IIc) o la acetiltransferasa *(AAC-6’-Iz), y varias bombas* de eflujo RND como SmeYZ. Otras bombas de eflujo también podrían comprometer la actividad de las tetraciclinas. La presencia del gen *Smqnr*, codificado cromosómicamente, disminuye aún más la actividad de las fluoroquinolonas. Además, pueden existir genes adquiridos que confieren resistencia a una amplia gama de agentes, incluido el trimetoprim-sulfametoxazol.

La resistencia esperada a antibióticos betalactámicos en *A. xylosoxidans* viene principalmente determinada por la presencia de dos bombas de expulsión de fármacos de la familia RND: AxyABM y AxyXY-OprZ y por la betalactamasa de clase D no inducible codificada cromosómicamente, OXA-114. Estos mecanismos intrínsecos en *A. xylosoxidans* hacen que la población silvestre presente un perfil general de resistencia esperada a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Mientras que puede presentar sensibilidad a ceftazidima, cefepima, piperacilina, meropenem e imipenem. Los mecanismos de resistencia adquiridos pueden ser debidos a una sobreexpresión de las bombas de expulsión o a la adquisición de elementos genéticos externos. *A. xylosoxidans* posee una gran capacidad de captación genes de resistencia horizontales portadores de resistencias a betalactámicos. Se han descrito hasta la fecha numerosas betalactamasas adquiridas tales como betalactamasas de espectro reducido (PSE-1 y TEM-1), betalactamasas de espectro extendido (CTX-M y VEB-1), AmpCs plasmídicas (CMY-2) y carbapenemasas (clase B: IMP, VIM, TMB, NDM-1, clase A: AXC, clase D: OXA21).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Navarro F (Coordinador). Calvo J, Canton R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica no 38. SEIMC 2011. Disponible en http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia38.pdf.

Fenotipos esperados de resistencia, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/ eucast/pdf/expert_rules/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf

Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en www.eucast.org.

Documento guía de *Stenotrophomonas maltophilia*, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Stenotrophomonas_maltophilia_guidance_document_v2_20241114.pdf

Documento guía de qué hacer cuando no hay puntos de corte, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/When_there_are_no_breakpoints_2024-09-03.pdf

Documento guía de rea de Incertidumbre Técnica. Disponible en https://www.eucast.org/ fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Area_of_Technical_Uncertainty_-_guidance_v4_2024.pdf

Documento para el control de calidad de la determinación de CMI y disco difusión, EUCAST. Disponible en https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/

4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

4 .1. CONDICIONES TÉCNICAS GENERALES

El método de referencia para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a *S. maltophilia* es la microdilución en caldo según la ISO 20776-1. Sin embargo, se han descrito discrepancias entre metodologías en cuanto a la precisión y reproducibilidad de las pruebas de sensibilidad in vitro utilizados en los laboratorios tales como, la difusión con discos o con las tiras en gradiente de concentración y la microdilución con métodos automatizados. La dificultad inherente a la determinación de la actividad *in vitro* se ve agravada por la limitada disponibilidad de puntos de corte clínicos definidos en los distintos comités, lo que dificulta la estandarización e interpretación del antibiograma para este microorganismo.

Actualmente EUCAST únicamente define un punto de corte clínico para cotrimoxazol (S ≤0,001 mg/L y R >2mg/L), enfatizando la necesidad de la utilización de exposición incrementada para este antimicrobiano. También se describen ECOFFs para la mayoría de alternativas de tratamiento recomendadas para este microorganismo (minociclina, tigeciclina, levofloxacino), así como para los nuevos betalactámicos como cefiderocol (0,125 mg/L) y aztreonam-avibactam (8 mg/L).

Las pruebas de sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol pueden realizarse mediante métodos de difusión en disco. Sin embargo, la lectura de los bordes de la zona de inhibición es compleja y requiere orientación. EUCAST ha publicado una guía en forma de imágenes en la tabla de puntos de corte. Si se determina la CMI,

debe leerse a la concentración más baja que inhiba aproximadamente el 80 % del crecimiento en comparación con el control de crecimiento.

Las pruebas de sensibilidad a aztreonam-avibactam no presentan complicaciones técnicas, pero no existe aún evidencia como para establecer un punto de corte clínico, así como de los datos de difusión en disco necesarios para definir las correlaciones del diámetro de la zona. El ECOFF se puede utilizar para excluir mecanismos de resistencia adquirida (presencia de resistencia indicada por CMI >8 mg/L o diámetro de zona del disco de aztreonam-avibactam 30-20 µg <21 mm).

