



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

OPTIMIZACIÓN DE LA EVALUACIÓN DE SINERGIAS
ENTRE CEFTAZIDIMA AVIBACTAM Y AZTREONAM EN
BACTERIAS METALOBELACTAMASAS.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Simó Ferrandis, Lidia

Tutor/a: Almudéver Folch, Patricia

Cotutor/a externo: Navarro Ortega, David

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

RESUMEN

En la actualidad, el aumento de las resistencias antibióticas representa un desafío a nivel global para la salud pública, destacando entre ellas las Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas que confieren resistencia a gran parte de los antibióticos disponibles. En estos casos y, en particular, en las metalobetalactamasas (carbapenemasas de clase B), las escasas opciones terapéuticas provocan que no sea siempre suficiente el tratamiento en monoterapia. Por lo que el estudio del efecto sinérgico entre diversos antibióticos cobra especial relevancia. La sinergia se da cuando dos antibióticos interactúan positivamente potenciando su efecto antimicrobiano. Son numerosos los métodos para estudiar el efecto sinérgico entre dos antibióticos. El objetivo de este trabajo es evaluar la concordancia y rendimiento de cuatro métodos para el demostrar in vitro el efecto sinérgico entre Ceftazidima-Avibactam y Aztreonam en cepas de Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas de clase B. Para ello se utilizaron cepas criopreservadas de *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies de Enterobacterias aisladas de pacientes en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Estas se analizaron, a partir de colonia bacteriana aislada, por cuatro métodos: , concretamente: el método de referencia de tiras E-test cruzadas (TC) y cálculo del iCIF; resensibilización de Aztreonam (ATM) mediante tiras E-test paralelas (TP); método de disco de ATM junto a tira E-test de CZA para observar el aumento de halo de ATM y/o la D invertida (TD); y el método de elución en medio Cerebro-Corazón con discos de CZA y ATM (ED), determinando por MALDI-TOF la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano con base en el resultado de la identificación.

PALABRAS CLAVE

Resistencia antibiótica, sinergia, bacterias gramnegativas, aztreonam, ceftazidima/avibactam y metalo β -lactamasas.

RESUM

En l'actualitat, l'augment de les resistències antibiòtiques representa un desafiament a nivell global per a la salut pública, destacant entre elles els Enterobacteris i Pseudomonas aeruginosa productores de carbapenemasas que conferixen resistència a gran part dels antibiòtics disponibles. En estos casos i, en particular, en les metalobetalactamasas (carbapenemasas de classe B), les escasses opcions terapèutiques provoquen que no siga sempre suficient el tractament en monoteràpia. És per això que l'estudi de l'efecte sinèrgic entre diversos antibiòtics és important. La sinèrgia es dona quan dos antibiòtics interactuen positivament potenciant el seu efecte antimicrobià. Són nombrosos els mètodes per a estudiar l'efecte sinèrgic entre dos antibiòtics. L'objectiu d'este treball és avaluar la concordança i rendiment de quatre mètodes per al demostrar in vitro l'efecte sinèrgic entre ceftazidima-avibactam i aztreonam en ceps d'Enterobacteris i Pseudomonas aeruginosa productores de carbapenemasas de classe B. Per a això es van utilitzar aïllats criopreservats de Pseudomonas aeruginosa i diverses espècies d'Enterobacteris de pacients en el Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic Universitari de València. Estes es van analitzar, per quatre mètodes: el mètode de referència, de tires E-test creuades (TC), tires E-test paral·leles (TP); mètode de disc de ATM al costat de tira E-test de CZA per a observar l'augment d'halo de ATM i/o la D invertida; i el mètode d'elució al mig CC amb discos de CZA i ATM (ED), determinant per MALDI-TOF l'absència o presència de creixement bacterià amb base en el resultat de la identificació.

PARAULES CLAU

Resistència antibiòtica; sinèrgia; bacteris gramnegatius; aztreonam; ceftazidima/avibactam i metalo β -lactamasas.

SUMMARY

Nowadays, the increase in antibiotic resistance represents a worldwide challenge for public health, emphasizing on Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*, which are producers of carbapenemases (class B) that provide them resistance to the vast majority of the available antibiotics. In this cases, and particularly, in metalloβ-lactamases (B class), the lack of efficient therapeutics options makes impossible to treat diseases by using one antibiotic. That is why the study of the synergistic effect between different antibiotics is so important. This effect is produced when two antibiotics interact positively enhancing their antimicrobial effect. There are a lot of methods to study this effect. The aim of this project is to evaluate the concordance and the efficiency of four methods in order to prove the synergistic effect between Cefatazidima- Avibactam and Aztreonam in strains of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. In order to do it, *Pseudomonas aeruginosa* and several species of Enterobacteriaceae' s cryopreserved strains isolated from patients at the Microbiology Department of the Hospital Clínico Universitario de Valencia were used. These strains were analyzed by four methods: the crossed E-test strips method, parallel E-test strips; ATM disk method plus CZA E-test strips to observe the increase of ATM halo and the inverted D and the elution method in CC medium with CZA and ATM disks using MALDI- TOF to check the presence or absence of bacterial growth.

KEY WORDS

Optimization; synergism; antibiotic resistance; metalloβ-lactamases; Aztreonam and Ceftazidime/Avibactam.

