



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

IMPACTO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LOS PUNTOS DE CORTE CLÍNICOS (CLSI Y EUCAST) DE LAS COMBINACIONES BETALACTÁMICOS/INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS EN EL PRONÓSTICO DE BACTERIEMIAS POR ENTEROBACTERIACEAE

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por la Licenciada en Farmacia Dña. M^a Mercedes Delgado Valverde

Sevilla, mayo de 2017



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

Dr. D. Jesús Rodríguez Baño, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla y Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “IMPACTO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LOS PUNTOS DE CORTE CLÍNICOS (CLSI Y EUCAST) DE LAS COMBINACIONES BETA-LACTÁMICOS/INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS EN EL PRONÓSTICO DE BACTERIEMIAS POR ENTEROBACTERIACEAE” ha sido realizada por Dña. M^a Mercedes Delgado Valverde bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación como compendio de publicaciones.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 18 de mayo de 2017.

Fdo. Dr. D. Jesús Rodríguez Baño

Fdo. Dr. D. Álvaro Pascual Hernández



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

Dr. D. Javier Aznar Martin, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la tesis para optar al trabajo de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “IMPACTO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LOS PUNTOS DE CORTE CLÍNICOS (CLSI Y EUCAST) DE LAS COMBINACIONES BETALACTÁMICOS/INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS EN EL PRONÓSTICO DE BACTERIEMIAS POR ENTEROBACTERIACEAE” ha sido realizada por Dña. M^a Mercedes Delgado Valverde bajo mi tutela, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación como compendio de publicaciones.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Sevilla a 18 de mayo de 2017.

Fdo. Dr. D. Javier Aznar Martin

AGRADECIMIENTOS

Parecía que nunca llegaría este momento y al fin aquí estoy intentando expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

A mis directores de tesis....

A Jesús, por tantas horas empleadas en explicarme como hacer los análisis estadísticos y tantas otras cosas, por transmitirme tus conocimientos y ayudarme a entender e interpretar todos esos números. Por tu infinita paciencia y por haber depositado tu confianza en mí para llevar a cabo este trabajo.

A Álvaro, por haber confiado en mí desde el principio y haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. Aún recuerdo aquel día hace más de 5 años en el que nos reunimos para hablar de la posibilidad de hacer la tesis, no puedo más que agradecerle que apostarás por mí, tus consejos y haber estado siempre atento y disponible para ofrecerme tu ayuda.

Al Dr. Javier Aznar agradecerle haber sido mi tutor del Trabajo Fin de Máster y del Proyecto de Tesis Doctoral.

A todos los investigadores de los trece centros participantes que han colaborado en la recogida de datos clínicos y de aislados, gracias a todos vosotros este proyecto no habría sido posible.

A todos mis compañeros de la cátedra, a los que están y los que se han ido. A Eva Torres, por toda tu ayuda con las microdiluciones y esas horas pasando datos a la tabla Excel. A Fran, Paula, Lara y Fany por estar siempre ahí y ofrecerme vuestra ayuda cuando lo he necesitado. A todas las profesoras que también habéis resuelto mis dudas y me habéis ayudado cuando lo he necesitado.

A Rafa y Fernando por aguantarme en el despacho con mis innumerables preguntas sobre como modificar el Word, como escribir esta frase en inglés o como hacer que una tabla quede bonita.

A Mónica, has estado ahí mostrándome tu apoyo y dándome ánimos para terminar de escribir la tesis. Siempre recordaremos estos últimos meses compartiendo mesa y picándonos haber quien ponía más citas bibliográficas o quien acababa la tesis antes y con más páginas.

A mi familia...

A mi madre, mama como no voy a agradecértelo. Por fin termino la tesis, cuantas veces me has preguntado: pero Mercedes ¿cuándo vas a terminar la tesis? Gracias por tu dedicación y por animarme a que siempre consiga mis objetivos, tu ayuda ha sido muy valiosa.

A mi padre, mi fan número uno, y a mi hermana y mi sobrina por una vez más estar interesados por el trabajo que hago y animarme a terminarlo.

A Toni, siempre has mostrado interés por lo que hago y me has apoyado y animado para continuar aunque eso supusiera pasar menos tiempo juntos. Gracias por hacerme ser mejor persona y apoyarme en este camino.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	11
TESIS COMO COMPENDIO DE ARTÍCULOS PREVIAMENTE PUBLICADOS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Las resistencias bacterianas como problema de salud pública y el uso de antimicrobianos.....	17
1.2. Estudios de sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos. Técnicas y limitaciones.....	20
1.3. Puntos de corte de sensibilidad.....	24
1.3.1. Organismos internacionales: CLSI, EUCAST.....	24
1.3.1.1. CLSI.....	24
1.3.1.2. EUCAST.....	25
1.3.2. Puntos de corte epidemiológicos (<i>epidemiologic cut-off</i> o ECOFF).....	27
1.3.3. Puntos de corte clínicos.....	30
1.3.4. Puntos de corte farmacocinéticos/farmacodinámicos (FC/FD).....	32
1.3.5. Principales discrepancias entre las recomendaciones de CLSI y EUCAST.....	32
1.4. Evidencias para la toma de decisión en puntos de corte.....	33
1.4.1. Datos <i>in vitro</i> , distribución de CMI y ECOFF.....	33
1.4.2. Datos farmacocinéticos/farmacodinámicos (FD/FD).....	34
1.4.3. Estudios <i>in vitro</i>	35
1.4.4. Modelos animales.....	36
1.4.5. Datos clínicos.....	36
1.5. Enterobacterias.....	37
1.5.1. Aspectos microbiológicos generales.....	37
1.5.2. Aspectos generales de las infecciones por Enterobacterias.....	39

1.6. Antibióticos betalactámicos: Penicilinas y combinaciones con inhibidores de betalactamasas.....	41
1.6.1. Resistencia de enterobacterias a betalactámicos. Papel de los inhibidores de betalactamasas	44
1.6.2. Sensibilidad a piperacilina-tazobactam. Puntos de corte CLSI y EUCAST	49
1.6.3. Sensibilidad a amoxicilina-clavulánico. Puntos de corte CLSI y EUCAST. Controversia sobre el método	50
1.6.4. Efecto inóculo: controversias	51
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.1. Hipótesis de trabajo.....	55
2.2. Objetivos del estudio	55
3. RESULTADOS	59
3.1. Publicaciones	59
3.1.1. Artículo 1: Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae: the Bacteraemia-MIC project	59
3.1.2. Artículo 2: MIC of amoxicillin/clavulanate according to CLSI and EUCAST: discrepancies and clinical impact in patients with bloodstream infections due to Enterobacteriaceae	69
3.2. Resumen de los resultados.....	79
3.2.1. Primer artículo.....	79
3.2.2. Segundo artículo.....	80
4. DISCUSIÓN.....	85
4.1. Aspectos generales.....	85
4.2. Primer artículo.....	86
4.3. Segundo artículo.....	90
5. CONCLUSIONES.....	97

ABREVIATURAS

AMC: amoxicilina/clavulánico

BL: betalactámicos

BL/IBL: betalactámico/inhibidor de betalactamasa

IBL: inhibidor de betalactamasa

CDC: Centros de Control y Prevención de Enfermedades

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMT: *complex mutant TEM*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

ECOOFF: *epidemiologic cut-off*

ESCMID: *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

EUCAST: *European Committe of Antimicrobial Susceptibility Testing*

FC: farmacocinética

FC/FD: farmacocinético/farmacodinámico

FD: farmacodinamia

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

IRT: *inhibitor-resistant TEM betalactamases*

PTZ: piperacilina/tazobactam

NCCLS: *National Committe for Clinical Laboratory Standards*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: *penicilling binding proteins*

PAO: probabilidad de alcanzar el objetivo

TESIS COMO COMPENDIO DE ARTÍCULOS PREVIAMENTE PUBLICADOS

Esta tesis, de acuerdo con el informe correspondiente y la autorización de los directores de la misma y del órgano responsable del Programa de Doctorado, se presenta como un compendio de dos artículos. Las referencias completas a los artículos que componen el cuerpo de la tesis son las siguientes:

Delgado-Valverde M, Torres E, Valiente-Mendez A, Almirante B, Gómez-Zorrilla S, Borrell N, Corzo JE, Gurgui M, Almela M, García-Álvarez L, Fontecoba-Sánchez MC, Martínez-Martínez L, Cantón R, Praena J, Causse M, Gutiérrez-Gutiérrez B, Roberts JA, Farkas A, Pascual Á, Rodríguez-Baño J; REIPI/GEIH-SEIMC BACTERAEEMIA-MIC Group. Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae: the Bacteraemia-MIC project. *J Antimicrob Chemother.* 2016; Feb; 71(2):521-30. Factor de impacto: 4,919.

Delgado-Valverde M, Valiente-Mendez A, Torres E, Almirante B, Gómez-Zorrilla S, Borrell N, Aller-García AI, Gurgui M, Almela M, Sanz M, Bou G, Martínez-Martínez L, Cantón R, Lepe JA, Causse M, Gutiérrez-Gutiérrez B, Pascual Á, Rodríguez-Baño J; REIPI/GEIH-SEIMC BACTERAEEMIA-MIC Group. MIC of amoxicillin/clavulanate according to CLSI and EUCAST: discrepancies and clinical impact in patients with bloodstream infections due to Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2017; Jan 15 [Epub ahead of print]. Factor de impacto: 4,919.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

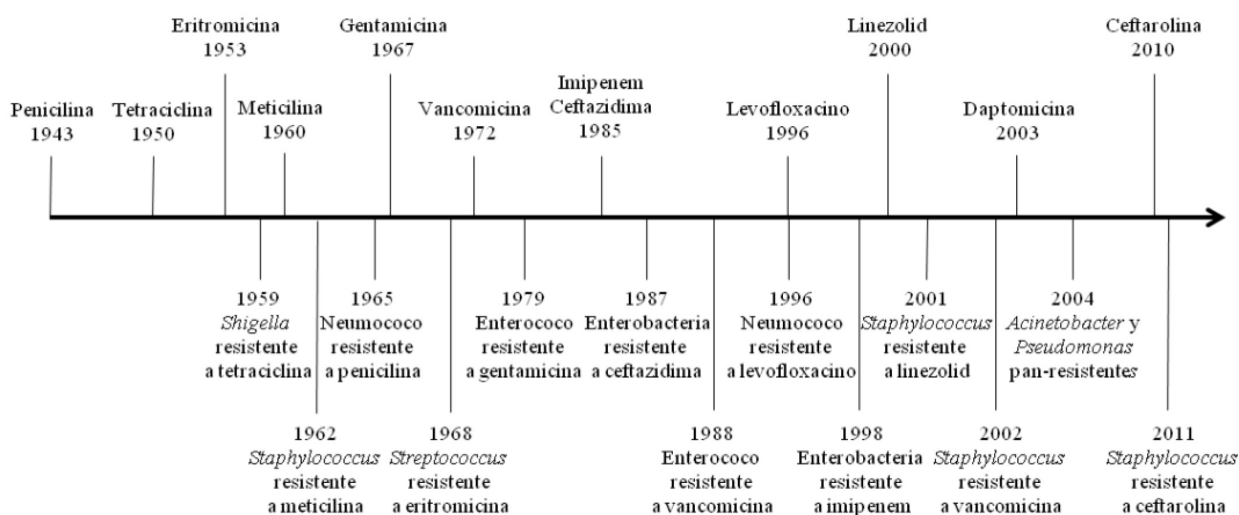
1.1. LAS RESISTENCIAS BACTERIANAS COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA Y EL USO DE ANTIMICROBIANOS

Durante más de 60 años, los antibióticos han sido considerados como la panacea para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, independientemente de si su uso era o no apropiado. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos han calculado que anualmente se realizan en la práctica clínica más de 60 millones de prescripciones de antibióticos innecesarias¹. La mayor parte del consumo de antibióticos en España, al igual que en otros países, se produce en el ámbito extrahospitalario donde alcanza aproximadamente el 90% del total.

En 1945, Alexander Fleming, al recibir el premio Nobel por el descubrimiento de la penicilina advirtió de que las bacterias podrían volverse resistentes a estos fármacos. La predicción de Fleming fue acertada: cada vez que se ha puesto en uso un nuevo agente antimicrobiano en el ámbito clínico, al poco tiempo se han detectado aislados resistentes al mismo(Figura 1)².

Figura 1. Línea temporal de descubrimiento de nuevos antibióticos y aparición de resistencias.

Descubrimiento de antibióticos



Aparición de resistencias

El desarrollo de resistencias es un proceso evolutivo normal para los microorganismos, pero en los últimos años se ha acelerado debido a la presión selectiva ejercida por el uso generalizado de los antibióticos. Además, las cepas resistentes son capaces de diseminarse cuando no se toman medidas de prevención y control de las infecciones³. La frecuencia de bacterias resistentes en la comunidad ha extendido el problema de la resistencia más allá de los límites del hospital, de manera que las cepas resistentes pueden ser transferidas de la comunidad al hospital y viceversa⁴.

Estos hechos han dado lugar a un escenario en el que las bacterias con mecanismos de resistencia emergentes se están diseminando por todo el mundo, amenazando nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas bacterianas comunes, y originando un aumento de la morbimortalidad de las mismas⁵. La diseminación de bacterias multiresistentes es por lo tanto un problema de salud pública, estimándose que causan unas 700.000 muertes atribuibles al año y en ausencia de medidas eficaces, se estima que esta cifra continuara aumentando hasta alcanzar los 10 millones de muertes en el año 2050⁶.

Además de para el tratamiento de infecciones en humanos, los antibióticos también se utilizan como profilaxis de infecciones en la cirugía y otros procesos, en veterinaria, acuicultura, agricultura y con fines no terapéuticos como desinfectantes, conservantes y aditivos de alimentos y piensos⁷. En este sentido, el uso de los antimicrobianos en ganadería y agricultura tanto en profilaxis y tratamiento como para promover el crecimiento es un tema muy debatido. Se ha demostrado que este uso induce un aumento de la resistencia a antimicrobianos en bacterias de origen animal, que estas cepas se han transmitido a humanos y contribuyen a la creación y establecimiento de reservorios de genes de resistencia^{8,9}.

Por un amplio período de tiempo los antibióticos han permitido la progresión de avances en medicina. Este hecho se hace evidente en áreas como la quimioterapia anticancerosa, el trasplante de órganos o células hematopoyéticas o en la cirugía¹⁰. En muchas ocasiones las alternativas terapéuticas en pacientes con infecciones por bacterias multiresistentes son muy limitadas, motivando el uso de combinaciones de antibióticos, así como antibióticos que habían dejado de usarse años atrás debido a su poca actividad o elevada toxicidad¹¹. Sin embargo, a pesar de la clara necesidad de nuevas moléculas con actividad antibiótica que amplíen los espectros de acción de las actuales o tengan como objetivo nuevas dianas de acción, el número de nuevos antibióticos que se encuentran en fases precomercialización es muy escaso y son pocas las posibilidades de poder tener una gran cantidad de nuevos fármacos en los próximos años.

Debido a la importancia mundial del problema, múltiples organizaciones han tomado conciencia de ello y han desarrollado medidas para el control de las resistencias a antibióticos. Todas coinciden en una serie de estrategias principales:

1. **Prevención de infecciones:** si prevenimos las infecciones evitaremos el uso de antibióticos de amplio espectro para tratarlas, así como la diseminación de bac-

terias multirresistentes. Las medidas más básicas pueden llegar a ser en muchas ocasiones las más eficaces en la prevención de las infecciones. Entre estas medidas se encuentran la higiene de manos, la desinfección de superficies inertes, el aislamiento de pacientes colonizados o con infección por bacterias multirresistentes o la vacunación¹²⁻¹⁵.

2. **Reducir el uso de antibióticos en veterinaria:** aunque existen fármacos específicos para uso veterinario, en la mayoría de los casos son los antibióticos para uso humano los que se aplican en este campo o pertenecen a las mismas familias¹⁶. El Parlamento Europeo ha aprobado un proyecto legislativo por el cual quedará estrictamente restringido el uso de antibióticos para el tratamiento colectivo y preventivo en los animales destinados a alimentación, con el fin de atajar el grave riesgo para la salud pública en que se ha convertido la resistencia antimicrobiana por el abuso en el consumo de antibióticos, fundamentalmente de forma indirecta a través de la cadena alimentaria de carnes¹⁷.
3. **Desarrollo de nuevos antibióticos:** desde el descubrimiento de la penicilina se han introducido más de cien nuevos antibióticos en clínica en menos de 50 años, pero en la última década ha habido una disminución en el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. Desde hace varios años, las compañías farmacéuticas invierten poco en la búsqueda de nuevos antibióticos. Se da la paradoja de que se necesitan nuevas clases de antibióticos eficaces en especies bacterianas resistentes pero que serán necesariamente fármacos de uso restringido. El resultado es la disminución de las alternativas terapéuticas disponibles. En el año 2010 la *Infectious Diseases Society of America* propuso una acción coordinada para llevar a cabo una iniciativa que se denominó 10x20 con la que se proponía el desarrollo de 10 nuevos antibióticos antes del año 2020¹⁸. Recientemente, en Febrero de este año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una lista de las bacterias que necesitan urgentemente nuevos antibióticos, entre las de mayor prioridad se encuentran los bacilos gramnegativos multirresistentes, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y varias enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp. y *Proteus* spp¹⁹.
4. **Recuperar antiguos antibióticos y nuevas indicaciones:** debido a esta problemática cada vez es más frecuente encontrar tratamientos en los que están presentes antibióticos que habían caído en desuso o tenían otras indicaciones, como la colistina o la fosfomicina. Además, se emplean antibióticos clásicos con nuevas indicaciones o pautas de dosificación, así como tratamientos combinados.
5. **Uso racional y optimizado de los antibióticos:** aunque son muchos los factores que favorecen la selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos²⁰, el uso inapropiado e indiscriminado de los mismos es uno de los factores principales que contribuyen a este fenómeno²¹ junto al control deficiente de la infección

bacteriana. El uso de antibióticos es excesivo y frecuentemente inadecuado tanto en atención primaria como en la atención hospitalaria. Se estima que más del 50% de los tratamientos antimicrobianos en humanos son inadecuados, tanto en el ámbito hospitalario como en atención primaria²². Existe un consenso generalizado en la necesidad de mejorar el uso de antibióticos. Hay un alto grado de evidencia científica de que las intervenciones dirigidas a mejorar el uso de antibióticos reducen la presión antibiótica y contribuyen al control de las resistencias tanto en el ámbito hospitalario como comunitario^{23, 24}. Las intervenciones son diversas y deberán adaptarse al medio. Las recomendaciones de la OMS y la Comisión Europea indican que para tener éxito en la lucha contra la resistencia a antimicrobianos se requiere un planteamiento global y multidisciplinario, en el que se incluyan todos los agentes implicados tales como diferentes profesionales sanitarios con capacidad para prescribir los medicamentos (médicos y veterinarios), farmacéuticos, farmacólogos clínicos, microbiólogos, profesionales dedicados a la medicina preventiva, profesionales de enfermería, así como los dedicados a la vigilancia y al estudio de las resistencias, profesionales con actividades en el campo de la veterinaria, entidades sociales que favorezcan la difusión de los mensajes a la opinión pública y, de manera muy relevante, responsables de la Administración con capacidad de implementar estas estrategias de control²⁵. Acciones tales como una adecuada prescripción, la notificación a la red de vigilancia de la existencia de microorganismos resistentes, la rápida identificación de mecanismos de resistencia y clones epidémicos, el fomento de las buenas prácticas profesionales y la promoción, fomento y difusión del estudio y la investigación de las resistencias son vitales para conseguir el uso óptimo de los antibióticos^{26, 27}.

1.2. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS A LOS ANTIBIÓTICOS. TÉCNICAS Y LIMITACIONES

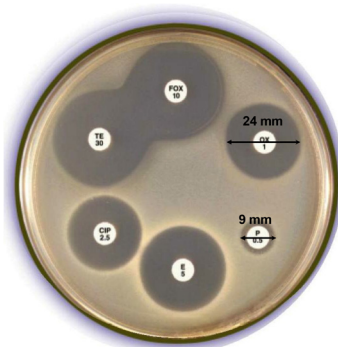
Los estudios de sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se realizan mediante técnicas de antibiograma, cuyo objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a la exposición a un antimicrobiano. De este modo, el antibiograma define la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un microorganismo concreto y su resultado se utiliza como factor predictor de su eficacia clínica. Las pruebas de sensibilidad han de estar normalizadas y sujetas a un control para asegurar su reproducibilidad. Los métodos de sensibilidad tuvieron un gran desarrollo durante la década de 1940; con la aparición de numerosas técnicas y el gran avance de las mismas pronto se hizo evidente la necesidad de estandarización. Así, en 1961 la OMS publicó un informe sobre la metodología para estudios de sensibilidad a antimicrobianos^{28, 29}. Actualmente, el *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y el *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) proporcionan las recomendaciones más aceptadas (estos organismos se describen más adelante).

Existen diferentes métodos para realizar el antibiograma, y en función del método usado los resultados de sensibilidad se expresaran como diámetro de halo (en mm) o como concentración mínima inhibitoria (CMI) (en mg/L).

1.2.1. Método de difusión con discos

El antibiograma mediante difusión con disco está basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores^{30, 31}. En 1975, este método se convirtió en la base de los estándares de difusión con discos del entonces llamado *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), que aun en la actualidad siguen vigentes. La técnica consiste en depositar, sobre una superficie de agar previamente inoculada con un microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con una concentración conocida de antibiótico. Una vez que el disco se pone en contacto con la superficie del agar, el antibiótico comienza a difundir radialmente a través del mismo formándose un gradiente de concentración. Transcurridas entre 18-24 horas de incubación se genera un halo de inhibición alrededor del disco (figura 2). Todo el procedimiento está detalladamente estandarizado, así como los medios de cultivo, el inóculo bacteriano necesario, la lectura de los halos de inhibición y la interpretación de los resultados³²⁻³⁴. El método es fácil de realizar, rápido, barato y reproducible, siempre y cuando se realice de acuerdo a la recomendación de los estándares. Los resultados se expresan en mm, que corresponden al diámetro del halo de inhibición que se genera alrededor del disco de antibiótico. La principal limitación es que no permite conocer el valor de la CMI y la necesidad de esperar 18-24 horas para conocer los resultados.

Figura 2. Antibiograma realizado por difusión con discos.

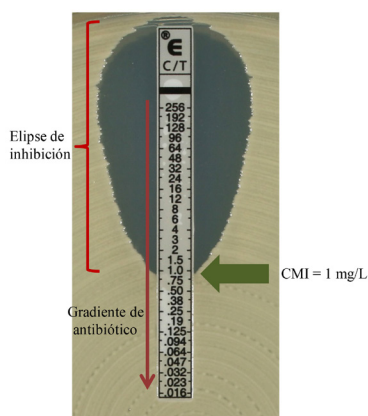


1.2.2. Método de Epsilon test (E-test)

El E-test se describió por primera vez en 1988 como un nuevo método para determinar la CMI mediante difusión en placa y se introdujo en el mercado en 1991 tras ser aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)^{35, 36}. La técnica se basa también en la difusión del antibiótico por la superficie de agar; sin embargo, con el E-test podemos mediante lectura directa determinar la CMI. En concreto, se trata de una tira de plástico no poroso que incorpora un gradiente de concentración del antimicrobiano en cuestión. La metodología es la misma que para

el antibiograma mediante difusión en disco. Al poner en contacto la tira de E-test con la superficie de agar se produce de forma inmediata la difusión del antibiótico desde la tira hasta el agar, creándose un gradiente exponencial de concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de la placa se observa una zona de inhibición con forma de elipse, de manera que el valor de la CMI coincidirá con el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira (figura 3). Por lo tanto, el E-test se considera una alternativa para el estudio cuantitativo de sensibilidad a antimicrobianos, que además es sencillo, rápido y tiene una buena correlación con el método de referencia.

Figura 3. Antibiograma realizado por difusión con E-test.

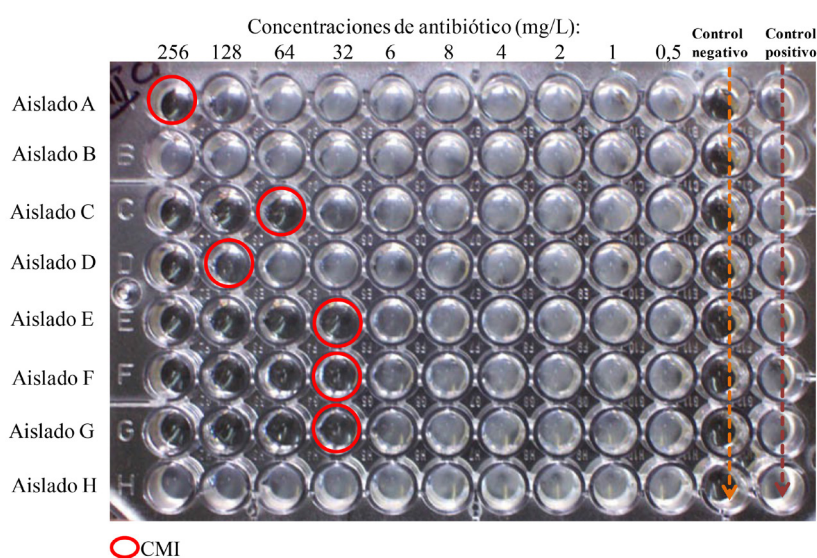


1.2.3. Microdilución

Actualmente es el método de referencia para determinar la CMI a la mayoría de antimicrobianos. Se necesita un control y normalización cuidadosa para la reproducibilidad intra- e interlaboratorio, ya que los resultados pueden estar significativamente influidos por el método utilizado. Por ello, el método se encuentra completamente estandarizado y todas las recomendaciones se basan en la norma ISO³⁷. En la microdilución se prueba la capacidad de los microorganismos de producir crecimiento visible en los pocillos de placas de microdilución, que contienen diluciones seriadas de los antimicrobianos (dilución en caldo). Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), podemos estudiar con cada una de ellas, y para el mismo microorganismo 8 antimicrobianos y 11 diluciones o viceversa. El resultado se expresa como una concentración (en mg/L o $\mu\text{g}/\text{mL}$) que corresponde a la CMI. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos usados como control positivo, dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro (figura 4). La CMI corresponde a la concentración más baja de un agente antimicrobiano

que, en condiciones *in vitro* definidas, impide la aparición de crecimiento visible de un microorganismo antes de transcurrido un periodo de tiempo definido. La CMI proporciona información sobre la sensibilidad o resistencia del organismo al antimicrobiano y puede ayudar en la toma de las decisiones terapéuticas correctas. Generalmente se acepta que los ensayos para determinar la CMI en caldo son reproducibles dentro de un intervalo del doble de la dilución del punto final, es decir, ± 1 pocillo en una serie de dilución al doble.

Figura 4: Antibiograma realizado por microdilución en caldo.



1.2.4. Dilución en agar

Este método se describió por primera vez en 1940, durante esa década aparecieron numerosas publicaciones en las que se aplicó el método para el estudio de diferentes antibióticos en diferentes especies bacterianas²⁸. El agente antimicrobiano se incorpora dentro al medio con agar. Para lograr el rango de concentración deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antibiótico. Los inóculos de los distintos microorganismos se pueden aplicar simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando replicadores de Steers (figura 5). La mayoría de los replicadores existentes tienen una capacidad para inocular entre 32 a 36 microorganismos. En la actualidad, la técnica de dilución en agar continúa siendo el único método de referencia para determinar la CMI de fosfomicina, aunque es un método recomendado para el estudio de sensibilidad del resto de antibióticos excepto daptomicina³⁸⁻⁴⁰. La principal limitación de este método es el tiempo que requiere para preparar el material necesario y la imposibilidad de automatización.

Figura 5. Replicador de Steers.



1.3. PUNTOS DE CORTE DE SENSIBILIDAD

En términos generales, un punto de corte de sensibilidad representa una concentración de antibiótico que separa a poblaciones de microorganismos⁴¹. Partiendo de esta premisa, los puntos de corte son usados para definir la sensibilidad y la resistencia de los microorganismos a los antibióticos. Dependiendo del método de antibiograma utilizado, se expresan como concentración (mg/L) si utilizamos técnicas como la microdilución o la dilución en agar o como diámetro de halo (mm) si utilizamos la técnica de difusión con discos. Todos los métodos de estudio de sensibilidad requieren de puntos de corte y de criterios de interpretación para poder expresar los resultados del antibiograma como categorías clínicas (sensible, intermedio o resistente)⁴². El principal objetivo de los puntos de corte es por lo tanto predecir la sensibilidad o resistencia de un microorganismo en particular a un determinado antibiótico, pero la definición de sensibilidad o resistencia a un antibiótico es compleja y conlleva un significado diferente según el objetivo. Mientras que los términos parecen claros, su significado es ambiguo, ya que pueden referirse a la interacción directa entre un microorganismo y un agente antimicrobiano (significado microbiológico), o a la respuesta que presentará un paciente frente a un tratamiento con ese antimicrobiano (significado clínico).

1.3.1. Organismos internacionales: CLSI, EUCAST

En la actualidad, los puntos de corte clínicos que se utilizan en la mayoría de laboratorios del mundo son publicados por dos grandes organismos internacionales: CLSI y EUCAST.

1.3.1.1. CLSI

En 1968, 31 médicos y científicos que representaban a 15 organizaciones se reunieron para discutir cómo mejorar la práctica con los pacientes y desarrollar un documento de consenso formal para la normalización de las intervenciones clínicas, entonces fundaron el NCCLS. En 1977, CLSI fue acreditado por el *American National Standards Institute* como una organización voluntaria de estándares. Al mismo tiempo, CLSI se con-

virtió en la sede del *National Reference System for the Clinical Laboratory* que constaba de una red de varios sistemas de referencia que tenían como objetivo mejorar la reproducibilidad de los resultados de las pruebas analíticas, de acuerdo con las necesidades de la práctica clínica. En 1985, el NCCLS como el Centro de Estándares del laboratorio Clínico de la OMS. En 2005, se le otorgó una nueva designación y pasó a denominarse CLSI⁴³. Desde su inicio en 1968, CLSI ha evolucionado hasta convertirse en una institución internacional con 1.500 organizaciones miembros y miembros individuales, así como más de 2.000 voluntarios, todos trabajando juntos para avanzar en la calidad de las pruebas de atención de la salud. En la actualidad, CLSI es una organización sin ánimo de lucro que reúne a la comunidad mundial de laboratorios por la causa común de fomentar la excelencia en el laboratorio clínico mediante el desarrollo de normas para las pruebas clínicas de laboratorio basado en las aportaciones y el consenso entre la industria, el gobierno y los profesionales de la salud (www.clsi.org). Es importante conocer que en el comité de CLSI están representadas las empresas farmacéuticas.

