



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos en enterobacterias

Alba Rivera<sup>a</sup>, Nieves Larrosa<sup>b,c,d</sup>, Beatriz Mirelis<sup>a,c,d,e</sup> y Ferran Navarro<sup>a,c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

<sup>c</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, España

<sup>d</sup>Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>e</sup>Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, España.

### RESUMEN

#### Palabras clave:

$\beta$ -lactamasas  
Control de calidad  
 $\beta$ -lactamasas AmpC  
Carbapenemasas  
Resistencia antimicrobiana

Los  $\beta$ -lactámicos son los antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias, y el principal mecanismo de resistencia frente a ellos es la producción de  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas de mayor relevancia clínica, debido a su perfil de sustrato y a sus repercusiones epidemiológicas, son las de espectro extendido, las de clase C y las carbapenemasas. La detección fenotípica de estas  $\beta$ -lactamasas puede ser complicada y se basa, generalmente, en la utilización de inhibidores específicos y en la demostración de la pérdida de actividad frente a  $\beta$ -lactámicos indicadores. A pesar de que diferentes comités internacionales no consideran necesaria la determinación del mecanismo de resistencia ni la interpretación del antibiograma, son varias las voces críticas que estiman imprescindible esta detección y alertan de la conveniencia de interpretar el antibiograma mientras no se disponga de más datos sobre la eficacia clínica de los  $\beta$ -lactámicos en estos casos.

Por estas dificultades metodológicas y los constantes cambios de criterios de interpretación, consideramos imprescindibles las labores de docencia en este campo. En este sentido, los controles de calidad externos son de gran relevancia para la continua actualización en esta área. Cualquiera de estos programas debe ir siempre acompañado de una revisión de los resultados, de la metodología y de las causas de los posibles errores, para poder realizar una actividad docente completa. En el presente trabajo se repasan y contextualizan todos los aspectos relacionados con la detección e interpretación de estas  $\beta$ -lactamasas.

© 2014 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### Keywords:

$\beta$ -lactamases  
Quality control  
AmpC  $\beta$ -lactamases  
Carbapenemases  
Antimicrobial resistance

### Importance of quality control for the detection of $\beta$ -lactam antibiotic resistance in Enterobacteriaceae

#### ABSTRACT

$\beta$ -lactam antimicrobial agents are frequently used to treat infections caused by Enterobacteriaceae. The main mechanism of resistance to these antibiotics is the production of certain enzymes, collectively named  $\beta$ -lactamases. Due to their substrate profile and their epidemiological implications, the most clinically important  $\beta$ -lactamases are extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, class C  $\beta$ -lactamases and carbapenemases. Phenotypic detection of these enzymes may be complicated and is based on the use of specific inhibitors of each  $\beta$ -lactamase and on the loss of activity on some  $\beta$ -lactam indicators. Various international committees postulate that it is no longer necessary to interpret the susceptibility results or determine the mechanism of resistance. Several critics disagree, however, and consider that susceptibility results should be interpreted until more data are available on the clinical efficacy of treatment with  $\beta$ -lactams.

Given these methodological difficulties and constant changes in the interpretation criteria, we consider that training and external quality controls are essential to keep updated in this field. For learning purposes, these external quality controls should always be accompanied by a review of the results and methodology used, and the analysis of errors. In this paper we review and contextualize all the aspects related to the detection and interpretation of these  $\beta$ -lactamases.

© 2014 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fnavarror@santpau.cat (F. Navarro).

## Introducción

Los  $\beta$ -lactámicos son los antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias. La actividad de estos compuestos se ve comprometida por la creciente proliferación y diversificación de  $\beta$ -lactamasas, enzimas bacterianas con capacidad de hidrolizar y conferir resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican según su estructura molecular en 4 clases: A, B, C y D<sup>1</sup>. También pueden clasificarse según el patrón de sustrato y el perfil de inhibición<sup>2</sup>. Las enzimas de las clases A, C y D se caracterizan por presentar una serina en su centro activo, mientras que las de clase B son metaloenzimas que contienen al menos un ión cinc en su centro activo. La clasificación funcional basada en el patrón de sustrato y el perfil de inhibición divide las  $\beta$ -lactamasas en 3 grandes grupos y varios subgrupos, que se correlacionan con la clasificación molecular. El grupo 1 (clase C) incluye las cefalosporinas ( $\beta$ -lactamasas tipo AmpC), el grupo 2 (clases A y D) incluye las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, las resistentes a inhibidores, las de espectro extendido (BLEE) y las serincarbapenemasas, y el grupo 3 (clase B) las metalo- $\beta$ -lactamasas.

Las  $\beta$ -lactamasas pueden estar codificadas por genes cromosómicos propios de especie o bien adquiridos a través de elementos genéticos móviles. Las BLEE, las  $\beta$ -lactamasas AmpC y las carbapenemasas son las que presentan mayor relevancia clínica debido a su amplio perfil de sustrato y a sus repercusiones clinicoepidemiológicas. El principal problema de las enterobacterias productoras de estas  $\beta$ -lactamasas es la gran limitación de las opciones terapéuticas disponibles. Esto es debido, sobre todo, a que en los plásmidos donde van vehiculizados los genes codificadores de las  $\beta$ -lactamasas suelen coexistir genes de resistencia a aminoglucósidos (p. ej., *aac(6')-Ib-cr* en CTX-M-15), sulfonamidas y tetraciclinas, y a que, además, en estas cepas se suele asociar resistencia a quinolonas<sup>3</sup>. Otro hecho, no menos importante, es que las bacteriemias ocasionadas por este tipo de aislados se asocian a una mayor mortalidad, sobre todo en relación con el tratamiento inicial inadecuado<sup>4,5</sup>.