1	ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	3
2.1	Microbiología y procesos infecciosos.	3
2.2	Características microbiológicas de los microorganismos.....	4
2.3	Antibióticos.....	7
2.3.1	Penicilina.	7
2.3.2	Cefalosporinas y cefamicinas.	8
2.3.3	Monobactámicos.	9
2.3.4	Carbapenémicos.....	9
2.3.5	β -lactámicos asociados a inhibidores de β -lactamasas.	10
2.4	Estudio de sensibilidad antibiótica.....	10
2.5	Resistencias antibióticas a β - lactamasas.	12
2.6	Estudio de sinergismo.	15
2.6.1	Método tradicional.	16
2.6.1.1	Método tiras de gradiente.	17
2.6.1.2	Métodos basados en dilución.....	19
2.6.2	Ceftazidima/avibactam y aztreonam.	20
3	OBJETIVOS.	21
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1	Aislados bacterianos.	21
4.2	Ensayos para realizar estudios de sensibilidad y detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos.	21
4.3	Estudio de sinergismo entre CAZ-AVI y ATM.	22
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	22
5.1	Estudios de sinergismo.....	23
5.2	Estudios de sinergismo para <i>Pseudomonas</i> spp.	24
5.3	Estudios de sinergismo para Enterobacterias.	26
6	CONCLUSIÓN.	32
7	ANEXO 1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.....	33
8	BIBLIOGRAFÍA.	35

1 ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ATM – Aztreonam.

BES - Brazil Extended-Spectrum.

BEL - β -lactamase Extended of Belgium

BLEE - β -lactamasa de Espectro Extendido.

BGNMF -Bacterias Gramnegativas no Fermentadoras.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI - Concentración Mínima Inhibitoria.

Caldo CC – Caldo Cerebro-Corazón

CZA-AVI - Ceftazidima/avibactam.

ED – Elución con disco.

ENTB – Enterobacterias.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

FDA – Food and Drug Administration.

GES- Guiana Extended-Spectrum.

iCIF - Índice de concentración inhibitoria fraccional.

IMP – Imipenemasa.

ITU – Infecciones del tracto urinario.

KPC - Klebsiella Pneumoniae Carbapenemasa.

MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight.

NDM - New Delhi Metalo β -lactamasa.

MBL – Metalo β -lactamasas.

OMS - Organización Mundial de la Salud.

PBP – Penicilin-Binding Protein.

PER - Pseudomonas Extended Resistance.

PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa.

qRT-PCR – Real-time quantitative reverse transcription PCR.

SFO - Sulphydryl Fold Oxidase.

TC - Tiras Cruzadas.

TD - Tira-Disco.

TLA - Tlahuica β -lactamasa.

TP - Tiras Paralelas.

VEB - Vietnamese Extended-Spectrum β -lactamasa.

VIM - Verona Integron-encoded Metalo β -lactamasa.

VPN - Valor Predictivo Negativo.

VPP - Valor Predictivo Positivo.

2 INTRODUCCIÓN.

2.1 Microbiología y procesos infecciosos.

Las enfermedades infecciosas son patologías causadas por la invasión y multiplicación en los tejidos del organismo a causa de un patógeno. Las características de esta dependen de factores como las propiedades del microorganismo, la cantidad del inóculo y factores dependientes del huésped como la respuesta inmunitaria.

En la mayoría de los casos, estas infecciones están causadas por microorganismo que forman parte del microbioma del ser humano, donde colonizan regiones, como el tracto intestinal y genitourinario, la piel, las vías respiratorias, entre otras. Aquí, los microorganismos mantienen relaciones de simbiosis con el huésped, sin embargo, cuando existe una alteración en el equilibrio huésped-microorganismo se produce una infección (Palomo *et al.*, 2010).

Al inicio de los años XX estas enfermedades suponían las primeras causas de muerte entre la población. En la actualidad estas enfermedades son mucho menos mortales, sobre todo en los países desarrollados. Sin embargo, a pesar de la disminución de la mortalidad, siguen suponiendo un importante problema de salud debido a la reaparición de enfermedades que se creían controladas, así como también, el surgimiento de nuevas cepas de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos disponibles en la actualidad. Las bacterias que más preocupan en la actualidad son aquellas que se encuentran en la lista de patógenos de alta prioridad publicada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en el 2024, en la cual se encuentran 15 familias de patógenos resistentes a antibióticos, como las enterobacterias o las *Pseudomonas* spp. (World Health Organization, 2024).

Para el control de estas enfermedades es imprescindible las campañas activas de vacunación, junto con la mejora de las prácticas sanitarias, el uso correcto de agentes antimicrobianos, así como también la comprensión de los procesos de la enfermedad y una de las ciencias que se encargan de ello es la microbiología (Madigan, 2015).

La microbiología es una ciencia aplicada encargada del estudio de los microorganismos y cómo funcionan. Y concretamente, dentro de este campo de estudio la microbiología clínica es una disciplina interpretativa que se encarga del diagnóstico de las enfermedades infecciosas, siendo principalmente causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos; así como también los agentes antimicrobianos potencialmente efectivos para estas. Para dicho diagnóstico es esencial el aislamiento e identificación de los patógenos causantes. Anteriormente, para dicha identificación, se utilizaban métodos basados en rasgos fenotípicos o propiedades bioquímicas, que resultaban costosos y complejos, lo que dificultaba la correcta identificación de los microorganismos. Es por ello, que a lo largo de los últimos años han surgido tecnologías novedosas entre las que destacan la espectrometría de masas, MALDI-TOF y los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han transformado el campo de la microbiología clínica por su elevada sensibilidad y rapidez.

En el contexto de las infecciones bacterianas y fúngicas, uno de los objetivos fundamentales de la microbiología clínica tras el aislamiento e identificación del agente causal del proceso infeccioso, es evaluar la susceptibilidad a determinados antimicrobianos con el objetivo de determinar las opciones terapéuticas óptimas para dicha infección.

Para estos estudios de susceptibilidad antimicrobiana se emplean diferentes métodos entre las que destacan las técnicas de disco-difusión, la difusión con tiras de gradiente de E-test y la microdilución en caldo.