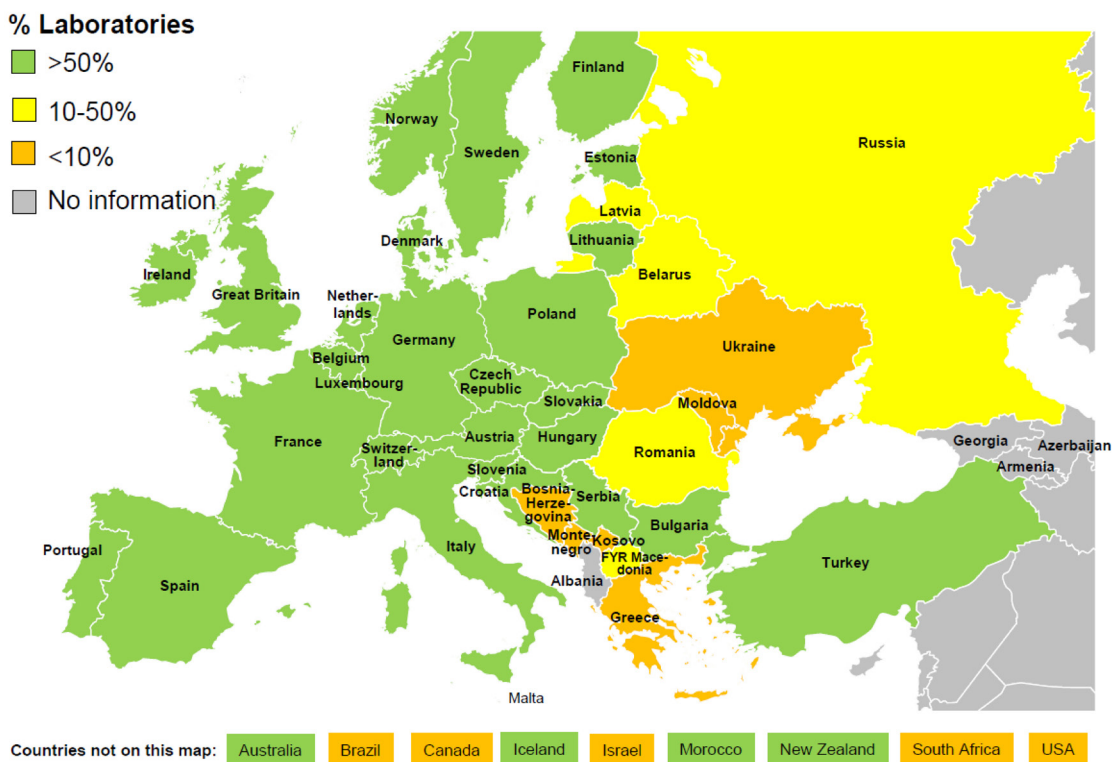
1.3.1.2. EUCAST

Durante muchos años en Europa existían varios comités nacionales para el establecimiento de puntos de corte clínicos. En 2002 había al menos seis comités activos: BSAC (Reino Unido), CA-SFM (Francia), SWAB (Países Bajos), DIN (Alemania), NWGA (Noruega) y SRGA (Suecia). En otros países donde no había comités específicos se utilizaban los puntos de corte de CLSI. Las diferencias en la interpretación de los estudios de sensibilidad eran considerables, originando confusión entre los clínicos, así como impidiendo la comparación de la tasas de resistencia entre los países europeos. En 1997, la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) junto a varias agencias nacionales de Europa y el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) se unieron para formar el EUCAST, con el principal objetivo de lograr la armonización de los puntos de corte clínicos en todos los países europeos y de este modo actuar como un comité europeo único comparable al CLSI en EEUU^{44, 45}. Se crearon diferentes subcomités con la finalidad de abordar todos los aspectos referentes a las pruebas de sensibilidad, incluyendo la terminología, los puntos de corte y la metodología. Sin embargo, en ese momento no existía una relación formal con los comités nacionales por lo que la armonización de los puntos de corte no era posible. Entre los años 2001 y 2002 EUCAST sufrió una reorganización para dar un mayor protagonismo a los comités nacionales. Se formó el comité directivo de EUCAST compuesto por un presidente, un secretario científico, representantes de todos los comités nacionales activos y dos representantes del comité general de EUCAST. El comité general de EUCAST tiene representantes de todos los países europeos, de la industria farmacéutica y de fabricantes de sistemas para estudios de sensibilidad. Esta estructura organizativa permanece vigente en la actualidad. Entre 2002 y 2010, EUCAST armonizó los puntos de corte en toda Europa y para cada agente se elaboró y publicó un documento de justificación que describe el proceso de armonización, enumera los datos utilizados y las excepciones pertinentes⁴⁶. En 2010 ya había un conjunto completo de puntos de corte europeos, aceptados por las autoridades europeas⁴⁷. Desde entonces cada vez más laboratorios clínicos en

toda Europa han implementado su normativa y sus puntos de corte en su práctica habitual, en el año 2013 más del 70% de los laboratorios clínicos europeos utilizaban los estándares de EUCAST^{48, 49}. En la actualidad este porcentaje es mayor, no solo en el territorio Europeo ya que cada vez más países de otros continentes implementan las directrices de EUCAST (figura 8). Las funciones actuales de EUCAST son armonizar los puntos de corte clínicos de los antimicrobianos en Europa, determinar los puntos de corte clínicos de nuevos fármacos, establecer puntos de corte epidemiológicos, revisar los puntos de corte cuando según sea necesario, armonizar la metodología de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, desarrollar una página web con las distribuciones de CMI y diámetros de halo de los antimicrobianos para una gran cantidad de microorganismos y servir de enlace con las agencias gubernamentales europeas y las redes europeas que participan en la resistencia a los antimicrobianos y la vigilancia de la resistencia⁵⁰. En la actualidad, esta organización pone toda esta información de manera gratuita a través de su página web (www.eucast.org) a disposición de cualquier profesional que la necesite, y está en continua actualización. La utilización de las recomendaciones de EUCAST en laboratorios de otros continentes ha ido creciendo progresivamente.

Figura 8. Implementación de los puntos de corte EUCAST en diferentes países en Abril de 2017.

Implementation of EUCAST breakpoints, April 2017



Fuente: Página web EUCAST, presentaciones y estadísticas⁵¹.

1.3.2. Puntos de corte epidemiológicos (*epidemiologic cut-off* o *ECOFF*)

A mediados de los noventa del siglo pasado se hizo evidente que los puntos de corte debían tener la capacidad de detectar mecanismos de resistencia bacteriana y así poder vigilar el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Así, se demostró que los puntos de corte diseñados para guiar la terapia antimicrobiana (puntos de corte clínicos) no necesariamente distinguen entre bacterias sin mecanismos de resistencia adquiridos (*wild-type* o salvaje) o con ellos, y no siempre permiten su detección^{48, 52}. Para satisfacer esta necesidad, en el año 2002 EUCAST estableció los denominados puntos de corte epidemiológicos, microbiológicos o ECOFF⁵³. Los ECOFF están relacionados con la distribución de las CMI para las poblaciones salvajes que carecen de mecanismos resistencia adquirida a un agente antimicrobiano en cuestión. El ECOFF se define para un agente y una especie. Corresponde al mayor valor de CMI para aislados de una misma especie que carecen de mecanismos de resistencia adquiridos expresados fenotípicamente para un antimicrobiano en concreto, y por lo tanto también al valor de CMI más alto que divide a la población bacteriana salvaje de la no salvaje. Los ECOFF tienen un papel importante en la detección de la resistencia fenotípica a los agentes antimicrobianos como un fenómeno biológico y pueden detectar la presencia de genes de resistencia con CMI inferiores al punto de corte clínico. Este fenómeno puede carecer de relevancia clínica, pero es un indicador del desarrollo gradual de resistencia que en algún momento puede ser significativo a nivel clínico. Los ECOFF además pueden ser útiles en situaciones en la que se carece de punto de corte clínico, como ocurre con algunos agentes tópicos, o en la práctica veterinaria, donde estos pueden ser utilizados⁵⁰. Para determinar los ECOFF se estudian las CMI de un gran número de aislados que provienen de una amplia variedad de fuentes, incluyendo comités de puntos de corte, investigadores individuales en medicina humana y veterinaria, programas para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en seres humanos y animales y proyectos de desarrollo de EUCAST^{42, 54}. Actualmente hay más de 29.000 distribuciones de CMI en la base de datos EUCAST, lo que equivale a varios millones de valores de CMI. El número (o proporción) de aislados que tienen la misma CMI se traza para obtener una curva de distribución. El ECOFF se establece como el límite superior de la curva para la mayoría de la población. Aquellos aislamientos que tienen CMI por encima de este punto de corte se consideran resistentes microbiológicamente hablando (no salvajes) al antibiótico incluso si sus CMI están por debajo del punto de corte clínico. Los ECOFF deben establecerse usando métodos estandarizados para determinar la CMI mediante dilución en caldo⁵³. De acuerdo a los ECOFF los microorganismos se dividen en dos categorías⁵⁵:

- o **Salvajes:** un microorganismo se define como salvaje cuando carece de mecanismos de resistencia adquiridos a un fármaco en cuestión. Los microorganismos de tipo salvaje pueden o no responder clínicamente al tratamiento antimicrobiano.
- o **No salvaje o resistencia microbiológica:** un microorganismo se define como no salvaje cuando están presentes mecanismos de resistencia adquirida al fármaco en cuestión. Los microorganismos de tipo no salvaje pueden o no responder clínicamente al tratamiento antimicrobiano.

Estos puntos de corte son conceptualmente invariables, no dependen de las dosis de antimicrobiano que puedan utilizarse y no necesariamente tienen que coincidir con los puntos de corte para definición de categorías clínicas. Este último aspecto se explica porque algunos mecanismos de resistencia no confieren incrementos de CMI suficientemente altos como para comprometer la actividad terapéutica del antimicrobiano considerado.

El número de distribuciones de CMI y ECOFF va en aumento, pero aun son necesarios muchos datos. A modo de ejemplo, en el caso de amoxicilina-clavulánico (AMC), en el sitio web donde podemos consultar las distribuciones de CMI de los microorganismos salvajes y los ECOFF⁵⁶, los datos disponibles son escasos. Se encuentran disponibles las distribuciones de CMI determinadas usando una concentración fija de 2 mg/L de ácido clavulánico de *A. baumannii*, *Citrobacter* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, sin embargo solo en el caso de *E. coli* el número de observaciones es elevado. A pesar de ello y aunque podemos observar la distribución de la CMI entre la población de *E. coli*, EUCAST aun no ha determinado el ECOFF (figura 6).

Figura 6. Distribución de la CMI de amoxicilina-clavulánico en aislados de *E. coli*.

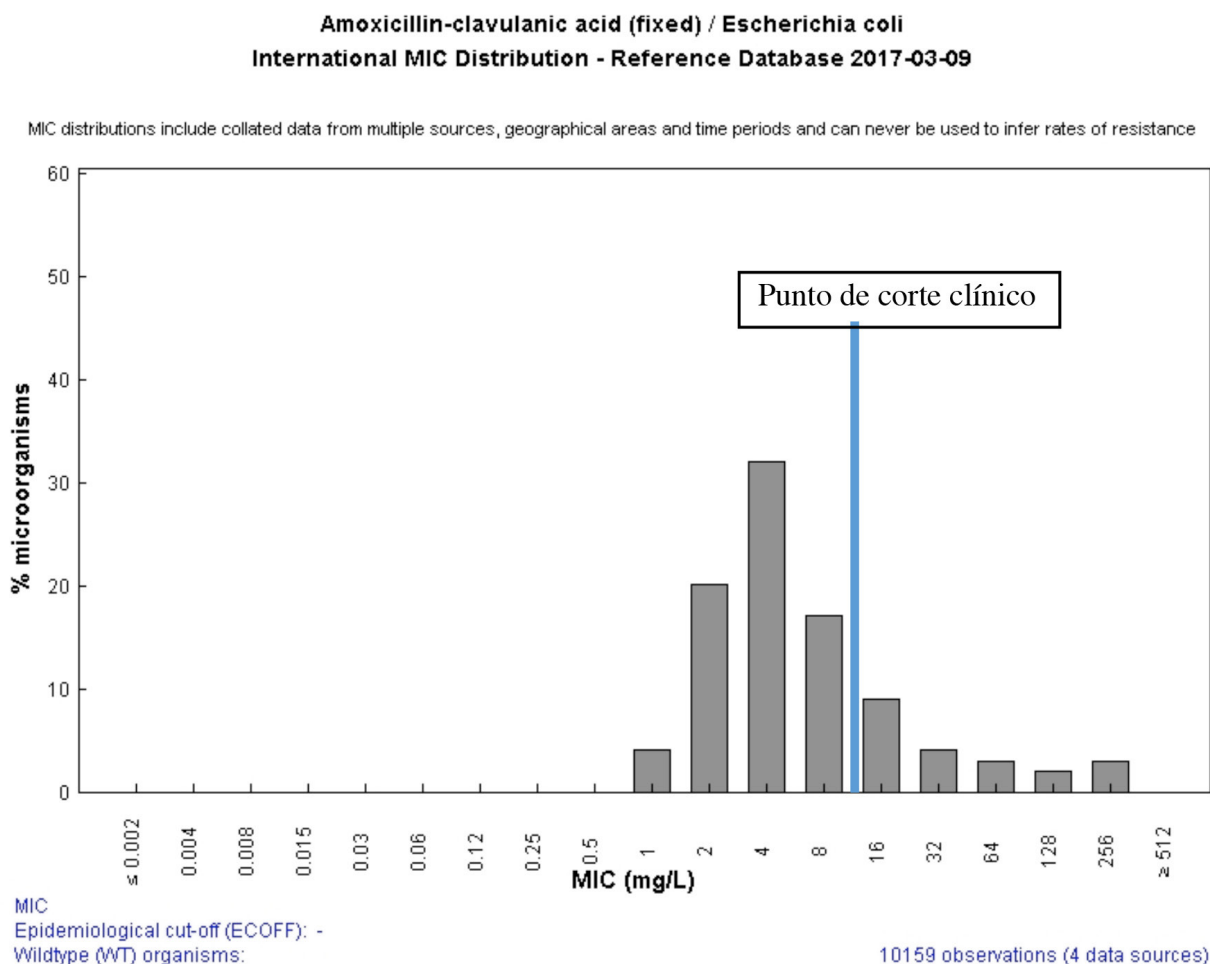


Figura modificada de la página web de distribuciones de CMI y ECOFF de EUCAST⁵⁷.

Como ya se ha comentado, los puntos de corte clínicos no tienen porqué coincidir con el ECOFF, pudiendo ser menores, iguales o mayores a este. Por ejemplo, EUCAST determina el ECOFF para piperacilina-tazobactam (PTZ) en aislados de *E. coli* en 8 mg/L, siendo las cepas con CMI ≤ 8 mg/L consideradas salvajes; sin embargo, el punto de corte clínico de EUCAST considera a los aislados de enterobacterias con CMI ≤ 8 mg/L como sensibles y aquellos con CMI >16 mg/L como resistentes (Figura 7).

Figura 7. Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam en aislados de *E. coli*.

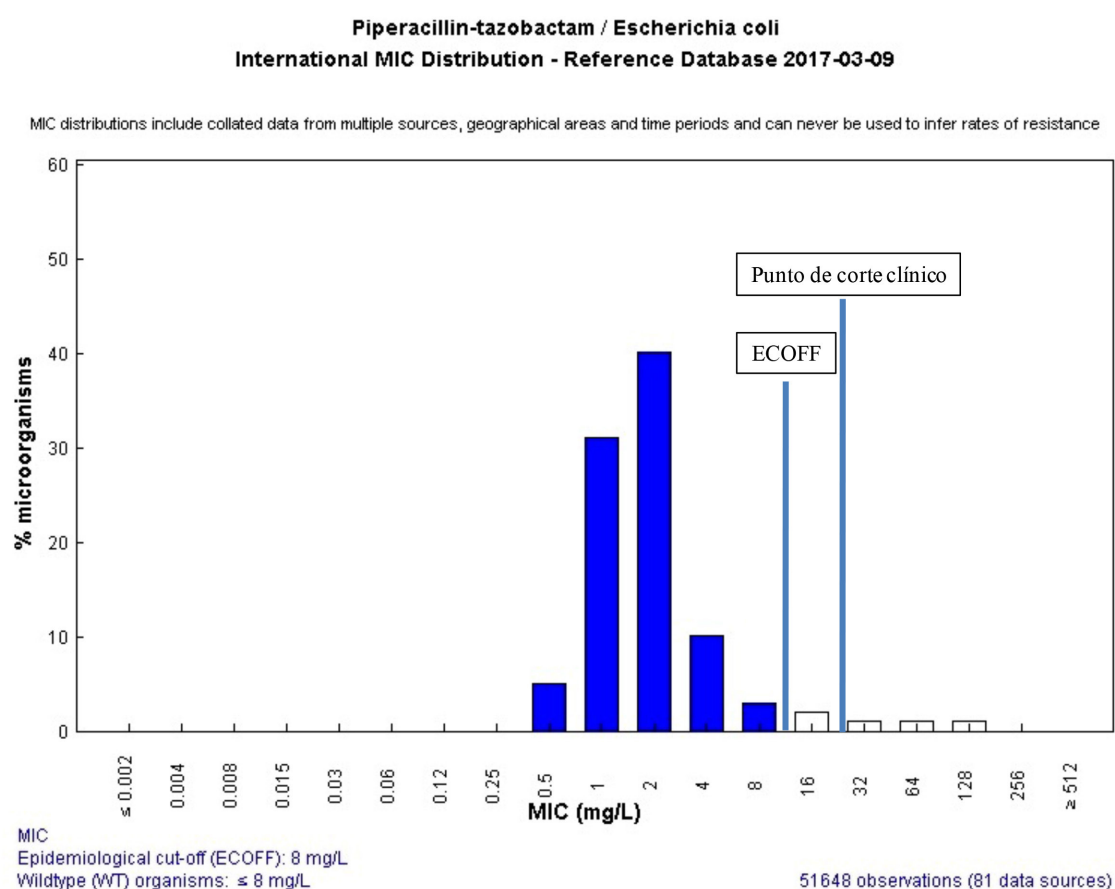


Figura modificada de la página web de distribuciones de CMI y ECOFF de EUCAST⁵⁸.

En el año 2015 CLSI introdujo también el concepto de punto de corte epidemiológico para una combinación específica organismos/antimicrobiano. Al igual que EUCAST, se define el punto de corte epidemiológico como un valor de CMI que separa las poblaciones bacterianas en aquellas sin (salvajes) y con (no salvajes) mecanismos de resistencia y/o mutaciones adquiridas, basados en fenotipos (CMI). CLSI solo establece estos puntos de corte para valores de CMI, mientras que EUCAST también los ha establecido para valores de mm de halo mediante difusión con discos. En el documento M100-S25 de

CLSI⁵⁹ se incorporó el concepto solo para vancomicina y *Propionibacterium acnés*; en el año 2016⁶⁰ se añadió para azitromicina y *Shigella flexneri* y *S. sonnei*, y en el año 2017³⁸ para colistina y *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Raoultella ornithinolytica* y para la combinación azitromicina y *Neisseria gonorrhoeae*.

1.3.3. Puntos de corte clínicos

Los puntos de corte clínicos hacen referencia a la concentración de un antibiótico que es capaz de predecir la eficacia terapéutica de dicho fármaco cuando se utiliza a la dosis estándar para el tratamiento de una infección causada por el patógeno analizado. Por lo tanto, intentan distinguir entre los pacientes en los que es probable o improbable, respectivamente, una respuesta favorable al tratamiento antimicrobiano^{42, 61}. Estos se utilizan para informar a los clínicos acerca de los posibles antibióticos de elección para el tratamiento. Esta definición no tiene en cuenta mecanismos de resistencia de bajo nivel que aumenten la CMI sin alcanzar el punto de corte, lo que teóricamente podría originar el desarrollo posterior de resistencia clínicamente relevante de alto nivel. De acuerdo a estos puntos de corte los microorganismos se clasifican en tres categorías clínicas: sensible, intermedio y resistente. La definición de las categorías muestra leves diferencias dependiendo del organismo que la defina. En cualquier caso, las tres categorías referidas se definen como tales aplicando puntos de corte adecuados a una prueba fenotípica definida; dichos puntos de corte clínicos pueden cambiar en función del conocimiento disponible en cada momento sobre la correlación CMI–respuesta clínica, así como con las circunstancias (por ejemplo, cambios en las dosis del fármaco comúnmente utilizadas, emergencia de mecanismos de resistencias nuevos).

Definiciones de EUCAST

Las definiciones de EUCAST coinciden con las publicadas en la norma de referencia internacional ISO 20776-1^{37, 55}.

- o **Sensible:** cepa bacteriana inhibida *in vitro* por una concentración de un agente antimicrobiano que se asocia con una alta probabilidad de éxito terapéutico.
- o **Intermedio:** cepa bacteriana inhibida *in vitro* por una concentración de un agente antimicrobiano que se asocia con un efecto terapéutico incierto. Esta definición implica que una infección debida al aislado puede ser tratada apropiadamente en localizaciones anatómicas en las que el antimicrobiano se concentre fisiológicamente o cuando pueda utilizarse una dosis alta del mismo. Esta categoría también implica una “zona reguladora”, para impedir que factores técnicos, pequeños pero difícilmente controlables, causen discrepancias importantes en las interpretaciones.
- o **Resistente:** cepa bacteriana inhibida *in vitro* por una concentración de un agente antimicrobiano, que se asocia con una alta probabilidad de fallo terapéutico.

Definiciones de CLSI

CLSI proporciona un aspecto más amplio a las definiciones de las categorías clínicas, ya que incorpora a la clasificación basada en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un agente antimicrobiano aspectos relacionados con los niveles sanguíneos o tisulares alcanzados por los mismos con las dosis generalmente prescritas de estos³⁸.

- o **Sensible:** aislados inhibidos por las concentraciones del antimicrobiano que normalmente se alcanzan cuando se usa a la dosis recomendada para tratar el lugar de infección, resultando en probable eficacia clínica.
- o **Sensible-dosis dependiente (SDD):** aislados cuya sensibilidad depende de la dosis empleada en el paciente. En los casos donde las pruebas de sensibilidad (CMI o difusión) determinen que la categoría de interpretación es SDD, será necesario utilizar un régimen de dosificación que resulte en una mayor exposición al antimicrobiano que la que se utilizó para establecer los puntos de corte clínicos. Esto se logra bien aumentando la frecuencia de las dosis (si el antimicrobiano es tiempo-dependiente) o la dosis en cada administración (si es concentración-dependiente), o ambos. Una exposición mayor al fármaco aumenta la probabilidad de conseguir respuesta clínica con los aislados SDD. El concepto de SDD está incluido dentro de la definición de la categoría intermedia de los antimicrobianos. Sin embargo, a menudo es pasado por alto o no es bien entendido por los médicos y microbiólogos al informarse un resultado intermedio. CLSI utiliza la categoría SDD cuando se aprueban dosis muy superiores a las previamente utilizadas para establecer el punto de corte de sensibilidad, así como cuando existen suficientes datos para justificar su designación. Esta categoría se introdujo por primera vez en el año 2014 para enterobacterias y cefepime, pero ya se utilizaba en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos⁶².
- o **Intermedio:** se utiliza para los aislados con CMI de un antimicrobiano que se aproxima a los niveles sanguíneos y tisulares que normalmente se alcanzan en el organismo y para los cuales la tasa de respuesta al tratamiento puede ser inferior a la que se alcanza con aislados sensibles. La categoría intermedia implica la eficacia clínica en localizaciones anatómicas donde los fármacos están fisiológicamente concentrados (por ejemplo, quinolonas y betalactámicos en la orina) o cuando se pueden usar dosis mayores que las más usualmente utilizadas pero dentro del rango estándar para del antimicrobiano (por ejemplo, betalactámicos). Esta categoría también incluye una zona reguladora que pretende evitar que pequeños detalles técnicos, incontrolados, causen discrepancias mayores en la interpretación del antibiograma, especialmente en los fármacos con estrechos márgenes de toxicidad.
- o **Resistente:** aislados que no son inhibidos por las concentraciones sanguíneas o tisulares que normalmente alcanza el antimicrobiano con las dosis habitua-

les, y/o que tienen valores de CMI que se incluyen dentro del intervalo en el cual habría que sospechar la presencia de mecanismos de resistencia específicos y en los que la eficacia clínica del antimicrobiano frente al aislado no se ha demostrado de forma fiable.

1.3.4. Puntos de corte farmacocinéticos/farmacodinámicos (FC/FD)

El punto de corte FC/FD es el valor de CMI que permite alcanzar un valor de probabilidad poblacional para alcanzar el objetivo terapéutico farmacodinámico o probabilidad de alcanzar el objetivo (PAO) mayor al 90% con un determinado régimen de dosificación. De este modo, se pueden considerar tratamientos con elevada probabilidad de éxito aquellos que permitan obtener, para un valor dado de CMI, un PAO superior al 90%. El valor de PAO se calcula a partir de simulaciones de Montecarlo, las cuales consideran la variabilidad individual de los parámetros tanto FC como FD, donde cada grupo de parámetros se describe como una distribución de valores para los cuales se asocia una probabilidad de inhibir al microorganismo implicado. De esta manera podemos estimar estocásticamente la proporción de una población determinada de personas en la que se podrá alcanzar el objetivo farmacodinámico requerido para una CMI determinada. En el caso de los antibióticos betalactámicos el parámetro FC/FD que se asocia con la erradicación bacteriana y la respuesta microbiológica es el tiempo durante el cual las concentraciones permanecen por encima de la CMI ($T > CMI$), dado que son antibióticos con actividad dependiente del tiempo. Para las penicilinas es $fT > CMI > 50\%$, es decir, el tiempo durante el cual la concentración de fármaco libre está por encima de la CMI debe ser superior al 50% del intervalo de dosificación^{61, 63}. Desde el año 2013, EUCAST publica en su documento sobre puntos de corte clínico los puntos de corte FC/FD no relacionados con especies para diversos antibióticos, añadiendo progresivamente datos para más antibióticos. En el documento se indica que estos puntos de corte solo deben usarse en ausencia de puntos de corte clínicos específicos de cada especie⁶⁴.

1.3.5. Principales discrepancias entre las recomendaciones de CLSI y EUCAST

Los puntos de corte clínicos, como ya se ha mencionado anteriormente, afectan a la toma de decisiones clínicas al determinar si un antibiótico es informado como sensible o resistente para un aislado bacteriano en cuestión. Básicamente, los puntos de corte de CLSI se basan en las distribuciones de CMI, en propiedades FC/FD y en los mecanismos de resistencia. Las medidas para la determinación de puntos de corte en EEUU están reguladas por la FDA. Sin embargo, desde su creación, EUCAST basa sus puntos de corte en los ECOFF, estudios FC/FD y datos clínicos. Se han publicado numerosos trabajos en los que se comparan los puntos de corte de CLSI y EUCAST para diferentes parejas de microorganismo/antimicrobiano⁶⁵⁻⁷¹. Las recomendaciones de CLSI tienen una serie de inconvenientes con respecto a EUCAST; en primer lugar, para su consulta se requiere de una suscripción económica anual y esto puede ser un problema para los laboratorios de microbiología con pocos recursos. En segundo lugar, los detalles sobre la toma de decisiones no están disponibles para su consulta pública. En tercer lugar, la presencia de representantes de la industria farmacéutica en el comité de votación

plantea la cuestión de la existencia de potenciales conflictos de interés en el establecimiento de los estándares. En el caso de EUCAST, la industria solo desempeña un papel consultivo y no se le permite financiar o participar en la toma de decisiones. Además, EUCAST fomenta la formación de Comités Nacionales que pueden estar representados en el Comité General de EUCAST y que de este modo puedan formar parte del proceso de toma de decisiones⁴⁵. Por último, en CLSI no existen estándares para los antibióticos que no están aprobados en los EEUU.

1.4. EVIDENCIAS PARA LA TOMA DE DECISIÓN EN PUNTOS DE CORTE

El establecimiento de puntos de corte clínicos es un proceso complejo para el que se requieren numerosos datos y herramientas. Hace cincuenta años, cuando se determinaban los primeros puntos de corte, estos se basaban en los valores de CMI y en las concentraciones séricas alcanzadas por los antimicrobianos. Todas las especies tenían el mismo punto de corte para un mismo agente antimicrobiano. Hoy en día las indicaciones de uso de los antibióticos son muy específicas y los puntos de corte para un antimicrobiano son específicos para cada especie, género o familia de microorganismos. En los últimos años se han desarrollado múltiples herramientas para facilitar el establecimiento de puntos de corte de calidad, de manera que lo que solía ser un “arte” es ahora una metodología basada en la mejor evidencia científica disponible⁴⁷. De hecho, en el proceso por el cual se establecen los puntos de corte clínicos se emplean una amplia variedad de datos, incluyendo datos de actividad *in vitro*, datos de FC/FD de animales y humanos y datos clínicos sobre el pronóstico de los pacientes cuando existen. Ningún conjunto de datos por sí mismo proporciona toda la información necesaria. Un aspecto básico en la discusión sobre el establecimiento de puntos de corte es hasta qué punto deben ser únicos para todas las infecciones, y por tanto sencillos (lo que requiere una interpretación posterior) o diversificarlos (y por tanto, aumentar la complejidad) para las distintas localizaciones de las infecciones, en las que la concentración de los antimicrobianos es distinta a igualdad de dosis, como ocurre por ejemplo en las meningitis, infecciones del tracto urinario, osteomielitis o neumonías^{42, 72}. Es importante destacar que la existencia de evidencias clínicas sobre la capacidad de predicción de los puntos de corte es, desafortunadamente, escasa en general, y difícil de generar.

1.4.1. Datos *in vitro*, distribución de CMI y ECOFF

Realizar una buena curva de distribución de CMI para las combinaciones microorganismo/antimicrobiano es el primer paso en el desarrollo de puntos de corte clínicos para ese antimicrobiano. Los datos de distribución de CMI deben basarse en la prueba de un mínimo de 500 aislamientos clínicos recientes usando metodologías recomendadas por CLSI y EUCAST^{72, 73}. Como ya se ha comentado, EUCAST publica tablas e histogramas que muestran las distribuciones de CMI para un gran número de microorganismos y antibióticos. Con la observación del histograma fácilmente podemos estimar donde se encuentra la CMI que divide la población salvaje de la que presenta mecanismos de resistencia adquiridos, valor que coincide con el ECOFF. Existen análisis estadísticos que

permiten determinar de manera fiable los ECOFF sin necesidad de estimar los valores visualmente^{74, 75}. Cuando se establecen puntos de corte clínicos generalmente se considera inadecuado que estos estén dentro del rango de valores de CMI de las cepas de tipo salvaje. Si esto ocurre se genera una situación en las que cepas clínicamente resistentes tienen un valor de CMI dentro del intervalo de las cepas salvajes que por definición carecen de mecanismos de resistencia adquiridos^{42, 76}. Clásicamente las distribuciones de CMI eran el parámetro principal en el que se basaban las organizaciones para el desarrollo de puntos de corte clínico, pero esto tenía el inconveniente de que no se conseguía predecir una relación óptima entre la dosis y el efecto bacteriológico o clínico⁷⁷.

1.4.2. Datos farmacocinéticos/farmacodinámicos (FD/FD)

El desarrollo del conocimiento sobre la farmacodinamia de los antimicrobianos ha permitido su aplicación en el establecimiento de los puntos de corte clínicos^{78, 79}. La farmacodinamia hace referencia al estudio de los mecanismos de acción de los fármacos y los efectos bioquímicos, fisiológicos o farmacológicos que desarrollan los fármacos al reaccionar con el organismo. Por otro lado, la farmacocinética estudia los procesos a los que es sometido el fármaco al interactuar con el organismo, desde que es administrado hasta su eliminación. Dicho de otro modo, la farmacodinamia estudia los efectos del fármaco sobre el microorganismo diana y la farmacocinética los efectos del organismo del huésped sobre el fármaco. Los conceptos de FC/FD en antimicrobianos fueron inicialmente definidos entre 1940 y 1950 por Eagle, quien a través de experimentos en modelos animales con roedores identificó el patrón tiempo-dependiente de la actividad bactericida de la penicilina, la naturaleza concentración-dependiente de la estreptomina y el patrón mixto de la actividad bactericida de las tetraciclinas^{80, 81}. Para los antibióticos, la FC/FD es el estudio de la relación entre las variables FC y la acción bacteriostática o bactericida *in vivo* y por extensión del resultado clínico^{82, 83}. Esta actividad antibacteriana *in vivo* dependería de la exposición del microorganismo al fármaco en el lugar de infección. Se han descrito tres parámetros FC/FD que predicen la eficacia de la mayoría de los antimicrobianos. De este modo, los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a cuál de estos parámetros describe mejor su patrón de actividad. Los primero son los antibióticos concentración-dependiente (su acción depende de la concentración plasmática alcanzada), siendo el parámetro FC/FD que define su actividad la relación entre la concentración máxima alcanzada por el antibiótico y la CMI (C_{max}/CMI). Dentro de este grupo se encuentran los aminoglucósidos o las quinolonas. El segundo grupo de antibióticos son los tiempo-dependiente (su actividad se relaciona con el tiempo en el cual su concentración plasmática se encuentra por encima de la CMI); en este caso el parámetro FC/FD predictor de la eficacia es el tiempo de exposición del patógeno a concentraciones del fármaco que superan la CMI ($fT > CMI$). Ejemplos de este tipo de antibióticos son los betalactámicos y los macrólidos. En último lugar se encuentran los fármacos cuya actividad depende del cociente entre el área bajo la curva de concentraciones (ABC) y la CMI del microorganismo que se está tratando (ABC/CMI); estos antibióticos son también predominantemente concentración-dependientes. En este grupo se encontrarían la vancomicina y las tetraciclinas^{79, 82}.

La relación entre un índice FC/FD y la respuesta al tratamiento permite la definición de un objetivo farmacodinámico. Idealmente, el objetivo farmacodinámico debería calcularse a partir de datos de ensayos clínicos en pacientes, pero en general esto no es posible. Por tanto, el objetivo se define en general en base a los resultados de modelos dinámicos *in vitro* o modelos de infección en animales de experimentación. A continuación, como se explicó arriba, se realizan modelos estocásticos que estiman la probabilidad de alcanzar ese objetivo con distintas dosis teniendo en cuenta la variabilidad de las concentraciones del fármaco (farmacocinética) conocida a raíz de estudios realizados en individuos (idealmente pacientes con la infección).

Para lograr el objetivo farmacodinámico en un paciente concreto se deben cumplir dos condiciones. La primera es que la exposición del microorganismo al antimicrobiano sea adecuada en ese paciente. En la práctica clínica, sin embargo, las dosis que se prescriben son estándares, a pesar de que la exposición varía entre los pacientes debido a la variabilidad interindividual de los parámetros FC como el aclaramiento y el volumen de distribución, los cuales deben tenerse en cuenta al tratar de predecir el resultado del tratamiento basado en el objetivo. La segunda condición es que la CMI sea lo suficientemente baja como para alcanzar un valor de índice FC/FD por encima del objetivo. Los microorganismos con CMI que tengan índices FC/FD inferiores al objetivo FD deben considerarse resistentes (baja probabilidad de curación), mientras que aquellos con CMI que dan como resultado valores de índices FC/FD más altos que el objetivo PD deben considerarse sensibles (alta probabilidad de curación). De este modo, el punto de corte clínico de CMI se basa en el valor del índice FC/FD que diferencia entre los dos grupos. Es evidente que el valor del punto de corte depende directamente de la exposición esperada del microorganismo al agente antimicrobiano en el paciente a tratar. Por lo tanto, el primer paso es verificar la dosis y el régimen de dosificación que más se usa en el tratamiento para una determinada indicación. El método más sencillo para determinar el punto de corte de CMI relacionado con una exposición particular y un objetivo terapéutico es usar la curva farmacocinética simulada (basada en las propiedades farmacocinéticas y las ecuaciones estándares) para un agente y calcular directamente el valor de punto de corte⁸⁴.