Respecto a los nuevos antimicrobianos tales como ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam y meropenem-vaborbactam, la combinación con el inhibidor de betalactamasa no parece aportar beneficio respecto al betalactámico en solitario. No hay suficientes datos clínicos para determinar un punto de corte clínico para el cefiderocol. La determinación de la CMI del cefiderocol por microdilución en caldo debe realizarse en caldo Mueller-Hinton con deficiencia de hierro y deben seguirse las instrucciones de lectura específicas. Los aislados con valores de CMI ≤0,5 mg/L (diámetro de zona ≥26 mm) carecen en su mayoría de mecanismos de resistencia y es probable que sean un objetivo para el tratamiento con este agente. Los aislados con CMI de 1-2 mg/L tienen algunos mecanismos de resistencia adquirida. Los aislados con valores de CIM >2 mg/L (diámetro de zona <22 mm) han adquirido mecanismos de resistencia y es probable que sean resistentes a este agente.

No se dispone de criterios de difusión en disco para fluoroquinolonas ni tetraciclinas. Los ECOFF pueden utilizarse para excluir mecanismos de resistencia adquirida.

Actualmente EUCAST incluye puntos de corte para *A. xylosoxidans* para meropenem, piperacilina-tazobactam y cotrimoxazol. Las pruebas de sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol pueden realizarse mediante métodos de difusión en disco y con tiras de gradiente de concentración. Sin embargo, la lectura de los bordes de la zona de inhibición es compleja y requiere orientación. EUCAST ha publicado una guía en forma de imágenes en la tabla de puntos de corte. Si se determina la CMI, debe leerse a la concentración más baja que inhiba aproximadamente el 80 % del crecimiento en comparación con el control de crecimiento.

4.2. CONFIRMACION DE IDENTIFICACION Y CALIDAD

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Reactivos necesarios para la determinación de sensibilidad:

- Placa de agar Mueller-Hinton.
- Discos de antibióticos.
- Sistemas comerciales de determinación de sensibilidad a antimicrobianos (equipo y fungibles).

Control de calidad.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para obtener información sobre los agentes no cubiertos por esta cepa y para el control de los inhibidores de betalactámicos, consulte las tablas de control de calidad de EUCAST.

<table>
<tr><td rowspan="2">Servicio / Unidad de Microbiología
Hospital.....</td><td rowspan="2">Lectura interpretada de la resistencia antibiótica en Stenotrophomonas maltophilia y Achromobacter xylosoxidans</td><td colspan="2">PNT-3</td></tr>
<tr><td>Edición Nº 01</td><td>Página 5 de 11</td></tr>
</table>

5. APARATOS Y MATERIAL

En función del tipo de determinación de sensibilidad, difusión en disco, tiras de gradiente o microdilución, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

5.1. APARATOS

Disco difusión y tiras de gradiente:

• Estufa de 35ºC.
• Agitador tipo vortex.
• Nevera de 4ºC.
• Congelador (-20ºC).
• Posibilidad de lector semiautomático.

Microdilución:
• Estufa de 35ºC.
• Agitador tipo vórtex.
• Nevera de 4ºC.
• Equipo de lectura semiautomática

5.2. MATERIAL

Disco difusión y tiras de gradiente:

• Asas de siembra.
• Torundas de algodón estériles.
• Dispensadores multidisco o pinzas.
• Escala del 0.5 de McFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
• Contenedores para desechar material infeccioso.
• Discos y tiras de gradiente
• Placas de agar Mueller Hinton

Microdilución:

• Asas de siembra.
• Torundas de algodón estériles.
• Dispensadores en función del equipo de lectura.
• Escala del 0.5 de McFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
• Contenedores para desechar material infeccioso.
• Paneles-tarjetas en función del equipo de lectura.
• Placas de agar para control de crecimiento de los paneles-tarjetas.
El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Lectura interpretada de la resistencia antibiótica en *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans*	PNT-3	
		Edición Nº 01	Página 6 de 11

6. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

• Ensayos de sinergia con inhibidores de betalactamasa (cloxacilina, clavulánico, avibactam y/o EDTA):

Esta técnica podría tener alguna utilidad en *A. xiloxosidans* pero no en *S. maltophilia,* ya que su resistencia esperada viene principalmente determinada por la expresión de dos beta-lactamasas inducibles (L1 y L2).