Finalmente, es fundamental la estrecha colaboración y la comunicación entre microbiólogo y médico acerca del diagnóstico microbiológico para que se realice de forma rápida y directa de modo que la instauración de la terapia para el paciente se inicie de forma precoz, lo que puede tener un impacto directo en la evolución clínica del paciente, la estancia hospitalaria y los costes asociados. Para ello en la gran mayoría de los hospitales emplean sistemas informáticos que facilitan al médico realizar un seguimiento de la muestra, a la vez que permita al laboratorio obtener toda la información del paciente para que el estudio de la enfermedad sea lo más personalizado posible. Para ello, es esencial una colaboración estrecha entre el médico y el laboratorio (Mühlhauser & Rivas, 2014).

2.2 Características microbiológicas de los microorganismos.

Los microorganismos son seres microscópicos unicelulares o multicelulares que se encuentran en la gran mayoría de los ecosistemas de nuestro planeta. En este grupo se incluyen las bacterias, virus, hongos y parásitos.

Centrándonos en las bacterias, estas son seres procariotas unicelulares con una gran diversidad morfológica que pueden encontrarse como parte de nuestro microbiota o bien puede ser patogénicas causando enfermedades. En cuanto a la morfología, las más comunes son las bacterias con forma redondeada (cocos), cilíndrica (bacilos), en forma de racimo de uva (estreptococos), en forma de cadena (estafilococos) o en forma de espiral (vibrios). A nivel estructural, al ser células procariotas, no tienen orgánulos y tampoco tienen un núcleo sino que tienen un nucleoide, que contiene el DNA circular libre en el citoplasma. Además tienen una pared celular común a todas las bacterias, pero cuya composición y estructura varía entre especies. En la superficie celular, estas pueden tener flagelos, que son filamentos proteicos propios de las bacterias móviles como los bacilos; o fimbrias, que son también filamentos proteicos de menor tamaño que intervienen en la adhesión celular. Además, algunas bacterias tienen una cápsula que se encuentra rodeando a la pared celular compuesta de polisacárido que dificulta su fagocitosis (Baron, 1996).

En cuanto a su clasificación, estas pueden dividirse en dos grandes grupos: la grampositivas y las gramnegativas. Esta distinción se basa en la reacción a la tinción de Gram debido a las diferencias en la estructura de la pared celular (Figura 1 y 2); en el cual las grampositivas se tiñen de morado mientras que las negativas se tiñen de rosa/rojo. Esto es así porque primero, tras fijar la muestra en un portaobjetos, se tiñe con cristal violeta seguido de yodo para formar el complejo con el colorante. Posteriormente se decolora la muestra con alcohol o acetona, de manera que el complejo permanece en las bacterias grampositivas. Sin embargo, se pierde el colorante de los gramnegativos. Estos microorganismos retienen el colorante safranina que es el que les da el aspecto rojo/rosa (Murray *et al.*, 2020).

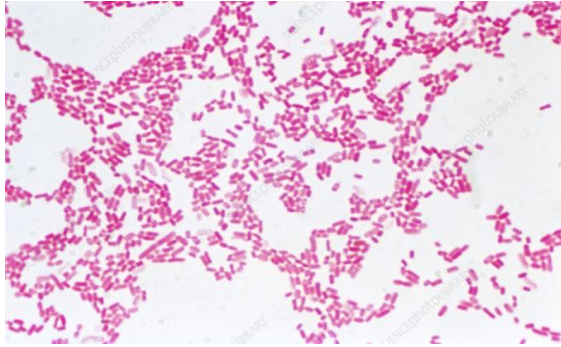


Figura 1. Imagen al microscopio óptico de *Escherichia coli* teñida con tinción de gram.

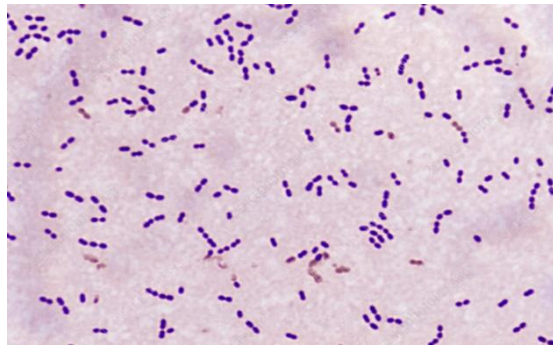


Figura 2. Imagen al microscopio óptico de *Streptococcus pneumoniae* teñida con tinción de gram.

La pared celular de ambas clases está compuesta por peptidoglicano formada por varias cadenas de 10 a 65 residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, las cuales se entrecruzan por puentes peptídicos, por la acción de unas enzimas denominadas Proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Sin embargo, existen diferencias respecto a la cantidad de peptidoglicano entre ambas clases. Respecto a la pared celular de las grampositivas, esta es mucho más gruesa y está compuesta mayormente por este peptidoglicano y polímeros como los ácidos teicoicos, que se unen covalentemente a este peptidoglicano. Mientras que la pared celular de la gramnegativas está formada por dos capas, una capa fina de peptidoglicano y una membrana externa más gruesa compuesta por lipopolisacáridos (LPS). Los LPS aportan resistencia a las gramnegativas y además son los responsables de la toxicidad para los animales; como es el caso de la *Salmonella* spp. o la *Escherichia* spp., que son enterobacterias que producen problemas gastrointestinales como consecuencia de la toxicidad de este lipopolisacárido, concretamente al lípido A (Madigan, 2015).

En este trabajo nos vamos a centrar en dos grupos de bacterias: las bacterias gramnegativas no fermentadoras (BGNNF) y las enterobacterias (ENTB).