1.4.3. Estudios *in vitro*

Las propiedades PD de un antibiótico se determinan inicialmente *in vitro*. Tradicionalmente los modelos *in vitro* eran estáticos y analizaban la naturaleza de actividad antibacteriana, el efecto post-antibiótico (EPA) y los efectos de las concentraciones sub-inhibitorias. El EPA se refiere a la capacidad del antibiótico para suprimir el crecimiento bacteriano una vez que su concentración sérica ha decrecido hasta estar por debajo de la CMI. Dicho de otro modo, es la supresión del crecimiento bacteriano que persiste después de una corta exposición del microorganismo a los antimicrobianos⁸⁵. En base al EPA los antibióticos se clasifican en aquellos con un EPA prolongado o con un EPA leve o moderado⁸⁶. La demostración del EPA *in vitro* requiere de su validación en un modelo animal, ya que este efecto observado *in vitro* puede estar ausente *in vivo*⁸⁷. Con la combinación de los datos de la actividad antibacteriana *in vitro* y el patrón de EPA es

posible definir las propiedades PD *in vitro* y con ello poder realizar predicciones sobre las propiedades FC/FD *in vivo*. Los modelos FC/FD han evolucionado hasta la actualidad, hoy en día se usan modelos más sofisticados donde se simula la FC de los fármacos en humanos y se mide el efecto antibacteriano de los mismos^{88, 89}. Estos modelos tienen las características de ser flexibles, adaptables, económicos y además presentar una buena correlación con datos en animales y humanos. Estas cualidades les hacen ser una excelente herramienta de investigación, no solo para predecir el efecto antibacteriano, sino también para conocer la actividad frente a bacterias con sensibilidad disminuida, explicar fracasos clínicos y determinar los valores FC/FD necesarios para prevenir la aparición de subpoblaciones resistentes⁹⁰.

1.4.4. Modelos animales

Los modelos animales han sido un pilar fundamental para la comprensión de las características FC/FD de los antibióticos. Desde que Eagle iniciará su investigación en este campo los conocimientos han evolucionado enormemente. En su primer trabajo, demostró la importancia del intervalo de dosificación en la eficacia de penicilina⁹¹. Sin embargo, la importancia de sus trabajos no fue apreciada hasta años más tarde: entre finales de 1970 y principios de 1990, los conceptos FC/FD fueron redescubiertos y ampliados a través de experimentos con roedores⁸². Desde entonces los modelos de infección en animales han permitido la evaluación *in vivo* del efecto de los antimicrobianos para el tratamiento de infecciones inducidas de forma experimental. En los últimos veinte años, ha habido un aumento considerable de la información sobre FC/FD de diferentes antibióticos para el tratamiento de infecciones en pacientes. Hoy, la información FC/FD extraída de las infecciones en modelos animales sirve como base fundamental para seleccionar las dosis y los intervalos de dosificación de los antimicrobianos y aportan información útil para el establecimiento de los puntos de corte clínicos⁹². La utilidad de la información obtenida en modelos animales para el manejo de pacientes ha sido evaluada, y en general existe una buena concordancia entre los datos FC/FD de los antibióticos en modelos animales y pacientes. Los extensos estudios realizados en animales y en modelos *in vitro* de FC en los últimos 20 años han llevado a una clara comprensión de las relaciones FC/FD de la mayoría de los antibacterianos⁹³.

1.4.5. Datos clínicos

Los datos clínicos deberían constituir el punto más relevante en la toma de decisiones para el establecimiento de puntos de corte, pero desgraciadamente estos datos no suelen estar disponibles, ya que son necesarios ensayos clínicos o estudios prospectivos muy bien diseñados y con suficiente tamaño muestral para poder obtener datos de calidad. Estos datos son difíciles de evaluar debido a la gran cantidad de factores de confusión que entran en juego en la respuesta de un paciente al tratamiento antimicrobiano. Como parte del proceso para el establecimiento de puntos de corte, los resultados clínicos se correlacionan con los de sensibilidad *in vitro*. Durante el proceso, se examinan los efectos del tratamiento, medidos como curación, mejoría

o fracaso clínico y/o microbiológico, de acuerdo a la especie y el lugar de infección. Generalmente, no se dispone de datos suficientes para apoyar los puntos de corte solamente en ellos, por lo que estos datos sirven para apoyar al resto de información y con el conjunto de todos ellos establecer los puntos de corte clínicos. Con frecuencia, los datos clínicos se obtienen de análisis post-hoc de los pacientes tratados con un fármaco concreto en estudios aleatorizados, que utilizan regímenes de dosificación predefinidos. Estos estudios tienen la ventaja de que el antibiótico raramente se usa en combinación por lo que podemos analizar fácilmente los efectos antibacterianos del antibiótico a estudio. La variable resultado de estos suele ser el resultado clínico respecto a la CMI del patógeno causante de la infección. Sin embargo, con frecuencia los estudios aleatorizados presentan una serie de limitaciones para este objetivo: (1) En muchas ocasiones se excluyen pacientes con aislados resistentes; cuando se trata de ensayos clínicos previos a la comercialización de nuevos antibióticos esta definición de resistencia suele estar basada en las curvas de distribución de CMI, es decir, en los puntos de corte epidemiológicos que como ya se ha comentado no siempre tienen por que coincidir con los clínicos. En este caso no es posible establecer si el punto de corte puede estar por encima de los predefinidos. (2) Es frecuente que la distribución de CMI de los aislados sea heterogénea con lo que el tamaño muestral para determinadas CMI suele ser insuficiente para evaluar la eficacia. Los únicos estudios clínicos con un número de pacientes suficiente son aquellos que se realizan para nuevos fármacos con fines regulatorios^{42, 94}, pero en muchos de los pacientes no hay diagnóstico etiológico, y las propias características de los ensayos hacen que se seleccionen pacientes con bajo riesgo de patógenos resistentes. (3) No suelen incluir todas las especies que pueden ser de interés para un cuadro clínico en particular, por lo que los puntos de corte pueden ser inapropiadamente extrapolados al resto de especies no incluidas. (4) Los estudios suelen realizarse para un síndrome concreto, por lo que los resultados podrían no ser extrapolables a otros síndromes. (5) Finalmente, existe poco consenso sobre cuales deber ser las tasas de curación y/o erradicación microbiológica aceptables, al no tener en cuenta la respuesta inmunitaria de huésped.

Por este motivo, pueden ser de gran utilidad los estudios observacionales diseñados para este fin. Un estudio clínico ideal debería reclutar un número significativo de casos en los que el patógeno tiene una CMI en ambos lados del puntos de corte epidemiológico y FC/FD para sí poder ayudar en la validación clínica de los puntos de corte clínicos definitivos. Por todo ello, son necesarios más estudios prospectivos de práctica clínica habitual para analizar la relevancia y aplicabilidad de los puntos de corte actuales.

1.5. ENTEROBACTERIAS

1.5.1. Aspectos microbiológicos generales

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son bacilos gramnegativos, de tamaño intermedio (0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0 μm). Se definen por compartir un antígeno común (an-

tígeno de Kunin, también conocido como ECA, del inglés *enterobacterial common antigen*), ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos, no producir esporas y en ocasiones ser capsulados. Se consideran anaerobios facultativos, ya que todos los miembros pueden crecer rápidamente de forma aerobia o anaerobia en varios medios no selectivos y selectivos. Son microorganismos quimio-organotrofos, poseedores a la vez de un metabolismo respiratorio y fermentativo, fermentadores de la glucosa (con o sin producción de gas), catalasa positivos, oxidasa negativos y nitrato reductasa positivos^{95, 96}.

La familia Enterobacteriaceae pertenece al dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria y orden Enterobacteriales⁹⁷ y comprende numerosos géneros y especies relevantes desde el punto de vista médico. El nombre de la familia Enterobacteriaceae fue acuñado por Rahn en 1937, y si bien fue ampliamente utilizado durante años^{98, 99}, en 1979 Lapage sostuvo que esa nomenclatura era incorrecta. Él consideraba ilegítimo el nombre Enterobacteriaceae y propuso Enterobacteraceae (sin “i”). Se basaba en que etimológicamente derivaba de *Enterobacter* (un género de la familia) y el sufijo *-aceae*, que denota “familia”, y no *-iaceae (sic)*¹⁰⁰. Pero estas reglas del Código Internacional de Nomenclatura no existían cuando Rahn había planteado el nombre de la familia¹⁰¹. Una Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática determinó finalmente que la nomenclatura válida era Enterobacteriaceae (Rahn 1937)⁹⁹, y su género tipo sería *Escherichia* (según Castellani y Chalmers 1919)¹⁰², como queda reflejado en las Listas Aprobadas de Nombres Bacterianos de 1980 donde figura dentro de los *nomina conservanda familiarum* (nombres de familias conservados)^{103, 104}. Una explicación etimológica fue expuesta por Brenner en la 7ª edición de “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”, aquí se propuso *enterobacterium* para denotar “bacteria intestinal” y el sufijo *-aceae* para “familia”. Esta etimología sí explicaría el porqué del nombre Enterobacteriaceae¹⁰⁵.

En febrero de 1980, se publicaron en las Listas Aprobadas de Nombres Bacterianos sólo 19 géneros dentro de la familia Enterobacteriaceae¹⁰⁴. A la fecha de escritura de este trabajo, ese número ha aumentado de forma considerable, siendo 53 los géneros válidamente publicados (Tabla 1)¹⁰⁶. El número de especies dentro de la familia es más difícil de apreciar, ya que numerosas especies han sido reclasificadas dentro de otros géneros en forma de nuevas combinaciones. Actualmente el número de especies diferentes válidamente publicadas rondaría las 340¹⁰⁶.

Se caracterizan por ser microorganismos ubicuos, ya que se encuentran de forma universal en el medio ambiente (suelo, agua y vegetación), además forman parte de la flora intestinal de muchos animales, incluido el ser humano.

Tabla 1. Géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

<i>Arsenophonus</i>	<i>Biotrasticola</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Buchnera</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Buttiauxella</i>
<i>Calymmatobacterium</i>	<i>Cedecea</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Cosenzaea</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Dickeya</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ewingella</i>	<i>Gibbsiella</i>
<i>Hafnia</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Kluyvera</i>	<i>Leclercia</i>
<i>Leminorella</i>	<i>Levinea</i>
<i>Lonsdalea</i>	<i>Mangrovibacter</i>
<i>Moellerella</i>	<i>Morganella</i>
<i>Obesumbacterium</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Pectobacterium</i>	<i>Phaseolibacter</i>
<i>Photorhabdus</i>	<i>Plesiomonas</i>
<i>Pragia</i>	<i>Proteus</i>
<i>Providencia</i>	<i>Rahnella</i>
<i>Raoultella</i>	<i>Saccharobacter</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Samsonia</i>
<i>Serratia</i>	<i>Shigella</i>
<i>Shimwellia</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Tatumella</i>	<i>Thorsellia</i>
<i>Trabulsiella</i>	<i>Wigglesworthia</i>
<i>Xenorhabdus</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Yokenella</i>	

1.5.2. Aspectos generales de las infecciones por Enterobacterias

Las enterobacterias son el grupo de microorganismos que con mayor frecuencia se aísla en los laboratorios de Microbiología Clínica como agentes causales de una amplia variedad de infecciones en el ser humano. Son responsables de un tercio de todas las bacteriemias, de dos tercios de las infecciones del tracto urinario (ITU), así como de un elevado número de infecciones gastrointestinales. Habitualmente, las enterobacterias aisladas con mayor frecuencia en un laboratorio de Microbiología Clínica son *E. coli* y *Klebsiella* spp., seguidas por *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y diferentes especies del grupo *Proteus-Morganella-Providencia* o *Salmonella* spp.

Dentro de la familia hay especies consideradas patógenas primarias para el ser humano, como *Shigella* que produce cuadros de enteritis, *Salmonella* serotipo Typhi y Paratyphi cuya infección causa fiebre tifoidea y paratifoidea, o *Yersinia pestis* agente causal de la peste; mientras que otras especies forman parte de la flora comensal normal del ser humano y producen infecciones oportunistas, entre estas se encuentran los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* o *Serratia*, con la excepción de las cepas de *E. coli* patógenas intestinales que son causa de enfermedad diarreica aguda (Tabla 2).

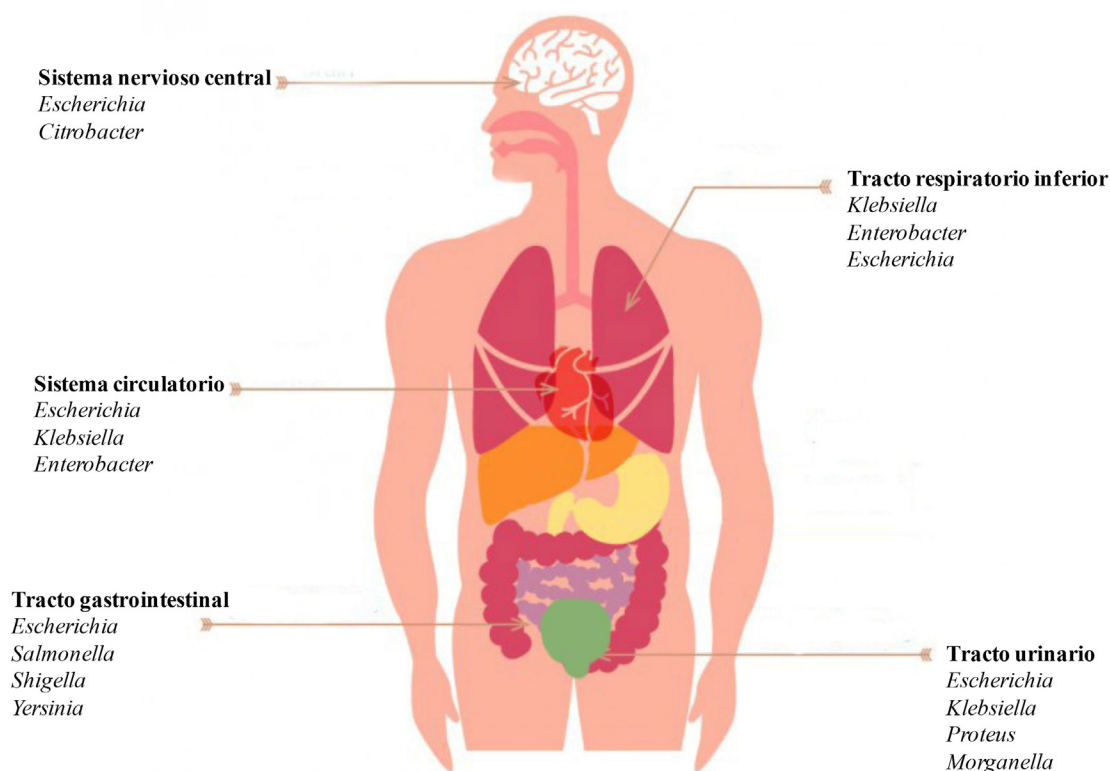
Tabla 2. Especies de la familia Enterobacteriaceae con importancia clínica.

<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

Los mecanismos de transmisión de estos microorganismos son muy variados y difieren de unas especies a otras. En general está estrechamente relacionado con el hábitat natural de las especies; de este modo pueden originar infecciones desde reservorios animales como la mayoría de las especies de *Salmonella* y *Yersinia*, a través de portadores humanos como en el caso de *Shigella* o *Salmonella* serotipo Typhi, o bien por diseminación endógena de los microorganismos en el tracto gastrointestinal del propio huésped como en el caso de las especies oportunistas⁹⁶.

Aunque se han descrito infecciones por enterobacterias en múltiples órganos y sistemas del ser humano, en la figura 9 se muestran los principales sistemas afectados, así como los principales géneros causantes de infección en los mismos. Son de especial relevancia las infecciones en el ámbito hospitalario, siendo las especies oportunistas las principales implicadas afectando a pacientes sondados, intubados, e inmunodeprimidos, causando infecciones urinarias, colecistitis, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas o sepsis.

Figura 9. Localizaciones más frecuentes de infección por enterobacterias.



1.6. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS: PENICILINAS Y COMBINACIONES CON INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS

Los antibióticos betalactámicos (BL) son agentes en general bactericidas que ejercen su acción al inhibir la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, al impedir la elongación del peptidoglicano en formación. Son análogos estructurales del aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la pared de peptidoglicano, lo que facilita su unión de carácter irreversible al sitio activo de las peptidasas PBPs (*penicilling binding proteins*), interrumpiendo la elongación del peptidoglucano de la pared celular. Hasta hoy se han desarrollado gran cantidad de antibióticos BL naturales y derivados semisintéticos, que han convertido a esta familia de antimicrobianos en la más utilizada para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias¹⁰⁷.

Las penicilinas contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina (figura 10), formando el ácido 6-aminopenicilánico. La presencia de una cadena lateral característica en la posición 6 del anillo betalactámico define el espectro bacteriano y las propiedades farmacológicas de las distintas penicilinas. De este modo, las penicilinas

se pueden clasificar en 5 clases: 1) penicilinas naturales, 2) penicilinas resistentes a penicilinasas, 3) aminopenicilinas, 4) carboxipenicilinas y 5) acilureidopenicilinas^{95, 107} (tabla 3).

Figura 10. Estructura química de todas las penicilinas.

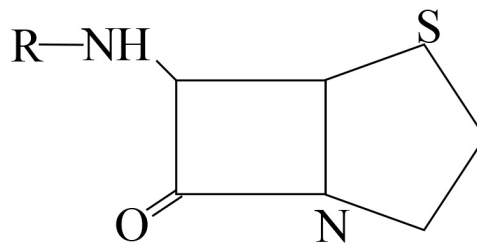


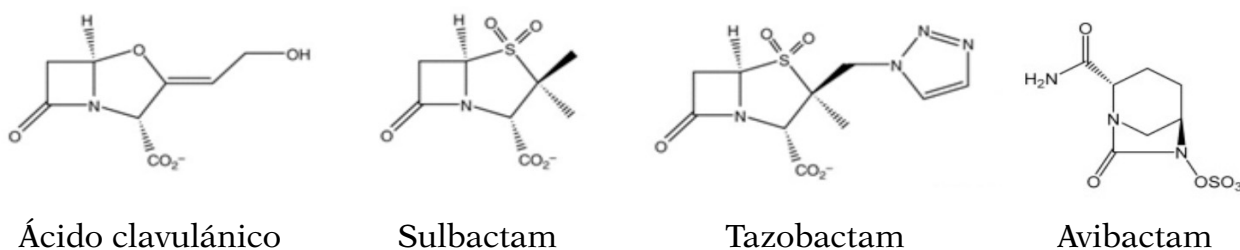
Tabla 3. Clasificación de penicilinas.

Naturales
Bencilpenicilina (Penicilina G)
Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)
Semisintéticas
Resistentes a penicilinasas
Meticilina
Nafcilina
Cloxacilina
Oxacilina
Aminopenicilinas
Ampicilina
Amoxicilina
Bacampicilina
Pivampicilina
Carboxipenicilinas
Cabercilina
Ticarcilina
Ureidopenicilinas
Azlocilina
Mezlocilina
Piperacilina

Otros fármacos BL que no desarrollamos en este trabajo son las cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos.

Los inhibidores de betalactamasas (IBL) son compuestos con actividad antibacteriana débil, pero con una potente actividad inhibitoria de enzimas betalactamasas de clase A (figura 11). Cuando se combinan con ciertos antibióticos BL, los IBL evitan su hidrólisis por las betalactamasas actuando como un sustrato suicida al formar un compuesto intermedio estable que inhibe la actividad enzimática. Actualmente hay cuatro IBL comercializados: ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y avibactam. El ácido clavulánico fue el primer IBL introducido en la clínica después de ser aislado de *Streptomyces clavuligerus* en la década de los setenta¹⁰⁸. Desde el punto de vista químico está constituido por un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas, caracterizado por la sustitución de un átomo de azufre en posición 3 por uno de oxígeno y la ausencia de la cadena lateral acilamino en posición 6. En España, se comercializa combinado con amoxicilina en administración oral y parenteral. Inhibe las betalactamasas de estafilococos y de muchas bacterias gramnegativas. Sulbactam y tazobactam son sulfonas del ácido penicilánico que fueron desarrolladas por la industria farmacéutica como compuestos sintéticos en 1978 y 1980, respectivamente^{109, 110}. El sulbactam es una 6-desaminopenicilina sulfona que se administra en combinación con ampicilina; a pesar de tener un espectro de acción más amplio que el ácido clavulánico posee menor actividad¹¹¹. Tazobactam se diferencia de sulbactam por la presencia de un grupo tiazol en posición 3, tiene un espectro de inhibición similar al de sulbactam pero con una potencia más parecida a la del ácido clavulánico. Se encuentra disponible para administración por vía parenteral en combinación con piperacilina, en una proporción de peso entre piperacilina y tazobactam de 8:1, y recientemente con una nueva cefalosporina, ceftolozano. Los tres inhibidores comparten similitud estructural con la penicilina, son eficaces frente a muchos organismos sensibles que expresan betalactamasas de clase A (incluyendo CTX-M y BLEEs derivadas de SHV-1 y TEM-1), por lo general son menos eficaces frente a las betalactamasas de clases B, C y D¹¹². Avibactam es el primer miembro de la familia de derivados de la diazabicilo-(3.2.1)-octanona cuya actividad inhibitoria de las betalactamasas no es suicida^{113, 114}.

Figura 11. Estructura química de los inhibidores de betalactamasas.



1.6.1. Resistencia de enterobacterias a betalactámicos. Papel de los inhibidores de betalactamasas

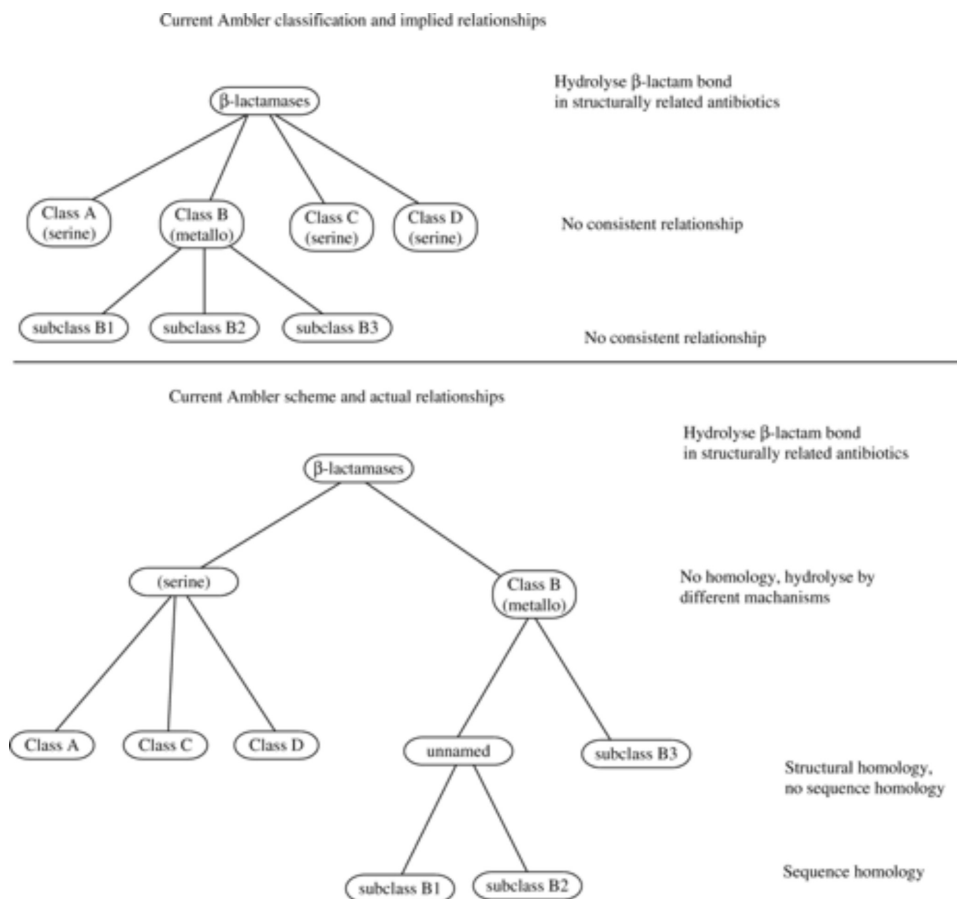
La resistencia a antimicrobianos puede ser natural o adquirida. La resistencia intrínseca o natural de una especie bacteriana a un antibiótico particular es la capacidad de resistir la acción de ese antibiótico como resultado de características estructurales o funcionales inherentes. El ejemplo más simple es cuando una bacteria no posee la diana sobre la que actúa el antimicrobiano, un ejemplo es la resistencia de los micoplasmas a los BL al carecer de pared celular; por lo general esta resistencia carece de interés clínico. La resistencia adquirida ocurre cuando las bacterias aun poseyendo la diana de acción del antibiótico, consiguen evitar la acción del antimicrobiano¹¹⁵.

La resistencia de las enterobacterias a los antibióticos BL puede ser debida a varios mecanismos, que en ocasiones se asocian:

1. **Hidrólisis del antibiótico mediante betalactamasas:** la producción de betalactamasas es el mecanismo de resistencia más importante en enterobacterias a los antibióticos BL¹¹⁶. Las betalactamasas o penicilnamido-beta-lactamhidrolasas han sido definidas por el *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry* como “enzimas que hidrolizan amidas, amidas y otras uniones C-N”. Son responsables de la mayor parte de fracasos terapéuticos debido a que hidrolizan el anillo betalactámico al unirse al grupo carboxilo y romper el enlace amídico del anillo, lo cual hace que se pierda la capacidad de unión a las PBP^{117, 118}. Existen dos clasificaciones para las betalactamasas:

- Clasificación molecular de Ambler (figura 12): clasifica a las betalactamasas en cuatro clases moleculares en base a su estructura primaria^{119, 120}. La clase A (serin-penicilinasas), B (metaloenzimas), C (serin-cefalosporinasas) y D (serin-oxacilinasas).

Figura 12. Clasificación de betalactamasas según Ambler.



Fuente: Hall, 2005¹¹⁹.

- Clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros (tabla 4): clasifica a las enzimas de acuerdo a de su espectro de acción y respuesta a los inhibidores^{121, 122}. Esta clasificación es la más útil desde el punto de vista clínico ya que considera tanto los IBL como los sustratos de las enzimas.

Tabla 4. Clasificación funcional de las betalactamasas.

Grupo funcional	Grupo estructural	Sustrato	Inhibidor		Características	Enzimas representativas
			CA* o TZB†	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	No	Si	Cefalosporinas>Penicilinas. Hidrólisis de cefamicinas	AmpC: ACT-1, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	↑ hidrólisis de ceftazidima	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Si	No	Penicilinas>Cefalosporinas	Penicilinas de grampositivos
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	Si	No	Penicilinas≈Cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	Si	No	↑hidrólisis de oximino-betalactámicos	BLEE: CTX-M-15, TEM-3, SHV-2
2br	A	Penicilinas	Variable	No	Resistencia a inhibidores de betalactamasas	TEM-30 (IRT-2), SHV-10
2c	A	Carbenicilina	Si	No	↑hidrólisis de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Si	No	↑hidrólisis de carbenicilina y cefepime	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	↑hidrólisis de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplio espectro	Variable	No	Hidroliza cloxacilina y oximino-betalactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	Hidroliza cloxacilina y carbapenémicos	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplio espectro	Si	No	Inhibida por clavulánico pero no por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	↑ Hidrólisis de carbapenémicos, oximino-betalactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenémicos	No	Si	No hidroliza monobactámicos	IMP-1, VIM-1
3b	B	Carbapenémicos	-	+	Hidrólisis preferente de carbapenémicos	CphA, Sfh-1

*CA, ácido clavulánico

†TZB, tazobactam

2. **Alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa:** los antibióticos BL atraviesan la membrana a través de canales proteicos denominados porinas y, una vez en el espacio periplásmico, se unen a las PBP objetivo. Las mutaciones en las porinas originan una disminución de la concentración de antibiótico en el interior de la célula, lo que reduce significativamente su capacidad de acción^{123, 124}.
3. **Bombas de expulsión activa:** el fármaco que entra en el espacio periplásmico se bombea de vuelta a través de la membrana externa por medio de bombas de expulsión¹²⁵.
4. **Disminución de la afinidad del antibiótico a las PBP:** las PBP pueden sufrir pérdida de afinidad por los BL a consecuencia de las mutaciones que afectan a su estructura terciaria.

Como se mencionó anteriormente, durante los años setenta y ochenta se desarrollaron moléculas con capacidad de resistir la acción de las betalactamasas predominantes en aquel momento (como determinadas cefalosporinas o carbapenems) o de inhibir su acción (IBL). Los IBL son eficaces en la inhibición de las denominadas de amplio espectro como TEM-1, TEM-2 y SHV-1 y sus variantes de espectro extendido (BLEE), así como las BLEE tipo CTX-M. Sin embargo, las enterobacterias rápidamente desarrollaron variantes de betalactamasas capaces de evitar la acción de los IBL. La resistencia a IBL y sus combinaciones puede ser debida a varios mecanismos:

1. **Producción de betalactamasas cromosómicas tipo AmpC:** *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella* y *Pseudomonas aeruginosa* tienen estas betalactamasas resistentes a la acción de inhibidores de manera natural, y pueden expresarlas en determinadas situaciones.
2. **Adquisición plasmídica de betalactamasas tipo AmpC.**
3. **Hiperproducción de betalactamasas constitutivas:** ejemplo de este mecanismo es la hiperproducción de AmpC en *E. coli* o SHV-1 en *K. pneumoniae*¹²⁷.
4. **Hiperproducción de betalactamasas TEM-1 y SHV-1:** la hiperproducción de enzimas tipo TEM y SHV, así como sus derivados BLEE pueden producir una disminución de la sensibilidad a los inhibidores. Con frecuencia las bacterias producen simultáneamente BLEE y otra betalactamasa de amplio espectro, aumentando así el número de copias de betalactamasas sobre las que el inhibidor tiene que actuar, esta situación disminuye la sensibilidad de las combinaciones de BL con inhibidor¹²⁸.
5. **Producción simultánea de betalactamasas y pérdida de porina:** la pérdida de las porinas OmpF y/o OmpC en *E. coli* no afecta significativamente a la sensibilidad de los inhibidores, pero cuando se asocia con la presencia de betalactamasas se hace relevante reduciendo la sensibilidad a los mismos¹²⁹.

6. **Producción de betalactamasas tipo OXA:** por lo general este tipo de enzimas son resistentes a la acción de los IBL¹³⁰. En los últimos se ha producido una gran diseminación de estas enzimas.
7. ***Inhibitor-resistant TEM betalactamases (IRT)*:** en los primeros años de la década de los noventa se describieron betalactamasas plasmídicas resistentes a la inhibición por el ácido clavulánico. El estudio de su secuencia reveló que eran variantes de las betalactamasas TEM-1 y TEM-2, por ello se les denominó IRT. Estas enzimas se encontraron inicialmente en aislados de *E. coli*¹³¹, pero también se han detectado en *Klebsiella spp.*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *C. freundii* y *S. sonnei*¹³²⁻¹³⁶. Los aislados productores de IRT son resistentes a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas pero sensibles a cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos y en la mayoría de casos a PTZ. Sin embargo son resistentes a ampicilina-sulbactam e intermedios o resistentes a AMC. Las mutaciones que dan lugar a estas enzimas se producen en sitios muy específicos sobre la estructura del gen de TEM-1 y/o TEM-2. Los cambios más frecuentes se han descrito en la metionina 69, arginina 244, arginina 275 y aspártico 276 en las derivadas de TEM-1, y en lisina 39 en las IRT que derivan de TEM-2. (Tabla 5) La prevalencia real de estas enzimas se encuentra infraestimada, siendo quizás una de las principales razones para ello las discrepancias entre CLSI y EUCAST en los puntos de corte de las combinaciones de BL/IBL, así como en la concentración de clavulánico que se usa para realizar las pruebas de sensibilidad a AMC. En general, para la detección de IRT es preferible el uso de una concentración fija de clavulánico de 2 mg/L, tal como recomienda EUCAST, frente al uso de un ratio 2:1 como recomienda CLSI. Además se ha de tener en cuenta que el nivel de resistencia a las combinaciones BL/IBL se correlaciona con el número de copias de la enzima, por lo que una producción de bajo nivel podría ser indetectable cuando se utiliza un ratio 2:1¹²⁸.
8. ***Complex mutant TEM (CMT)*:** en algunos casos se producen mutaciones en TEM que además de afectar a la sensibilidad de los inhibidores afecta a las cefalosporinas de amplio espectro, dando lugar a las enzimas CMT. Para la aparición de estas enzimas es necesario que se produzcan simultáneamente mutaciones en TEM tipo BLEE e IRT. Las CMT se caracterizan por afectar de forma variable a la actividad de las oximino-cefalosporinas y de los IBL. Hasta la fecha se han descrito 10 enzimas de esta familia (<https://www.lahey.org/Studies/>), las cuales han sido identificadas en diferentes especies de enterobacterias, incluidas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *E. aerogenes*¹³⁷⁻¹⁴⁰. La detección en el laboratorio de estas enzimas puede ser difícil, ya que el resultado del test de sinergia con doble disco de clavulánico puede verse reducido debido a un alto nivel de resistencia a ácido clavulánico y a la actividad variable sobre cefalosporinas^{128, 139}.

Tabla 5: Sustituciones aminoacídicas en IRT derivadas de TEM-1 y TEM-2.