Este método está disponible comercialmente por diferentes fabricantes o también puede hacerse mediante la adición de inhibidores a discos de carbapenémicos. El ácido clavulánico y el borónico inhiben carbapenemasas de clase A, el avibactam inhibe las betalactamasas de clases A y C, y el ácido dipicolínico y el etilendiamino-tetracético (EDTA) inhiben carbapenemasas de clase B. La cloxacilina, que inhibe las beta-lactamasas AmpC, se añade a los tests para diferenciar entre hiperproducción de AmpC más pérdida de porinas y producción de carbapenemasas. El método de sinergia de doble disco utilizando la combinación de ceftazidima y ácido clavulánico puede detectar la producción de una BLEE. La mayor desventaja de estos métodos es que hay que esperar unas 18h (periodo de incubación de las placas) para obtener resultados, además de la difícil interpretación cuando hay presencia concomitante de mecanismos de resistencia cromosómicos.

• Ensayos de hidrólisis (Carbapenem Inactivation Method CIM):

Estas pruebas se pueden usar para determinar si existe la producción de carbapenemasas, pero no identifican las enzimas o genes específicos responsables.

Puede tener alguna utilidad en *A. xyloxosidans*, ya que en aquellos aislados de *A. xyloxosidans* con CMIs altas a carbapenémicos, se recomienda estudiar la posible presencia de carbapenemasas, teniendo en cuenta, sin embargo, que la resistencia a estos antibióticos puede ser debida a otros mecanismos como la sobreexpresión de bombas de expulsión. El porcentaje de productores de carbapenemasas entre los aislados resistentes a carbapenémicos se ha descrito en un 15%.

El método modificado de inactivación de carbapenémicos ha demostrado una sensibilidad del 100% y una especificidad del 87%, por lo que se sugiere que podría utilizarse como método de cribado para detección de carbapenemasas, con la necesidad de una confirmación con otro método ante resultados positivos.

Éste método (mCIM-test) consiste en la detección de hidrólisis enzimática al incubar un antibiótico carbapenémico con una suspensión bacteriana, utilizando discos antibióticos como sustrato. Después de 4 horas de incubación de una suspensión bacteriana con un disco de meropenem, el disco se coloca en una placa de agar inoculada con *Escherichia coli* ATCC 25922. Se deben medir los milímetros de halo de inhibición, ya que la presencia de una carbapenemasa habrá hidrolizado el carbapenémico del disco y por tanto evitará la inhibición. La falta de actividad de la carbapenemasa, dará lugar a un halo de inhibición, pues el meropenem presente en el disco no habrá sido hidrolizado. Su efectividad es variable, y al igual que el método de combinación de discos de inhibidores requiere de 18h de incubación.

• Inmunocromatografías para la detección de carbapenemasas o BLEE:

Estos métodos están basados en la captura inmunológica de epítopos de las diferentes carbapenemasas,

utilizando nanopartículas de oro coloidales unidas a una membrana de nitrocelulosa dentro de un aparato con flujo lateral. Este método está disponible por diferentes casas comerciales. El procedimiento de trabajo a seguir es el recomendado por el proveedor.

• PCR de para la detección de mecanismos de resistencia:

A. xylosoxidans posee una gran capacidad de captación genes de resistencia horizontales portadores de resistencias a betalactámicos. Se han descrito hasta la fecha numerosas betalactamasas adquiridas tales como betalactamasas de espectro reducido (PSE-1 y TEM-1), beta-lactamasas de espectro extendido (CTX-M y VEB-1), AmpCs plasmídicas (CMY-2) y carbapenemasas (clase B: IMP, VIM, TMB, NDM-1, clase A: AXC, clase D: OXA21).

En el caso de *S. maltophilia*, se ha descrito la presencia de metalocarbapenemasas adquiridas, e incluso plásmidos portadores de una amplia gama de genes de resistencia en aislados ambientales, pero la importancia de estos hallazgos radicaría en el papel de este microorganismo como reservorio de estas resistencias.

La detección molecular mediante PCR de BLEE, AmpC y carbapenemasas es una herramienta de diagnóstico rápido y preciso para identificar mecanismos de resistencia. Pueden utilizarse métodos "*in house*" o bien PCR multiplex que detectan simultáneamente las carbapenemasas/BLEE más frecuentes. En el caso de carbapenemasas existen paneles comerciales que detectan KPC, NDM, VM, IMP y OXA-48. En el caso de BLEE, existen paneles comerciales que detectan CTX-M, TEM y SHV.