En cuanto a las primeras, estas son un grupo de bacterias aerobias estrictas que se encuentran ampliamente distribuidas sobre todo en ambientes húmedos. Son agentes patógenos frecuentes de infecciones nosocomiales y patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos y sometidos a tratamientos invasivos. Este grupo puede causar una gran variedad de infecciones, como infecciones del sistema nervioso, del tracto urinario, otitis, artritis séptica, infectan heridas quirúrgicas, úlceras, entre otras. Además representan el 15% de todos los aislamientos en los laboratorios de microbiología. Un género para destacar es la *Pseudomonas* spp., que contiene más de 140 especies, la mayoría de las cuales son saprófitas. De entre sus especies, la más relevante a nivel hospitalario e infeccioso es la

Pseudomonas aeruginosa (Figura 3) que conforma un alto porcentaje de las infecciones oportunistas (Baron, 1996).

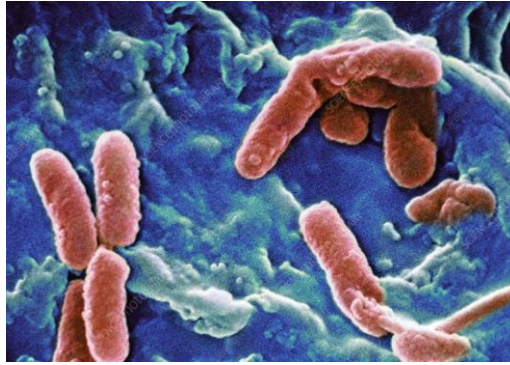


Figura 3. Imagen coloreada de microscopía electrónica de barrido de células de *Pseudomonas aeruginosa*.

En cuanto a las enterobacterias, son un grupo de bacterias anaerobias facultativas, fermentadoras, mayormente bacilos, que forman parte de la familia *Enterobacteriaceae* y que se encuentran formando parte de la microbiota de humanos y animales. La mayoría de las especies de esta familia son móviles y algunas están capsuladas. Algunas de las especies de esta familia son patógenas causando mayormente problemas gastrointestinales así como también infecciones del tracto respiratorio, urinario o sistémicas. Entre las ENTB más comunes en los procesos infecciosos destacan *Escherichia* spp. y *Klebsiella* spp.

La *Klebsiella* spp. es un enterobacteria inmóvil y capsulado. Este género se subdivide principalmente en dos complejos de especies, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* (Figura 4), en la cual nos centraremos. Esta última es una bacteria oportunista conocida por su diversidad de genes de resistencias a las sustancias antimicrobianas y es causante de una gran variedad de infecciones siendo la más destacada la neumonía nosocomial, especialmente en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos, enfermedades crónicas o que hayan recibido tratamiento con antibióticos de amplio espectro (Bridel *et al.*, 2021).



Figura 4. Imagen coloreada de Microscopía electrónica de barrido de células de *Klebsiella pneumoniae*.

Escherichia spp. es una enterobacteria anaerobia facultativa y móvil. De este género destaca *Escherichia coli* (Figura 5), que forma parte de la microbiota intestinal; sin embargo, al incorporar factores de virulencia codificados en plásmidos o ADN de bacteriófagos, se vuelven virulentas causando enfermedades, como la gastroenteritis, meningitis o ITU. Todas las cepas causantes de gastroenteritis se dividen en cinco grupos: enterotoxigénica, enteropatógena, enteroagregativa, productora de toxina Shiga y enteroinvasiva; de las cuales los tres primeros provocan una diarrea secretora que afecta al intestino delgado mientras que los dos últimos afectan al intestino grueso (Murray *et al.*, 2020).

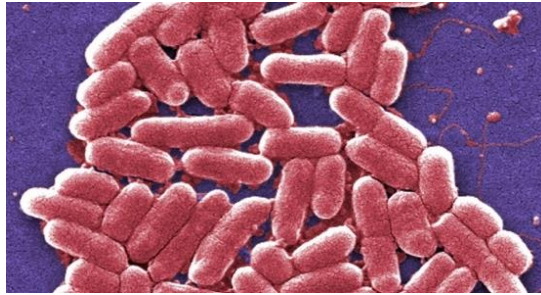


Figura 5. Imagen coloreada de microscopía electrónica de barrido de células de *E. coli* O157:H7.

2.3 Antibióticos.

Un antibiótico es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles. Estos se clasifican según su mecanismo de acción, estructura molecular y su espectro de actividad antimicrobiana.

Existen diferentes clases de antibióticos según su mecanismo de acción pero en este estudio nos vamos a centrar en los inhibidores de la síntesis de la pared celular, entre los cuales la mayoría de los antibióticos activos son los β -lactámicos. Estos antibióticos constituyen una extensa familia de antibióticos que pueden ser de origen natural o bien de semisintético, cuya función es inhibir el ensamblaje de la pared celular actuando sobre las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Todos estos antibióticos se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico, cuya composición varía según el antibiótico. De este gran grupo de antibióticos distinguimos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de β -lactamasas (Murray *et al.*, 2020).

2.3.1 Penicilina.

Centrándonos en el primer grupo de antibióticos, la penicilina, esta se puede obtener de forma sintética o bien de forma natural, a partir del cultivo del hongo *Penicillium chrysogenum*; del cual se obtiene el anillo β -lactámico que es fusionado con un anillo tiazolidínico (ácido 6-aminopenicilánico).

La forma de administración puede ser por vía oral o por administración intravenosa.

Las penicilinas de primera generación son las naturales, entre las cuales distinguimos la penicilina G y la penicilina V. Las primeras son inactivadas por el ácido gástrico por ello se administran de forma intravenosa, mientras que las segundas son más resistentes al ácido gástrico y se administra de forma oral. Estos antibióticos son activos frente a las grampositivas y los cocos gramnegativos, sin embargo tienen actividad limitada o escasa contra los estafilococos y bacilos gramnegativos.