β -Lactamases	Amino-acid at position												pI
	21	39	69	127	130	165	182	244	261	265	275	276	
TEM-1	Leu	Gln	Met	Ile	Ser	Trp	Met	Arg	Val	Thr	Arg	Asn	5.4
TEM-30 (IRT-2)								Ser					5.2
TEM-31 (IRT-1)								Cys					5.2
TEM-32 (IRT-3)			Ile				Thr						5.4
TEM-33 (IRT-5)			Leu										5.4
TEM-34 (IRT-6)			Val										5.4
TEM-35 (IRT-4)			Leu								Asp		5.2
TEM-36 (IRT-7)			Val								Asp		5.2
TEM-38 (IRT-9)			Val							Leu			5.2
TEM-39 (IRT-10)			Leu			Arg					Asp		5.4
TEM-40 (IRT-11)			Ile										5.4
TEM-45 (IRT-14)			Leu							Gln			5.2
TEM-51 (IRT-15)							His						5.2
TEM-58							Ser	Ile					NA
TEM-73 (IRT-18)	Phe						Cys		Met				5.2
TEM-74 (IRT-19)	Phe						Ser		Met				5.2
TEM-76 (IRT-20)					Gly								NA
TEM-77 (IRT-21)			Leu					Ser					NA
TEM-78 (IRT-22)			Val			Arg					Asp		NA
TEM-80 (IRT-24)			Leu	Val							Asp		5.2
TEM-103 (IRT-28)										Leu			5.2
TEM-2		Lys											5.6
TEM-44 (IRT-13)		Lys						Ser					5.4
TEM-59 (IRT-17)		Lys		Gly									5.6
TEM-65 (IRT-16)		Lys						Cys					5.4

NA, not available.

Fuente: Canton, 2008¹²⁸.

1.6.2. Sensibilidad a piperacilina-tazobactam. Puntos de corte CLSI y EUCAST

PTZ es un antibiótico BL/IBL de amplio espectro con actividad frente a bacterias gram-negativas y grampositivas. En la actualidad CLSI y EUCAST difieren en el punto de corte de sensibilidad del mismo, de modo que CLSI recomienda considerar a los aislados con CMI $\leq 16/4$ mg/L como sensibles, $32-64/4$ mg/L como intermedios y $\geq 128/4$ mg/L como resistentes¹⁴¹, mientras que EUCAST considera los aislados con CMI $\leq 8/4$ mg/L sensibles, $16/4$ mg/L como intermedios y $\geq 32/4$ mg/L resistentes³⁹. Ambos comités utilizan una concentración fija de 4 mg/L de tazobactam para determinar la CMI de la

combinación. La diferencia en el punto de corte origina discrepancias en la interpretación del antibiograma y diferentes porcentajes de resistencia en función del comité usado en la interpretación. En Europa, en el control de calidad externo del *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* realizado en 2014, en el que participaron 837 centros de 30 países se determinó la sensibilidad a PTZ en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Un 20% de los centros usaron los criterios CLSI, mientras que un 72% usó EUCAST. En *E. coli*, los resultados del control de calidad mostraron grandes discrepancias en los informes de sensibilidad con una concordancia del 57,3%; los centros que usaron los puntos de corte CLSI informaron el aislado como sensible en un 59,5% de los casos frente a un 38,9% en los centros que seguían recomendaciones EUCAST, el aislado fue informado como intermedio en un 28% de los casos independientemente del punto de corte aplicado, y resistente en un 12,3% según CLSI frente a un 32,6% según EUCAST. Sin embargo, la concordancia en *K. pneumoniae* fue del 98,8%¹⁴². En general el número de aislados de enterobacterias resistentes a PTZ no es elevado, el porcentaje de resistencia descrito en diferentes publicaciones se encuentra en torno al 10%^{143, 144}.

1.6.3. Sensibilidad a amoxicilina-clavulánico. Puntos de corte CLSI y EUCAST. Controversia sobre el método

AMC es un antibiótico BL/IBL de amplio espectro con actividad frente a bacterias gramnegativas y grampositivas. CLSI y EUCAST difieren en el punto de corte y en la concentración de ácido clavulánico que se debe usar para determinar la CMI. CLSI recomienda usar un ratio de concentración 2:1 de AMC, y considera a los aislados con CMI $\leq 8/4$ mg/L sensibles, 16/8 mg/L intermedios y $\geq 32/16$ mg/L resistentes¹⁴¹. Por otro lado, EUCAST propone usar una concentración fija de 2 mg/L de clavulánico cuando se use su punto de corte, según el cual los aislados con CMI $\leq 8/2$ mg/L son sensibles y con CMI $> 8/2$ mg/L resistentes, la categoría intermedia no existe³⁹. Estas diferencias han originado una gran variabilidad en los niveles de resistencias en enterobacterias entre los centros que realizan el antibiograma de acuerdo a CLSI o EUCAST. La concordancia en los resultados de CMI entre los métodos ha demostrado ser muy baja. Díez-Aguilar *et al.* determinó una concordancia menor del 30% en la CMI de AMC por microdilución en caldo en aislados clínicos de *E. coli*, en este estudio un 79% de los aislados fueron resistentes de acuerdo a EUCAST, mientras que por CLSI lo fueron el 60%⁶⁹. En otro trabajo realizado en Holanda, los autores también informaron de una mayor tasa de resistencia en aislados de *E. coli* de pacientes con bacteriemia cuando se aplicaban las recomendaciones y los puntos de corte de EUCAST, en este caso las CMIs se determinaron mediante sistemas automatizados y E-Test. En este trabajo además se correlacionó la CMI de AMC con el pronóstico clínico de pacientes con bacteriemia, mostrando la metodología EUCAST una mejor correlación con la respuesta clínica de los pacientes⁷⁰. Sin embargo, este trabajo tiene importantes limitaciones para evaluar la respuesta clínica: además de ser retrospectivo, no incluyó un análisis del impacto de posibles factores de confusión (como el foco de infección o la gravedad de los pacientes) en la respuesta clínica; no se conoce si se cambió el antimicrobiano o cuanta fue la duración de la exposición al mismo; y finalmente usó un criterio de respuesta poco específica. En general, la CMI

determinada usando un ratio 2:1 origina mayores porcentajes sensibilidad que cuando se determina usando una concentración fija de ácido clavulánico y aunque se ha indicado que esta última parece predecir mejor la eficacia clínica del tratamiento con AMC, las evidencias al respecto son débiles^{145, 146}. Además, los datos de concordancia de los métodos de CLSI y EUCAST para especies de Enterobacteriaceae distintas de *E. coli* son escasos.

1.6.4. Efecto inóculo: controversias

El efecto inóculo se define como la influencia de la concentración bacteriana en la sensibilidad antibiótica, de modo que se considera que existe efecto inóculo cuando al aumentar la concentración de microorganismos se produce un aumento de la CMI. Diferentes trabajos han establecido considerar la presencia de este efecto cuando la CMI aumenta 8 veces o más^{147, 148}. El efecto inoculo en antibióticos BL ha sido ampliamente estudiado, la mayoría de estos experimentos se han realizado *in vitro*, sin embargo pocos trabajos han demostrado la existencia *in vivo* de este efecto, por lo tanto es difícil establecer la trascendencia que tiene en la terapéutica antimicrobiana. Parece haber consenso en cuanto a la existencia de este efecto en PTZ tanto en aislados no productores de betalactamasas como en aislados productores de las mismas. En los aislados productores de betalactamasas, parece que el efecto es más marcado cuando la betalactamasa pertenece a la familia SHV¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. López-Cerero *et al.* estudiaron el efecto inóculo de AMC y PTZ en aislados de *E. coli* en ensayos *in vitro*, los resultados mostraron que la actividad de PTZ, pero no la de AMC, se veía afectada por la concentración bacteriana inicial del ensayo. En este estudio se usaron cepas de *E. coli* productoras de distintas betalactamasas y dos cepas sin estos mecanismos de resistencia. En estos casos se observó que la existencia de un efecto inóculo era independiente de la producción de betalactamasas¹⁴⁸. Posteriormente, Docobo-Pérez *et al.* estudiaron la influencia del efecto inóculo en la eficacia del tratamiento con AMC y PTZ en un modelo de sepsis peritoneal murino. De nuevo, se puso de manifiesto el efecto inóculo en PTZ pero no en AMC en una cepa no productora de betalactamasa. Sin embargo, esto no ocurrió con una cepa productora de CTX-M-14. Esto pudo ser debido a la menor semivida de eliminación del ácido clavulánico respecto al tazobactam¹⁵⁰. Con los datos disponibles no se puede asegurar que el efecto inóculo tenga relevancia en el tratamiento de los pacientes, ya que se desconoce si su existencia es un artefacto de laboratorio o un efecto con implicaciones clínicas¹⁵¹.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 2.1.1. Los pacientes con bacteriemia por bacterias de la familia Enterobacteriaceae tratados con piperacilina-tazobactam no tienen peor pronóstico si la cepa tiene una CMI cercana al punto de corte de las cepas sensibles, usando los criterios EUCAST.
- 2.1.2. La metodología para el estudio de sensibilidad de EUCAST y CLSI para amoxicilina-clavulánico no proporcionan resultados concordantes para distintas bacterias de la familia Enterobacteriaceae.
- 2.1.3. Las metodologías de EUCAST y CLSI no tiene el mismo valor predictor del pronósticos de los pacientes con bacteriemia por Enterobacteriaceae tratados con amoxicilina-clavulánico.

2.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.2.1. Objetivos principales

- 2.2.1.1. Evaluar si los pacientes con bacteriemia por Enterobacteriaceae con CMI en el límite de sensibilidad (8-16 mg/L) de piperacilina-tazobactam y tratados con este antimicrobiano presentan peor pronóstico que aquellos con cepas que presentan CMI menores a 8 mg/L.
- 2.2.1.2. Evaluar la concordancia de valores de CMI de amoxicilina-clavulánico en Enterobacteriaceae aisladas de hemocultivos entre las metodologías de EUCAST y CLSI.
- 2.2.1.3. Estudiar el valor predictivo de las CMI de amoxicilina-clavulánico obtenidas mediante EUCAST y CLSI para el pronóstico de los pacientes con bacteriemia por Enterobacteriaceae, controlando el efecto de posibles variables confusoras.

2.2.2. Objetivo secundario

- 2.2.2.1. Conocer los factores predictores del pronóstico en pacientes con bacteriemia por Enterobacteriaceae tratados con piperacilina-tazobactam y amoxicilina-clavulánico.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. PUBLICACIONES

3.1.1. Artículo 1: Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae: the Bacteraemia-MIC project

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

J Antimicrob Chemother 2016; **71**: 521–530
doi:10.1093/jac/dkv362 Advance Access publication 3 November 2015

Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae: the Bacteraemia-MIC project

Mercedes Delgado-Valverde¹, Eva Torres¹, Adoración Valiente-Mendez¹, Benito Almirante²,
Silvia Gómez-Zorrilla³, Núria Borrell⁴, Juan E. Corzo⁵, Mercedes Gurgui^{6,7}, Manuel Almela⁸, Lara García-Álvarez⁹,
María Cruz Fontecoba-Sánchez¹⁰, Luis Martínez-Martínez^{11,12}, Rafael Cantón¹³, Julia Praena^{1,14},
Manuel Causse¹⁵, Belén Gutiérrez-Gutiérrez¹, Jason A. Roberts¹⁶, Andras Farkas^{17,18}, Álvaro Pascual^{1,19}†
and Jesús Rodríguez-Baño^{1,20*}† on behalf of the REIPI/GEIH-SEIMC BACTERAE-MIC group‡

¹Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Seville, Spain; ²Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ³Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Spain; ⁵Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain; ⁶Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁷Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁸Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ⁹Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital San Pedro – CIBIR, Logroño, Spain; ¹⁰Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; ¹¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla – IDIVAL, Santander, Spain; ¹²Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ¹³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ¹⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla, Spain; ¹⁵Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain; ¹⁶Burns Trauma and Critical Care Research Centre, University of Queensland, Brisbane, Australia; ¹⁷Department of Pharmacy, Vassar Brothers Medical Center, Poughkeepsie, NY, USA; ¹⁸Optimum Dosing Strategies, Bloomingdale, NJ, USA; ¹⁹Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ²⁰Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

*Corresponding author. Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda. Dr. Fedriani 3, 41009 Sevilla, Spain. Tel: +34677906512; E-mail: jesusrb@us.es

†These authors contributed equally.

‡Other investigators from the REIPI/GEIH-SEIMC BACTERAE-MIC group are listed in the Acknowledgements section.

Received 30 July 2015; returned 7 September 2015; revised 15 September 2015; accepted 4 October 2015

Objective: Our objective was to evaluate the impact of low versus borderline MIC of piperacillin/tazobactam on the clinical outcomes of patients with bacteraemia caused by Enterobacteriaceae who were treated with that antimicrobial.

Patients and methods: A prospective observational multicentre cohort study was conducted in 13 Spanish university hospitals. Patients >17 years old with bacteraemia due to Enterobacteriaceae who received empirical piperacillin/tazobactam treatment for at least 48 h were included. Outcome variables were clinical response at day 21, clinical response at end of treatment with piperacillin/tazobactam and all-cause 30 day mortality. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed.

Results: Overall, 275 patients were included in the analysis; 248 (90.2%) in the low MIC group (≤ 4 mg/L) and 27 (9.8%) in the borderline MIC group (8–16 mg/L). The biliary tract was the most common source of infection (48.4%) and *Escherichia coli* was the most frequent pathogen (63.3%). Crude 30 day mortality rates were 10.5% and 11.1% for the low MIC group and the borderline MIC group, respectively (relative risk = 1.06, 95% CI = 0.34–3.27, $P=1$). Multivariate analysis of failure at day 21 and at end of treatment with piperacillin/tazobactam and 30 day mortality showed no trend towards increased clinical failure or mortality with borderline MICs (OR = 0.96, 95% CI = 0.18–4.88, $P=0.96$; OR = 0.47, 95% CI = 0.10–2.26, $P=0.35$; OR = 1.48, 95% CI = 0.33–6.68, $P=0.6$).

Conclusions: We did not find that higher piperacillin/tazobactam MIC within the susceptible or intermediate susceptibility range had a significant influence on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae.

Delgado-Valverde *et al.*

Introduction

Clinical breakpoints for the interpretation of antimicrobial susceptibility testing of microorganisms in the laboratory are set up by international expert committees to help guide decisions for antimicrobial therapy.¹ The EUCAST² uses several criteria for establishing breakpoints, including MIC distributions for large collections of microorganisms, phenotypic and genotypic resistance markers, the pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) properties of the antimicrobials and, most importantly, if available, the observed clinical outcome of patients treated with licensed doses of those drugs relative to MIC.^{1,3} Unfortunately, clinical data supporting the establishment of clinical breakpoints are usually lacking, particularly for antimicrobials not recently approved and so *in vitro* data, animal experiments and PK-PD stochastic models are frequently the only data available for use.⁴

Piperacillin/tazobactam is a broad-spectrum β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. As a β -lactam, the best PK-PD predictor for efficacy is the length of time at which free drug concentrations remain above the MIC for the microorganism ($fT_{>MIC}$);⁵ the target is to obtain free drug concentrations above the MIC for at least 40%–50% of the dosing interval.^{6,7} EUCAST recommends considering Enterobacteriaceae with MICs of ≤ 8 mg/L as susceptible, MICs of 16 mg/L are intermediate and those with > 16 mg/L as resistant;² patients with isolates showing intermediate MIC can be treated with higher doses. A fixed concentration of 4 mg/L tazobactam is considered for susceptibility testing of the piperacillin/tazobactam combination.

The objective of this study was to evaluate the impact of piperacillin/tazobactam MIC on the clinical outcomes of patients with bacteraemia caused by Enterobacteriaceae treated with piperacillin/tazobactam when the isolate was fully or borderline susceptible.

Patients and methods

This study is part of the Bacteraemia-MIC project, aimed at investigating the impact of the MICs of different antimicrobials on the outcome of bacteraemia due to Enterobacteriaceae. A prospective observational multicentre cohort study was conducted between January 2011 and December 2013 at 13 Spanish university hospitals associated with the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (www.reipi.org). Patients aged > 17 years with monomicrobial bacteraemia due to Enterobacteriaceae and initially treated with β -lactam or a fluoroquinolone monotherapy were identified by daily communication with the microbiology laboratory, and were included in the Bacteraemia-MIC database if the first antibiotic dose was administered within the first 12 h after blood cultures were obtained and was administered for at least 48 h. Patients with any of the following criteria were excluded: transient bacteraemia (occurring after an invasive procedure such as a digestive tract endoscopy that cleared without treatment and had no complications); polymicrobial bacteraemia; combination antibiotic treatment with the drug of interest; non-hospitalized patients; patients with a do-not-resuscitate order; neutropenic patients (total neutrophil count $< 500/\text{mm}^3$); and survival less than 24 h after blood cultures were obtained. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario Virgen Macarena (reference number 1578), which waived the need to obtain consent because of the observational nature of study. In this analysis only patients initially treated with piperacillin/tazobactam in monotherapy were included.

Variables and definitions

Outcome variables were: clinical response at day 21, irrespective of whether piperacillin/tazobactam continued for the full course of treatment or was changed to another antibiotic; clinical response at the end of treatment with piperacillin/tazobactam; and all-cause mortality until day 30. Mortality at days 7 and 14 were also analysed. Clinical response at day 21 was classified as: 'clinical cure' if all symptoms and signs of infection had been completely resolved and all antibiotic therapy for the episode had ceased; 'improvement' if all symptoms and signs of infection had been completely resolved, but antibiotic therapy for the episode was still needed; and 'failure' if there were any persistent, recurrent or new symptoms or signs related to infection present, or death occurred. Clinical response at the end of therapy with piperacillin/tazobactam was classified as: 'clinical cure' if all symptoms and signs of infection had been completely resolved and no further antibiotics were needed; 'improvement' if all symptoms and signs of infection were completely or partially resolved, but antibiotic therapy for the episode continued with another drug because of de-escalation, switch to an oral drug or a more convenient parenteral drug for outpatient therapy; and 'failure' if a switch to or addition of another antibiotic was needed because infection-related symptoms or signs worsened or persisted, or death occurred. Clinical response was decided by a trained clinical investigator at each site; however, because of the subjectivity of this endpoint, an investigator (J. R.-B.) blinded with respect to exposure (piperacillin/tazobactam MIC) assessed the clinical response data of all cases according to vital signs, evolution of Pitt^{8,9} and SOFA¹⁰ scores, and laboratory data. When the assessment of the blind investigator for the clinical response was different from that indicated by the local investigator, a query with the indication to review the case was sent to the local team, and an agreement was reached according to the available data.

All data were collected by local trained clinical investigators. Training was provided by a teleconference-assisted presentation based on the study protocol procedures; one investigator (J. R.-B.) was accessible for solving doubts during the study. Queries for missing and inconsistent data were sent when appropriate. The data included: demographics; height; weight; site of acquisition, classified as community, healthcare-associated or nosocomial according to Friedman's criteria;¹¹ chronic underlying diseases; severity of underlying condition according to the Charlson index¹² and McCabe score;¹³ severity of acute condition according to Pitt and SOFA scores; invasive procedures; source of bacteraemia according to clinical and microbiological criteria;¹⁴ severity of the systemic inflammatory response syndrome at presentation; basal creatinine level; aetiology; treatment; and outcome. Additionally, vital signs were recorded daily, if available, until day 7, and thereafter weekly, Pitt and SOFA scores were recorded at end of therapy with piperacillin/tazobactam and at days 14 and 21, and all key laboratory data were also recorded as available. Patients were followed for 1 month after the onset of bacteraemia to assess clinical outcome, including mortality.

Estimating exposure to piperacillin/tazobactam

The software used to predict serum piperacillin concentrations in individual patients was ID-ODSTM (Individually Designed Optimum Dosing Strategies) (<http://www.optimum-dosing-strategies.org/>). ID-ODSTM is a dose optimization tool powered by R[®] software [version 2.15.3; Institute for Statistics and Mathematics (<http://www.r-project.org/>)] with an extensive model library built from population PK models published in peer-reviewed literature. ID-ODSTM is based on patient demographics and laboratory information that is readily available at the bedside, and incorporates Monte Carlo simulation and Bayesian feedback into the design of personalized dosing regimens via a graphical user interface. Piperacillin concentration-time profiles were computed, based on the first-order two-compartment intravenous infusion model of Felton *et al.*,¹⁵ written in R[®] language using published mean population PK parameter values for drug clearance, volume of

distribution and transfer rate constants. Individualized patient concentrations were predicted using actual body weight and calculated creatinine clearance, which were covariates in the original model. Change in calculated PK parameters was allowed to ensure that changing physiological variables were incorporated during the time course of therapy. Protein binding of 30% was assumed for calculating the free piperacillin concentrations¹⁶ since the model used described only total piperacillin concentrations. The model-based predictions of free piperacillin concentrations at 0.6 min time intervals were then used to calculate the %fT_{>MIC} in the last recorded dosing interval and the concentration/MIC ratios, estimated at half the dosing interval (MID concentration/MIC) or at the end of the dosing interval (END concentration/MIC).

Microbiological studies

The antibiotic susceptibility of the first blood culture isolate obtained from each patient was determined at each study hospital by disc diffusion or automated broth microdilution methods. All isolates included in the study were frozen at -80°C and sent to the reference laboratory (Hospital Universitario Virgen Macarena) where identification was confirmed and the piperacillin/tazobactam MIC was determined for each isolate by manual broth microdilution, following the EUCAST methodology.¹⁷ Briefly, piperacillin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) MICs in the presence of sodium salt tazobactam (Sigma-Aldrich) were determined by standard ISO broth microdilution (BBL-Mueller-Hinton-II cation-adjusted broth; Becton-Dickinson, Madrid, Spain). The panels were prepared freshly with concentrations of piperacillin from 0.06 to 128 mg/L, and a fixed concentration of 4 mg/L of tazobactam.

ESBL production was determined according to EUCAST recommendations by phenotypic method.¹⁸ PCR assays were used to characterize the β -lactamase produced. PCR conditions and previously described group-specific primers covering the most frequent ESBLs in our area (SHV,¹⁹ CTX-M-9,²⁰ CTX-M-21 and TEM¹⁹) were used to amplify the *bla* genes, and the amplicons were sequenced.

Statistical analysis

A classification and regression tree was created (CART software 6.0; Salford Systems) to identify a potential piperacillin/tazobactam breakpoint for the studied outcomes, both in crude analysis and including confounders. Because a breakpoint could not be found, the isolates were classified according to MIC as low MIC (≤ 4 mg/L), borderline MIC (8–16 mg/L) and high MIC (≥ 32 mg/L). Percentages were compared using the χ^2 or Fisher's exact test, as appropriate. For univariate analyses, quantitative variables were appropriately dichotomized. Contingency tables were used to calculate relative risk (RR) with 95% CI. Multivariate analysis was performed by logistic regression. Variables with univariate $P < 0.1$ were introduced into the models and selected using the backward stepwise approach. The MIC of piperacillin/tazobactam was forced into the final models. Interactions of interest were tested. The prediction ability of the models was studied by calculating the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve. All tests were performed using SPSS 18.0.

Results

During the study period, 1058 episodes of bacteraemia due to Enterobacteriaceae were included in the Bacteraemia-MIC cohort. Of these, 287 were initially treated with piperacillin/tazobactam. Demographic, epidemiological, clinical and microbiological data and the outcomes of the episodes are shown in Table 1. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were the most frequent pathogens. ESBL-producing Enterobacteriaceae were identified in 13 (4.7%) episodes: 10 were *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* and 1 *Enterobacter cloacae* (5.7%, 4.3% and 5.9% of the total specific

species, respectively). The ESBL genes were characterized in all of them: *bla*_{CTX-M-15} (six isolates); *bla*_{CTX-M-14} (three); *bla*_{CTX-M-1} (two); *bla*_{CTX-M-9} (one); *bla*_{CTX-M-27} (one); *bla*_{CTX-M-28} (one); and one isolate produced two ESBLs. The most common source of bacteraemia was the biliary tract.

Outcomes according to MIC are shown in Table 2. Since CART analysis could not find an MIC breakpoint that predicted outcome, either in crude analysis or when confounders were added (see below), we compared the outcomes of patients with isolates showing low MICs (≤ 4 mg/L; $n = 248$, 86.4%) and borderline MICs (8–16 mg/L; $n = 27$, 9.4%). In 12 patients (4.2%), the isolate was resistant (> 16 mg/L) and these were not included for further analysis. No significant differences between the low MIC group and the borderline MIC group were detected, except for type of acquisition. Nosocomial acquisition was more frequent among borderline MIC cases (Table 1). With respect to the piperacillin/tazobactam dose, there was no difference between the low MIC group and the borderline MIC group. Estimated exposures to piperacillin/tazobactam, measured as %fT_{>MIC}, were, as expected, higher among low MIC isolates (Tables 1 and 3).

The median duration of therapy with piperacillin/tazobactam was 3 days for patients in whom it was changed to another drug and 10 in those who were treated with this antibiotic for the whole course; 216 patients (78.5%) were changed from piperacillin/tazobactam to another antibiotic during the course of treatment (80.2% of patients with low MIC and 63.0% with borderline MIC, $P = 0.04$). The most common reasons for the switch were: de-escalation in 167 patients (64.1% of patients with low MIC and 29.6% with borderline MIC, $P < 0.0001$) or an unsatisfactory clinical evolution in 23 patients (8.9% of patients with low MIC and 3.7% with borderline MIC, $P = 0.71$). The most frequently used antibiotics after piperacillin/tazobactam were quinolones (29.2%), cephalosporins (26.9%), amoxicillin/clavulanic acid (23.6%) and carbapenems (17.1%), with no significant differences between the low MIC group and the borderline MIC group (data not shown).

A crude analysis of clinical outcome at day 21 that compares low MIC and borderline MIC cases according to patient characteristics and clinical and microbiological variables is shown in Table 4. Charlson index, Pitt score, severe sepsis or septic shock, need for mechanical ventilation and respiratory tract source were associated with an increased risk of failure at the end of antimicrobial treatment, while biliary tract source and change of treatment were protective.

A multivariate analysis was then performed (Table 5). The presence of a low or borderline MIC showed no influence on cure rates. Interactions between MIC and severe sepsis/shock, and between MIC and source of bacteraemia, were tested, but showed no significant modification effect. The area under the ROC curve for this model was 0.82. When multivariate analyses were performed, considering the MIC of piperacillin/tazobactam as a continuous variable, the model showed similar results; the OR (95% CI) for MIC was 0.97 (0.8–1.17), $P = 0.72$. Estimated exposure to piperacillin/tazobactam, calculated as %fT_{>MIC}, had no impact on the results, either when added to the model or used instead of MIC [OR (95% CI) was 1.008 (0.94–1.08), $P = 0.82$]. The inclusion of MID concentration/MIC and END concentration/MIC had no impact on the results (data not shown).

We also analysed the risk factors associated with failure at end of treatment with piperacillin/tazobactam (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). The following clinical variables

Delgado-Valverde et al.

Table 1. Characteristics, clinical features and outcomes of patients with bloodstream infections caused by Enterobacteriaceae treated with piperacillin/tazobactam; data are expressed as number of patients (%) except where specified

Variable	All patients, n=287	Low MIC (≤ 4 mg/L), n=248	Borderline MIC (8–16 mg/L), n=27	<i>P</i> ^a	High MIC (≥ 32 mg/L), n=12
Age (years), median (IQR)	73 (64–80)	73 (64–81)	69 (60–83)	0.53	68 (65–77)
Male	188 (65.5)	160 (64.5)	19 (70.4)	0.55	9 (75.0)
Hospital-acquired infection	178 (62.0)	146 (58.9)	21 (77.8)	0.05	11 (91.7)
Comorbidities					
diabetes mellitus	88 (30.7)	80 (32.3)	5 (18.5)	0.14	3 (25)
chronic pulmonary disease	36 (12.5)	32 (12.9)	3 (11.1)	1	1 (8.3)
congestive heart failure	17 (5.9)	14 (5.6)	2 (7.4)	0.66	1 (8.3)
malignancy	83 (28.9)	72 (29.0)	9 (33.3)	0.64	2 (16.7)
renal failure (end-stage renal disease)	24 (8.4)	22 (8.9)	2 (7.4)	1	0 (0)
liver cirrhosis	8 (2.8)	6 (2.4)	1 (3.7)	0.52	1 (8.3)
immunocompromised	22 (7.6)	22 (8.9)	0 (0)	0.14	0 (0)
ultimately or rapidly fatal disease (McCabe classification)	103 (35.9)	92 (37.1)	10 (37.0)	0.99	1 (8.3)
age-weighted Charlson comorbidity index, median (IQR)	2 (0–3)	2 (0–3)	2 (0–3)	0.8	1 (0–2)
Pitt score, median (IQR)	1 (0–2)	1 (0–2)	0 (0–2)	0.28	1.5 (0–2)
Invasive procedures					
mechanical ventilation	10 (3.5)	9 (3.6)	0 (0)	0.61	1 (8.3)
major surgery	41 (14.3)	36 (14.5)	3 (11.1)	0.78	2 (16.7)
severe sepsis or septic shock	95 (33.1)	84 (34.0)	8 (29.6)	0.65	3 (25.0)
Source of bacteraemia					
urinary tract	74 (25.8)	65 (26.2)	6 (22.2)	0.65	3 (25.0)
biliary tract	138 (48.1)	119 (48.0)	14 (51.9)	0.7	5 (41.7)
intra-abdominal	30 (10.5)	25 (10.1)	2 (7.4)	1	3 (25.0)
vascular catheter	12 (4.2)	9 (3.6)	3 (11.1)	0.1	0 (0)
respiratory tract	16 (5.6)	15 (6.0)	0 (0)	0.38	1 (8.3)
others	17 (5.8)	15 (6.0)	2 (7.4)	0.68	0 (0)
Aetiology					
<i>Escherichia coli</i>	183 (63.8)	160 (64.5)	14 (51.9)	0.19	9 (75.0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49 (17.1)	43 (17.3)	4 (14.8)	1	2 (16.7)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8 (2.8)	7 (2.8)	1 (3.7)	0.57	0 (0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	17 (5.9)	14 (5.6)	3 (11.1)	0.23	0 (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8 (2.8)	5 (2.0)	2 (7.4)	0.14	1 (8.3)
<i>Citrobacter freundii</i>	3 (1.0)	2 (0.8)	1 (3.7)	0.27	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	4 (1.4)	4 (1.6)	0 (0)	1	0 (0)
<i>Morganella morganii</i>	3 (1.0)	3 (1.2)	0 (0)	1	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	12 (4.2)	10 (4.0)	2 (7.4)	0.33	0 (0)
ESBL producer	14 (4.9)	11 (4.4)	2 (7.4)	0.37	1 (8.3)
Piperacillin/tazobactam dose					
4.5 g/8 h bolus	174 (60.6)	149 (60.1)	16 (59.3)	0.93	9 (75.0)
4.5 g/8 h extended infusion	51 (17.8)	42 (16.9)	6 (22.2)	0.59	3 (25.0)
others	62 (21.6)	57 (23.0)	5 (18.5)	0.59	0 (0)
<i>f</i> _{T>MIC}	(n=251)	(n=220)	(n=21)		(n=10)
50% <i>f</i> _{T>MIC}	242 (96.4)	219 (99.5)	18 (87.5)	0.002	5 (50.0)
100% <i>f</i> _{T>MIC}	196 (78.1)	189 (85.9)	7 (33.3)	<0.0001	0 (0)

Continued

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> at UNIVERSIDAD DE SEVILLA on January 15, 2016

Piperacillin/tazobactam MIC related to bacteraemic-patient outcome

Table 1. Continued

Variable	All patients, n=287	Low MIC (≤ 4 mg/L), n=248	Borderline MIC (8–16 mg/L), n=27	P^a	High MIC (≥ 32 mg/L), n=12
Outcome at day 21					
clinical cure	227 (79.1)	200 (80.6)	19 (70.4)	0.21	8 (66.7)
improvement	34 (11.8)	26 (10.5)	6 (22.2)	0.11	2 (16.7)
failure	26 (9.1)	22 (8.9)	2 (7.4)	1	2 (16.7)
Outcome at the end of treatment with piperacillin/tazobactam					
clinical cure	57 (19.9)	47 (19.0)	7 (25.9)	0.39	3 (25.0)
improvement	185 (64.5)	162 (65.3)	18 (66.7)	0.89	5 (41.7)
failure	45 (15.7)	39 (15.7)	2 (7.4)	0.39	4 (3.3)
Mortality at day 30	31 (10.8)	26 (10.5)	3 (11.1)	1	2 (16.7)

^aLow versus borderline MIC.