• Secuenciación WGS:

La secuenciación masiva permite la detección simultánea de múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos mediante el análisis del genoma completo (WGS) o paneles dirigidos. Identifica genes de resistencia adquiridos y mutaciones cromosómicas, superando las limitaciones de los métodos fenotípicos tradicionales al ofrecer información epidemiológica y de transmisión precisa.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS, INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOSDE CULTIVO

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Se hace una suspensión bacteriana ajustada 0.5 McFarland con un asa de siembra y se descarga la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa.
5. La siembra para un antibiograma (técnica de Kirby-Bauer) se realiza mediante inóculo en césped utilizando un hisopo estéril. Se empapa el hisopo en la suspensión bacteriana ajustada previamente preparada y se extiende por toda la superficie de un agar Mueller-Hinton en tres direcciones, rotando la placa 60°, para asegurar un crecimiento uniforme. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35+-1ºC.
6. En el caso de optar por un método de microdilución en caldo semiautomático, se seguirán las instrucciones según las normas de cada fabricante.
7. Realizar lectura a las 18+-2 horas de incubación. Si la lectura está automatizada (disco difusión o microdilución), seguir las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.
8. Aplicación del algoritmo

7.2. CONTROL DE CALIDAD DEL ANTIBIOGRAMA

En cualquier antibiograma debe confirmarse que el cultivo está puro.
En caso de contaminación o dudas de la identificación, se confirmará por MALDI-TOF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana y/ o se repetirá el antibiograma.
Además, tal y como recomienda la guía de EUCAST, se hará un control de calidad de los métodos de determinación de sensibilidad del antibiograma.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Existen diferentes métodos comerciales basados en estos mismos principios que utilizan tiras de gradiente de antibiótico o discos de antibióticos. El procedimiento a seguir y la interpretación de los resultados se realizarán según las indicaciones de los fabricantes y guías EUCAST correspondientes.

Este PNT describe un algoritmo para el estudio e informe selectivo de antibióticos en *S. maltohilia* y *A. xyloxoxidans y* la inferencia de los mecanismos de resistencia implicados.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.
El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.
La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En general, las presencias de mecanismos mixtos de resistencia a antibióticos dificultan en gran medida la detección fenotípica.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado “Anotaciones al procedimiento”.

Este procedimiento es de utilidad para evaluar la sensibilidad a los antibióticos e interpretar los antibiogramas de *S. maltophilia* y *A. xylososidans*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que sólo se pueden obtener datos fiables si las técnicas de estudio de la sensibilidad antibiótica han sido realizadas mediante procedimientos estandarizados y con sistemas que garanticen la fiabilidad y calidad de los mismos.

Este procedimiento no hace referencia a antibiogramas de muestra directa ni a la predicción de resistencias basados en técnicas de secuenciación masiva.

Una limitación importante es la actual falta de concentraciones adecuadas para la categorización de trimetoprim-sulfametoxazol como SIR en los paneles comerciales. La evidencia disponible sobre algunos mecanismos de resistencia antimicrobiana emergente es limitada. Además, dado que la resistencia a los antimicrobianos evoluciona continuamente, es posible la aparición de nuevos mecanismos de resistencia que no estén contemplados en este procedimiento.