Las penicilinas semisintéticas resistentes a la penicilinasasa, entre las cuales distinguimos la meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina, están en desuso debido al desarrollo de resistencias causado por estafilococo. Su espectro de actividad es similar a las penicilinas de primera generación, excepto que estas son activas frente a estafilococo.

Respecto a las penicilinas de amplio espectro, distinguimos la amplicilina (la primera que se obtuvo) y la amoxicilina. Estas presentan actividad contra cocos grampositivos similar a la de las penicilinas naturales y contra algunos bacilos gramnegativos, concretamente especies de *Escherichia*, *Proteus* y *Haemophilus* (Murray *et al.*, 2020)

2.3.2 Cefalosporinas y cefamicinas.

Las cefalosporinas y cefamicinas son antibióticos β -lactámicos derivados del ácido 7-aminocefalosporánico similares a la penicilina, obtenidos a partir del hongo *Cephalosporium*, que presentan un espectro antibacteriano extendido, junto con una mayor actividad frente a las bacterias gramnegativas y con una amplia resistencia a abundantes β -lactamasas. La diferencia entre ambos grupos de antibióticos radica en el anillo dihidrotiazínico, las cefamicinas presentan oxígeno en lugar de azufre (como es el caso de las cefalosporinas), lo que la hace más estable a la hidrólisis de las β -lactamasas (Murray *et al.*, 2020).

Podemos distinguir diferentes generaciones de las cefalosporinas:

Las cefalosporinas de primera generación (cefalexina, cefazolina) son antibióticos de corto espectro con actividad frente a un número restringido de bacterias gramnegativas; las cuales son *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Proteus mirabilis*. Estas pueden ser administradas de forma oral y parenteral y son una buena opción terapéutica para tratar infecciones causadas por especies uropatógenas comunitarias susceptibles a estos antibióticos. Las cefalosporinas de segunda generación (cefuroxima, cefoxitina) son antibióticos de amplio espectro con una actividad similar a los antibióticos de primera generación incluyendo además *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* y algunas especies de *Proteus*. Las cefalosporinas de tercera generación (cefixima, cefotaxima, ceftazidima, ...) son antibióticos de amplio espectro, mayoritariamente usados en la actualidad, que presentan una elevada actividad frente *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* (ceftazidima y cefoperazona). Los antibióticos de cuarta generación (cefepime) son antibióticos de espectro extendido los cuales presentan una actividad similar a los antibióticos de tercera generación. A diferencia de las de tercera generación, presentan una elevada estabilidad a las β -lactamasas tanto cromosómicas como plasmídicas; así como también, baja capacidad de inducir la producción de β -lactamasas cromosómicas. Estos antibióticos son de gran importancia puesto que presentan una alternativa terapéutica para el tratamiento de bacterias gramnegativas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación.

Cabe destacar que todas las generaciones son activos frente a cocos grampositivos sensibles a oxacilina (Mella M *et al.*, 2001).

2.3.3 Monobactámicos.

Se tratan de antibióticos monocíclicos de corto espectro, lo cual supone una ventaja puesto que esto permite tratar de manera específica infecciones sin alterar el microbioma normal del paciente. El primer monobactámico que se comercializó fue el aztreonam, obtenido a partir de *Chromobacterium violaceum*; y es activo únicamente frente a enterobacterias aerobias y *Pseudomona aeruginosa*. Actualmente es el único que se emplea para uso terapéutico.

Al inicio este antibiótico era estable a la hidrólisis por todas las β -lactamasas, sin embargo como consecuencia de la aparición de las BLEEs y la serina carbapenemasas lo hace menos efectivo por sí solo frente a las bacterias productoras de β -lactamasas multirresistentes. Sin embargo, al ser resistente a la hidrólisis por las MBLs, lo hace un buen candidato para tratar, junto con inhibidores de β -lactamasas, las infecciones causadas por estas bacterias multirresistentes (Bush & Bradford, 2016).

2.3.4 Carbapenémicos.

Son antibióticos β -lactámicos de amplio espectro, ampliamente prescritos en la práctica médica que tienen actividad frente a un gran número de microorganismos. El primer carbapenémico que se empleó para uso terapéutico fue el imipenem, el cual suele usarse para tratar infecciones causadas por bacterias grampositivas, gramnegativas, tanto aerobias y anaerobias, excepto los estafilococos resistentes a oxacilina, enterobacterias resistentes a β -lactámicos y algunas especies tales como *Burkholderia*, *Stenotrophomonas maltophilia* y algunas *Pseudomonas* (Murray *et al.*, 2020).

Actualmente existen otros carbapenémicos para uso terapéutico, que son el meropenem, ertapenem y doripenem, los cuales en general tienen actividad frente a los mismos microorganismos. Estos tres frente al imipenem destacan por una mayor estabilidad química, permitiendo que tengan una mayor vida útil y como consecuencia tiempos de administración más largos (Bush & Bradford, 2016).

En cuanto a su actividad antibacteriana, existen ciertas diferencias respecto a su eficiencia y potencia frente a ciertos grupos de bacterias. El meropenem es mucho más potente que el imipenem contra enterobacterias pero es menos activo frente a bacterias grampositivas y *Acinetobacter baumannii*. El ertapenem, a diferencia a los otros antibióticos, este no presenta actividad frente *Pseudomona aeruginosa* y tiene CMI muy bajos en enterobacterias. Doripenem tiene las menores CMI frente a *Pseudomona aeruginosa* y además es menos susceptible a la hidrólisis por carbapenemasas (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Cabe destacar que todos son resistentes a la mayoría de las β -lactamasas, excepto a las carbapenemasas.

2.3.5 β -lactámicos asociados a inhibidores de β -lactamasas.