Table 2. Crude outcomes of patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae treated with piperacillin/tazobactam according to MIC

MIC (mg/L)	Failure at the end of therapy with piperacillin/tazobactam, n (%)	Failure at day 21, n (%)	Mortality, n (%)
<1 (n=27)	3 (11.1)	2 (7.4)	3 (11.1)
1 (n=73)	14 (19.2)	5 (6.8)	7 (9.5)
2 (n=100)	14 (14)	11 (11)	11 (11)
4 (n=47)	7 (14.5)	3 (6.3)	4 (8.5)
8 (n=20)	2 (10)	3 (15)	3 (15)
16 (n=8)	1 (12.5)	0	1 (12.5)
≥ 32 (n=12)	4 (33.3)	2 (16.6)	2 (16.6)

Table 3. Estimated $fT_{>MIC}$ reached by piperacillin/tazobactam among patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae; only patients for whom creatinine clearance could be calculated are included (n=251, 87.4% of the whole series)

MIC (mg/L)	$fT_{>MIC}$ (mean \pm SD)	40% $fT_{>MIC}$, n (%)	50% $fT_{>MIC}$, n (%)	100% $fT_{>MIC}$, n (%)
≤ 1 (n=86)	98.53 \pm 7.39	86 (100)	85 (98.8)	80 (93.0)
2 (n=87)	97.31 \pm 7.19	87 (100)	87 (100)	75 (86.2)
4 (n=47)	96.66 \pm 7.46	47 (100)	47 (100)	34 (72.3)
8 (n=13)	82.80 \pm 22.34	13 (100)	11 (84.6)	5 (38.5)
16 (n=8)	73.77 \pm 20.74	8 (100)	7 (87.5)	2 (25.0)
≥ 32 (n=10)	43.45 \pm 37.92	6 (60)	5 (50.0)	0 (0)

showed a significant association with failure under univariate analysis: mechanical ventilation; Charlson index; Pitt score; nosocomial acquisition; severe sepsis or septic shock; respiratory or vascular catheter source, whereas a biliary source was protective. The variables associated with increased risk of failure in the final multivariate model (Table 5) were Pitt score and biliary tract source (protective). Again, borderline MIC showed no association; severe sepsis/shock or source of bacteraemia did not show significant modification effects. The area under the ROC curve for the model was 0.79. When the MIC of piperacillin/tazobactam was used as a continuous variable, the model showed similar results;

the OR (95% CI) for MIC was 0.95 (0.81–1.11), $P=0.49$. Again, $\%fT_{>MIC}$ had no impact [OR (95% CI) was 0.99 (0.96–1.04), $P=0.85$]. MID concentration/MIC and END concentration/MIC had no impact (data not shown).

Finally, the univariate analyses of variables associated with 30 day mortality are shown in Table 6. The following variables were significantly associated with 30 day mortality, while treatment change and biliary tract source were shown to be protective factors ($P<0.01$): age >65 years; mechanical ventilation; Charlson index; Pitt score; present severe sepsis or septic shock; and abdominal or respiratory source of bacteraemia.

Delgado-Valverde et al.

Table 4. Univariate analysis of the association between different variables and clinical failure at day 21

Variable	Category	No. of patients who failed at day 21/no. of patients in category (%)	RR (95% CI)	P
Gender	male	15/179 (8.4)	Reference	0.78
	female	9/96 (9.4)	1.12 (0.51–2.46)	
Age	≤65	4/81 (4.9)	reference	0.147
	>65	20/193 (10.4)	2.09 (0.74–5.95)	
Mechanical ventilation	no	21/266 (7.9)	reference	0.035
	yes	3/9 (33.3)	4.22 (1.54–11.63)	
Charlson index	<2	5/132 (3.8)	reference	0.005
	≥2	19/143 (13.3)	3.51 (1.35–9.09)	
Pitt score	0–1	7/177 (4.0)	reference	0.0001
	≥2	17/97 (17.5)	4.42 (1.90–10.31)	
Onset	nosocomial	17/167 (10.2)	reference	0.289
	community	7/108 (6.5)	0.64 (0.27–1.48)	
Source	urinary tract	5/71 (7.0)	reference	0.559
	others	19/204 (9.3)	1.32 (0.51–3.41)	
	biliary tract	5/133 (3.8)	reference	0.005
	others	19/142 (13.4)	3.56 (1.37–9.26)	
	abdominal	5/27 (18.5)	reference	0.071
	others	19/248 (7.7)	0.414 (0.16–1.01)	
	vascular catheter	1/12 (8.3)	reference	1
	others	23/263 (8.7)	1.049 (0.15–7.14)	
Severe sepsis or septic shock	respiratory	6/15 (40.0)	reference	0.001
	others	18/260 (6.9)	0.173 (0.08–0.37)	
MIC of piperacillin/tazobactam	no	8/182 (4.4)	reference	0.0001
	yes	16/92 (17.4)	3.95 (1.76–8.93)	
Aetiology	low	22/248 (8.9)	reference	1
	borderline	2/27 (7.4)	0.83 (0.21–3.36)	
ESBL producer	<i>E. coli</i>	15/174 (8.6)	reference	0.934
	others	9/101 (8.9)	1.03 (0.47–2.28)	
Antibiotic changed	no	22/262 (8.4)	reference	0.316
	yes	2/13 (15.4)	1.831 (0.48–0.69)	
50% $fT_{>MIC}$	no	11/59 (18.6)	reference	0.002
	yes	13/216 (6.0)	0.322 (0.15–0.68)	
100% $fT_{>MIC}$	no	0/4 (0)	—	1
	yes	20/237 (8.4)	—	
	no	5/45 (11.1)	reference	0.547
	yes	15/196 (7.7)	0.689 (0.26–1.79)	

Downloaded from <http://jnc.oxfordjournals.org/> at UNIVERSIDAD DE SEVILLA on January 15, 2016

Table 5. Multivariate analysis of variables associated with clinical failure at day 21 and at end of treatment with piperacillin/tazobactam and mortality at day 30 among patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae

Variable	Failure at day 21		Failure at end of treatment with piperacillin/tazobactam		Mortality at day 30	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Charlson index	1.30 (1.09–1.55)	<0.01	1.14 (0.98–1.33)	0.09	1.36 (1.14–1.63)	<0.001
Pitt score	1.28 (1.00–1.63)	0.05	1.24 (0.99–1.54)	0.05	1.41 (1.09–1.82)	<0.01
Severe sepsis or septic shock	2.8 (0.95–8.30)	0.06	2.07 (0.88–4.88)	0.09	3.43 (1.16–10.2)	0.02
Source in biliary tract	0.37 (0.13–1.07)	0.06	0.22 (0.53–0.09)	0.001	4.52 (1.44–14.22)	0.01
Borderline MIC	0.96 (0.18–4.88)	0.96	0.47 (0.10–2.26)	0.35	1.48 (0.33–6.68)	0.6

Piperacillin/tazobactam MIC related to bacteraemic-patient outcome

Table 6. Univariate association between epidemiological, clinical and microbiological variables and mortality at day 30 among patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae

Variable	Category	No. of patients who died/no. of patients in category (%)	RR (95% CI)	P
Gender	male	19/179 (10.6)	reference	0.96
	female	10/96 (10.4)	0.981 (0.475–2.025)	
Age	≤65	4/81 (4.9)	reference	0.05
	>65	25/193 (13.0)	2.625 (0.94–7.299)	
Mechanical ventilation	no	24/266 (9.0)	reference	0.001
	yes	5/9 (55.6)	6.173 (3.06–12.356)	
Charlson index	<2	5/132 (3.8)	reference	0.0001
	≥2	24/143 (16.8)	4.425 (1.742–11.256)	
Pitt score	0–1	9/177 (5.1)	reference	0.0001
	≥2	19/97 (19.6)	3.846 (1.815–8.197)	
Onset	nosocomial	21/167 (12.6)	reference	0.17
	community	8/108 (7.4)	0.588 (0.27–1.282)	
Source	urinary tract	6/71 (8.5)	reference	0.51
	others	23/204 (11.3)	1.33 (0.566–3.144)	
	biliary tract	5/133 (3.8)	reference	
	others	24/142 (16.9)	4.504 (1.767–11.494)	
	abdominal	6/27 (22.2)	reference	
	others	23/248 (9.3)	0.417 (0.186–0.935)	
	vascular catheter	1/12 (8.3)	reference	
	others	28/263 (10.6)	1.277 (0.189–8.62)	
	respiratory	7/15 (46.7)	reference	
Severe sepsis or septic shock	no	8/182 (4.4)	reference	0.0001
	yes	20/92 (21.7)	4.95 (2.268–10.753)	
MIC of piperacillin/tazobactam	low	26/248 (10.5)	reference	1
	borderline	3/27 (11.1)	1.059 (0.343–3.268)	
Aetiology	<i>E. coli</i>	15/174 (8.6)	reference	0.17
	others	14/101 (13.9)	1.608 (0.809–3.195)	
ESBL producer	no	28/262 (10.7)	reference	1
	yes	1/13 (7.7)	0.719 (0.106–4.878)	
Antibiotic changed	no	12/59 (20.3)	reference	0.006
	yes	17/216 (7.9)	0.39 (0.196–0.765)	
50% $fT_{>MIC}$	no	0/4 (0)	—	1
	yes	22/237 (9.3)	—	
100% $fT_{>MIC}$	no	6/45 (13.3)	reference	0.263
	yes	16/196 (8.2)	0.612 (0.254–1.477)	

The final multivariate model is shown in Table 5. According to this model, a biliary tract source showed an independent protective effect against mortality, whereas severe sepsis or septic shock, Pitt score and Charlson index were associated with increased mortality. Borderline MIC of piperacillin/tazobactam showed no association. Again, severe sepsis/shock or source of bacteraemia did not show significant modification effects. In this model, the area under the ROC curve was 0.85. Again, the MIC of piperacillin/tazobactam as a continuous variable caused no change; the MIC showed an RR of 1.05 (95% CI=0.9–1.24), $P=0.5$. $\%fT_{>MIC}$ did not improve the model [OR (95% CI) was 0.99 (0.94–1.04), $P=0.59$] and MID concentration/MIC and END concentration/MIC showed no impact on this model (data not shown). We additionally performed analyses using 7 and 14 day mortality as outcomes; the adjusted OR (95% CI) for piperacillin/tazobactam

borderline MIC was 1.98 (0.15–25.31) and 1.93 (0.32–11.48), respectively.

The outcomes according to MIC were analysed in the subgroup of patients with a source of bacteraemia different from biliary or urinary tract (71 patients); only seven of them had isolates with a borderline MIC. No trends towards higher failure or mortality were shown; in fact, both failure and mortality were 14.3% (one patient) among those with borderline MIC and 35.9% and 26.6% among those with a low MIC, respectively.

The results of the multivariate analysis and CART classification tree (Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online) indicated that Charlson index, biliary source, age and severe sepsis or septic shock were the important prognostic factors for this kind of infection. The MIC had no influence. The sensitivity and specificity of the analysis were 69.9% and 89.7% respectively; the AUC

Delgado-Valverde et al.

(0.84) showed an excellent classification and diagnostic performance of the model.

Discussion

In this prospective cohort study and using carefully designed and executed assessments of outcome, we did not find that a borderline piperacillin/tazobactam MIC was associated with a worse outcome than a lower MIC among patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae treated with this antibiotic. The influence of other variables was as expected: severity of chronic underlying illness as measured by the Charlson index; severity of acute condition according to Pitt score; presentation with severe sepsis or septic shock were independent factors associated with a worse prognosis; while a biliary tract source had a protective effect. An overall interpretation of these results would be that the specific MIC of piperacillin/tazobactam, if susceptible, has no significant impact on outcome, which would therefore reinforce established breakpoints. Specifically, we think that our data are not enough to suggest that EUCAST susceptibility breakpoint should be changed to 16 mg/L. In fact, to interpret the data presented accurately, several important considerations should be mentioned.

Clinical studies are needed to help establish susceptibility breakpoints, but, because such studies are scarce,²²⁻²⁵ decisions about breakpoints are mainly based on *in vitro* and PK-PD studies. Designing and developing an observational study with this objective (finding an MIC cut-off to predict clinical outcomes) presents a challenge, since it requires a large number of patients infected with organisms with different MICs treated with a specific antibiotic, carefully chosen inclusion criteria that avoid exposure bias, accurate outcome definitions and assessment, and appropriate control for confounders. One systematic review of previous studies performed in Enterobacteriaceae that provided information on MIC-related outcomes disclosed that they were not designed for that purpose and so lacked essential data such as dosing, determination of MIC using reference methods or control for confounders, among other limitations.²⁵ Consequently, meta-analyses of data from those studies provided limited results. We tried to overcome these limitations in our study.

None the less, some limitations must be taken into account, including low statistical power to detect differences because of a smaller number of patients with a borderline MIC and the fact that we mainly evaluated the impact of empirical piperacillin/tazobactam, because the therapy was changed in a substantial proportion of patients; however, in bacteraemic patients, empirical therapy is an important determinant of outcome.²⁶

In this study, we compared the clinical outcomes of patients with low (≤ 4 mg/L) and borderline susceptible (8–16 mg/L) MICs; we included isolates with MIC=16 mg/L (considered intermediate according to EUCAST breakpoints) because some PK studies using Monte Carlo simulation suggested that satisfactory target attainment rates can be achieved for pathogens with MICs up to 16 mg/L when piperacillin/tazobactam is administered at 4.5 g every 6 or 8 h in continuous infusion (94% and 82%, respectively), but are much lower for higher MICs or other doses.¹⁵ In our study, most patients received 4.5 g every 8 h, using either a bolus or continuous infusion (infusion duration ≥ 3 h). Unfortunately, due to the low numbers, we could not make a comparison between these two methods of administering the drug. Whatever the infusion time, this dose seems to be appropriate according to our data,

and is the usual dose in most European countries.⁷ We cannot provide data for 3.375 g every 8 h, which is frequently used in the USA and other countries, but we would expect lower probability for target attainment.

Interestingly, even though we could not measure piperacillin/tazobactam levels due to funding limitations, our estimates of exposure suggested that most patients with susceptible isolates reached at least 50% of the time above the MIC for the isolate with the dose used. Piperacillin/tazobactam concentrations have been shown to vary widely in critically ill patients,²⁷⁻²⁹ although it should be noted that the majority of our patients were not critically ill (only 3.5% were under mechanical ventilation at the onset of bacteraemia), although a substantial proportion had severe sepsis or severe shock. Preliminary data of piperacillin/tazobactam concentrations measured in a very similar population also supported the notion that the PK-PD target was attained in a sample of similar patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae.³⁰ Our results would therefore mainly apply to patients who are not critically ill.

Another critical variable is the infection source. A previous small series of bacteraemic infections caused by ESBL-producing *E. coli* showed that the piperacillin/tazobactam MIC had no influence on urinary tract infections, but had a possible impact on other sources.³¹ The most common source in our cohort was the biliary tract, even more than the urinary tract, reflecting the fact that piperacillin/tazobactam is frequently used in empirical therapy for healthcare-associated biliary tract infections in Spain. This a relatively benign source when compared with nosocomial pneumonia or other complicated intra-abdominal infections;²⁶ in our analysis, it was a protective factor. Even though the source effect was controlled for in the multivariate analysis, we do think that more studies investigating the impact of piperacillin/tazobactam MIC within the susceptible range should be carried out for other types of infection.

One aspect of specific interest is the influence of piperacillin/tazobactam MICs in the treatment of patients with infection caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae. Previous data suggested that piperacillin/tazobactam at the doses used in this study would be efficacious for the treatment of bacteraemia due to susceptible ESBL-producing *E. coli*, particularly if the sources are the urinary or biliary tracts,^{31,32} but some doubts were raised for isolates with borderline MICs from other sources.³³ The ESBL producers with borderline MICs were not associated with worse outcomes in univariate or multivariate analyses in our study; however, only two of these cases had a source different than urinary or biliary tract, precluding any further analysis.

Other limitations of our study should also be considered when interpreting the results. First, the sample size was small, particularly in the borderline MIC group, which limited its power to detect the potential influence of MIC. None the less, this is, to the best of our knowledge, the largest study to date specifically to investigate this topic. Secondly, piperacillin/tazobactam was not always maintained throughout the full course of treatment of the patient. Since we had anticipated that this would be the case, we collected the reasons why therapy was changed, included clinical response at the end of piperacillin/tazobactam therapy as one of the outcome variables, and considered any change as failure, unless performed for de-escalation or dosage convenience. Finally, piperacillin/tazobactam exposure was estimated using a PK model because we could not measure plasma concentrations.

In conclusion, we did not find that higher piperacillin/tazobactam MIC within the susceptible or intermediate susceptibility range had a significant influence on the outcome of patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae. These results applied mainly to non-critically ill patients receiving 4.5 g every 8 h with biliary and urinary tract infections. More studies of other populations are needed.

Acknowledgements

Other investigators from the REIPI/GEIH-SEIMC BACTERAEMIA-MIC group

Marina de Cueto (Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Seville, Spain), Ana Maria Planes Reig (Departamento de Microbiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain), Fe Tubau Quintano (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain), Carmen Peña (Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain), M. Elvira Galán Otorola (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain), Carlos Ruiz de Alegría (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain), M. Isabel Morosini (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain), José Antonio Lepe (Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Seville, Spain), José Miguel Cisneros (Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Seville, Spain), Shawna Morey (Vassar Brothers Medical Center, Poughkeepsie, NY, USA, and Optimum Dosing Strategies, Bloomington, NJ, USA) and Mohd-Hafiz Abdul-Aziz (University of Queensland, Brisbane, Australia).

Funding

The study was funded by the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (FIS; PI10/02021) co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). J. A. R. is funded, in part, by an Australian National Health and Medical Research Council Research Fellowship (APP1048652).

Transparency declarations

B. A. has been a scientific advisor for AstraZeneca, Merck, Pfizer, Novartis, Astellas and Gilead, and has been a speaker for AstraZeneca, Merck, Pfizer, Astellas, Gilead and Novartis. R. C. is currently Chairman of EUCAST and has participated in educational programmes organized by AstraZeneca and MSD. J. A. R. has been a scientific advisor for InfectoPharm and Merck. J. R.-B. has been a scientific advisor for AstraZeneca, Merck, Roche, Achaogen, InfectoPharm and Basilea, and has been a speaker for Astellas, AstraZeneca, Merck, Pfizer and Novartis. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Table S1 and Figure S1 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- Mouton JW, Brown DF, Apfalter P *et al.* The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: E37–45.
- EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 5.0. 2015. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- Dudley MN, Ambrose PG. Pharmacodynamics in the study of drug resistance and establishing in vitro susceptibility breakpoints: ready for prime time. *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**: 515–21.
- Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 391–408, table of contents.
- Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1–10; quiz 11–2.
- Lodise TP, Lomaestro BM, Drusano GL. Application of antimicrobial pharmacodynamic concepts into clinical practice: focus on β -lactam antibiotics: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 2006; **26**: 1320–32.
- EUCAST. Piperacillin/tazobactam: Rationale for the EUCAST Clinical Breakpoints, version 1.0. 2010. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Piperacillin-tazobactam_rationale_Nov2010_v_1.0.pdf.
- Korvick JA, Bryan CS, Farber B *et al.* Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2639–44.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A *et al.* International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 2004; **140**: 26–32.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; **22**: 707–10.
- Friedman ND, Kaye KS, Stout JE *et al.* Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002; **137**: 791–7.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL *et al.* A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; **40**: 373–83.
- McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteremia. I. Etiology and ecology. *Arch Intern Med* 1962; **110**: 847–55.
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG *et al.* CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; **16**: 128–40.
- Felton TW, Hope WW, Lomaestro BM *et al.* Population pharmacokinetics of extended-infusion piperacillin-tazobactam in hospitalized patients with nosocomial infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4087–94.
- Wong G, Briscoe S, Adnan S *et al.* Protein binding of β -lactam antibiotics in critically ill patients: can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 6165–70.
- ISO. *Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Testing Device. Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases.* ISO 20776–1. Geneva, Switzerland: ISO, 2006.
- EUCAST. *EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance, Version*

Delgado-Valverde et al.

1.0. 2013: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.

- 19** Rasheed JK, Jay C, Metchock B et al. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 647–53.
- 20** Simarro E, Navarro F, Ruiz J et al. *Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M-like β -lactamase in Spain. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 4676–8.
- 21** Oteo J, Navarro C, Cercenado E et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2359–66.
- 22** Yamagishi Y, Terada M, Ohki E et al. Investigation of the clinical breakpoints of piperacillin-tazobactam against infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* 2012; **18**: 127–9.
- 23** Tamma PD, Turnbull AE, Milstone AM et al. Does the piperacillin minimum inhibitory concentration for *Pseudomonas aeruginosa* influence clinical outcomes of children with pseudomonal bacteremia? *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 799–806.
- 24** Tam VH, Gamez EA, Weston JS et al. Outcomes of bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to piperacillin-tazobactam: implications on the appropriateness of the resistance breakpoint. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 862–7.
- 25** Torres E, Delgado M, Valiente A et al. Impact of borderline minimum inhibitory concentration on the outcome of invasive infections caused by Enterobacteriaceae treated with β -lactams: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; **34**: 1751–8.
- 26** Retamar P, Portillo MM, Lopez-Prieto MD et al. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 472–8.
- 27** Roberts JA, Roberts MS, Robertson TA et al. Piperacillin penetration into tissue of critically ill patients with sepsis-bolus versus continuous administration? *Crit Care Med* 2009; **37**: 926–33.
- 28** Jamal JA, Roberts DM, Udy AA et al. Pharmacokinetics of piperacillin in critically ill patients receiving continuous venovenous haemofiltration: A randomised controlled trial of continuous infusion versus intermittent bolus administration. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 39–44.
- 29** Roberts JA, Kirkpatrick CM, Roberts MS et al. First-dose and steady-state population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin by continuous or intermittent dosing in critically ill patients with sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 156–63.
- 30** Valiente-Mendez A, Merino-Bohorquez V, Camean M et al. Variability in serum concentrations of piperacillin in non-critically ill patients with bloodstream infection due to Enterobacteriaceae. In: *Abstracts of the Twenty-fifth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Copenhagen, 2015*. Abstract 1129. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
- 31** Gavin PJ, Suseno MT, Thomson RB Jr et al. Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin-tazobactam against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2244–7.
- 32** Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Retamar P et al. β -lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 167–74.
- 33** Retamar P, Lopez-Cerero L, Muniain MA et al. Impact of the MIC of piperacillin-tazobactam on the outcome of patients with bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3402–4.

3.1.2. Artículo 2: MIC of amoxicillin/clavulanate according to CLSI and EUCAST: discrepancies and clinical impact in patients with bloodstream infections due to Enterobacteriaceae

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published January 15, 2017

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkw562

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

MIC of amoxicillin/clavulanate according to CLSI and EUCAST: discrepancies and clinical impact in patients with bloodstream infections due to Enterobacteriaceae

Mercedes Delgado-Valverde¹, Adoración Valiente-Mendez¹, Eva Torres¹, Benito Almirante², Silvia Gómez-Zorrilla³, Nuria Borrell⁴, Ana Isabel Aller-García⁵, Mercedes Gurgui^{6,7}, Manel Almela⁸, Mercedes Sanz⁹, Germán Bou¹⁰, Luis Martínez-Martínez^{11,12}, Rafael Cantón¹³, Jose Antonio Lepe¹, Manuel Causse¹⁴, Belén Gutiérrez-Gutiérrez¹, Álvaro Pascual^{1,15}† and Jesús Rodríguez-Baño^{1,16}*‡, on behalf of the REIPI/GEIH-SEIMC BACTERAEEMIA-MIC Group‡

¹Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío—IBiS, Seville, Spain; ²Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ³Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Spain; ⁵Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario de Valme, Seville, Spain; ⁶Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁷Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁸Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁹Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital San Pedro—CIBIR, Logroño, Spain; ¹⁰Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; ¹¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain; ¹²Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ¹³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ¹⁴Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario Reina Sofía-Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain; ¹⁵Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain; ¹⁶Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

*Corresponding author. Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda. Dr. Fedriani 3, 41009 Sevilla, Spain. Tel: +34 677906512; E-mail: jesusrb@us.es

†These authors contributed equally to authorship.

‡Other members are listed in the Acknowledgements section.

Received 17 August 2016; returned 25 November 2016; revised 1 December 2016; accepted 2 December 2016

Objectives: To compare results of amoxicillin/clavulanate susceptibility testing using CLSI and EUCAST methodologies and to evaluate their impact on outcome in patients with bacteraemia caused by Enterobacteriaceae.

Patients and methods: A prospective observational cohort study was conducted in 13 Spanish hospitals. Patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae who received empirical intravenous amoxicillin/clavulanate treatment for at least 48 h were included. MICs were determined following CLSI and EUCAST recommendations. Outcome variables were: failure at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate (FEAMC); failure at day 21; and 30 day mortality. Classification and regression tree (CART) analysis and logistic regression were performed.

Results: Overall, 264 episodes were included; the urinary tract was the most common source (64.7%) and *Escherichia coli* the most frequent pathogen (76.5%). Fifty-two isolates (19.7%) showed resistance according to CLSI and 141 (53.4%) according to EUCAST. The kappa index for the concordance between the results of both committees was only 0.24. EUCAST-derived, but not CLSI-derived, MICs were associated with failure when considered as continuous variables. CART analysis suggested a 'resistance' breakpoint of > 8/4 mg/L for CLSI-derived MICs; it predicted FEAMC in adjusted analysis (OR = 1.96; 95% CI: 0.98–3.90). Isolates with EUCAST-derived MICs >16/2 mg/L independently predicted FEAMC (OR = 2.10; 95% CI: 1.05–4.21) and failure at day 21 (OR = 3.01; 95% CI: 0.93–9.67). MICs >32/2 mg/L were only predictive of failure among patients with bacteraemia from urinary or biliary tract sources.

Conclusions: CLSI and EUCAST methodologies showed low agreement for determining the MIC of amoxicillin/clavulanate. EUCAST-derived MICs seemed more predictive of failure than CLSI-derived ones. EUCAST-derived MICs >16/2 mg/L were independently associated with therapeutic failure.

Delgado-Valverde *et al.*

Introduction

Clinical breakpoints for the interpretation of antimicrobial susceptibility testing of microorganisms in the laboratory are set by international expert committees to help guide clinical decisions in antimicrobial therapy.¹ EUCAST² and CLSI³ use a range of information to do this, including: MIC distributions for large collections of microorganisms; genotypic resistance markers; pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the antimicrobials; and clinical outcomes observed in patients relative to MIC values, when available.^{1,4} Unfortunately, clinical data supporting the establishment of clinical breakpoints are usually lacking particularly for older drugs, so that *in vitro* data, animal experiments and pharmacokinetic and pharmacodynamic stochastic models are frequently the only data available for these decisions.⁵

Amoxicillin/clavulanate is a broad-spectrum β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination with activity against Gram-negative and -positive bacteria. EUCAST recommends using a fixed concentration of 2 mg/L clavulanate for susceptibility testing of the amoxicillin/clavulanate combination; Enterobacteriaceae with MICs $\leq 8/2$ mg/L are considered as susceptible and those with MICs $> 8/2$ mg/L are considered as resistant for invasive infections.² CLSI recommends using a 2:1 ratio of amoxicillin/clavulanate, and considers Enterobacteriaceae with MICs $\leq 8/4$ mg/L as susceptible, but classifies those with MICs 16/8 mg/L as intermediate and those with MICs $\geq 32/16$ mg/L as resistant.³ The rationale for using a fixed concentration for clavulanate in EUCAST recommendations is based on the fact that a minimum concentration of the drug is needed to exert its inhibitory effect on β -lactamases; such concentrations would not be reached for low concentrations of amoxicillin if using a 2:1 ratio. Previous studies on *Escherichia coli* isolates have shown low agreement between the results obtained with the two methods, with EUCAST methodology providing higher rates of resistance;^{6,7} data on other Enterobacteriaceae and a more detailed analysis of the clinical implications of the results obtained using these two methods are needed.

The objective of this study was to evaluate the impact of amoxicillin/clavulanate MIC values on the clinical outcome of patients with bacteraemia caused by Enterobacteriaceae when treated following the recommendations of these two methodologies.

Patients and methods

This study forms part of the Bacteraemia-MIC project, aimed at investigating the impact of the MICs of different antimicrobials on the outcome of bacteraemia due to Enterobacteriaceae,⁸ and was designed as a prospective observational multicentre cohort study, conducted between January 2011 and December 2013 at 13 Spanish university hospitals belonging to the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (www.reipi.org). Patients aged > 17 years with monomicrobial bacteraemia due to Enterobacteriaceae, and monotherapy with a β -lactam or fluoroquinolone as initial treatment were identified by daily communication with the microbiology laboratory; patients were included in the Bacteraemia-MIC database if the first antibiotic dose was administered in the first 12 h after blood cultures were obtained and for at least 48 h. Patients with any of the following criteria were excluded: transient bacteraemia (occurring after an invasive procedure such as digestive tract endoscopy that cleared without treatment and had no complications); polymicrobial bacteraemia; non-hospitalized patients; patients with do-not-resuscitate orders; neutropenic patients (total neutrophil count $< 500/\text{mm}^3$); and survival < 24 h after blood

cultures were obtained. In this analysis, only patients initially treated with intravenous amoxicillin/clavulanate in monotherapy for at least 48 h were included; patients could be changed later to another antibiotic.

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario Virgen Macarena, which waived the need to obtain consent because of the observational nature of the study.

Variables and definitions

The outcome variables were: (i) clinical response at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate; (ii) clinical response at day 21, irrespective of whether amoxicillin/clavulanate continued for the full course of treatment or was changed to another antibiotic; and (iii) all-cause 30 day mortality.

Clinical response at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate was classified as: (i) 'clinical cure' if all symptoms and signs of infection were completely resolved and no further antibiotics were needed; (ii) 'improvement' if all symptoms and signs of infection were completely or partially resolved and antibiotic therapy for the episode was continued with another drug because of one of the following reasons: (a) de-escalation, (b) switch to an oral drug, (c) change to a more convenient parenteral drug for outpatient therapy, or (d) reported *in vitro* resistance to amoxicillin/clavulanate; and (iii) 'failure', if a switch to, or addition of, another antibiotic was needed because infection-related symptoms or signs worsened or persisted, or death from any cause occurred. Clinical response at day 21 was classified as: (i) 'clinical cure' if all symptoms and signs of infection were completely resolved and all antibiotics were stopped; (ii) 'improvement' if symptoms and signs of infection improved, but had not completely resolved; and (iii) 'failure' if there were persistent, recurrent or new symptoms or signs present related to the infection, or death occurred. Clinical response at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate and at day 21 was determined by a trained clinical investigator at each site; however, because of the subjectivity of this endpoint, one investigator (J. R. B.), blinded with respect to exposure (MIC of amoxicillin/clavulanate), assessed the clinical response data of all cases according to vital signs, evolution of Pitt^{9,10} and SOFA¹¹ scores, and laboratory data at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate and at day 21. When the assessment of clinical response made by the blind investigator differed from the one indicated by the local investigator, a query was sent to the local team with the indication to review the case, and agreement was reached based on available data.

Data collected included: patient demographics; height; weight; site of acquisition, classified as community, healthcare-associated or nosocomial according to Friedman's criteria;¹² chronic underlying diseases; severity of underlying condition according to the Charlson score¹³ and McCabe classification;¹⁴ severity of acute condition according to Pitt and SOFA scores; invasive procedures; source of bacteraemia according to standard clinical and microbiological criteria;¹⁵ severity of systemic inflammatory response syndrome at presentation, classified as sepsis, severe sepsis or shock; baseline creatinine level; aetiology; treatment; and outcome. Vital signs were recorded daily, if available, until day 7, and thereafter weekly; Pitt and SOFA scores were recorded at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate and at days 14 and 21, and all key laboratory data were recorded as available. Patients were followed for 1 month after the onset of bacteraemia to assess clinical outcome, including mortality.

Microbiological studies

The first blood isolate from each patient was frozen at -80°C and sent to the reference laboratory (Hospital Universitario Virgen Macarena), where identification was confirmed and the amoxicillin/clavulanate MIC for each isolate was determined by manual broth microdilution following EUCAST and CLSI methodologies.^{16,17} Briefly, amoxicillin (Sigma-Aldrich, Madrid,

Spain) MICs in the presence of potassium salt clavulanate (Sigma-Aldrich) were determined by standard broth microdilution (BBL–Mueller–Hinton II cation-adjusted broth; Becton-Dickinson, Madrid, Spain). For the EUCAST methodology, panels were freshly prepared with a range of concentrations of amoxicillin, from 0.03 to 64 mg/L, and a fixed 2 mg/L concentration of clavulanate, while for CLSI, the panels were freshly prepared using amoxicillin/clavulanate in a 2:1 ratio with the same range of concentrations. *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* ATCC 35218 were used as the control strain in microdilution. The reading of the results was performed fully manually by three independent researchers.

ESBL production was determined by standard phenotypic methods.^{18,19} PCR assays were used to characterize β -lactamase genes. PCR conditions and previously described group-specific primers covering the most frequent ESBLs in our area (SHV,²⁰ CTX-M-9,²¹ CTX-M-1²² and TEM²⁰) were used to amplify the *bla* genes, and the amplicons were sequenced. When OXA-1 production was suspected, the presence was determined by PCR with specific primers.²³

Statistical analysis

Discrepancies between susceptibility methods were analysed by means of essential and categorical agreement. Essential agreement referred to amoxicillin concentration and was considered when the same MIC values (± 1 dilution) were obtained for both microdilution methods, using EUCAST as the reference. The kappa index was used to evaluate concordance.²⁴ For categorical agreement, MICs were classified into clinical categories according to EUCAST and CLSI interpretive criteria:^{19,25} very major, major and minor errors were calculated according to established guidelines, with EUCAST considered as the reference method.²⁶

For analysis of the independent impact of MIC breakpoints on outcome, a univariate analysis of associated variables was first performed; proportions were compared using the χ^2 or Fisher's exact test as appropriate. MIC breakpoints potentially predictive of clinical outcomes were initially explored by classification and regression tree (CART) analysis (CART software 7.0, Salford Systems) for both CLSI- and EUCAST-derived MICs once converted into their base 2 logs; however, the different breakpoints recommended by CLSI and EUCAST, as well as others, were also tested. The independent association between MIC values (base 2 log) or specific breakpoints and the different outcomes were assessed by multivariate logistic regression. Potential confounders (age, Charlson index, Pitt score, presentation with severe sepsis or shock, source, Enterobacteriaceae and site) were included in the models if their univariate *P* value was <0.1 . To control for the site effect, participating centres were classified into those with lower and higher rates of the different outcomes after considering all other variables using TreeNet (Salford Systems). Interaction between MIC breakpoints and source was also investigated. The variables in the final model were selected by a stepwise backward procedure; variables with $P < 0.1$ were kept in the models. The MIC breakpoint was always kept. Subgroup analyses of patients with and without a urinary tract source, and with urinary or biliary tract sources were also performed. All analyses were performed using SPSS 18.0.