Las BLEE presentan actividad sobre penicilinas, cefalosporinas de todas las generaciones y monobactámicos. No afectan a cefamicinas ni a carbapenémicos y, generalmente, se inhiben con ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam<sup>6</sup>. La mayor parte de BLEE pertenecen a la clase A, en la que se incluyen los 3 tipos principales, TEM, SHV y CTX-M, y otros poco frecuentes como PER, GES, VEB, BES, BEL, TLA y SFO<sup>7</sup>. Las BLEE tipo TEM y SHV se empezaron a describir en los años ochenta y derivan de sus predecesoras TEM-1, TEM-2 y SHV-1 por mutaciones puntuales que amplían el espectro. Las BLEE CTX-M derivan de enzimas cromosómicas de *Kluyvera* spp. y son las que han adquirido una mayor expansión en los últimos años, tanto en el ámbito nosocomial como en la comunidad<sup>8</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas AmpC se encuentran de forma natural en algunas especies de enterobacterias, en las que se expresan de manera constitutiva y a bajo nivel, como en *Escherichia coli*, o bien de manera inducible, como en *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens*. La expresión basal del gen *ampC* de *E. coli* no confiere resistencia clínica debido a la existencia de un promotor débil y un atenuador transcripcional mientras que en otras enterobacterias afecta a aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, y amoxicilina-ácido clavulánico. Diversas mutaciones en el promotor, atenuador o en genes reguladores originan la producción permanente de valores elevados de  $\beta$ -lactamasas, con lo que el patrón de resistencia se amplía a cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos<sup>9</sup>.

Los genes que codifican las  $\beta$ -lactamasas AmpC cromosómicas pueden pasar a elementos genéticos móviles y transmitirse de manera horizontal entre diferentes especies. Estas  $\beta$ -lactamasas conocidas como AmpC adquiridas o plasmídicas (AmpCp) confieren el mismo patrón de resistencia que el de la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas AmpC cromosómicas. Se han descrito varias AmpCp, que incluyen

CMY, ACT, FOX, MOX, DHA, MIR, ACC, CFE y LAT, siendo las de la familia CMY las más prevalentes<sup>9</sup> (<http://www.lahey.org/Studies/>).

También se han descrito variantes de  $\beta$ -lactamasas AmpC conocidas como AmpC de espectro extendido, en las que mutaciones en la proximidad del centro activo provocan que el espectro de hidrólisis se amplíe a cefalosporinas de cuarta generación<sup>10</sup>.

Las carbapenemasas son las  $\beta$ -lactamasas con el perfil de sustrato más amplio, ya que abarca la mayor parte de  $\beta$ -lactámicos, incluidos los carbapenémicos<sup>11,12</sup>. Se clasifican en las clases moleculares A, B y D. Entre las carbapenemasas de clase A, la descrita con más frecuencia en enterobacterias es KPC, que presenta actividad hidrolítica sobre todos los  $\beta$ -lactámicos y es inhibida parcialmente por ácido clavulánico, tazobactam y ácido borónico. Las carbapenemasas de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas como IMP, VIM y NDM hidrolizan todos los  $\beta$ -lactámicos excepto aztreonam, y son inhibidas por quelantes metálicos como EDTA y ácido dipicolínico. En el grupo de  $\beta$ -lactamasas de clase D, la más frecuente en enterobacterias es OXA-48, que hidroliza aminopenicilinas, ureidopenicilinas y carbapenémicos a bajo nivel, pero no afecta a cefalosporinas de amplio espectro. No se inactiva con los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de uso clínico, pero sí con cloruro sódico in vitro.

## Detección

La detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas comprende técnicas de cribado y de confirmación. Las técnicas de cribado se basan en el estudio de la sensibilidad frente a  $\beta$ -lactámicos indicadores, para los que se han establecido puntos de corte generalmente coincidentes o cercanos a los puntos de corte epidemiológicos que permiten definir una disminución de la sensibilidad. Tanto el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) coinciden en que los antibióticos indicadores más idóneos son ceftazidima y cefotaxima, o ceftriaxona para el cribado de BLEE y meropenem para el de carbapenemasas, si bien difieren en la definición de los valores críticos<sup>13,14</sup> (tabla 1).

La mayor parte de las pruebas fenotípicas de confirmación se basan en la utilización de inhibidores específicos de cada tipo de  $\beta$ -lactamasas y en la demostración de la pérdida de actividad con  $\beta$ -lactámicos indicadores. Para la detección de BLEE se utiliza el ácido clavulánico como inhibidor en una variedad de técnicas que incluyen la sinergia de doble disco, los discos combinados, la difusión en gradiente y la microdilución<sup>13-18</sup>.