Los inhibidores de las β -lactamasas, se tratan de antibióticos β -lactámicos formados por un anillo β -lactámico, que surgieron como consecuencia de la aparición de β -lactamasas. Estos inhibidores por sí solos tienen poca actividad antibacteriana es por ello por lo que se encuentran combinados con otros antibióticos β -lactámicos, y actúan uniéndose irreversiblemente a las β -lactamasas inactivándolas, permitiendo así que el antibiótico asociado actúe sobre la pared celular.

Distinguimos tres inhibidores de β -lactamasas con uso clínico, que son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, los cuales se unen a penicilinas y cefalosporinas. Las combinaciones más comunes son la ampicilina-sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima/avibactam, de entre estas destacan piperacilina/tazobactam y la ceftazidima/avibactam, que presentan una mayor actividad (Murray *et al.*, 2020).

2.4 Estudio de sensibilidad antibiótica.

La determinación de la sensibilidad antimicrobiana es de vital importancia en la microbiología clínica para conocer la adquisición de resistencias por diferentes microorganismos, así como también para poder predecir el éxito o el fracaso de las terapias antimicrobianas. Estos estudios, son pruebas *in vitro* que pretenden predecir el comportamiento de las bacterias *in vivo* frente a determinados antibióticos. Diferentes técnicas son empleadas actualmente, entre las cuales destacan aquellas basadas en cultivos, inmunocromatografía, técnicas moleculares y espectroscopía de masas, entre otras.

Respecto a las primeras se basan en la presencia o ausencia de crecimiento de un aislado bacteriano cultivado en presencia de un antibiótico para determinar su resistencia a este. Estas tecnologías ofrecen datos cualitativos (resistente, sensible o sensible a exposición incrementada) además de datos cuantitativos en forma de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja (en mg/L) de antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana (Maugeri *et al.*, 2018)

Estas técnicas de cultivo, podemos clasificarlas en manuales (difusión en agar, difusión en disco, prueba de gradiente o microdilución) y automáticas. Respecto a la difusión en agar, esta es realizada en placas Petri con agar Mueller-Hinton suplementado con una determinada dilución de antibiótico en la cual se pueden testar el crecimiento o la ausencia de este, de hasta 36 inóculos por placa. Respecto a la difusión en disco, esta también se realiza en una placa con agar Mueller-Hinton en la cual se disponen en su superficie discos de papel impregnados con determinado antibiótico, alrededor del cual aparecen un halo de inhibición que se mide para determinar la resistencia o sensibilidad. El inconveniente de esta técnica es que solo nos ofrece datos cualitativos, no nos aporta los datos de la CMI. Respecto a la prueba de gradiente esta es similar a la anterior sin embargo sí que ofrece el valor concreto de la CMI. Respecto a las microdiluciones, en estas se testan diferentes concentraciones de antibiótico en diluciones seriadas del inóculo de manera que midiendo la turbidez podemos saber si ha habido crecimiento y su CMI. Esta metodología se ha automatizado para aportar facilidad en la incubación e interpretación de los resultados. Entre estos sistemas de microdilución automatizados destaca el sistema MicroScan WalkAway (Maugeri *et al.*, 2018).

Los resultados de halos de inhibición o CMI obtenidos en el estudio de sensibilidad son utilizados para la interpretación del antibiótico como resistente, sensible o sensible a exposición incrementada. Para ellos los laboratorios de Microbiología utilizan los puntos de corte estandarizados establecidos por comités internacionales como nacionales, entre los que destacan European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

En cuanto a las técnicas moleculares, estas se basan en la PCR y la qRT-PCR. En ambos casos, el primer paso es la extracción de ADN bacteriano para ello se debe lisar la célula, eliminar las proteínas y otros restos celulares que contaminen la muestra. Posteriormente, se le añade alcohol para precipitar el ADN y una vez finalizado este paso el ADN se lava y se disuelve en una solución tampón para llevar a cabo la PCR (Figuerola *et al.*, 2007).

En cuanto a la PCR, esta se emplea para la detección de genes de las β -lactamasas y carbapenemasas en la familia *Enterobacteriaceae*, mediante la hibridación de los amplicones obtenidos mediante esta técnica. Esta técnica tiene una gran sensibilidad y especificidad sin embargo su principal inconveniente es que en algunos casos la presencia de estos genes no implica su expresión.

En cuanto a la qRT-PCR, esta se emplea para detectar el crecimiento de bacterias en presencia de determinados antibióticos, mediante la detección de regiones génicas altamente conservadas. El principal inconveniente de esta técnica se encuentra en la no limitación de dicho estudio a las células viables, puesto que esto lleva a una sobreestimación de células viables dando lugar a falsos positivos (Maugeri *et al.*, 2018).

En cuanto a las técnicas de espectroscopía de masas, como el MALDI-TOF, esta técnica se puede emplear también para el estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante la interpretación del espectro obtenido. Este método se ha empleado para detectar carbapenemasas en bacterias gramnegativas, incubando aislados de estas junto con carbapenémicos, concretamente ertapenem (Maugeri *et al.*, 2018). Este enfoque se ha usado también para detectar BLEEs y AmpCs en enterobacterias, añadiendo a aislados de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación, inhibidores de las β -lactamasas y cefalosporinas; estudiando también su sinergismo (Correa-Martínez *et al.*, 2019).

Sin embargo esta técnica no es del todo precisa puesto que no detecta otros mecanismos de resistencia, como las alteraciones en las porinas o la regulación positiva de las bombas de flujo (Maugeri *et al.*, 2018).