12. BIBLIOGRAFÍA

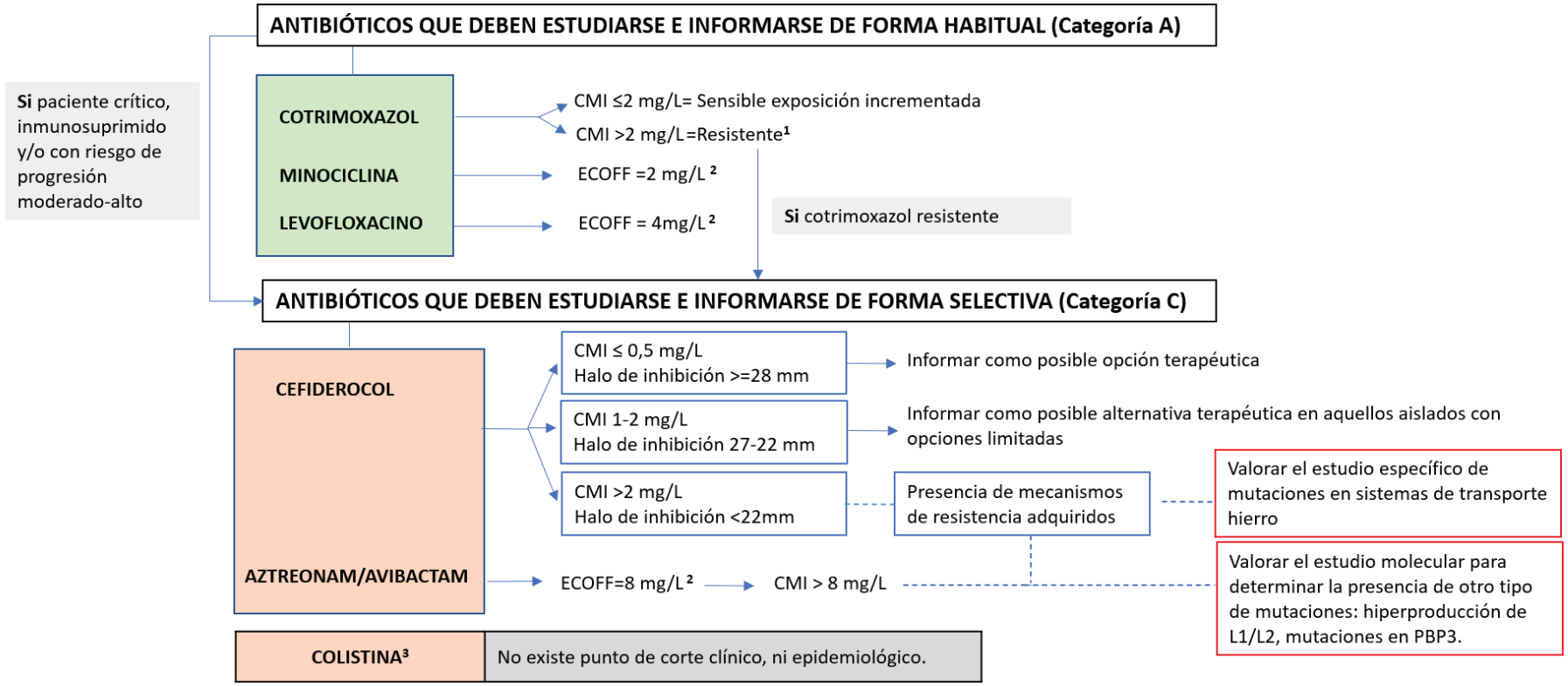
1. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. J Clin Microbiol. 2018 Oct 25;56(11):e01140-18. doi: 10.1128/JCM.01140-18. PMID: 3015819

2.Calvo J, Canton R, Fernandez-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica no 38. SEIMC 2011. Disponible en:https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf

3. Protocolos Red de Laboratorio para la Vigilancia de los microorganismos Resistentes (RedLabRA): Detección fenotípica de enterobacterias productoras de carbapenemasas y pruebas de hidrólisis antibiótica (carbapenémico) e inmunocromatográficas. Disponible en:https://www.isciii.es/documents/20119/dd37fc5a-5cbc-5654-bc75-3f67a2c034c8

4. Causapé López C, González Candelas F, Carmona MT y Oliver Palomo A. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica no 71. SEIMC 2021. Disponible en:https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimiento71.pdf

ALGORITMO DE TRABAJO EN *Stenotrophomonas maltophilia*



[1] Se han descrito aislados resistentes a cotrimoxazol, portadores de carbapenemasas tipo IMP. Valorar el estudio molecular para determinar la presencia de carbapenemasas transferibles. Se han descrito falsos positivos (NDM, OXA-48) por inmunocromatografía.

[2] Por debajo del ECOFF, se podría informar como opción terapéutica. Por encima del ECOFF, se desaconsejaría el tratamiento con ese antibiótico.

[3]En caso de que sea necesario informar la categorización, inferir según el punto de corte de *P. aeruginosa* (4 mg/L). Además, sería conveniente añadir el siguiente comentario: "La colistina se administra a menudo en combinación con otros antimicrobianos, ya sea para potenciar su actividad o para ampliar el espectro terapéutico. En infecciones sistémicas, la colistina debe estar respaldada por otra terapia activa".
En infecciones del tracto respiratorio (pacientes con ventilación mecánica/fibrosis quística), puede considerarse la administración de colistina inhalada.