En el caso de la detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas AmpC el CLSI no aporta ninguna recomendación. El EUCAST ha desarrollado una guía con recomendaciones para el cribado y para la confirmación tanto de  $\beta$ -lactamasas AmpC como BLEE y carbapenemasas<sup>14</sup>. Este comité aconseja utilizar como cribado para la detección de AmpC la reducción de sensibilidad a cefoxitina y a alguna cefalosporina de tercera generación. No obstante, este método se considera poco específico y además no permite detectar  $\beta$ -lactamasas AmpCp sensibles a cefoxitina, como ACC. Para la confirmación de AmpC pueden usarse técnicas basadas en inhibidores similares a las descritas para BLEE, pero en este caso utilizando cloxacilina o ácido borónico y sus derivados<sup>14,15,17-19</sup>. La sensibilidad en la detección de  $\beta$ -lactamasas AmpC puede incrementarse con la utilización de técnicas de difusión con discos, ya que permiten poner de manifiesto fenómenos de sinergia y antagonismo que no pueden observarse con técnicas de dilución. De este modo, la producción de  $\beta$ -lactamasas inducibles, como por ejemplo DHA, da lugar a un achatamiento de los halos de cefalosporinas cercanos a inductores fuertes como cefoxitina, carbapenémicos o ácido clavulánico. Las  $\beta$ -lactamasas ACC no tienen actividad frente a cefoxitina y puede observarse un efecto de sinergia entre cefoxitina y cefalosporinas de tercera generación<sup>20</sup>. También se ha descrito una característica fenotípica altamente sugestiva de la producción de AmpCp, que es la presencia de colonias en el interior

**Tabla 1**

Puntos de corte propuestos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>13</sup> y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>14</sup> para el cribado de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), carbapenemasas y AmpCp

Antimicrobiano indicador (carga disco $\mu$ g EUCAST/CLSI)	CMI (mg/l)		Diámetro inhibición (mm)	
	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI
<b>BLEE</b>				
Cefotaxima (5/30)	> 1	$\geq 2^{ab}$	< 21	$\leq 27^{ab}$
Ceftazidima (10/30)	> 1	$\geq 2^{ab}$	< 22	$\leq 22^{ab}$
Cefpodoxima (10/10)	> 1	$\geq 8^a$	< 21	$\leq 17^a$
		$\geq 2^b$		$\leq 22^b$
Ceftriaxona (30/30)	> 1	$\geq 2^a$	< 23	$\leq 25^a$
Aztreonam (30/30)	nd	$\geq 2^a$	nd	$\leq 27^a$
<b>Carbapenemasas</b>				
Meropenem (10/10)	> 0,12	$\geq 2$	< 25	$\leq 21$
Imipenem (10/10)	> 1	$\geq 2$	< 23	Nd
Ertapenem (10/10)	> 0,12	$\geq 2$	< 25	$\leq 21$
<b>AmpCp</b>				
Cefoxitina	> 8	nd	nd	nd
Cefotaxima	> 1	nd	nd	nd
Ceftazidima	> 1	nd	nd	nd

CMI: concentración mínima inhibitoria; nd: no determinado.

<sup>a</sup>Puntos de corte establecidos para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

<sup>b</sup>Puntos de corte establecidos para *Proteus mirabilis*.

de los halos de inhibición de cefalosporinas y aztreonam<sup>21</sup>. No obstante, ninguna técnica fenotípica permite distinguir las  $\beta$ -lactamasas AmpCp de las cromosómicas en aislados naturalmente productores de AmpC. Una excepción es la presencia de antagonismo, indicativo de una  $\beta$ -lactamasa inducible, en una especie como *E. coli*, cuya  $\beta$ -lactamasa AmpC natural no es inducible.

Para la detección fenotípica de carbapenemasas en enterobacterias se dispone de técnicas de cribado y confirmación, si bien estas últimas solo son aplicables a carbapenemasas de las clases A y B<sup>13-15,17,18,22</sup>. Las recomendaciones para el cribado de carbapenemasas muestran algunas diferencias entre el CLSI y el EUCAST (tabla 1). Este hecho refleja la dificultad en la elección, tanto del carbapenémico como de los puntos de corte que proporcionen mayor sensibilidad y especificidad. La técnica recomendada por el CLSI para la confirmación de carbapenemasas es el test modificado de Hodge. Esta técnica presenta buena sensibilidad para la detección de algunas carbapenemasas, pero no está exenta de inconvenientes como son la dificultad en la interpretación y la ocurrencia de resultados falsos positivos debido a la producción de otras  $\beta$ -lactamasas como AmpC o BLEE. Además, no permite diferenciar la clase de carbapenemasa. También pueden emplearse inhibidores como el ácido borónico y sus derivados para la detección de carbapenemasas de clase A y quelantes metálicos como EDTA o ácido dipicolínico para carbapenemasas de clase B. Para la detección de carbapenemasas de clase D de tipo OXA-48 no se han descrito inhibidores que puedan usarse en las técnicas fenotípicas de confirmación. La resistencia a temocilina (CMI > 64 mg/l) y a piperacilina-tazobactam, además de una sensibilidad disminuida o resistencia a algún carbapenémico, se ha referido como una primera aproximación para la identificación de estas carbapenemasas<sup>22</sup>.

Otros métodos fenotípicos basados en la evaluación de la hidrólisis de carbapenémicos incluyen el método espectrofotométrico<sup>23</sup> y entre los propuestos recientemente se encuentra el que utiliza el equipamiento MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionisation*

*time of flight*)<sup>24,25</sup> y el test bioquímico Carba NP<sup>26,27</sup>, que permiten la detección de carbapenemasas en pocas horas.

La implementación de técnicas genéticas para la detección de  $\beta$ -lactamasas de forma rutinaria es difícil debido a la existencia de complejos y muy variados patrones de resistencia. Generalmente se realizan en situaciones concretas y consisten en la detección de genes de resistencia conocidos mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las últimas aproximaciones que han mostrado resultados prometedores son las técnicas de *microarrays*<sup>28,29</sup> y las de secuenciación del genoma completo<sup>30,31</sup>.