Results

Description of the cohort

During the study period, 1058 episodes of bacteraemia due to Enterobacteriaceae were included in the Bacteraemia-MIC cohort. Of these, 264 were initially treated with amoxicillin/clavulanate and included in this analysis. Demographic, epidemiological, clinical and microbiological data and the outcomes of episodes are shown in Table 1. The most common source of bacteraemia was the urinary tract. *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* were the most frequent pathogens. ESBL-producing Enterobacteriaceae were

identified in 15 (5.7%) episodes: nine were *E. coli*, five *K. pneumoniae* and one *Proteus mirabilis* (4.5%, 14.7% and 9.1% of total specific species, respectively). The ESBL genes were *bla*_{CTX-M-15} (seven isolates), *bla*_{CTX-M-14} (two), *bla*_{CTX-M-1} (one) and *bla*_{SHV-12} (five). The OXA-1 gene was detected in five (1.9%) isolates, all of which were also ESBL producers (four *E. coli* and one *K. pneumoniae*).

The median duration of therapy with amoxicillin/clavulanate was 4 days for 135 patients who were changed to another drug and 11 days for those treated with amoxicillin/clavulanate for the whole course of treatment. The most frequent dose was 1 g of amoxicillin plus 0.2 g of clavulanate (1.2 g) every 8 h intravenously; we have no information about the reasons why some patients were administered 2.2 g every 8 h; finally, some patients received other doses because of adjustments due to renal insufficiency. The most common reasons for switching from amoxicillin/clavulanate to another drug were: report of resistance, 41 patients (15.5%); de-escalation, 39 patients (14.8%); and unsatisfactory clinical evolution, 31 patients (11.7%). The most frequently used antibiotics after amoxicillin/clavulanate were cephalosporins (31.1%), fluoroquinolones (29.6%), carbapenems (20.7%) and piperacillin/tazobactam (13.3%).

MIC distributions and concordance between CLSI and EUCAST methodologies

Figure 1 shows the MIC distributions according to the CLSI and EUCAST methods. Overall, the essential agreement was 73.1% and categorical agreement was only 65.5%. The kappa index was 0.24, indicating weak concordance. Taking the EUCAST criteria as reference, there were 45 (17%) very major errors, 1 (0.4%) major error and 45 (17.0%) minor errors. For *E. coli*, essential agreement was 74.3% and categorical agreement was 58.9%; the kappa index was 0.19. For Enterobacteriaceae other than *E. coli*, the percentages for essential and categorical agreement were 69.4% and 87.1%, respectively, and the kappa index was 0.28.

The data for specific microorganisms are shown in Table 2. *E. coli* and *Klebsiella* spp. were more frequently considered resistant by EUCAST than by CLSI, although *Proteus* spp. was more frequently susceptible. All other Enterobacteriaceae were resistant by both methods.

We analysed the crude outcomes of patients with bacteraemia due to isolates with concordant and discrepant categories. The rate of failure at the end of amoxicillin/clavulanate treatment was 13.1% (16 of 122) for patients with isolates classified as susceptible and 23.5% (12 of 51) for those classified as resistant by both CLSI and EUCAST [relative risk (RR) = 1.76; 95% CI: 0.90–3.45; *P* = 0.09]. The failure rate for isolates classified as susceptible or intermediate by CLSI and resistant by EUCAST lay between the two [17.8% (16 of 90)]. All failures among discrepant isolates occurred in those with MICs of 8/4 or 16/8 mg/L by CLSI. The results were similar for failure at day 21 (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online).

Association of CLSI-derived MICs and outcomes

Associations between MICs and categories obtained with CLSI methodology and outcomes are shown in Table 3 and Figure 2. Crude comparisons of outcomes according to recommended breakpoints are also shown in Table 3; only failure at the end of

Delgado-Valverde et al.

Table 1. Characteristics, clinical features and outcomes of patients with bloodstream infections caused by Enterobacteriaceae treated with amoxicillin/clavulanate according to CART-derived breakpoints for both CLSI and EUCAST methods

Variable	All isolates (N = 264)	CLSI		EUCAST	
		MIC (mg/L)		MIC (mg/L)	
		≤8/4 (N = 167)	>8/4 (N = 97)	≤32/2 (N = 189)	>32/2 (N = 75)
Age (years), median (IQR)	75 (64–82)	75 (65–82)	76 (64–84)	76 (65–83)	75 (63–80)
Male	123 (46.6)	73 (43.7)	50 (51.5)	84 (44.4)	39 (52.0)
Hospital-acquired episode	109 (41.3)	60 (35.9)	49 (50.5) ^a	68 (36.0)	41 (54.7) ^a
Comorbidities					
diabetes mellitus	86 (32.6)	58 (34.7)	28 (28.9)	68 (36.0)	18 (24.0)
chronic pulmonary disease	42 (15.9)	26 (15.6)	16 (16.5)	29 (15.3)	13 (17.3)
congestive heart failure	27 (10.2)	17 (10.2)	10 (10.3)	20 (10.6)	7 (9.3)
malignancy	47 (17.8)	28 (16.8)	19 (19.6)	30 (15.9)	17 (22.7)
renal failure (end-stage renal disease)	35 (13.3)	18 (10.8)	17 (17.5)	21 (11.1)	14 (18.7)
liver cirrhosis	4 (1.5)	2 (1.2)	2 (2.1)	2 (1.1)	2 (2.7)
immunocompromised	22 (8.3)	13 (7.8)	9 (9.3)	13 (6.9)	9 (12.0)
Ultimately or rapidly fatal disease (according to McCabe classification)	62 (23.5)	36 (21.6)	26 (26.8)	152 (80.4)	50 (66.7) ^a
Age-weighted Charlson comorbidity index, median (IQR)	2 (0–3)	2 (0–3)	2 (0.5–3.5)	2 (0.5–3)	2 (0–4)
Pitt score, median (IQR)	1 (0–2)	1 (0–2)	1 (0–2)	1 (0–2)	1 (0–2)
Previous invasive procedures					
mechanical ventilation	1 (0.4)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)
major surgery	21 (8.0)	9 (5.4)	12 (12.4) ^a	10 (5.3)	11 (14.7) ^a
urinary catheter	34 (12.9)	17 (10.2)	17 (17.5)	16 (8.5)	18 (24.0) ^a
Severe sepsis or septic shock	49 (18.6)	28 (16.8)	21 (21.6)	30 (15.9)	19 (25.3)
Source of bloodstream infections					
urinary tract	171 (64.7)	105 (62.9)	67 (69.1)	125 (66.1)	47 (62.7)
biliary tract	44 (16.7)	33 (19.8)	11 (11.3)	34 (18.0)	10 (13.3)
abdominal	14 (5.3)	9 (5.4)	5 (5.2)	8 (4.2)	6 (8.0)
vascular catheter	5 (1.9)	1 (0.6)	4 (4.1)	2 (1.1)	3 (4.0)
respiratory	7 (2.7)	4 (2.4)	3 (3.1)	5 (2.6)	2 (2.7)
others	22 (8.3)	15 (9.0)	7 (7.2)	15 (7.9)	7 (9.3)
Aetiology					
<i>E. coli</i>	202 (76.5)	130 (77.8)	72 (74.2)	152 (80.4)	50 (66.7) ^a
<i>K. pneumoniae</i>	34 (12.9)	25 (15.0)	9 (9.3)	26 (13.8)	8 (10.7)
<i>K. oxytoca</i>	2 (0.8)	1 (0.6)	1 (1.0)	1 (0.5)	1 (1.3)
<i>E. cloacae</i>	7 (2.6)	0 (0)	7 (7.2) ^a	0 (0)	7 (9.3) ^a
<i>P. mirabilis</i>	11 (4.2)	10 (6.0)	1 (1.0)	10 (5.3)	1 (1.3)
<i>S. marcescens</i>	3 (1.1)	0 (0)	3 (3.1) ^a	0 (0)	3 (4.0) ^a
others	5 (1.9)	1 (0.6)	4 (4.1) ^a	0 (0)	5 (6.7) ^a
ESBL producer	15 (5.7)	7 (4.2)	8 (8.2)	0 (0)	5 (6.7) ^a
OXA-1 producer	5 (1.9)	0 (0)	5 (5.2) ^a	6 (3.2)	6 (12.0) ^a
Reason for changing amoxicillin/clavulanate to another antibiotic					
resistance	41 (15.5)	0 (0)	41 (42.3) ^a	3 (1.6)	38 (50.7) ^a
de-escalation	39 (14.8)	29 (17.4)	10 (10.3)	30 (15.9)	9 (12.0)
unsatisfactory evolution	31 (11.7)	19 (11.4)	12 (12.4)	20 (10.6)	11 (14.7)
Dose					
1.2 g/8 h	210 (79.5)	135 (80.8)	75 (77.3)	154 (81.5)	56 (74.7)
2.2 g/8 h	23 (8.7)	17 (10.2)	6 (6.2)	18 (9.5)	5 (6.7)
others	31 (11.7)	15 (9.0)	16 (16.5)	15 (8.0)	14 (18.7) ^a
Outcome at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate					
clinical cure	115 (43.6)	82 (49.1)	33 (34.0) ^a	91 (48.1)	24 (32.0) ^a

continued

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> at UNIVERSIDAD DE SEVILLA on January 17, 2017

Amoxicillin/clavulanate MIC related to bacteraemic outcome

Table 1. continued

Variable	All isolates (N = 264)	CLSI		EUCAST	
		MIC (mg/L)		MIC (mg/L)	
		≤8/4 (N = 167)	>8/4 (N = 97)	≤32/2 (N = 189)	>32/2 (N = 75)
improvement	105 (39.8)	63 (37.7)	42 (43.3)	74 (39.2)	31 (41.3)
failure	44 (16.7)	22 (13.2)	22 (22.7) ^a	24 (12.7)	20 (26.7) ^a
Outcome at day 21					
clinical cure	208 (78.8)	135 (80.8)	73 (75.3)	154 (81.5)	54 (72.0)
improvement	41 (15.5)	25 (15.0)	16 (16.5)	29 (15.3)	12 (16.0)
failure	15 (5.7)	7 (4.2)	8 (8.2)	6 (3.2)	9 (12.0) ^a
Mortality at day 30	19 (7.2)	12 (7.2)	7 (7.2)	11 (5.8)	8 (10.7)

Data are expressed as number of patients (%) except where specified.
^aP < 0.05.

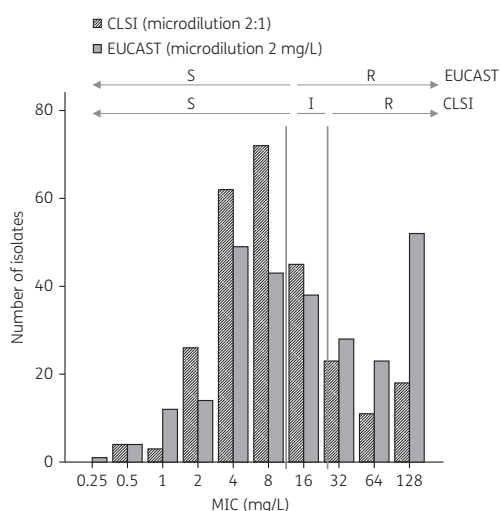


Figure 1. MIC distribution of amoxicillin/clavulanate for all isolates according to the method used: microdilution with a 2:1 amoxicillin/clavulanate ratio (CLSI) and microdilution with fixed 2 mg/L clavulanate (EUCAST). I, intermediate; R, resistant; S, susceptible.

therapy with amoxicillin/clavulanate was near statistical significance when susceptible and non-susceptible isolates were compared. Considered as a continuous variable, base 2 log-converted MIC obtained with CLSI methodology was not significantly associated with failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate in adjusted analysis (OR per increase in MIC value = 1.13; 95% CI: 0.92–1.39; P = 0.20), failure at day 21 (OR = 1.22; 95% CI: 0.85–1.75; P = 0.27) or mortality (OR = 0.91; 95% CI: 0.66–1.25; P = 0.58).

We first analysed MIC >8/4 mg/L, which is the present CLSI breakpoint for non-susceptibility, which was also selected by exploratory CART analysis as predictive of failure at the end of

Table 2. Distribution of Enterobacteriaceae causing bacteraemia, according to EUCAST and CLSI criteria for susceptibility to amoxicillin/clavulanate

		Susceptible	Intermediate	Resistant
All isolates (n = 264)	EUCAST	123 (46.6)	–	141 (53.4)
	CLSI	167 (63.3)	45 (17.0)	52 (19.7)
<i>E. coli</i> (n = 202)	EUCAST	91 (45.0)	–	111 (55.0)
	CLSI	130 (64.4)	42 (20.8)	30 (14.8)
<i>Klebsiella</i> spp. (n = 36)	EUCAST	24 (66.7)	–	12 (33.3)
	CLSI	26 (72.3)	3 (8.3)	7 (19.4)
<i>Proteus</i> spp. (n = 12)	EUCAST	8 (66.7)	–	4 (33.3)
	CLSI	11 (91.7)	0	1 (8.3)
Other (n = 14) ^a	EUCAST	0	–	14 (100)
	CLSI	0	0	14 (100)

Data are presented as number of isolates (%).
^a*Enterobacter* spp. (8), *Serratia* spp. (4) and *Morganella morganii* (2).

therapy with amoxicillin/clavulanate. The characteristics of patients with isolates showing MICs ≤8/4 mg/L (n = 167) or >8/4 mg/L (n = 97) are compared in Table 1. Several differences were found: nosocomial infection, major surgery and specific aetiologies (*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) were more frequent in the MIC >8/4 mg/L group. The failure rate at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate was significantly higher in the MIC >8/4 mg/L group in crude analysis (22.7% versus 13.2%, RR = 1.72; 95% CI: 1.00–2.94; P = 0.04) and in adjusted analysis (Table 4). An MIC >8/4 mg/L was not predictive of failure at day 21 or mortality in multivariate analyses (Table 4). Subgroup analyses of patients according to the source of bacteraemia showed similar results (data not shown).

Multivariate analysis was also performed using MIC >16/8 mg/L as the breakpoint, which is the CLSI breakpoint for resistance; no association with any studied outcome could be identified (Table 4).

Exploratory CART analysis selected >4/2 mg/L as a predictor of failure at day 21; the rates of failure were 2.1% (2 of 95) for MIC

Delgado-Valverde et al.

Table 3. Crude outcomes of patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae treated with amoxicillin/clavulanate, by MIC and category, according to CLSI and EUCAST methods

MIC (mg/L)	CLSI			EUCAST		
	failure at end of therapy with amoxicillin/clavulanate	failure at day 21	mortality	failure at end of therapy with amoxicillin/clavulanate	failure at day 21	mortality
≤1	0 (0)	0 (0)	1 (14.3)	1 (5.9)	0 (0)	2 (11.8)
2	3 (11.5)	0 (0)	1 (3.8)	3 (21.4)	0 (0)	0 (0)
4	9 (14.5)	2 (3.2)	5 (8.1)	5 (10.2)	1 (2.0)	1 (2.0)
8	10 (13.9)	5 (6.9)	5 (6.9)	8 (18.6)	3 (7.0)	5 (11.6)
16	10 (22.2)	3 (6.7)	3 (6.7)	4 (10.5)	1 (2.6)	2 (5.3)
32	6 (26.1)	2 (8.7)	2 (8.7)	4 (14.3)	1 (3.6)	1 (3.6)
>32	6 (20.7)	3 (10.3)	2 (6.9)	20 (26.7)	9 (12.0)	8 (10.7)
Category						
susceptible	22 (13.2) ^a	7 (4.2) ^c	12 (7.2) ^e	16 (13.0) ^g	4 (3.3) ^h	8 (6.5) ⁱ
intermediate	10 (22.2)	3 (6.7)	3 (6.7)	–	–	–
resistant	12 (23.2) ^b	5 (9.6) ^d	4 (7.7) ^f	28 (19.9)	11 (7.8)	11 (7.8)

Data are presented as number of patients (%).

Comparisons of outcomes (Fisher test):

^asusceptible versus intermediate and resistant, *P* = 0.06;

^bresistant versus susceptible and intermediate, *P* = 0.21;

^csusceptible versus intermediate and resistant, *P* = 0.17;

^dresistant versus susceptible and intermediate, *P* = 0.18;

^esusceptible versus intermediate and resistant, *P* = 1.0;

^fresistant versus susceptible and intermediate, *P* = 0.77;

^gsusceptible versus resistant, *P* = 0.18;

^hsusceptible versus resistant, *P* = 0.18; and

ⁱsusceptible versus resistant, *P* = 0.81.

Table 4. Adjusted association of different breakpoints using CLSI or EUCAST methodology with clinical outcomes in patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae treated with amoxicillin/clavulanate

Outcome	Adjusted OR (95% CI)	<i>P</i>	Adjusted OR (95% CI)	<i>P</i>	Adjusted OR (95% CI)	<i>P</i>
	CLSI >4/2 mg/L		CLSI >8/4 mg/L		CLSI >16/8 mg/L	
Failure at the end of amoxicillin/clavulanate	1.47 (0.69–3.12)	0.31	1.96 (0.98–3.90)	0.05	1.81 (0.81–4.03)	0.14
Failure at day 21	2.92 (0.62–14.31)	0.17	1.97 (0.65–5.98)	0.22	2.20 (0.64–7.52)	0.20
Mortality at day 30	0.70 (0.25–1.99)	0.51	0.91 (0.33–2.50)	0.86	0.98 (0.29–3.31)	0.98
	EUCAST >8/2 mg/L		EUCAST >16/2 mg/L		EUCAST >32/2 mg/L	
Failure at the end of amoxicillin/clavulanate	1.68 (0.82–3.41)	0.14	2.10 (1.05–4.21)	0.03	2.32 (1.13–4.77)	0.02
Failure at day 21	2.36 (0.69–8.08)	0.17	3.01 (0.93–9.67)	0.06	3.44 (1.08–10.88)	0.03
Mortality at day 30	1.05 (0.38–2.85)	0.91	1.17 (0.43–3.18)	0.74	1.43 (0.50–4.02)	0.49

≤4/2 mg/L and 7.7% (13 of 169) for >4/2 mg/L (unadjusted RR = 3.64; 95% CI: 0.84–15.78; *P* = 0.06). No significant association could be demonstrated by multivariate analysis (Table 4). In subgroup analyses, there was a trend towards increased risk of failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate in patients whose source was different from the urinary or biliary tract (adjusted OR = 2.28; 95% CI: 0.92–5.68; *P* = 0.07). No other subgroup analyses provided significant results. CART analysis could not find any MIC value that predicted mortality.

Association of EUCAST-derived MICs and outcomes

The associations between MICs obtained with EUCAST methodology and outcomes are shown in Table 3 and Figure 2. Crude comparisons of outcomes according to recommended breakpoints are also shown in Table 3; no statistically significant differences between susceptible and non-susceptible isolates were found. Considered as a continuous variable, base 2 log-converted MIC obtained with EUCAST methodology was associated with failure at

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> at UNIVERSIDAD DE SEVILLA on January 17, 2017

Amoxicillin/clavulanate MIC related to bacteraemic outcome

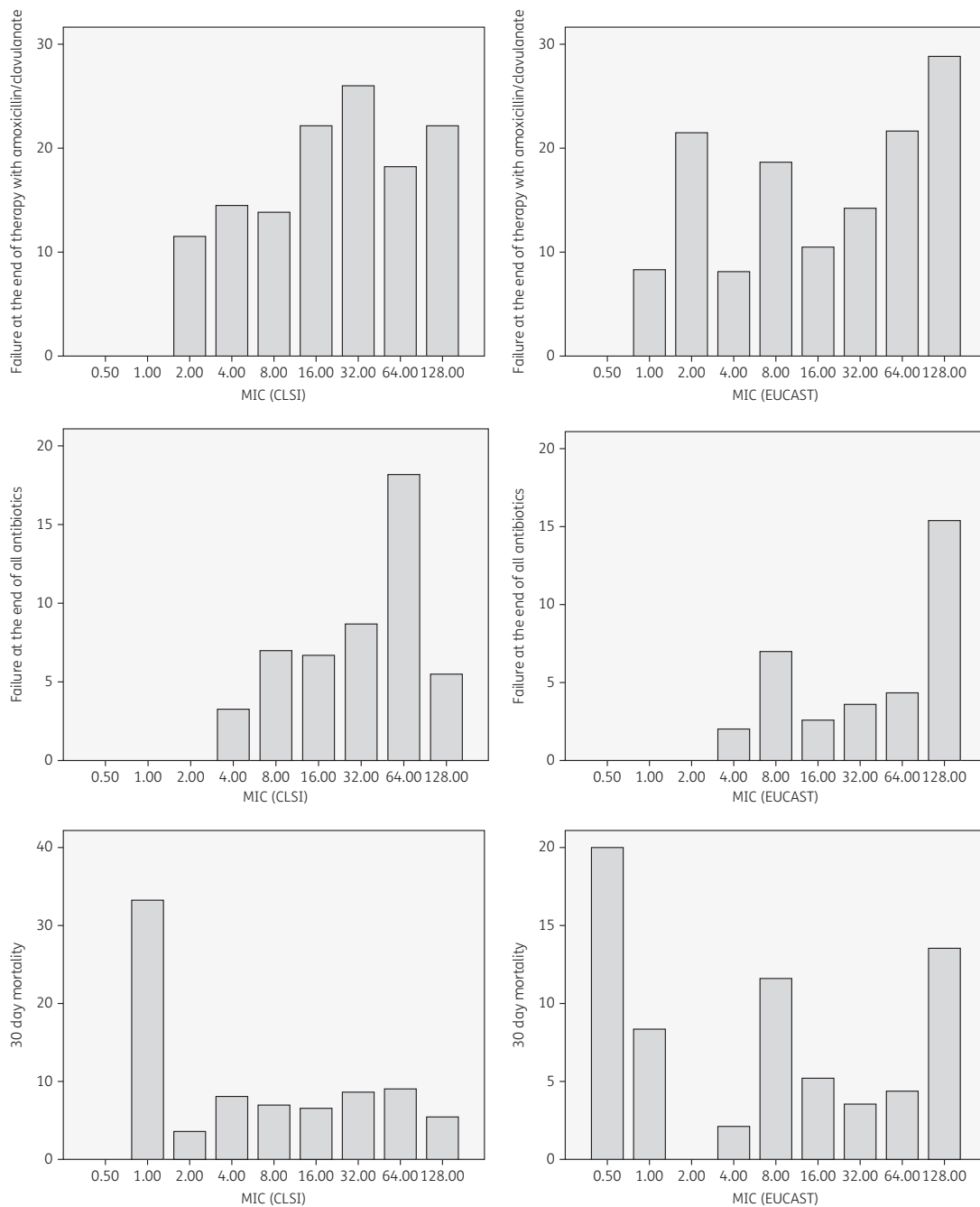


Figure 2. Outcome of patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae treated with amoxicillin/clavulanate according to MIC, as determined by CLSI or EUCAST. Data are presented as percentage of patients with the specified outcome. Numbers of patients at each MIC value are specified in Table 3.

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> at UNIVERSIDAD DE SEVILLA on January 17, 2017

Delgado-Valverde et al.

the end of therapy with amoxicillin/clavulanate (OR per increase in MIC value = 1.22; 95% CI: 1.03–1.43; $P = 0.01$) and at day 21 (OR = 1.42; 95% CI: 1.06–1.92; $P = 0.01$), but not with mortality (OR = 1.06; 95% CI: 0.85–1.33; $P = 0.57$).

No significant association could be found with MIC $>8/2$ mg/L (present breakpoint recommended by EUCAST for resistance) and any of the outcomes investigated (Table 4).

Exploratory CART analysis selected $>32/2$ mg/L as predicting failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate. The features of patients with isolates showing MIC $\leq 32/2$ mg/L and $>32/2$ mg/L are shown in Table 1. Higher rates of failure were observed in the high MIC group in crude analysis at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate (12.7% versus 26.7%; RR = 2.10; 95% CI: 1.23–3.56; $P = 0.006$) and at day 21 (3.2% versus 12.0%, RR = 3.78; 95% CI: 1.39–10.25; $P = 0.01$). The differences were not significant for mortality (5.8% versus 10.7%, RR = 1.83; 95% CI: 0.76–4.37; $P = 0.17$). By multivariate analysis (Table 4), isolates with MICs $>32/2$ mg/L remained independently associated with a higher risk of failure at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate and at day 21 (Table 4). However, subgroup analysis showed that isolates with MICs $>32/2$ mg/L were associated with failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate in patients with a urinary or biliary tract source (adjusted OR = 2.34; 95% CI: 1.00–5.44; $P = 0.04$), but the association was not significant for other sources (adjusted OR = 1.83; 95% CI: 0.44–7.61; $P = 0.4$). MIC $>32/2$ mg/L also showed independent association with failure at day 21, but not with mortality (Table 4).

We also investigated lower breakpoints. Importantly, MIC $>16/2$ mg/L was also associated with crude higher risk of failure at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate (12.4% versus 23.3%; RR = 1.88; 95% CI: 1.09–3.21; $P = 0.02$) and at day 21 (3.1% versus 9.7%; RR = 3.12; 95% CI: 1.10–8.84; $P = 0.02$), but not with mortality (6.2% versus 8.7%; RR = 1.40; 95% CI: 0.59–3.34; $P = 0.4$). The associations with failure at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate and at day 21 were also significant in multivariate analysis (Table 4). Stratified analysis according to source (urinary tract or others) did not change the results.

Discussion

There are few clinical data available to support the establishment of susceptibility breakpoints for most antimicrobial agents due to the difficulties of performing studies that address this issue. It would be impossible, as well as unethical, to randomize patients for empirical therapy by MIC, and *post-hoc* analyses of patients included in randomized trials are usually limited by the fact that the most severely affected patients or those with resistant isolates are typically underrepresented. Well-designed observational studies could be useful for this purpose, although designing such studies also presents challenges. Several aspects must be taken into account. First, only patients treated in monotherapy with the antibiotic of interest should be included; second, all patients should receive the antibiotic early enough and for a minimum period to allow the activity to be measured; third, the reasons for changing to another antibiotic should be assessed; fourth, the outcomes should be appropriately chosen to measure the effect; and fifth, the effect of confounders should be controlled for.

The Bacteraemia-MIC project was specifically designed to investigate the impact of MICs of β -lactams and fluoroquinolones

on the outcome of patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae. We focused, in this analysis, on amoxicillin/clavulanate because it is commonly used in many countries, and because the methods recommended by CLSI and EUCAST for susceptibility assays and clinical breakpoint values differ.

The results obtained from this study showed significant discrepancies and there was low overall agreement for susceptibility data obtained using CLSI and EUCAST methodologies; this resulted in a higher percentage of resistant isolates for *E. coli* and *Klebsiella* spp. and a lower one for *Proteus* spp. when EUCAST methodology was used. Two previous studies including only *E. coli* isolates showed higher resistance rates with EUCAST.^{6,7} These data have very important implications for surveillance of resistance and antibiotic use; surveillance systems should specify the methodology used and take into account that whenever EUCAST criteria are applied, higher rates of resistance to amoxicillin/clavulanate should be expected for *E. coli* and *Klebsiella* spp. In addition, empirical and targeted therapy with amoxicillin/clavulanate would be less frequently recommended if EUCAST is used.

To the best of our knowledge, this is the first study to include a detailed prospective clinical evaluation of patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae and treated with amoxicillin/clavulanate with the specific objective of investigating the impact of MIC on outcome. Several features of the cohort, even though it was typical of infection studies, should be taken into account when interpreting the data: first, a high proportion of the cases were due to *E. coli* and representation of other Enterobacteriaceae was therefore limited; second, the most frequent source of bacteraemia was the urinary tract, which has better expected outcomes than other sources; and third, severe sepsis or septic shock were not frequent. This probably explains the low rate of clinical failures and mortality found even in the resistant subgroups. MIC was not therefore expected to have a clear impact on mortality, and clinical failure was also assessed as an outcome. Because clinical failure is prone to subjective interpretations, to try and limit investigator-derived information bias, objective data were collected for use by a blind investigator to check the outcomes determined by the local investigators. In addition, because antibiotic therapy is frequently changed during the course of infection, we assessed clinical failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate and at day 21. We expected failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate to be most directly associated with amoxicillin/clavulanate activity, because a change to another drug is expected to cure eventually the patients who survive. The definition for this outcome considered any change of antibiotic where the patient was not clearly improving as a failure, to be as sensitive as possible in detecting what was considered as failure in clinical practice.

Overall, our results suggest that EUCAST-derived MICs were more predictive of outcomes. Interestingly, EUCAST-derived MIC values were predictive of outcome when considered as a continuous variable, while CLSI-derived MIC values were not. The failure rates for patients with isolates with discrepant CLSI and EUCAST susceptibility results lay between those that were susceptible and resistant according to the two methodologies, although the differences were not statistically significant, which may be due to the lack of statistical power. Because all failures among discrepant isolates occurred with borderline MICs (8/4–16/8 mg/L) using CLSI criteria, this would suggest using caution when interpreting CLSI results with borderline MICs until more data become available.

The CART analysis for CLSI-derived MICs suggested the currently recommended breakpoint (non-susceptible, $>8/4$ mg/L) as predictive of failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate. When confounders were taken into account, however, the estimate was less precise as the 95% CI was wider and the association was borderline significant. In any case, we think that these results tend to reinforce the fact that isolates with MICs $>8/4$ mg/L should not be considered as susceptible when using CLSI methods. We were unable to find any crude or adjusted association between this breakpoint and failure at day 21 or mortality. Interestingly, isolates from patients with sources other than the urinary or biliary tract and with MICs $>4/2$ mg/L showed an independent trend towards higher risk of failure at day 21. Despite the limitation inherent to low number of cases with other sources, caution should be exercised with patients with these infections and with borderline MICs using CLSI criteria.

On the other hand, the breakpoint for failure identified by CART analysis for EUCAST-derived MICs ($>32/2$ mg/L) is two dilutions higher than the actual breakpoint for resistance ($>8/2$ mg/L), but is the recommended breakpoint for uncomplicated urinary tract infections. Importantly, the results of multivariate analysis supported $>32/2$ mg/L as an independent predictor of failure at the end of treatment with amoxicillin/clavulanate in patients with urinary or biliary tract infections; therefore, the latter types of infection might be treated with intravenous amoxicillin/clavulanate, even with MICs up to $32/2$ mg/L. However, as MIC $>16/2$ mg/L was also independently associated with failure, this latter breakpoint is probably more reasonable and safer for all types of infection. Importantly, the present breakpoint recommended by EUCAST ($>8/2$ mg/L) did not show any predictive effect on any of the outcomes measured. A previous study with fewer patients showed a higher failure rate for patients with isolates with MICs $>8/2$ mg/L using EUCAST; in that study, however, only episodes caused by *E. coli* were included, an automated system and gradient test (Etest[®]) were used to determine the MIC, and the definitions of outcome were different.⁷ Our results would suggest that the EUCAST breakpoint for invasive infections might need to be reconsidered.

For interpretation of the data, it should be kept in mind that most patients were treated with 1.2 g every 8 h. Because some patients were administered 2.2 g every 8 h, we explored dosing as a potential confounder, but we found no crude association or trend with any of the outcomes. Nevertheless, we performed additional multivariate analysis introducing this variable, but it showed no statistically significant influence on any outcomes or modification effect (interaction) with MIC values (data not shown).

This study has some limitations that should be taken into account. Despite the high number of patients included, the statistical power was limited for some subgroup analyses. The results would apply mainly to the type of patients included here and to the most frequent sources of bacteraemia and severity at presentation as shown by the fact that the rate of failure in our cohort was low even in patients with resistant isolates. We included patients in whom amoxicillin/clavulanate was changed to another antibiotic for various reasons, which gave our results greater external validity, but jeopardized their internal validity. Finally, we used MIC values as a continuous variable for some analysis, which is subject to debate; however, it should be noted that it is not usually possible to analyse this

variable as a discrete categorical variable in clinical studies, as was the case in this one, because of the low number of cases for most of the MIC values.

In conclusion, CLSI and EUCAST methodologies showed low agreement when determining the MICs of amoxicillin/clavulanate and interpreting susceptibility; EUCAST MICs were associated with outcomes when considered as a continuous variable while CLSI ones were not. The present CLSI breakpoint ($>8/4$ mg/L) was only borderline predictive of failure at the end of therapy with this drug; an MIC $>16/2$ mg/L using EUCAST methodology was independently associated with failure at the end of therapy with amoxicillin/clavulanate and at day 21. However, because of the high proportion of cases with a urinary tract source, more studies are needed in patients with bloodstream infections from other sources.