Por último, respecto a las técnicas inmunocromatográficas, estas son ampliamente usadas en laboratorios debido a sus evidentes ventajas, siendo estas su económico precio, su sencillez y la rapidez, puesto que en 20 minutos se pueden obtener los resultados. Esta técnica se basa en la migración de la muestra por capilaridad sobre una membrana de nitrocelulosa detectando las enzimas bacterianas responsables de la hidrólisis de los antibióticos como resultado de la unión de dichos antígenos al anticuerpo fijado. Actualmente se han comercializado dos inmunocromatográficas capaces de detectar carbapenemasas tipo OXA-48 y KPC con una sensibilidad y especificidad muy elevada, casi del 100% (March-Rosselló, 2017).

2.5 Resistencias antibióticas a β - lactamasas.

El surgimiento de los antibióticos supuso una revolución en la medicina moderna permitiendo erradicar algunas enfermedades, así como también llevar a cabo numerosas operaciones quirúrgicas que antes eran impensables debido al riesgo de infección. Esto permitió como consecuencia, aumentar la esperanza de vida de la población. Sin embargo la adquisición de resistencias a los antibióticos actuales está dificultando el avance terapéutico siendo este uno de los problemas de salud más graves en la actualidad y en el futuro más próximo (Huemer *et al.*, 2020).

La resistencia antibiótica es la capacidad de los microorganismos de crecer a altas concentraciones de un antibiótico. Esta capacidad puede ser intrínseca a este o puede ser adquirida mediante transferencia horizontal o mutaciones genéticas como consecuencia de la selección positiva (Munita & Arias, 2016).

Concretamente, centrándonos en la resistencia adquirida por las bacterias frente a los antibióticos β -lactámicos, como consecuencia de alteraciones genéticas, los tres mecanismos principales son: la disminución de la concentración del antibiótico en la diana de la pared celular, alteraciones en la unión del antibiótico a las proteínas fijadoras de penicilina o por la acción de β -lactamasas.

El primer mecanismo es debido a unos poros que se encuentran en la membrana externa que permite la penetración de los antibióticos β -lactámicos a través de la pared celular. Estos poros están compuestos por porinas, los cambios en estas pueden cambiar el tamaño del orificio del poro o la carga de estos canales provocando la exclusión del antibiótico. Además, un flujo o bombeo de salida activo del antibiótico puede disminuir la concentración de antibiótico en la célula.

El segundo mecanismo puede estar debido a la sobreexpresión de las proteínas fijadoras de penicilina, la aparición de nuevas proteínas fijadoras de penicilina (resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*), la modificación de proteínas fijadoras de penicilina existentes por recombinación (resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae*) o una mutación puntual (resistencia a penicilina en *Enterococcus faecium*).

Centrándonos en este último, las β -lactamasas son el mecanismo principal de las bacterias gramnegativas que inactivan los antibióticos β -lactámicos hidrolizando el anillo β -lactámico. Distinguimos más de 200 β -lactamasas, las cuales se clasifican en cuatro clases: A, B, C y D basadas en la identidad de la secuencia aminoacídica. Las de la clase A, C y D son serina-proteasas debido a la presencia del aminoácido serina en el sitio activo; mientras que la B son metaloproteasas puesto que su sitio activo contiene una o dos moléculas de Zinc (Munita & Arias, 2016).

Clase A: BLEE (β -lactamasas de espectro extendido).

Las BLEE, las cuales se encuentran codificadas en los plásmidos, confieren resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación y al aztreonam; sin embargo, son sensibles a los carbapenémicos, cefamicinas e inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico. Además suelen presentar resistencias a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas, debido a que los genes que codifican para las BLEE se transmiten junto a otros genes que otorgan resistencia a otros antibióticos (Cercenado *et al.*, 2020).

Dentro de esta clase, los tres grupos principales TEM, SHV y CTX-M y otras menos frecuentes como son PER, GES, VEB, BES, BEL, TLA y SFO. Las BLEE TEM y SHV son derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1 de menor espectro de hidrólisis; mientras que las BLEE CTX-M son derivadas de enzimas cromosómicas de *Kluyvera* spp. (Astocondor-Salazar, 2018).

Estas se encuentran mayoritariamente en diferentes especies de *Enterobacteriaceae*, mayormente en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, causando brotes epidémicos tanto hospitalarios como comunitarios (Gobernado, 2005).

Su prevalencia ha ido aumentando con el paso de los años, destacando sobre todo las BLEE de tipo CTX-M casi sustituyendo a los tipos TEM y SHV (Cercenado *et al.*, 2020).

Mayoritariamente se han detectado en pacientes con enfermedades previas e inmunodeprimidos a los cuales se le han administrado durante largos periodos de tiempo antibióticos como cefalosporinas o quinolonas. Las infecciones causadas por estas bacterias son mayormente urinarias, neumonía o meningitis, aunque también pueden encontrarse como bacterias colonizadoras con elevado riesgo de transmisión (Gobernado, 2005).

La detección de estas en el laboratorio se ha basado en su mayoría en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico, mediante la técnica de difusión con disco, o bien mediante la técnica de difusión en gradiente con tiras de cefalosporinas/ácido clavulánico. (Cercenado *et al.*, 2020). Actualmente, con la aparición de las técnicas inmunocromatográficas, ha permitido la detección de esta clase de β -lactamasas de forma rápida y con una elevada sensibilidad.

CLASE B: MBL (Metallo β -lactamasas).

Dentro de este gran grupo, se subdividen en tres subclases: B1, B2 y B3, de las cuales las enzimas que pertenecen a la subclase B1 y B3 presentan en su sitio activo dos iones de zinc y un amplio espectro de actividad actuando sobre penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Sin embargo las enzimas que pertenecen a la subclase B2 presentan en su sitio activo un ion de zinc activo y actividad sobre las cefalosporinas únicamente. (Wu *et al.*, 2019). Común a ambas subclases, estas son resistentes al ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y avibactam, así como también por las sulfonas del ácido penicilánico y los diazabiciclooctanos (Boyd *et al.*, 2020).