## Interpretación

En años recientes hemos asistido a un cambio sustancial en los criterios de interpretación de los estudios de sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos en enterobacterias recomendados tanto por el CLSI como por el EUCAST. Hasta el año 2009, ambos comités recomendaban realizar una búsqueda activa de BLEE e interpretar los resultados del antibiograma de manera que ningún  $\beta$ -lactámico considerado sustrato de estas enzimas se informara como sensible, independientemente del resultado obtenido in vitro. El CLSI recomendaba interpretar todas las cefalosporinas y monobactámicos como resistentes<sup>32</sup>, mientras que el EUCAST aconsejaba interpretar los resultados sensibles como intermedios y los intermedios como resistentes<sup>33</sup>. En 2010, el CLSI eliminó dicha recomendación y adoptó puntos de corte más bajos de cefalosporinas y aztreonam<sup>34</sup>. Al mismo tiempo suprimió la necesidad de realizar cribado y confirmación para detectar BLEE, excepto con finalidad epidemiológica o para el control de la infección. El EUCAST propuso las mismas recomendaciones, pero con puntos de corte de cefalosporinas más bajos que los del CLSI (tabla 2)<sup>35-37</sup>. La justificación de estos cambios se basa en variables farmacocinéticas y farmacodinámicas, en la distribución de valores de CMI y en escasos estudios de evolución clínica en humanos tratados con cefalosporinas<sup>38</sup>. Además, con los puntos de corte más bajos se incrementa la posibilidad de informar las cefalosporinas de amplio espectro resistentes en aislados productores de BLEE sin necesidad de reinterpretar el resultado.

A pesar de la armonización de criterios entre el CLSI y el EUCAST en cuanto a informar los resultados de cefalosporinas de acuerdo a los puntos de corte, sigue existiendo controversia acerca de si los resultados de los estudios de sensibilidad predicen mejor la evolución clínica que el mecanismo de resistencia<sup>38-40</sup>. Si bien faltan estudios clínicos que validen la mejor estrategia terapéutica, en el caso de las BLEE, la combinación de  $\beta$ -lactámico con inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas utilizado a dosis elevadas puede ser una alternativa en el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas. Se considera que la mejor opción es amoxicilina-ácido clavulánico, puesto que alcanza una elevada concentración en orina y se ve menos afectada por el efecto inóculo que piperacilina-tazobactam<sup>41,42</sup>. Algunos autores plantean la posibilidad de tratar las bacteriemias por *E. coli* BLEE con cefalosporinas de tercera o cuarta generación si la CMI está dentro del rango sensible, siempre que clínicamente la presentación de la bacteriemia no sea severa o esta no sea secundaria a una infección asociada a elevada carga bacteriana<sup>43</sup>. Asimismo se refieren mejores resultados cuando se administra un carbapenémico o la combinación de un  $\beta$ -lactámico con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa<sup>4</sup>.

Respecto al tratamiento de las infecciones por enterobacterias portadoras de AmpC (cromosómica o plasmídica), se ha planteado la posibilidad de utilizar fármacos como cefepime, piperacilina-tazobactam o incluso cefalosporinas de tercera generación con el fin de minimizar la presión selectiva generada por el uso excesivo de carbapenémicos y quinolonas y la toxicidad de los aminoglucósidos<sup>41,42,44</sup>.

En el caso de las carbapenemasas, el CLSI disminuyó los puntos de corte de carbapenémicos en junio de 2010, siendo más bajos que los del EUCAST para la mayoría de carbapenémicos (tabla 2)<sup>37,45</sup>. Ambos comités coinciden en la recomendación de informar de acuerdo a los

**Tabla 2**

Puntos de corte clínicos propuestos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

A) Valores de concentración inhibitoria mínima								
Antimicrobiano	CMI (mg/l)							
	EUCAST <sup>35</sup> 2009		EUCAST <sup>37</sup> 2013		CLSI <sup>32</sup> 2009		CLSI <sup>13</sup> 2013 <sup>a</sup>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R ≥	S ≤	R ≥
Cefotaxima	1	2	1	2	8	64	1	4
Ceftriaxona	1	2	1	2	8	64	1	4
Ceftazidima	1	8	1	4	8	32	4	16
Cefepime	1	8	1	4	8	32	8	32
Aztreonam	1	8	1	4	8	32	4	16
Imipenem	2	8	2	8	4	16	1	4
Meropenem	2	8	2	8	4	16	1	4
Ertapenem	0,5	1	0,5	1	2	8	0,5	2

  

B) Diámetro de los halos de inhibición por técnica de disco difusión								
Antimicrobiano (carga disco µg EUCAST/CLSI)	Diámetro de inhibición (mm)							
	EUCAST <sup>35</sup> 2009		EUCAST <sup>37</sup> 2013 <sup>b</sup>		CLSI <sup>32</sup> 2009		CLSI <sup>13</sup> 2013 <sup>a</sup>	
	S ≥	R <	S ≥	R <	S ≥	R ≤	S ≥	R ≤
Cefotaxima (5/30)	21	18	20	17	23	14	26	22
Ceftriaxona (30/30)	23	20	23	20	21	13	23	19
Ceftazidima (10/30)	20	15	22	19	18	14	21	17
Cefepime (30/30)	24	18	24	21	18	14	18	14
Aztreonam (30/30)	25	21	27	24	22	15	21	17
Imipenem (10/10)	21	15	22	16	16	13	23	19
Meropenem (10/10)	22	16	22	16	16	13	23	19
Ertapenem (10/10)	25	22	25	22	19	15	22	18

CMI: concentración mínima inhibitoria.