Acknowledgements

Other members of the REIPI/GEIH-SEIMC BACTEREMIA-MIC Group

Marina de Cueto (Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Seville, Spain), Ana María Planes-Reig (Departamento de Microbiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain), Fe Tubau-Quintano (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain), Carmen Peña (Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, Spain), Carlos Ruiz de Alegría (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain), M. Isabel Morosini, Adriana Shan (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain), José Miguel Cisneros (Unidad Clínica Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Seville, Spain), J. Enrique Corzo (Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario de Valme, Seville, Spain), Núria Prim, María Elvira Galán (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain), Lara García-Álvarez (Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital San Pedro-CIBIR, Logroño, Spain), Irene Gracia-Ahufinger, Julia Guzmán-Puche, Julián Torre-Cisneros (Unidad de Gestión Clínica de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain).

Funding

The study was funded by the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (Fondo de investigación en salud; PI10/02021) co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

Transparency declarations

B. A. has been a scientific advisor for AstraZeneca, Merck, Pfizer, Novartis, Astellas and Gilead, and has been a speaker for AstraZeneca, Merck, Pfizer, Astellas, Gilead and Novartis. R. C. is part of the Steering Committee of EUCAST. J. R.-B. has been a scientific advisor for

Delgado-Valverde *et al.*

AstraZeneca, Merck, Pfizer, Roche, Achaogen, InfectoPharm and Basilea, and has been a speaker for AstraZeneca, Astellas, Merck, Pfizer and Novartis. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online.

References

- Mouton JW, Brown DF, Apfalter P *et al.* The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: E37–45.
- EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 6.0*, 2016. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-sixth Informational Supplement M100-S26*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
- Dudley MN, Ambrose PG. Pharmacodynamics in the study of drug resistance and establishing *in vitro* susceptibility breakpoints: ready for prime time. *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**: 515–21.
- Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 391–408.
- Diez-Aguilar M, Morosini MI, Lopez-Cerero L *et al.* Performance of EUCAST and CLSI approaches for co-amoxiclav susceptibility testing conditions for clinical categorization of a collection of *Escherichia coli* isolates with characterized resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2306–10.
- Leverstein-van Hall MA, Waar K, Muilwijk J *et al.* Consequences of switching from a fixed 2: 1 ratio of amoxicillin/clavulanate (CLSI) to a fixed concentration of clavulanate (EUCAST) for susceptibility testing of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2636–40.
- Delgado-Valverde M, Torres E, Valiente-Mendez A *et al.* Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae: the Bacteraemia-MIC project. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 521–30.
- Korvick JA, Bryan CS, Farber B *et al.* Prospective observational study of *Klebsiella bacteremia* in 230 patients: outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2639–44.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A *et al.* International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 2004; **140**: 26–32.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; **22**: 707–10.
- Friedman ND, Kaye KS, Stout JE *et al.* Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002; **137**: 791–7.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL *et al.* A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; **40**: 373–83.
- McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteremia. I. Etiology and ecology. *Arch Intern Med* 1962; **110**: 847–55.
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG *et al.* CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; **16**: 128–40.
- International Organization for Standardization. *Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems—Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices—Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. International Standard 20776-1*. Geneva, Switzerland: ISO, 2006.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Ninth Edition: Approved Standard M07-A9*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
- EUCAST. *EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance, Version 1.0*, 2013. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.
- Rasheed JK, Jay C, Metchock B *et al.* Evolution of extended-spectrum β -lactamase resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 647–53.
- Simarro E, Navarro F, Ruiz J *et al.* *Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like β -lactamase in Spain. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 4676–8.
- Oteo J, Navarro C, Cercenado E *et al.* Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2359–66.
- Lavollay M, Mamlouk K, Frank T *et al.* Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -Lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris Area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2433–8.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; **33**: 159–74.
- EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 5.0*, 2015. <http://www.eucast.org/>.
- Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ *et al.* *Cumitech 31A, Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory*. Coordinating Editor S. E. Sharp. Washington, DC, USA: ASM Press, 2009.

3.2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Los dos trabajos que componen este proyecto de tesis doctoral forman parte del proyecto multicéntrico Bacteriemia-MIC llevado a cabo en el territorio nacional entre Enero de 2011 y Diciembre de 2013, financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI10/02021) e incluido entre los proyectos de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosas (REIPI) (www.reipi.org). El proyecto se diseñó como un estudio observacional de cohortes prospectivo, en el que participaron 13 hospitales universitarios españoles. El objetivo general del proyecto era investigar el impacto de la CMI de diferentes antibióticos betalactámicos y quinolonas en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia por enterobacterias. El pronóstico se evaluó como fracaso clínico al final del tratamiento con el antimicrobiano de interés, fracaso clínico en los días 14 y 21 y mortalidad en el día 30. Durante el período de estudio se incluyeron un total de 1058 pacientes con bacteriemia por enterobacterias tratados con alguno de estos antibióticos en monoterapia desde el primer día tras la toma de los hemocultivos. De ellos, 287 fueron tratados con PTZ y 264 con AMC. Como fruto de este trabajo se han publicado los dos artículos que componen esta Tesis Doctoral.

3.2.1. Artículo 1: Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to Enterobacteriaceae: the Bacteraemia-MIC project

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el impacto de la CMI de PTZ en el pronóstico clínico de pacientes con bacteriemia tratados con este antibiótico cuando el aislado era categorizado como sensible o cercano a la sensibilidad.

Descripción de la cohorte

Se analizaron las cepas de 287 pacientes, de los cuales 248 (86,4%) tenían una CMI ≤ 4 mg/L (que consideramos como “CMI baja”), 27 (9,4%) una CMI entre 8 y 16 mg/L (consideradas como “CMI límite”) y 12 (4,2%) una CMI > 16 mg/L (resistentes). Los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron *E. coli* (183, 63,8%) y *K. pneumoniae* (49, 17,1%), de entre todos los aislados se detectaron 13 (4,5%) enterobacterias productoras de BLEE. El principal origen de la infección fue el tracto biliar (138, 48,1%). Un 60,6% de los pacientes recibieron una dosis de PTZ igual a 4,5g cada 8 horas administradas en 30 minutos. La duración media del tratamiento con PTZ fue de 10 días para aquellos pacientes en los que se mantuvo el antibiótico durante todo el seguimiento, mientras que en aquellos pacientes en los que el tratamiento se cambió por otro antibiótico fue de 3 días; en un 64,1% de los casos el motivo para el cambio fue la desescalada, y solo en un 8,9% de los casos el tratamiento se cambió por una mala evolución clínica. Cuando se compararon las características de los pacientes con aislados de CMI baja y límite no se detectaron diferencias importantes, salvo en el tipo de adquisición, siendo el origen nosocomial más frecuente en el grupo de pacientes con aislados con CMI límite, y en el porcentaje de pacientes con un %T>CMI estimado $> 50\%$ o del 100% que, como era de esperar, fue mayor en el grupo de CMI baja.

Análisis pronóstico en función de la CMI y otras variables

Los resultados del análisis crudo mostraron un aumento del riesgo de fracaso clínico en el día 21 en función del índice de Charlson, la escala de Pitt, la presentación como sepsis grave o shock séptico, la necesidad de ventilación mecánica y el origen respiratorio de la infección; sin embargo, el origen biliar y el cambio de tratamiento antibiótico fueron factores protectores. Cuando se analizó el fracaso clínico al final del tratamiento con PTZ (fuera este cuando fuera) en vez de en el día 21, los resultados fueron similares; en este caso las variables clínicas asociadas con el fracaso en el análisis univariante fueron la necesidad de ventilación mecánica, el índice de Charlson, la escala de Pitt, la adquisición nosocomial, la presentación como sepsis grave o shock séptico y el origen respiratorio o de catéter. Nuevamente, el origen biliar fue un factor protector. Por último se analizó la asociación de las variables clínicas y la CMI con la mortalidad en el día 30 tras la infección, en este caso las variables estadísticamente asociadas con las mortalidad fueron la edad >65 años, la necesidad de ventilación mecánica, el índice de Charlson, la escala de Pitt, la presentación como sepsis grave o shock séptico y el origen abdominal o respiratorio de la bacteriemia. Como en los análisis anteriores el origen biliar fue un factor protector, en este caso además también lo fue el cambio de tratamiento antibiótico. La CMI de PTZ no fue predictor de ninguna de las variables resultado estudiadas en los análisis crudos.

Se realizaron los análisis multivariante para todas las variables resultado (fracaso en el día 21, fracaso al final del tratamiento con PTZ y mortalidad en el día 30); en todos los casos la variable CMI no se relacionó de manera independiente con el pronóstico. Tampoco lo hizo cuando se midió de manera cuantitativa ni como interacción con otras variables. Del mismo modo, tampoco mostró relación independiente la estimación de la exposición a PTZ, calculada como %ofT>CMI. En todos los análisis, el índice de Charlson, la escala de Pitt y la presentación como sepsis grave o shock se asociaron con peor pronóstico, mientras que origen biliar de la bacteriemia se confirmó como factor protector independiente del pronóstico de la bacteriemia.

3.2. Artículo 2: MIC of amoxicillin/clavulanate according to CLSI and EUCAST: discrepancies and clinical impact in patients with bloodstream infections due to Enterobacteriaceae

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la concordancia de los resultados de sensibilidad para AMC en enterobacterias causantes de bacteriemia usando las recomendaciones de EUCAST y CLSI para microdilución en caldo, así como estudiar el impacto de la CMI de AMC en el pronóstico clínico de pacientes con bacteriemia producida por enterobacterias tratados con este antibiótico y la capacidad de predicción de ambos métodos en el pronóstico.

Descripción de la cohorte

Se estudiaron los 264 pacientes de la cohorte Bacteriemia-MIC tratados con AMC. El origen de la infección más frecuente fue el urinario (171, 64.7%), siendo *E. coli* y *K.*

pneumoniae los patógenos más frecuentemente aislados. De entre todas las enterobacterias, 15 (5,7%) fueron productoras de BLEE y 5 (1,9%) de OXA-1, todas estas últimas conjuntamente con BLEE. Un 79,5% de los pacientes recibieron una dosis intravenosa de AMC igual a 1,2g cada 8 horas. La duración media del tratamiento con AMC fue de 11 días para aquellos pacientes en los que se mantuvo el antibiótico durante todo el seguimiento, mientras que en aquellos pacientes en los que el tratamiento se cambió por otro antibiótico fue de 4 días; en 41 pacientes el motivo para el cambio fue un informe de resistencia y en 31 una mala evolución clínica.

Distribución de CMI y concordancia entre CLSI y EUCAST

Cuando se compararon las CMI determinadas de acuerdo a las recomendaciones de ambos comités, la concordancia entre las CMI fue del 73,1% y entre las categorías clínicas del 65,5%. Si consideramos EUCAST como método de referencia, obtuvimos 45 errores máximos, 1 error mayor y 45 errores mínimos. Para medir el impacto de los errores definidos, se analizó el pronóstico clínico entre los pacientes con resultados concordantes y discrepantes. Para aislados con clasificados dentro de la misma categoría hubo un 13,1% de fracasos al final del tratamiento con AMC cuando fueron sensibles y un 23,5% entre los resistentes [Riesgo Relativo (RR) = 1,76; IC 95%: 0,90–3,45; $p = 0,09$]. Si los aislados eran categorizados como resistentes de acuerdo a EUCAST e intermedios o sensibles según CLSI el porcentaje de fracaso al final del tratamiento se situó en un porcentaje intermedio (17,8%). En cuanto a los datos por especies, *E. coli* y *Klebsiella* spp. fueron identificadas como resistentes con más frecuencia usando la metodología EUCAST que con CLSI, pero lo contrario ocurrió para *Proteus* spp. El resto de las enterobacterias fueron resistentes con ambos métodos.

Asociación entre las CMI determinadas por CLSI y el pronóstico

No se encontró relación entre la CMI considerada como variable continua y el pronóstico. El punto de corte de no sensibilidad seleccionado con el análisis CART para predecir el fracaso al final del tratamiento con AMC fue $>8/4$ mg/L; efectivamente, los pacientes con CMI $>8/4$ mg/L presentaron significativamente mayor fracaso clínico al final del tratamiento con AMC incluso en el análisis ajustado (OR=1,96; IC 95%: 0,98-3,90; $p=0,05$). Por otra parte, el análisis CART seleccionó el punto de corte $>4/2$ mg/L como factor predictor del fracaso clínico en el día 21; sin embargo, este punto de corte no fue predictor del fracaso en el día 21 en el análisis multivariante. En un análisis por subgrupos, los pacientes con bacteriemias de origen distintos al biliar o urinario presentaron una tendencia mayor hacia el fracaso al final del tratamiento con AMC al aplicar este punto de corte (OR: 2,28; IC 95%: 0,92 - 5,68; $p=0,07$).

Asociación entre las CMI determinadas por EUCAST y el pronóstico

Cuando se consideró la CMI como una variable continua, se encontraron diferencias significativas para el fracaso clínico al final del tratamiento con AMC (OR por incremento de CMI = 1,22; IC 95%: 1,03–1,43; $p = 0,01$) y en el día 21 (OR por incremento de

CMI = 1,42; IC 95%: 1,06–1,92; $p = 0,01$), pero no para la mortalidad. El análisis CART seleccionó una CMI $>32/2$ mg/L como factor predictor del fracaso al final del tratamiento con AMC; el análisis crudo de ambos grupos mostró un mayor número de fracasos en el grupo con CMI $>32/2$ mg/L tanto medido al final del tratamiento con AMC (12,7% *versus* 26,7%; RR = 2,10; IC 95%: 1,23–3,56; $p = 0,006$) como en el día 21 (3,2% *versus* 12,0%, RR = 3,78; 95% CI: 1,39–10,25; $p = 0,01$). Estas diferencias se confirmaron en el análisis multivariante, donde la CMI $>32/2$ mg/L demostró asociarse de manera independiente con el fracaso clínico al final del tratamiento con AMC y en el día 21. En el análisis de subgrupos, esta asociación solo se mantuvo para aquellos pacientes con bacteriemia de origen urinario o biliar (OR = 2,34; IC 95%: 1,00–5,44; $p = 0,04$), pero no para el resto (aunque el pequeño tamaño muestral es una limitación). Cuando se analizó el punto de corte $>16/2$ mg/L también se encontró asociación estadísticamente significativa con el fracaso al final del tratamiento con AMC (RR = 1,88; IC 95%: 1,09–3,21; $p = 0,02$) y en el día 21 (RR = 3,12; IC 95%: 1,1–8,84; $p = 0,02$), confirmándose en el análisis multivariante (OR = 2,10; IC 95%: 1,05–4,21; $p = 0,03$ y OR = 3,01; IC 95%: 0,93–9,67; $p = 0,03$, respectivamente).

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. ASPECTOS GENERALES

En general, existen pocos datos clínicos disponibles para apoyar el establecimiento de puntos de corte de sensibilidad para la mayoría de los agentes antimicrobianos debido a las dificultades de realizar estudios que aborden esta cuestión. Por ello, debido a que estos estudios son escasos, las decisiones sobre puntos de corte se basan principalmente en estudios *in vitro* y FC/FD⁴². El diseño y desarrollo de un estudio observacional con este objetivo (encontrar un valor de CMI para predecir los resultados clínicos) presenta un gran desafío, ya que requiere un elevado número de pacientes infectados con microorganismos con diferentes valores de CMI y que sean tratados con un antibiótico específico. Para evitar el sesgo de exposición, las definiciones de las variables resultado deben de ser precisas y la evaluación de las mismas exhaustiva, además se debe de llevar a cabo un control adecuado de los factores de confusión. Sería imposible, y en todo caso no ético, asignar al azar a los pacientes para recibir un tratamiento empírico de acuerdo a la CMI, ya que esto implicaría tratar a pacientes con un fármaco potencialmente inactivo frente a la infección; además los análisis post-hoc de pacientes incluidos en ensayos clínicos aleatorizados están limitados por el hecho de que los pacientes más graves o aquellos con aislamientos resistentes normalmente están infrarrepresentados.

Los estudios observacionales bien diseñados pueden ser muy útiles para este propósito, aunque el diseño de estos estudios también presenta desafíos. Hay que tener en cuenta varios aspectos. En primer lugar, sólo deben incluirse pacientes tratados en monoterapia con el antibiótico de interés. Segundo, todos los pacientes deben recibir el antibiótico lo suficientemente pronto y durante un período mínimo de tiempo para poder medir el efecto del antibiótico en la respuesta. En tercer lugar, deben evaluarse las razones para el cambio a otro antibiótico para así poder medir su impacto en el resultado. Cuarto, se deben incluir todos los posibles factores de confusión como covariables y proporcionar definiciones adecuadas para ellos para poder medir su efecto sobre el resultado. En quinto lugar, se deberá hacer una definición clara de la población de estudio y utilizar criterios de inclusión y exclusión clínicos muy estrictos, así como definir los criterios para la asignación de pacientes a cada grupo de tratamiento. Sexto, siempre que sea posible deben diseñarse como estudios prospectivos y multicéntricos; Además, los investigadores deberán asegurarse de que los datos recogidos de los pacientes sean de calidad y si es posible que se haga por dos investigadores independientes; en el caso de estudios multicéntricos el investigador principal deberá asegurarse de que las definiciones queden claras para todos los participantes y se haga una correcta interpretación de las mismas en todos los centros. Finalmente, los proyectos deben registrarse por adelantado en sitios web públicos, incluyendo la hipótesis, los objetivos, la metodología y el análisis estadístico que se prevea hacer con los datos recogidos, los métodos estadísticos que se utilicen para el análisis han de ser adecuados para controlar todos los posibles factores de confusión y obtener resultados de calidad¹⁵². De hecho, en la literatura hay un número muy limitado de estudios que evalúen el impacto de la CMI

de un antibiótico en la respuesta clínica del paciente, y en general, los que hay incluyen un número muy pequeño de casos^{70, 153-159}.

Recientemente, nuestro grupo ha publicado una revisión sistemática y metaanálisis en el que se evaluó el impacto de las CMI límite en el pronóstico de infecciones invasivas por enterobacterias tras tratamiento con antibióticos betalactámicos¹⁶⁰. Una conclusión importante fue verificar que los estudios incluidos no estaban diseñados con este propósito y, por lo tanto, presentaban limitaciones importantes como no especificar las dosis usadas, determinación de las CMI mediante distintos métodos y no siempre de referencia o la falta de un adecuado control de los factores de confusión. Ese trabajo puso de manifiesto la necesidad de disponer de estudios clínicos bien diseñados que apoyen los puntos de corte clínicos para infecciones por este grupo de bacterias y de este modo poder modificar los puntos de corte actuales cuando sea necesario basándose en datos de práctica clínica real. En consecuencia, los metaanálisis de datos de estudios publicados con otra finalidad proporcionan resultados limitados, aunque son necesarios para mostrar las deficiencias actuales y la necesidad de estudios clínicos bien diseñados con esta finalidad. Con nuestro estudio hemos intentado superar estas limitaciones, ya que el proyecto Bacteriemia-MIC fue diseñado específicamente para investigar el impacto de las CMI de betalactámicos y fluoroquinolonas sobre el pronóstico de pacientes con bacteriemia debida a Enterobacteriaceae.

4.2. PRIMER ARTÍCULO

En este estudio de cohortes prospectivo en el que se evaluó la asociación entre la CMI de PTZ y el pronóstico clínico de pacientes con bacteriemia por enterobacterias, no encontramos que una CMI cercana al punto de corte de PTZ se asociará con mayores tasas de fracaso respecto a CMI más bajas cuando los pacientes fueron tratados con este antibiótico, a las dosis utilizadas (la más habitual, 4,5 g cada 8 horas, administradas en bolo de 30 minutos). En cambio, si encontramos asociación de otras variables clínicas con el pronóstico de la bacteriemia. La influencia de estas otras variables fue la esperada y ya descrita previamente en otros trabajos¹⁶¹⁻¹⁶⁴; las variables que se asociaron de manera independiente con el fracaso clínico medido en diferentes momentos de la infección (fin del tratamiento con PTZ, día 21 y mortalidad cruda) fueron la gravedad de la enfermedad crónica de base medida con el índice de Charlson, la gravedad de la situación aguda de acuerdo a la escala de Pitt y la presentación de la infección como sepsis grave o shock séptico. Sin embargo, los pacientes con una bacteriemia de origen biliar tuvieron significativamente menor tasa de fracaso clínico que el resto, por lo que el origen biliar de la bacteriemia resulto ser un factor de protección en el pronóstico.

Los puntos de corte EUCAST de PTZ para Enterobacteriaceae consideran los aislados con CMI ≤ 8 mg/L como sensibles, aquellos con CMI > 16 mg/L como resistentes y por lo tanto a los que tienen CMI de 16 mg/L como intermedios; de acuerdo a la interpretación de la categoría clínica aquellos pacientes con una CMI categorizada como intermedia podrían ser tratados con altas dosis de PTZ³⁹. Por otro lado, los puntos de corte

CLSI para este antibiótico difieren con los de EUCAST. CLSI recomienda considerar sensibles a aquellos aislados con una CMI ≤ 16 mg/L, intermedios cuando la CMI se encuentre entre 32-64 mg/L y resistentes si la CMI es ≥ 128 mg/L³⁸. En este trabajo analizamos la asociación entre el pronóstico y la CMI comparando dos grupos de pacientes, aquellos con aislados con CMI baja (≤ 4 mg/L) y pacientes con aislados con CMI cercana al punto de corte, incluyendo sensibles e intermedios para EUCAST (8-16 mg/L). Teniendo en cuenta los puntos de corte descritos y la interpretación de los mismos, una interpretación general de nuestros resultados podría ser que dentro de los aislados no resistentes, el valor de CMI para PTZ no tiene un impacto significativo en el resultado clínico, ya que no hay diferencias entre el grupo de pacientes con CMI baja y aquellos con CMI cercana al punto de corte e intermedios; estos resultados podrían reforzar los puntos de corte actuales y, desde luego, sugieren que no es necesario bajarlos. Por otro lado, en función de nuestros resultados el punto de corte de sensibilidad de CLSI podría ser más adecuado que el de EUCAST para las dosis utilizadas en nuestros pacientes. Sin embargo, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones antes de concluir que el punto de corte de sensibilidad de EUCAST debe cambiarse a 16 mg/L.

Para el análisis de los resultados se realizó la estratificación de los grupos que se ha indicado previamente (CMI baja y CMI cercana al punto de corte); aunque la interpretación de la CMI se hizo de acuerdo a los puntos de corte EUCAST, y por lo tanto los aislados con CMI de 16 mg/L fueron clasificados como intermedios, nosotros decidimos incluir aquellos aislados con CMI igual a 16 mg/L dentro del grupo de CMI cercano al punto de corte de sensibilidad. Esta decisión se tomó en base a los resultados de algunos trabajos que estudian la farmacocinética y farmacodinamia de PTZ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. En un trabajo de Lodise *et al.*¹⁶⁸ se estudió la farmacodinamia de piperacilina en presencia de tazobactam mediante simulación de Monte Carlo; sus resultados estimaron que la probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico administrando 3g de piperacilina cada 6 horas es $>95\%$ para CMI de PTZ ≤ 8 mg/L, y de un 72,7% para 16 mg/L. La administración de piperacilina cada 4 horas tuvo un perfil farmacodinámico superior y proporcionaba tasas de objetivo terapéutico superiores al 95% para CMI de ≤ 16 mg/L. Felton *et al.*¹⁶⁷ demostraron que la infusión de 4,5g de PTZ en infusión prolongada (durante 3 o 4 horas) cada 6 o 8 horas resultaba en un PAO superior al 98% para microorganismos con CMI ≤ 8 mg/L. En el caso de aislados con CMI de 16 mg/L, la PAO fue del 94% cuando PTZ fue administrado durante 3 horas cada 6 horas y del 82% cuando se administró durante 4 horas cada 8 horas. Sin embargo, cuando la CMI del microorganismo era superior a 16 mg/L, la PAO disminuía bruscamente hasta tasas cercanas al 0% independientemente del régimen de tratamiento utilizado. En nuestro estudio, la mayoría de los pacientes recibieron una dosis de 4,5 g cada 8 horas, principalmente en bolo pero algunos en infusión prolongada. Por ello era de esperar que los pacientes con infección causada por microorganismos con CMI de 16 mg/L tuvieran una alta probabilidad de alcanzar el objetivo farmacodinámico. Habría sido ideal poder comparar los dos regímenes de tratamiento más utilizados en nuestro estudio (bolo y perfusión prolongada), pero debido al bajo número del segundo no se pudo realizar. Independientemente del tiempo de infusión empleado, la dosis más frecuente entre nuestros pacientes parecer ser apropia-

da de acuerdo a los resultados obtenidos tras los análisis, siendo esta la dosis habitual utilizada en la mayoría de países europeos¹⁶⁹, a diferencia de la que tradicionalmente se ha venido usando en EEUU (3,4 g cada 6 u 8 horas).

Habría sido ideal poder medir los niveles plasmáticos del antibiótico en todos los pacientes, pero la financiación del proyecto no permitió esta posibilidad. En su lugar, realizamos una estimación de la exposición al fármaco utilizando los parámetros predictores de la misma descritos en la literatura para PTZ (peso, talla y aclaramiento de creatinina)^{167, 170}. El parámetro PD predictor de eficacia descrito para este antimicrobiano es una concentración plasmática de fármaco libre por encima del valor de CMI durante al menos el 50% del intervalo entre dosis ($50\% \text{ of } T > \text{MIC}$)⁸³. Las estimaciones realizadas en nuestros pacientes sugirieron que la inmensa mayoría de los pacientes con aislados sensibles e intermedios a PTZ alcanzaron este objetivo con la dosis administrada. Diferentes estudios publicados previamente han demostrado que las concentraciones plasmáticas de PTZ tienen una gran variabilidad en los pacientes críticos¹⁷¹⁻¹⁷³, aunque en nuestra serie en la mayoría de los casos los pacientes no podrían describirse basalmente como tales (solo el 3,5% necesitaban ventilación mecánica), sí que hubo una proporción importante de casos con sepsis grave o shock séptico (33,1%). Se han publicados datos preliminares sobre las concentraciones de PTZ medidas en una población de pacientes no críticos con bacteriemia por Enterobacteriaceae, y por lo tanto muy similar a nuestra cohorte, que apoyan los resultados de las estimaciones FC/FD que se alcanzaron en nuestra serie^{174, 175}. Por lo tanto, creemos que nuestros resultados serían aplicables principalmente a pacientes no críticos, aunque inicialmente puedan presentar datos de gravedad.

Para realizar una correcta interpretación de nuestros resultados es necesario tener en cuenta las limitaciones del estudio. La primera consideración que hay que resaltar es que, desde el punto de vista estadístico, nuestro estudio podría tener una capacidad limitada para detectar diferencias entre los dos grupos analizados, debido al bajo número de pacientes con aislados con CMI límite. Sin embargo, este es el mayor estudio publicado hasta la fecha que aborda específicamente este tema. Esto es una limitación inherente a la baja frecuencia de cepas con estas CMI en la realidad clínica. En segundo lugar, la evaluación del impacto de la CMI se ha realizado principalmente en relación al tratamiento empírico de la bacteriemia. La implicación de la terapia empírica en el pronóstico de las infecciones graves como la bacteriemia ha sido ampliamente estudiada¹⁷⁶, habiéndose demostrado que la terapia empírica es un factor importante y estrechamente relacionado con el resultado clínico, de tal modo que una terapia empírica inadecuada se ha asociado independientemente con el aumento de la mortalidad en pacientes con bacteriemia¹⁷⁷. Sin embargo, el tratamiento dirigido es también relevante, y dado que no es ético forzar a mantener el tratamiento con un fármaco informado como intermedio o resistente para el pronóstico, hubimos de diseñar una forma de controlar el efecto del cambio de tratamiento. Por este motivo recogimos en nuestro estudio el momento y los motivos para el cambio, y se han tenido en cuenta en los análisis, además de considerar la variable resultado "fracaso al final del tratamiento con PTZ".

En tercer lugar, debemos tener en cuenta que otra variable crítica para analizar los resultados es el foco de la infección. Una pequeña serie publicada previamente por nuestro grupo de pacientes con bacteriemia causadas por *E. coli* productor de BLEE mostró que la CMI de PTZ no influyó en el pronóstico de las infecciones del tracto urinario pero sí para bacteriemias de otros focos, en las que se encontró menor mortalidad para los aislados con CMI ≤ 16 mg/L (sensibles e intermedias) que para los que tenían una CMI >16 mg/L (resistentes)¹⁷⁸. El origen de la bacteriemia más común en nuestra cohorte fue el biliar, incluso más que el tracto urinario, lo que refleja el hecho de que PTZ se utiliza con frecuencia en el tratamiento empírico para las infecciones del tracto biliar asociadas a la asistencia sanitaria en nuestro país. Las bacteriemias de origen biliar son relativamente benignas en comparación con la neumonía nosocomial u otras infecciones intraabdominales complicadas¹⁷⁷; de hecho, en nuestro análisis la bacteriemia de origen biliar resultó ser un factor protector del pronóstico clínico tanto en el análisis univariante como en el multivariante. La falta de asociación de las cepas con CMI límite con el pronóstico es independiente de que la bacteriemia fuera originada en un foco biliar, pero a pesar de que ello, consideramos son necesarios más estudios que investiguen el impacto de la CMI de PTZ dentro de las categorías sensible e intermedia en otros focos de infección.

Un aspecto de interés especial es la influencia de la CMI de PTZ en el tratamiento de pacientes con infección causada por Enterobacteriaceae productoras de BLEE. Se han publicado estudios previos cuyos resultados sugieren que las dosis utilizadas en nuestro trabajo serán eficaces para el tratamiento de la bacteriemia por *E. coli* productor de BLEE sensible a PTZ, más concretamente cuando el origen de la bacteriemia fuera urinario o biliar^{153, 178}, pero como hemos comentado, un análisis específico sugirió que PTZ puede ser menos efectiva en pacientes con infecciones bacterianas graves no urinarias causadas por cepas de *E. coli* productor de BLEE con CMI cercanas al punto de corte¹⁵⁷. Recientemente, Gutiérrez-Gutiérrez *et al.* han publicado los resultados de un proyecto multicéntrico en el que han demostrado que las combinaciones de BL/IBL no son inferiores a los carbapenémicos para el tratamiento de la bacteriemia por enterobacterias productoras de BLEE independientemente del origen de la infección y de la especie, siempre y cuando los aislados sean sensibles a PTZ y se administren las dosis apropiadas. En este trabajo no se hizo un análisis comparativo entre las CMI de PTZ y su implicación en el tratamiento; sin embargo, en la tesis doctoral de esta autora se comunicaron estos análisis, y los resultados sugieren que entre los aislados con CMI sensibles no hubo diferencias en el resultado clínico, pero si mostraron una tendencia de mayor mortalidad según aumentaba la CMI de PTZ por encima de 16 mg/L¹⁷⁹. En nuestro estudio, los aislados productores de BLEE fueron muy escasos como para obtener conclusiones.

Como conclusión general de esta publicación, no encontramos que una CMI mayor dentro de la categoría sensible o un valor de CMI categorizado como intermedio para PTZ, tuviera una influencia significativa en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia debida a Enterobacteriaceae. Estos resultados podrán ser aplicados principalmente

a pacientes no críticos que reciban una dosis igual a 4,5g cada 8 horas con infecciones del tracto urinario o biliar. Para confirmar que estos resultados puedan aplicarse a la población general, serán necesarios estudios que incluyan un mayor número de pacientes y con mayor variabilidad de focos de infección.

4.3. SEGUNDO ARTÍCULO

En este trabajo nos concentramos en AMC ya que es un antibiótico ampliamente utilizado en muchos países y porque CLSI y EUCAST discrepan en los métodos recomendados para los estudios de sensibilidad y en los puntos de corte clínicos.

Los resultados de este trabajo demostraron importantes discrepancias entre los valores de CMI cuando se calcularon de acuerdo a la recomendación de cada comité, lo cual se tradujo en una baja concordancia entre los resultados de sensibilidad al compararlas metodologías de CLSI y EUCAST. Como consecuencia de las discrepancias, en nuestra serie hubo un mayor porcentaje de aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes cuando la CMI se determinó siguiendo las recomendaciones EUCAST, por el contrario en el caso de aislados de *Proteus* spp. el número de cepas resistentes fue menor cuando la sensibilidad se determinó por EUCAST. Previamente se han publicado varios trabajos que comparan diferentes metodologías para el estudio de la sensibilidad a AMC, todos estos trabajos se hicieron en aislados de *E. coli* mientras que en nuestro estudio incluimos toda la familia de enterobacterias. En todos los trabajos se obtuvieron mayores tasas de resistencia al usar la metodología recomendada por EUCAST (concentración fija de 2 mg/L de ácido clavulánico)⁶⁸⁻⁷⁰. Los resultados de los estudios de sensibilidad a AMC tienen una importante implicación en los programas de vigilancia de microorganismos resistentes y en el uso de antibióticos, ya que cuando los estudios de sensibilidad se realicen de acuerdo a las recomendaciones EUCAST habrá que tener en cuenta que se deben esperar mayores tasas de resistencia al menos en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Por ello, los datos presentados en los programas de vigilancia deberían especificar claramente la metodología usada para determinar la sensibilidad a AMC y sus resultados deberían ser analizados con precaución. Además, en lo que al tratamiento empírico se refiere, los médicos prescriptores deberían conocer la metodología usada por sus centros para los estudios de sensibilidad; ya que en función de ello las tasas de resistencia locales a AMC pueden variar enormemente y es posible que existiera la necesidad de modificar las recomendaciones de tratamiento empírico con este antibiótico.