Algoritmo de trabajo en *Stenotrophomonas maltophilia*. En este esquema se muestran los antibióticos que deben estudiarse e informarse en *S. maltophilia* según el tipo de paciente y el perfil antimicrobiano del aislado. Asimismo, se indican los puntos de corte clínicos de EUCAST o los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) en ausencia de puntos de corte clínicos y consideraciones sobre la interpretación de la sensibilidad en ausencia de puntos de corte específicos. Se especifican los supuestos en los que se debe considerar el estudio de mecanismos de resistencia.

ALGORITMO DE TRABAJO EN *Achromobacter xylosoxidans*

ANTIBIÓTICOS QUE DEBEN ESTUDIARSE E INFORMARSE DE FORMA HABITUAL (Categoría A)

	SENSIBLE	RESISTENTE
COTRIMOXAZOL	≤ 0,125 mg/L	> 0,125 mg/L
PIPERACILINA/TAZOBACTAM	≤ 4 mg/L	> 4 mg/L
MEROPENEM	≤ 1 mg/L	> 4 mg/L
	Posible opción terapéutica	**Desaconsejar el tratamiento**
MINOCICLINA[1]	≤ 4 mg/L	≥ 16 mg/L
CEFTAZIDIMA[2]	≤ 8 mg/L*	> 8 mg/L
IMIPENEM[2]	≤ 4 mg/L*	> 4 mg/L
CIPROFLOXACINO[2]	≤ 0,5 mg/L*	> 0,5mg/L
LEVOFLOXACINO[2]	≤ 2 mg/L*	> 2mg/L

Si carbapenémicos resistentes→ valorar el estudio para determinar la presencia de carbapenemasas

Cribado con CIM test/Inmunocromatografía

ANTIMICROBIANOS QUE DEBEN ESTUDIARSE DE FORMA HABITUAL E INFORMARSE DE FORMA SELECTIVA (Categoría B)

Si Ceftazidima resistente, valorar informar:	**CEFTAZIDIMA/ AVIBACTAM [2,3]**	**Posible opción terapéutica**	**Desaconsejar el tratamiento**
		≤ 8 mg/L	> 8 mg/L

ANTIBIÓTICOS QUE DEBEN ESTUDIARSE E INFORMARSE DE FORMA SELECTIVA (Categoría C)

Si Meropenem resistente, valorar estudio de:	**MEROPENEM/ VABORBACTAM[4]**	**Posible opción terapéutica**	**Desaconsejar el tratamiento**
		≤ 8 mg/L	> 8 mg/L

Si betalactámicos resistentes, valorar estudio de:	**Posible opción terapéutica**	**Alternativa en aislados con opciones limitadas**	**Desaconsejar el tratamiento**
CEFIDEROCOL	≤ 0,5 mg/L >=28 mm	1-2 mg/L 27-22 mm	> 2 mg/L <22mm

Valorar el estudio específico de mutaciones en sistemas de transporte hierro

Presencia de mecanismos de resistencia adquiridos

COLISTINA[5]	No existe punto de corte clínico, ni epidemiológico.

[1]Según guía CLSI (tabla del grupo no enterobacterias)
[2]Inferido de los puntos de corte de *P. aeruginosa.* Por debajo del punto de corte, se podría informar como opción terapéutica, por encima se desaconsejaría el tratamiento con ese antibiótico.*Exposición incrementada
[3]En casos de resistencia a ceftazidima y disminución de la CMI de ceftazidima-avibactam respecto a ceftazidima, considerar la posible presencia de betalactamasas de clase A o C
[4]Adaptado de la Sociedad Francesa de Microbiología
[5]En caso de que sea necesario informar la categorización, inferir según el punto de corte de *P. aeruginosa* (4 mg/L). Además, sería conveniente añadir el siguiente comentario: "La colistina se administra a menudo en combinación con otros antimicrobianos, ya sea para potenciar su actividad o para ampliar el espectro terapéutico. En infecciones sistémicas, la colistina debe estar respaldada por otra terapia activa." En infecciones del tracto respiratorio (pacientes con ventilación mecánica/fibrosis quística), puede considerarse la administración de colistina inhalada.

Algoritmo de trabajo en *Achromobacter xylosoxidans*. En este esquema se muestran los antibióticos que deben estudiarse e informarse en *A. xylosoxidans* según el perfil antimicrobiano del aislado. Asimismo, se indican los puntos de corte clínicos de EUCAST y consideraciones sobre la interpretación de la sensibilidad en ausencia de puntos de corte específicos. Se especifican los supuestos en los que se debe considerar el estudio de mecanismos de resistencia. CIM: método de inactivación de carbapenem.