<sup>a</sup>Entre los años 2009 y 2013 ha habido diversas modificaciones. La última modificación de los valores de ertapenem se realizó en la versión M100-S22 (2012).<sup>b</sup>Entre los años 2009 y 2013 ha habido diversas modificaciones. La última modificación de los valores de ceftazidima se realizó en la versión 1.2 (diciembre 2010) y la de los de cefotaxima e imipenem en la versión 2.0 (enero 2012).

resultados de los estudios de sensibilidad. El uso de carbapenémicos para el tratamiento de infecciones producidas por aislados productores de carbapenemasas también es un tema de discusión<sup>39,46</sup>. Las opciones terapéuticas que se barajan incluyen el uso combinado de carbapenémicos y otros agentes como tigeciclina, colistina, doxiciclina, rifampicina, fosfomicina, aminoglucósidos y fluoroquinolonas con mayor o menor éxito. Se ha propuesto incluso la combinación de 2 carbapenémicos, ertapenem y doripenem, intentando que el primero actúe de inhibidor suicida en el caso de la presencia de la carbapenemasa KPC, enzima con gran afinidad por este fármaco<sup>47</sup>. También ofrecen una prometedora actividad frente a algunas carbapenemasas las combinaciones de ceftazidima o ceftarolina con avibactam, y el sulfactam BAL30072 solo o combinado con meropenem<sup>42,48</sup>.

El hecho de basar la terapia únicamente en los resultados de las pruebas de sensibilidad, independientemente del mecanismo de resistencia, implica que estas deberían ser suficientemente precisas. A pesar de los esfuerzos por estandarizar las pruebas de sensibilidad, es bien conocido que puede haber una cierta variabilidad en los resultados relacionada con las propias técnicas o con determinadas combinaciones de antibióticos y microorganismos<sup>39,49</sup>. Otros factores

pueden contribuir además a variaciones en la CMI como son el efecto inóculo<sup>50</sup>, la hiperproducción de la β-lactamasa<sup>51</sup> y la heterorresistencia<sup>52</sup>.

A las posibles discrepancias entre las técnicas hay que añadir la variabilidad en los puntos de corte de algunas cefalosporinas en ambos comités. Estos hechos pueden traducirse en diferencias en las tasas de resistencia<sup>43,53,54</sup>, lo que dificulta la comparación de los resultados de los estudios de vigilancia<sup>55</sup>.

Todas estas cuestiones sin resolver conducen a una falta de uniformidad de criterios, tanto a la hora de presentar los resultados de los estudios de sensibilidad a los β-lactámicos como a la hora de instaurar el tratamiento<sup>56</sup>.

En Europa se está promoviendo la adopción de las recomendaciones del EUCAST con la finalidad de unificar criterios, labor que se realiza en España a través del Comité Español del Antibiograma (COESANT) (<http://www.coesant-seimc.org/organization.html>).

Debido a las dificultades metodológicas y de interpretación mencionadas, consideramos imprescindibles las labores de docencia en este campo. En este sentido, los controles de calidad como los que lleva a cabo la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) son de gran relevancia para la continua

**Tabla 3**

Características de las cepas enviadas por el Programa de Control de Calidad Externo SEIMC con los datos de participación y acierto del mecanismo de resistencia

Año	Referencia (cepa)	Centros (n)	Especie y objetivo del control	Tasa de aciertos del mecanismo de resistencia
1997 <sup>69</sup>	B-1/97	186	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE	24,2
1999 <sup>69</sup>	B-3/99	282	<i>K. pneumoniae</i> BLEE	55,0
2003 <sup>69</sup>	B-3/03	278	<i>Escherichia coli</i> BLEE	77,3
2005 <sup>69,70</sup>	BX-Abril 05	151	<i>K. pneumoniae</i> BLEE	89,4
2006 <sup>69,71</sup>	BX-Marzo 06	161	<i>E. coli</i> BLEE	75,6
2007 <sup>69,72</sup>	BX-Mayo 07	170	<i>E. coli</i> BLEE	92,3
2008 <sup>69,73</sup>	B-2/08	252	<i>Salmonella enterica</i> BLEE	69,0
	BX-Abril 08	175	<i>K. pneumoniae</i> BLEE	93,2
	BX-October 08	165	<i>E. coli</i> hiperproducción AmpC	50,3
2009 <sup>74</sup>	B-3/09	248	<i>K. pneumoniae</i> BLEE y AmpCp	16,5
	BX-Mayo 09	167	<i>Enterobacter cloacae</i> AmpC	64,7
2011 <sup>75</sup>	BX-Agosto 11	173	<i>K. pneumoniae</i> BLEE	87,3
2012	B-1/12	240	<i>S. enterica</i> BLEE	72,3
	BX-Abril 12	167	<i>Providencia stuartii</i> AmpCp	53,3*
	BX-Diciembre 12	166	<i>K. pneumoniae</i> BLEE y AmpCp	23,5

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

Solo se han considerado como respuestas correctas las que citan el mecanismo implicado exacto. Aun citando el mecanismo correcto, si se hacía referencia a otros mecanismos adicionales no presentes en la cepa, las respuestas se han considerado erróneas.