Hasta el momento este es, en nuestro conocimiento, el primer trabajo publicado que realiza una evaluación clínica prospectiva y detallada de la evolución clínica de pacientes con bacteriemia por enterobacterias y tratados con AMC incluyendo el análisis de factores de confusión, con el objetivo específico de investigar el impacto de la CMI de AMC en el pronóstico de la bacteriemia. Hasta la fecha solo un trabajo había hecho una evaluación del impacto de la CMI de AMC en el resultado clínico, Leverstain-van Hall y colaboradores encontraron que la CMI de AMC medida con el sistema comercial Phoenix se relacionaba mejor con la respuesta clínica que cuando se determinaba mediante

E-test⁷⁰. El sistema comercial usaba una concentración fija de clavulánico de 2 mg/L, tal y como recomienda EUCAST para determinar la CMI, y el E-test lleva incorporado un ratio de concentración 2:1 de AMC. A diferencia de nuestro trabajo, en este otro solo se incluyeron aislados de *E. coli* y como se ha comentado la metodología para determinar la CMI no fue el método de referencia, sino un sistema semiautomatizado comercial y el E-test. Nosotros sin embargo, incluimos aislados de toda la familia de enterobacterias y el estudio de sensibilidad lo hicimos mediante microdilución en caldo siguiendo la normativa ISO³⁷. Además, ese trabajo fue retrospectivo y no consideró el impacto de los factores de confusión, además de usar una variable resultado menos específica.

Hay una serie de consideraciones a tener en cuenta para poder realizar una correcta interpretación de los datos de esta cohorte. En primer lugar, en nuestra cohorte hay un elevado número de infecciones por *E. coli* con respecto al resto de géneros de la familia Enterobacteriaceae, aunque este hecho ocurre frecuentemente en todos los estudios debido a la mayor prevalencia de esta especie, por lo que debemos tener en cuenta que nuestros datos no siempre podrán ser aplicados a todas las enterobacterias. En segundo lugar, el origen de infección más frecuente en esta serie fue el urinario; las infecciones del tracto urinario por lo general tienen mejor pronóstico que infecciones de otros orígenes como el abdominal o el respiratorio, este debería de ser un factor a tener en cuenta a la hora de valorar las razones por las que los pacientes presentaron una evolución favorable y medir la implicación real del tratamiento con AMC en pronóstico. Por último, hubo un reducido número de pacientes con sepsis grave o shock séptico. Todas estas consideraciones podrían explicar la baja tasa de fracasos clínicos y mortalidad incluso en el grupo de pacientes resistentes a AMC.

Todo ello era esperado cuando se diseñó el trabajo y motivó que, dado que no podíamos esperar que la CMI tuviera un impacto directo en la mortalidad, utilizáramos también el fracaso clínico como variable resultado. Como bien es sabido, el fracaso clínico es susceptible de interpretaciones subjetivas por el investigador, por lo que para evitar o limitar en lo posible este sesgo derivado de la interpretación de los datos, se recogieron (además de la decisión del investigador local sobre si había o no fracaso) una serie de datos objetivables de los pacientes en los distintos momentos de la evaluación, que posteriormente fueron evaluados e interpretados por un investigador ciego del centro de referencia para verificar los resultados interpretados por los investigadores locales. Además, debido a que el tratamiento con AMC no tenía que mantenerse durante todo el período de estudio, sino que el médico responsable del paciente podía cambiar el tratamiento por otro antibiótico bajo su criterio, se evaluó el fracaso clínico al final del tratamiento con AMC y en el día 21 desde el inicio del tratamiento. Consideramos que el fracaso al final del tratamiento con AMC es una variable resultado más sensible para evaluar la actividad del fármaco, ya que es de esperar que, si se cambia éste por mala evolución o por tener una CMI más elevada, el nuevo fármaco tenga un importante impacto en la curación y mortalidad de los pacientes. No obstante, los motivos del cambio de antibiótico fueron varios y no siempre el fracaso del tratamiento con AMC.

En general, nuestros resultados sugieren que la CMI determinada por EUCAST predice mejor el pronóstico clínico del paciente con bacteriemia. Cuando analizamos la implicación de la CMI en el fracaso clínico medida como una variable continua, encontramos que si se había determinado de acuerdo a EUCAST se relacionaba con este, pero no cuando se calculó conforme a las directrices de CLSI. Asimismo, comparamos las tasas de fracaso entre los pacientes que tenían aislados con categorías clínicas concordantes y discordante en función del método, para el análisis tomamos como referencia la categoría de EUCAST. Este análisis mostró diferencias en las tasas de fracaso clínico entre los pacientes que tenían aislados sensibles y resistentes por ambos métodos, pero estas no fueron estadísticamente significativas ($p=0,09$) probablemente debido a la falta de poder estadístico. No obstante, cuando se compararon las tasas de fracaso entre los pacientes que fueron clasificados como sensibles o intermedios por CLSI y resistentes de acuerdo a EUCAST, todos los fracasos ocurriendo cuando la CMI tenía un valor de 8/4 mg/L o 16/8 mg/L usando criterios CLSI. Dado que los aislados con CMI 8/4 mg/L son considerados sensibles y aquellos con CMI 16/8 mg/L intermedios según el punto de corte CLSI, nuestros resultados sugieren que hasta disponer de más datos se debe tener precaución, al interpretar los resultados de aislados con CMI entre estos valores, en aquellos laboratorios donde se apliquen los puntos de corte CLSI.

Adicionalmente, aplicamos un análisis CART para determinar el valor de CMI que serviría como punto de corte predictivo de las variables resultados seleccionadas (fracaso al final del tratamiento con AMC, fracaso en el día 21 y mortalidad cruda en el día 30). Cuando se aplicó este análisis a las CMI determinadas por CLSI, los resultados sugirieron un valor de CMI como punto de corte predictivo del fracaso al final del tratamiento con AMC que coincidía con el punto de corte clínico actual de este comité. Sin embargo, cuando se hizo un análisis más detallado teniendo en cuenta los factores de confusión potencialmente implicados, la estimación fue menos precisa, ya que el IC al 95% fue más amplio. En cualquier caso, a la vista de los resultados pensamos que estos tienden a reforzar el hecho de que los aislados con CMI >8/4 mg/L no deben considerarse sensibles cuando se aplican los puntos de corte de CLSI. El análisis CART no encontró asociación cruda o ajustada entre este punto de corte y el fracaso clínico el día 21 o la mortalidad cruda. Se realizó un análisis en un subgrupo de pacientes en los que se incluyeron pacientes con infecciones cuyo origen era distinto del tracto urinario o biliar, en este subgrupo se demostró una relación independiente entre el fracaso en el día 21 y CMI >4/2 mg/L. A pesar de que en este subgrupo había pocos pacientes, este resultado debería tenerse en cuenta la hora de tratar a pacientes con bacteriemias de orígenes distintos al urinario o biliar y cuyos aislados tengan valores de CMI en el límite de la sensibilidad, ya que el resultado podría ser incierto.

Por otro lado, el análisis CART aplicado a las CMI obtenidas de acuerdo a EUCAST seleccionó como punto de corte una CMI dos diluciones mayor que el punto de corte clínico actual (>32/2 mg/L vs. >8/2 mg/L), que sin embargo coincide con el punto de corte recomendado para infecciones urinarias no complicadas. Cuando se hizo el análisis multivariante ajustando por los factores de confusión, se confirmó la relación indepen-

diente entre la CMI >32 mg/L y el fracaso al final del tratamiento con AMC en pacientes con infecciones de origen biliar o urinario, por lo que con estos resultados podríamos concluir que los pacientes con bacteriemias de origen biliar o urinario podrían ser tratados con AMC intravenosa, aun cuando el aislado causante de la infección tuviera una CMI de $32/2$ mg/L. Sin embargo, dado que un valor de CMI $>16/2$ mg/L también se asoció de manera independiente con el fracaso clínico al final del tratamiento con AMC y en el día 21 para todos los orígenes de la infección, posiblemente sea más razonable y seguro considerar este punto de corte de sensibilidad general. Es importante destacar que el punto de corte EUCAST actual ($>8/2$ mg/L) no mostró ningún efecto predictor sobre el fracaso clínico medido en cualquier punto o la mortalidad. Aunque como se ha comentado previamente, el trabajo de Leverstain-van Hall y colaboradores⁷⁰ mostró una buena relación entre el punto de corte de EUCAST y la respuesta clínica, pero debemos tener en cuenta a la hora de comparar los resultados las diferencias metodológicas con las usadas en nuestro trabajo y las importantes limitaciones del análisis clínico de aquel trabajo. Nuestros resultados sugieren, en resumen, que los valores de CMI obtenidos con EUCAST se correlacionan mejor con la respuesta clínica que la determinada por CLSI, pero también que el punto de corte EUCAST para infecciones invasivas debería de ser revisado. No obstante, también creemos que son necesarios más estudios clínicos de estas características para corroborar nuestros resultados.

Una consideración importante que debe ser valorada se refiere a la dosis de AMC que recibieron los pacientes. La mayoría de los pacientes fueron tratados con 1,2 g cada 8 horas, pero hubo un grupo de pacientes a los que se les administraron 2,2 g cada 8 horas. Por ello, en el análisis crudo incluimos la dosis administrada como un posible factor de confusión, pero no encontramos ninguna asociación o tendencia cruda con ninguna de las variables resultado. Del mismo modo realizamos un análisis multivariante adicional donde incluimos esta variable, pero nuevamente no mostró ninguna influencia de esta variable en el resultado clínico, ni tampoco cuando se analizó su posible efecto sobre la variable CMI a modo de interacción.

Finalmente, este estudio tiene algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, a pesar del elevado número de pacientes incluidos el poder estadístico fue limitado para algunos análisis de subgrupos. En segundo lugar, los resultados pueden ser aplicados principalmente al tipo de pacientes incluidos en la cohorte, es decir pacientes con bacteriemias de origen urinario o biliar y que no se presentan como sepsis grave. Este hecho va en concordancia con la baja tasa de fracasos clínicos incluso en pacientes con aislados resistentes. En tercer lugar, se incluyeron pacientes en los el tratamiento empírico con AMC se cambió a otro antibiótico por diversas razones, y por ello es difícil medir el verdadero papel de la CMI de AMC en la respuesta clínica final del paciente. Para solventar este problema analizamos el fracaso al final del tratamiento con AMC, ya que entendemos que este punto es donde podemos encontrar la mayor implicación del tratamiento con AMC en el pronóstico de la infección. A consecuencia de este posible cambio en el tratamiento antibiótico de los pacientes, nuestros datos tienen mayor validez externa, pero su validez interna pudo verse afectada. Finalmente,

en algunos análisis la CMI se incluyó como una variable continua, lo cual podría ser debatido ya que aquí medimos como cada incremento en el valor de la CMI influye en la respuesta clínica; sin embargo, cabe señalar que desde el punto de vista metodológico no suele ser posible analizar esta variable como una variable categórica discreta en los estudios clínicos, como en este caso, debido al escaso número de casos incluido para la mayoría de los valores de CMI.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en los trabajos expuestos en este proyecto de Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El valor de la CMI de piperacilina-tazobactam de enterobacterias sensibles o intermedias a este antimicrobiano (criterios EUCAST) no afecta significativamente al pronóstico en pacientes con bacteriemia tratados con este antimicrobiano a dosis de 4,5 g cada 8 horas.
2. Los factores asociados de manera independiente con un peor pronóstico en estos pacientes son una mayor puntuación en el índice de Charlson o en la escala de Pitt, y la presentación como sepsis grave o shock séptico, mientras que el origen biliar se asoció con mejor pronóstico.
3. Existe un alto grado de discordancia en los valores de CMI de amoxicilina-clavulánico para enterobacterias obtenidos usando las recomendaciones de CLSI (ratio de concentración 2:1) y las de EUCAST (concentración fija de ácido clavulánico de 2 mg/L), obteniéndose mayores tasas de resistencia con estas últimas para *E. coli* y *Klebsiella* spp., y menores para *Proteus* spp.
4. En los pacientes con bacteriemia por enterobacterias tratados con amoxicilina-clavulánico, la CMI (analizada como variable continua) de este antimicrobiano determinada con las recomendaciones de EUCAST muestra mejor capacidad predictiva del pronóstico que con las de CLSI.
5. Usando la metodología EUCAST, los aislados con CMI $>16/2$ mg/L (y $>32/2$ mg/L para bacteriemias de origen urinario) se asocian de forma independiente con mayor riesgo de fracaso terapéutico tanto al final del tratamiento con el fármaco como en el día 21, y estos podrían por tanto ser considerados como los puntos de corte para no sensibilidad. No hemos podido encontrar un punto de corte consistentemente asociado con el pronóstico utilizando la metodología recomendada por CLSI.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Levy Hara G, Sosa A. *Uso y abuso de los antibióticos. ¿Dónde estamos y adónde queremos llegar?* Montevideo, Uruguay: Arena Latinoamericana ed., 2006.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
3. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>.
4. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004; **10**: S122-9.
5. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 913-20.
6. Hampton T. Novel Programs and Discoveries Aim to Combat Antibiotic Resistance. *JAMA* 2015; **313**: 2411-3.
7. McEwen SA. Antibiotic use in animal agriculture: what have we learned and where are we going? *Anim Biotechnol* 2006; **17**: 239-50.
8. Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist* 2015; **8**: 49-61.
9. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 718-33.
10. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ *et al*. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis* 2011; **52 Suppl 5**: S397-428.
11. Comisión Europea. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/docs/communication_amr_2011_748_es.pdf.
12. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1.
13. Teerawattanapong N, Kengkla K, Dilokthornsakul P *et al*. Prevention and Control of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Adult Intensive Care Units: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2017; **64**: S51-S60.

14. Djibre M, Fedun S, Le Guen P et al. Universal versus targeted additional contact precautions for multidrug-resistant organism carriage for patients admitted to an intensive care unit. *Am J Infect Control* 2017.
15. French CE, Coope C, Conway L et al. Control of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect* 2017; **95**: 3-45.
16. Cantas L, Shah SQ, Cavaco LM et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol* 2013; **4**: 96.
17. Parlamento Europeo. Autorización y control de los medicamentos de uso veterinario.
<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML%20TA%20P8-TA-2016-0088%200%20DOC%20PDF%20V0//Es>.
18. The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 1081-3.
19. World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.
http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.
20. European Centre for Disease Control/European Medicines Agency. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: EMEA, 2009.
http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
21. Martinez-Martinez L, Calvo J. [Development of resistances to antibiotic drugs: causes, consequences and importance to the public health system]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; **28 Suppl 4**: 4-9.
22. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, Jr. et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 159-77.
23. Cisneros JM, Neth O, Gil-Navarro MV et al. Global impact of an educational antimicrobial stewardship programme on prescribing practice in a tertiary hospital centre. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 82-8.
24. Llor C, Hernandez S. [Infectious disease in primary care: 1-year prospective study]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; **28**: 222-6.

25. Rodríguez-Bano J, Pano-Pardo JR, Alvarez-Rocha L *et al.* [Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH consensus document]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**: 22 e1- e3.
26. Owens RC, Jr. Antimicrobial stewardship: concepts and strategies in the 21st century. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; **61**: 110-28.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs.
<http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/implementation/core-elements.html>
28. Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48 Suppl 1**: 1-4.
29. World Health Organization. Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Test. Second report of the Expert Committee on Antibiotics. WHO Technical Report Series, No. 210. Geneva, 1961.
30. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**: 493-6.
31. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol* 1966; **36**: 49-52.
32. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 12th Edition, M02-A12, 2017.
33. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 6.0
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Manual_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf.
34. European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 5.0, 2017.
35. Bolmström A, Arvidson, S., Ericsson, M., and Karlson, A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms, abstr. 1209, p. 325. *28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy American Society for Microbiology*. Washington, D.C., 1988.
36. Brown DF, Brown L. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**: 185-90.
37. International Organization for Standardization (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems-susceptibility testing of infectious agents and

evaluation of performance of antimicrobial susceptibility testing device. Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. *International Standard 20776-1 Geneva, Switzerland: International Standards Organisation, 2006.*

38. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-seventh Informational Supplement. M100-S27. 2017.

39. EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 7.0.

http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. 2017.

40. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. M07-A10. 2015.

41. Wikler MA, and P. G. Ambrose. The breakpoints, p. 1-7. In V. Lorian, *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

42. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 391-408, table of contents.

43. Bergen JV, Kimmelman, E. R. Chapter 11. *The Medical Device Industry: Science, Technology, and Regulation in a Competitive Environment*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1990.

44. Kahlmeter G, Brown, D., Chairman and Scientific Secretary of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Harmonization of Antimicrobial Breakpoints in Europe - Can It Be Achieved? *Clinical Microbiology Newsletter* 2004; **26**.

45. Kahlmeter G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement? *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2427-39.

46. Brown DF, Wootton M, Howe RA. Antimicrobial susceptibility testing breakpoints and methods from BSAC to EUCAST. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 3-5.

47. Kahlmeter G. Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Ups J Med Sci* 2014; **119**: 78-86.

48. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW *et al.* European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 145-8.

49. Brown D, Canton R, Dubreuil L *et al.* Widespread implementation of EUCAST breakpoints for antibacterial susceptibility testing in Europe. *Euro Surveill* 2015; **20**.

50. EUCAST. Harmonising breakpoints for existing antimicrobial agents, EUCAST SOP 2.2.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_SOP_2.2_Setting_breakpoints_existing_agents_20161121.pdf.

51. EUCAST. Maps of EUCAST 2017.

http://www.eucast.org/presentations_and_statistics/eucast_statistics/.

52. Baquero F. European standards for antibiotic susceptibility testing: towards a theoretical consensus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; **9**: 492-5.

53. Martinez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 116-23.

54. EUCAST. EUCAST Subcommittee on MIC distributions and epidemiological cut-off values (ECOFFs), Discussion document Version 3, 9 March 2017.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2017/MIC_and_ECOFF/EUCAST_MIC_and_ECOFF_discussion_document_version_3_20170309.pdf.

55. EUCAST. EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_definitions_of_clinical_breakpoints_and_ECOFFs.pdf.

56. EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Amoxicillin-clavulanic acid (fixed).

<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=724&Specium=-1>.

57. EUCAST. Amoxicillin-clavulanic acid (fixed) / *Escherichia coli*. International MIC Distribution.

<https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=36041>.

58. EUCAST. Piperacillin-tazobactam / *Escherichia coli*. International MIC Distribution.

<https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=5391>.

59. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. M100-S25. 2015.

60. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-sixth Informational Supplement. M100-S26. 2016.
61. Canut A, Martinez-Martinez L. [Ceftaroline breakpoints]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; **32 Suppl 2**: 21-6.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement. M100-S24. 2014.
63. Frei CR, Wiederhold NP, Burgess DS. Antimicrobial breakpoints for gram-negative aerobic bacteria based on pharmacokinetic-pharmacodynamic models with Monte Carlo simulation. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 621-8.
64. EUCAST. Clinical Breakpoints-bacteria (v 7.1). 2017.
65. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J *et al.* Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 159-66.
66. 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.
67. Suzuk S, Kaskatepe B, Avcikucuk H *et al.* [The comparison of antibiotic susceptibilities of uropathogenic Escherichia coli isolates in transition from CLSI to EUCAST]. *Mikrobiyol Bul* 2015; **49**: 494-501.
68. Maria DA, Maria-Isabel M, Maria-Carmen C *et al.* Establishing the validity of different susceptibility testing methods to evaluate the in vitro activity of amoxicillin-clavulanate against Escherichia coli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; **84**: 334-6.
69. Diez-Aguilar M, Morosini MI, Lopez-Cerero L *et al.* Performance of EUCAST and CLSI approaches for co-amoxiclav susceptibility testing conditions for clinical categorization of a collection of Escherichia coli isolates with characterized resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2306-10.
70. Leverstein-van Hall MA, Waar K, Muilwijk J *et al.* Consequences of switching from a fixed 2 : 1 ratio of amoxicillin/clavulanate (CLSI) to a fixed concentration of clavulanate (EUCAST) for susceptibility testing of Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2636-40.
71. Kassim A, Omuse G, Premji Z *et al.* Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines

- for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; **15**: 21.
72. EUCAST. EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1, August 2000: Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clin Microbiol Infect* 2000; **6**: 570-2.
73. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline, 3rd ed. CLSI publication M23-A3. 2008.
74. Kronvall G. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *Int J Antimicrob Agents* 2003; **22**: 7-13.
75. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 418-25.
76. Jenkins SG, Jerris, R. C. Critical Assessment of Issues Applicable to Development of Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints. *J Clin Microbiol* 2011; **Supp**: S5-S10.
77. Mouton JW. Impact of pharmacodynamics on breakpoint selection for susceptibility testing. *Infect Dis Clin North Am* 2003; **17**: 579-98.
78. Ambrose PG. Antimicrobial susceptibility breakpoints: PK-PD and susceptibility breakpoints. *Treat Respir Med* 2005; **4 Suppl 1**: 5-11.
79. Dudley MN, Ambrose PG. Pharmacodynamics in the study of drug resistance and establishing *in vitro* susceptibility breakpoints: ready for prime time. *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**: 515-21.
80. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin; importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *Am J Med* 1950; **9**: 280-99.
81. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. The effective concentrations of penicillin *in vitro* and *in vivo* for streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*. *J Bacteriol* 1950; **59**: 625-43.
82. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1-10; quiz 1-2.
83. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**: 289-300.
84. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P *et al*. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: E37-45.

85. Craig WA, and S. Gudmundsson. Postantibiotic effect, p. 296-329. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed.* Baltimore, MD.: Williams and Wilkins, 1996.
86. Majtanova L, Majtan V. [Postantibiotic effects of antimicrobial agents]. *Ceska Slov Farm* 1998; **47**: 255-60.
87. Vogelman B, Gudmundsson S, Turnidge J *et al.* In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 1988; **157**: 287-98.
88. Blaser J, Stone BB, Zinner SH. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. *J Antimicrob Chemother* 1985; **15 Suppl A**: 131-7.
89. Felton TW, Goodwin J, O'Connor L *et al.* Impact of Bolus dosing versus continuous infusion of Piperacillin and Tazobactam on the development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5811-9.
90. Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY *et al.* In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1604-13.
91. Eagle H, Fleischman R, Levy M. "Continuous" vs. "discontinuous" therapy with penicillin; the effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *N Engl J Med* 1953; **248**: 481-8.
92. Zhao M, Lepak AJ, Andes DR. Animal models in the pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem* 2016; **24**: 6390-400.
93. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM *et al.* Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 79-86.
94. Saito A, Inamatsu T, Okada J *et al.* Clinical breakpoints in pulmonary infections and sepsis: new antimicrobial agents and supplemental information for some agents already released. *J Infect Chemother* 1999; **5**: 223-6.
95. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*, Elsevier, ed. 2012; 2817-36.
96. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Enterobacteriaceae. In: *Microbiología Médica*, Barcelona: Elsevier, ed. 2014; 258-72.
97. Bergeys. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015
98. Euzeby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 1997; **47**: 590-2.

99. Ranh O. New principles for the classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt* 1937; **96**: 273-86.
100. Lapage SP. Proposal of Enterobactereaceae nom. nov. as a substitute for the illegitimate but conserved name Enterobacteriaceae Ranh 1937. *Int J Syst Bacteriol* 1979; **29**: 265-6.
101. Buchanan RE, St John-Brooks R, Breed RS. International bacteriological code of nomenclature. *J Bacteriol* 1948; **55**: 287-306.
102. Castellani A, Chalmers, A.J. *Manual of tropical medicine, 3rd ed.*, 1919.
103. Bacteriology, Judicial Commission of the International Committee on Systematic. Present Standing of the name Enterobacteriaceae Ranh 1937. *Int J Syst Bacteriol* 1981; **31**: 104.
104. Skerman VBD, McGowan, V. and Sneath, P.H.A. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* 1980; **30**: 225-420.
105. Breed RS, Murray EGD., Smith NR. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 17ed. Baltimore ed.,: The Williams and Wilkins Co, 1957.
106. Euséby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
<http://www.bacterio.net/-classifgenerafamilies.html>.
107. Suarez C, Gudiol F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**: 116-29.
108. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; **11**: 852-7.
109. English AR, Retsema JA, Girard AE *et al.* CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; **14**: 414-9.
110. Fisher J, Belasco JG, Charnas RL *et al.* Beta-lactamase inactivation by mechanism-based reagents. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; **289**: 309-19.
111. Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ *et al.* Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 767-72.
112. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**: 160-201.
113. Bush K. A resurgence of beta-lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 483-93.

114. Miller LA, Ratnam K, Payne DJ. Beta-lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Curr Opin Pharmacol* 2001; **1**: 451-8.
115. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 42-51.
116. Collatz E, Labia R, Gutmann L. Molecular evolution of ubiquitous beta-lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer beta-lactam antibiotics. *Mol Microbiol* 1990; **4**: 1615-20.
117. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; **289**: 321-31.
118. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**: 259-63.
119. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of [beta]-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 1050-1.
120. Frere JM, Galleni M, Bush K *et al.* Is it necessary to change the classification of [beta]-lactamases? *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 1051-3.
121. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1211-33.
122. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 969-76.
123. Pages JM, Peslier S, Keating TA *et al.* Role of the Outer Membrane and Porins in Susceptibility of beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae to Ceftazidime-Avibactam. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **60**: 1349-59.
124. Wassef M, Abdelhaleim M, AbdulRahman E *et al.* The Role of OmpK35, OmpK36 Porins, and Production of beta-Lactamases on Imipenem Susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates, Cairo, Egypt. *Microb Drug Resist* 2015; **21**: 577-80.
125. Saw HT, Webber MA, Mushtaq S *et al.* Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae to carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1510-9.
126. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008; **32**: 361-85.
127. Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Martinez-Martinez L. Hyperproduction of AmpC beta-lactamase in a clinical isolate of *Escherichia coli* associated with a 30 bp deletion in the attenuator region of ampC. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 251-2.

128. Canton R, Morosini MI, de la Maza OM *et al.* IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14 Suppl 1**: 53-62.
129. Reguera JA, Baquero F, Perez-Diaz JC *et al.* Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta-lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**: 569-75.
130. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2014; **27**: 241-63.
131. Vedel G, Belaouaj A, Gilly L *et al.* Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI beta-lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to beta-lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 1992; **30**: 449-62.
132. Bret L, Chanal C, Sirot D *et al.* Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 beta-lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**: 183-91.
133. Sirot D, Chanal C, Bonnet R *et al.* Inhibitor-resistant TEM-33 beta-lactamase in a *Shigella sonnei* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2179-80.
134. Arpin C, Labia R, Dubois V *et al.* TEM-80, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1183-9.
135. Bradford PA, Bratu S, Urban C *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 55-60.
136. Aragon LM, Mirelis B, Miro E *et al.* Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1029-32.
137. Robin F, Delmas J, Archambaud M *et al.* CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2403-8.
138. Fielt J, Palucha A, Miaczynska B *et al.* A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1499-505.
139. Neuwirth C, Madec S, Siebor E *et al.* TEM-89 beta-lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: new complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 3591-4.

140. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P. TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4528-31.
141. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-sixth Informational Supplement M100-S26, Wayne, PA, USA, 2016.
142. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, 2015.
143. Bou-Antoun S, Davies J, Guy R *et al*. Descriptive epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England, April 2012 to March 2014. *Euro Surveill* 2016; **21**.
144. Kronenberg A, Hilty M, Endimiani A *et al*. Temporal trends of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in in- and outpatients in Switzerland, 2004 to 2011. *Euro Surveill* 2013; **18**.
145. Greenwood D. Fixed or variable concentrations of beta-lactamase inhibitors in in-vitro tests? *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**: 17-20.
146. Thomson CJ, Miles RS, Amyes SG. Susceptibility testing with clavulanic acid: fixed concentration versus fixed ratio. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2591-2.
147. Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 3548-54.
148. Lopez-Cerero L, Picon E, Morillo C *et al*. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 132-6.
149. Wu N, Chen BY, Tian SF *et al*. The inoculum effect of antibiotics against CTX-M-extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; **13**: 45.
150. Docobo-Perez F, Lopez-Cerero L, Lopez-Rojas R *et al*. Inoculum effect on the efficacies of amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, and imipenem against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing *Escherichia coli* in an experimental murine sepsis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2109-13.
151. Craig WA, Bhavnani SM, Ambrose PG. The inoculum effect: fact or artifact? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **50**: 229-30.

152. Bettioli E, Rottier WC, Del Toro MD *et al.* Improved treatment of multidrug-resistant bacterial infections: utility of clinical studies. *Future Microbiol* 2014; **9**: 757-71.
153. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Retamar P *et al.* beta-Lactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 167-74.
154. Cagnacci S, Gualco L, Roveta S *et al.* Bloodstream infections caused by multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 296-300.
155. Lorente L, Jimenez A, Martin MM *et al.* Clinical cure of ventilator-associated pneumonia treated with piperacillin/tazobactam administered by continuous or intermittent infusion. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33**: 464-8.
156. Rodriguez-Bano J, Picon E, Navarro MD *et al.* 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.
157. Retamar P, Lopez-Cerero L, Muniain MA *et al.* Impact of the MIC of piperacillin-tazobactam on the outcome of patients with bacteremia due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3402-4.
158. Bin C, Hui W, Renyuan Z *et al.* Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; **56**: 351-7.
159. Sugimoto N, Yamagishi Y, Mikamo H. Proposed breakpoint of piperacillin/tazobactam against extended spectrum beta-lactamases producing bacteria in bacteremia. *J Infect Chemother* 2017; **23**: 65-7.
160. Torres E, Delgado M, Valiente A *et al.* Impact of borderline minimum inhibitory concentration on the outcome of invasive infections caused by Enterobacteriaceae treated with beta-lactams: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; **34**: 1751-8.
161. Lee NY, Lee CC, Li CW *et al.* Cefepime Therapy for Monomicrobial Enterobacter cloacae Bacteremia: Unfavorable Outcomes in Patients Infected by Cefepime-Susceptible Dose-Dependent Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7558-63.
162. Burnham JP, Lane MA, Kollef MH. Impact of Sepsis Classification and Multi-drug-Resistance Status on Outcome Among Patients Treated With Appropriate Therapy. *Crit Care Med* 2015; **43**: 1580-6.

163. Lee CC, Lee NY, Chen PL *et al.* Impact of antimicrobial strategies on clinical outcomes of adults with septic shock and community-onset Enterobacteriaceae bacteremia: de-escalation is beneficial. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; **82**: 158-64.
164. Retamar P, Lopez-Prieto MD, Natera C *et al.* Reappraisal of the outcome of healthcare-associated and community-acquired bacteremia: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 344.
165. Shea KM, Cheatham SC, Wack MF *et al.* Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin/tazobactam administered by prolonged infusion in hospitalised patients. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 429-33.
166. Lodise TP, Jr., Lomaestro B, Drusano GL. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 357-63.
167. Felton TW, Hope WW, Lomaestro BM *et al.* Population pharmacokinetics of extended-infusion piperacillin-tazobactam in hospitalized patients with nosocomial infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4087-94.
168. Lodise TP, Jr., Lomaestro B, Rodvold KA *et al.* Pharmacodynamic profiling of piperacillin in the presence of tazobactam in patients through the use of population pharmacokinetic models and Monte Carlo simulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4718-24.
169. EUCAST. Piperacillin-tazobactam: Rationale for the clinical breakpoints, version 1.0, 2010.
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Piperacillin-tazobactam_rationale_Nov2010_v_1.0.pdf.
170. Wong G, Briscoe S, Adnan S *et al.* Protein binding of beta-lactam antibiotics in critically ill patients: can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 6165-70.
171. Jamal JA, Roberts DM, Udy AA *et al.* Pharmacokinetics of piperacillin in critically ill patients receiving continuous venovenous haemofiltration: A randomised controlled trial of continuous infusion versus intermittent bolus administration. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 39-44.
172. Roberts JA, Kirkpatrick CM, Roberts MS *et al.* First-dose and steady-state population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin by continuous or intermittent dosing in critically ill patients with sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 156-63.
173. Roberts JA, Roberts MS, Robertson TA *et al.* Piperacillin penetration into tissue of critically ill patients with sepsis--bolus versus continuous administration? *Crit Care Med* 2009; **37**: 926-33.

174. Valiente-Mendez A, Merino-Bohorquez, V. Camean, M., Delgado, M., Pascual, A., Rodriguez-Baño, J. Variability in serum concentrations of piperacillin in non-critically ill patients with bloodstream infection due to Enterobacteriaceae. *Abstracts of the Twenty five European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Copenhagen, 2015.
175. Valiente-Mendez A, Merino-Bohorquez, V. Camean, M., Delgado, M., Pascual, A., Hope, W., Rodriguez-Baño, J. Development of a pharmacokinetic model for piperacillin-tazobactam in non-critically ill patients with bloodstream infection due to Enterobacteriaceae. *Abstracts of the Twenty six European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Amsterdam, 2016.
176. Paul M, Shani V, Muchtar E *et al*. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4851-63.
177. Retamar P, Portillo MM, Lopez-Prieto MD *et al*. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 472-8.
178. Gavin PJ, Suseno MT, Thomson RB, Jr. *et al*. Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin- tazobactam against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2244-7.
179. Gutierrez-Gutierrez B. Tesis Doctoral: Tratamiento de bacteriemias por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: la combinación de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas como alternativa a los carbapenemes. Proyecto INCREMENT. Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, 2015.