\*Porcentaje correspondiente a las respuestas de fenotipo AmpC. El porcentaje de centros que informaron como AmpCp (o posible AmpCp) fue del 2,4%.

Datos obtenidos de la página web <http://www.seimc.org/control/index.asp> y de las referencias mencionadas

actualización en esta área. Estos programas deben ir siempre acompañados de una revisión de los resultados, de la metodología y de las causas de los posibles errores para poder realizar una actividad docente completa.

### Programas de control de calidad

Los procesos involucrados en los estudios de sensibilidad deben estar estandarizados y debidamente controlados, por lo que resulta necesaria la implementación de rigurosos programas de control de calidad internos y externos.

El control de calidad interno tiene como objeto la verificación de la precisión del proceso analítico, del funcionamiento de los reactivos y equipos utilizados, y de la competencia del personal que realiza la prueba. Tanto el CLSI como el EUCAST disponen de recomendaciones para realizar las pruebas de control de calidad, interpretar los resultados y aplicar acciones correctivas en caso necesario<sup>13,57</sup>. La principal crítica planteada a estos controles internos es que los rangos aceptables de las cepas recomendadas son demasiado amplios, ya que permiten una variación de 2 a 3 diluciones<sup>39</sup>.

En los programas externos de control de calidad se distribuye a los laboratorios participantes cepas con patrones de resistencia caracterizados. Estos programas permiten evaluar la capacidad de cada laboratorio en comparación con otros centros, a la vez que constituyen una herramienta educativa y requerida por los organismos de acreditación de los laboratorios.

En España se han realizado varios estudios multicéntricos para evaluar la competencia de los laboratorios clínicos en la detección de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. En uno de estos estudios, realizado en el año 2001, se analizó la capacidad de 52 centros de evaluar la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en aislados de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, con mecanismos que incluían BLEE, hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa AmpC, alteraciones en la permeabilidad y mecanismos de expulsión<sup>58</sup>. La eficiencia de detección de BLEE fue del 71% en *Klebsiella pneumoniae* portadora de SHV-5 y del 69,2% en

*E. coli* portadora de TEM-27. Estas cepas presentaban el típico patrón de sinergia entre ceftazidima y ácido clavulánico, combinación incluida en muchos de los sistemas automatizados, lo que pudo facilitar la detección. La tasa de detección disminuyó hasta el 61,5% en la cepa de *E. coli* portadora de CTX-M-9, probablemente debido a que la sinergia era más evidente entre cefotaxima y ácido clavulánico y, en aquel momento, esta combinación no estaba incluida en los paneles de los sistemas automatizados. Este hecho corroboró la necesidad de utilizar más de una cefalosporina indicadora, tanto en las pruebas de cribado como en las de confirmación. Las tasas más bajas de detección se obtuvieron en la cepa de *Enterobacter cloacae* portadora de CTX-M-10 (34,6%) y especialmente en la cepa hiperproductora de AmpC (9,6%), hecho que pone de manifiesto la dificultad de detección de BLEE en cepas productoras de AmpC y la necesidad de incorporar pruebas complementarias<sup>14-18</sup>.

Los resultados mejoraron notablemente en un estudio con características similares realizado en 2007, en el que el 91% de los centros reconoció las BLEE correctamente, si bien solo se incluyeron cepas de *E. coli* (CTX-M-14, CTX-M-9, CTX-M-10 y SHV-12) y *K. pneumoniae* (TEM-4, CTX-M-10, SHV-18), sin mecanismos de resistencia adicionales<sup>59</sup>. Sin embargo, solamente el 47,4% de los laboratorios participantes identificó correctamente el mecanismo de resistencia en las 3 cepas portadoras de  $\beta$ -lactamasas AmpC (*K. pneumoniae* portadora de FOX-5, *E. coli* portadora de CMY-2 y *E. coli* hiperproductora de AmpC cromosómica). Las principales discordancias en los resultados de los estudios de sensibilidad se debieron a la aplicación de criterios de interpretación diversos y no a errores metodológicos.

La necesidad de unificar criterios para las pruebas de sensibilidad se ha puesto de manifiesto en un trabajo reciente, en el que se ha evaluado la capacidad de 54 laboratorios españoles para el estudio de sensibilidad y la detección de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en una colección de cepas de *P. aeruginosa*<sup>60</sup>. Los laboratorios participantes mostraron una elevada eficiencia en la detección de la carbapenemasa VIM-2 (83%), pero fue mucho más problemática la detección de otros mecanismos de resistencia como la

presencia de BLEE, en los que la tasa de acierto fue inferior al 40%. Además se observó una gran variabilidad y falta de precisión en los resultados de los estudios de sensibilidad, atribuible al uso de diferentes puntos de corte y dispositivos, a la complejidad de mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* y a la falta de pruebas estandarizadas para la detección de mecanismos de resistencia en esta especie<sup>60</sup>.

En los estudios multicéntricos realizados fuera de nuestro ámbito nacional se observa, en general, que la capacidad de los centros para detectar BLEE ha ido mejorando a lo largo de los años<sup>61-68</sup>. La detección de otros mecanismos como AmpC o carbapenemasas en general plantea mayor dificultad, si bien no hay tantos trabajos publicados<sup>61,64</sup>.

En España, además de los estudios puntuales mencionados previamente, se lleva a cabo un programa de control de calidad desarrollado por la SEIMC que incluye la identificación y el estudio de sensibilidad de microorganismos de interés clínico. Esta iniciativa nos ha permitido conocer la capacidad de los laboratorios españoles participantes para el estudio de sensibilidad y la detección de mecanismos de resistencia emergentes.

Desde el año 1997, este programa de control de calidad ha remitido 15 cepas de enterobacterias con diversos mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos que incluyen la producción de BLEE y la producción de AmpC cromosómica y plasmídica (tabla 3). Los porcentajes de acierto en la detección de BLEE muestran un claro incremento a lo largo de los años, hecho que puede estar relacionado con la creciente utilización de sistemas automatizados provistos de sistemas expertos y con las intervenciones formativas relativas al tema de cada control promovidas por el programa. Sin embargo, sorprende el bajo porcentaje de aciertos en la detección de BLEE en la cepa de *Salmonella enterica*. Los laboratorios participantes han mostrado una mayor dificultad en la detección de  $\beta$ -lactamasas AmpC. En 3 de las 5 cepas portadoras de AmpC evaluadas, las tasas de acierto oscilaron entre el 50,3 y el 64,7%. En las 2 restantes el porcentaje de aciertos fue muy bajo (16,5 y 23,5%) debido a que las cepas eran portadoras de BLEE y AmpC.

En el último control de la SEIMC (BX-Abril 12) se distribuyó una cepa de *Providencia stuartii* que presentaba resistencia a cefalosporinas, excepto a cefepime, y sensibilidad disminuida a imipenem. Este fenotipo se podía deber a la hiperproducción de la AmpC cromosómica propia de *Providencia* o a la adquisición de una AmpCp. Al realizar el antibiograma por técnica de disco difusión se observaron saltos de colonias dentro del halo de inhibición de las cefalosporinas, sugiriendo la presencia de una  $\beta$ -lactamasas AmpCp<sup>21</sup>. Por ello, dicha cepa fue estudiada con mayor detalle y se confirmó mediante PCR y secuenciación que era portadora de la  $\beta$ -lactamasas CMY-2 en un plásmido de aproximadamente 145 kb. Solamente el 2,4% de los centros participantes acertó o sospechó la presencia de AmpCp. Este hecho pone de manifiesto, una vez más, la dificultad de detección de algunos de estos mecanismos de resistencia y la importante labor docente que el programa de control de calidad realiza.

En conclusión, a pesar de que algunos comités no consideran necesaria la determinación del mecanismo de resistencia y aún menos la interpretación del antibiograma, son varias las voces críticas que consideran imprescindible esta detección y alertan de la conveniencia de interpretar el antibiograma mientras no se disponga de más datos sobre la eficacia clínica del tratamiento con  $\beta$ -lactámicos en pacientes infectados con enterobacterias portadoras de BLEE, AmpC o carbapenemasas<sup>39</sup>. Es por ello que consideramos imprescindible que se sigan realizando controles de calidad de mecanismos de resistencia, tanto establecidos como emergentes, y animamos al Programa de Control de Calidad de la SEIMC a continuar con esta labor.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289:321-31.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-76.
- Pitout JD. Infections with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs.* 2010;70:313-33.
- Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruiz M, Peña C, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis.* 2010;50:40-8.
- Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and patient outcome: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1311-20.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-86.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:42-52.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303:305-17.
- Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161-82.
- Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* 2007;2:297-307.
- Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* 2013;4:48.
- Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:682-707.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. Wayne, PA, USA: CLSI; 2013.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 1.0., 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/)
- Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. En: Cantón R, Cercenado E, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2.ª ed. (38) 2011. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1048-57.
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:524-34.
- Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:99-109.
- Gude MJ, Seral C, Sáenz Y, González-Domínguez M, Torres C, Castillo FJ. Evaluation of four phenotypic methods to detect plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2037-43.
- Ruppe E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler class C 1 AmpC  $\beta$ -lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4204-7.
- Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:370-2.
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:487-9.
- Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:88-90.
- Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321-4.
- Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441-3.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6437-40.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1503-7.
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1865-9.
- Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel  $\beta$ -lactamases: a snapshot of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1632-9.

30. Stoesser N, Batty EM, Eyre DW, Morgan M, Wyllie DH, Del Ojo Elias C, et al. Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. J Antimicrob Chemother. 2013. Doi:10.1093/jac/dkt180. [Epub ahead of print].
31. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agero Y, Lund O, et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. J Antimicrob Chemother. 2013;68:771-7.
32. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19. Wayne, PA, USA: CLSI; 2009.
33. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 1.0., 2008. Disponible en: [http://www.eucast.org/expert\\_rules](http://www.eucast.org/expert_rules)
34. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20. Wayne, PA, USA: CLSI; 2010.
35. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 1.0., 2009. Disponible en: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
36. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 2.0., 2011. Disponible en: [http://www.eucast.org/expert\\_rules](http://www.eucast.org/expert_rules)
37. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 3.1., 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
38. Dudley MN, Ambrose PG, Bhavnani SM, Craig WA, Ferraro MJ, Jones RN. Background and rationale for revised clinical and laboratory standards institute interpretive criteria (Breakpoints) for Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: I. Cephalosporins and Aztreonam. Clin Infect Dis. 2013;56:1301-9.
39. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? J Antimicrob Chemother. 2012;67:1569-77.
40. Tamma PD, Powers JH. Do patient data really support the clinical and laboratory standards institute recommendation for lowering third-generation cephalosporin interpretive breakpoints? Clin Infect Dis. 2013;57:624-5.
41. Kanj SS, Kanafani ZA. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Mayo Clin Proc. 2011;86:250-9.
42. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases). Expert Opin Pharmacother. 2013;14:199-210.
43. Rodríguez-Baño J, Picón E, Navarro MD, López-Cerero L, Pascual A. Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 2012;18:894-900.
44. Harris PN, Ferguson JK. Antibiotic therapy for inducible AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? Int J Antimicrob Agents. 2012;40:297-305.
45. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20U. (June 2010 update). Wayne, PA, USA: CLSI; 2010.
46. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? Clin Microbiol Infect. 2011;17:1135-41.
47. Bulik CC, Nicolau DP. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3002-4.
48. Hornsey M, Phee L, Stubbings W, Wareham DW. *In vitro* activity of the novel monosulfactam BAL30072 alone and in combination with meropenem versus a diverse collection of important Gram-negative pathogens. Int J Antimicrob Agents. 2013. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.05.010. [Epub ahead of print].
49. Schuurmans JM, Nuri Hayali AS, Koenders BB, Ter Kuile BH. Variations in MIC value caused by differences in experimental protocol. J Microbiol Methods. 2009;79:44-7.
50. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and  $\beta$ -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. J Clin Microbiol. 2004;42:269-75.
51. Palucha A, Mikiewicz B, Gniadkowski M. Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) during a hospital outbreak: emergence of an ESBL-hyperproducing strain resistant to expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:393-6.
52. Tato M, Morosini M, García L, Alberti S, Coque MT, Cantón R. Carbapenem heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2010;48:4089-93.
53. Hombach M, Mouttet B, Bloemberg GV. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL- and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. J Antimicrob Chemother. 2013;68:2092-8.
54. Hombach M, Wolfensberger A, Kuster SP, Bottger EC. Influence of clinical breakpoint changes from CLSI 2009 to EUCAST 2011 antimicrobial susceptibility testing guidelines on multidrug resistance rates of Gram-negative rods. J Clin Microbiol. 2013;51:2385-7.
55. Kahlmeter G, Brown DF. Resistance surveillance studies--comparability of results and quality assurance of methods. J Antimicrob Chemother. 2002;50:775-7.
56. Kallen AJ, Beekmann SE, Limbago B, Lentnek AL, Polgreen PM, Patel J, et al. Prevalence of  $\beta$ -lactam nonsusceptible Gram-negative bacilli and use and interpretation of current susceptibility breakpoints: a survey of infectious disease physicians. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:316-9.
57. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Quality Control. 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/qc\\_tables/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/qc_tables/)
58. Cantón R, Loza E, Conejo M, Baquero F, Martínez-Martínez L. Quality control for  $\beta$ -lactam susceptibility testing with a well-defined collection of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* strains in Spain. J Clin Microbiol. 2003;41:1912-8.
59. Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A. Detection and reporting of  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62:317-25.
60. Juan C, Conejo MC, Tormo N, Gimeno C, Pascual A, Oliver A. Challenges for accurate susceptibility testing, detection and interpretation of  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a Spanish multicentre study. J Antimicrob Chemother. 2013;68:619-30.
61. Corso A, Guerriero L, Pasterán F, Ceriana P, Callejo R, Prieto M, et al. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. Rev Panam Salud Publica. 2011;30:619-26.
62. Corso A, Pasterán F, Ceriana P, Guerriero L, Callejo R, Prieto M, et al. Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS): siete años de experiencia. Rev Panam Infectol. 2008;10:S26-37.
63. Hageman JC, Fridkin SK, Mohammed JM, Steward CD, Gaynes RP, Tenover FC. Antimicrobial proficiency testing of National Nosocomial Infections Surveillance system hospital laboratories. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003;28:59-61.
64. Jones RN, Glick T, Sader HS, Flamm RK, Ross JE, Rhomberg PR, et al. Educational antimicrobial susceptibility testing as a critical component of microbiology laboratory proficiency programs: American Proficiency Institute results for 2007-2011. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;75:357-60.
65. Luzzaro F, Gesu G, Endimiani A, Ortisi G, Malandrini S, Pagani L, et al. Performance in detection and reporting  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Enterobacteriaceae*: a nationwide proficiency study in Italian laboratories. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;55:311-8.
66. Steward CD, Wallace D, Hubert SK, Lawton R, Fridkin SK, Gaynes RP, et al. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;38:59-67.
67. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. J Clin Microbiol. 1999;37:4065-70.
68. Tenover FC, Mohammed MJ, Stelling J, O'Brien T, Williams R. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2001;39:241-50.
69. Guna M, Orta N, Ovies M, Gimeno C, Pérez J. Evaluación de los resultados del programa de control externo de calidad SEIMC en la detección de BLEE. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27 Especial:31-2.
70. Orta N, Guna M, Pérez JL, Gimeno C. Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Análisis de resultados. Año 2005. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24 Supl 1:1-7.
71. Guna M, Orta N, Gimeno C, Pérez J. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC, año 2006. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25 Supl 3:1-7.
72. Guna M, Orta N, Ovies M, Gimeno C, Pérez J. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC, año 2007. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26 Supl 13:1-7.
73. Guna M, Orta N, Ruiz de Gopegui E, Ovies M, Gimeno C, Pérez J. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC, año 2008. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28 Supl 1:1-6.
74. Ruiz de Gopegui E, Guna M, Orta N, Ovies M, Poveda M, Gimeno C, et al. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2009. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29 Supl 3:1-7.
75. Ruiz de Gopegui E, Guna M, Orta N, Ovies M, Poveda M, Gimeno C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2011. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31 Supl 1:1-7.