Se han encontrado numerosas enzimas de diferentes subclases pero en su mayoría las MBL pertenecen a la subclase B1; de las cuales las más comunes e importantes son: IMP (imipenemasa), VIM (metallobeta-lactamasa codificada por integrones de Verona) y NDM (metallobeta-lactamasa de Nueva Delhi) (Wu *et al.*, 2019).

Estas se encuentran codificadas en plásmidos y mayormente presentes en numerosas Enterobacteriales, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, y tienen actividad frente a todos los antibióticos β -lactámicos excepto a los monobactámicos, como es el caso del aztreonam. Además, estas bacterias presentan adicionalmente resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos o fluoroquinolonas, debido a que los genes que codifican para la resistencia frente a estos antibióticos se expresan en conjunto (Boyd *et al.*, 2020).

Aunque cabe destacar que se han encontrado, en el caso de NDM, incongruencias respecto a la resistencia *in vivo* e *in vitro* frente a las carbapenémicos, siendo *in vitro* las bacterias productoras de esta MBL menos resistentes a los carbapenémicos *in vitro*. Esto se cree que pueda ser debido a que las pruebas de sensibilidad antibiótica se llevan a cabo en medios ricos en zinc, sin embargo esto no ocurre en el huésped *in vivo*. Esta privación del ion zinc en el huésped interfiere en el correcto plegamiento y en la actividad catalítica del enzima, así como también promueve la degradación del enzima en el periplasma. Sin embargo, esto no ocurre con el resto MBL.

Por el contrario, las enzimas que pertenecen a la subclase B2 y B3 están codificadas cromosómicamente, como es el caso de L1 *Stenotrophomonas maltophilia* o Sfh-1 de *Serratia fonticol*. Sin embargo, existen algunas excepciones como es el caso de la enzima AIM-1 de *Pseudomonas aeruginosa* codificada por un gen insertado procedente de *Klebsiella pneumoniae* (Boyd *et al.*, 2020).

Las MBL son inhibidas por quelantes metálicos como EDTA y ácido dipicolínico (Astocondor-Salazar, 2018).

CLASE C: AmpC

Las AmpC o cefalosporinasas hidrolizan las penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de primera y segunda generación, y en menor medida a las de tercera generación; sin embargo, no tienen actividad frente a las de cuarta generación y carbapenémicos. Estas son inhibidas por el aztreonam, cloxacilina y el ácido borónico y derivados (Cercenado *et al.*, 2020).

La producción de las AmpC puede darse por tres mecanismos: resistencia cromosómica inducible (presente en algunas bacterias como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*), resistencia cromosómica no inducible (presente en algunas bacterias como *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*) o resistencia plasmídica (presente en algunas bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*) (Tamma *et al.*, 2019).

En el caso de la primera, las AmpC cromosómica inducible, la expresión del gen de AmpC es bajo, por el contrario como consecuencia de la exposición a un inductor, como son los β -lactámicos, se derreprimen sobreexpresando AmpC. Es por ello por lo que deben evitarse los β -lactámicos como tratamiento para evitar la derrepresión de AmpC inducibles. La derrepresión puede ser total o parcial.

En el caso de las AmpC cromosómicas no inducibles, los niveles basales de expresión son bajos pero como consecuencia a una mutación en atenuadores o promotores, los genes que codifican para estas enzimas se encuentran sobreexpresados. Por último, la resistencia plasmídica es adquirida por transferencia horizontal de genes cromosómicos de otras bacterias (Tamma *et al.*, 2019). De este último grupo, se clasifican en seis familias: CIT (derivada de *Citrobacter freundii*), DHA (derivada de *Morganella morganii*), ACC (derivada de *Hafnia alvei*), FOX (derivada de *Aeromonas media*), MOX (derivadas de *Aeromonas caviae*), EBC (derivada de *Enterobacter cloacae*) (Cercenado *et al.*, 2020).

Clase D: OXA.

Estas β -lactamasas, codificada en plásmidos, tienen actividad frente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y además una resistencia menor a amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam. Asimismo, estas β -lactámicos están caracterizadas por una sensibilidad reducida frente a cefepime, que sumado a la inhibición que sufren por el ácido clavulánico, se observa sinergia entre estos dos antibióticos (característico de OXA-1) (Navarro *et al.*, 2011).

Cabe destacar que algunas variantes también son capaces de hidrolizar carbapenémicos como son OXA-23 y la OXA-58, entre otras (Cercenado *et al.*, 2020).

Destaca la OXA-48, productora de carbapenemasas debido a su elevada mortalidad como también por sus escasas opciones terapéuticas. Los brotes de esta carbapenemasa suelen estar producidos por *Klebsiella pneumoniae*, aunque también se han detectado en otras cepas, tales como *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli* (Galan-Sanchez *et al.*, 2012).

2.6 Estudio de sinergismo.

La administración de varios antibióticos como tratamiento es una práctica cada vez más extendida cuyo fin es el tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos multirresistentes, disminución del tiempo de tratamiento y de la dosis de ambos tratamientos evitando la toxicidad de estos. Es por ello, que el estudio de las interacciones entre antibióticos es de gran importancia.

Los antibióticos, *in vitro*, pueden interactuar de diferentes maneras:

Sinergia, interacción positiva en el que la actividad de ambos antibióticos juntos es potenciada, siendo mucho mayor que la actividad de ambos por separado. Esta no debe confundirse con la **adición**, en el que la actividad de ambos antibióticos en conjunto es el sumatorio de la actividad de los antibióticos por separado, sin ser potenciada. Al contrario, el **antagonismo**, es una interacción negativa en el cual la actividad de ambos antibióticos en conjunto es menor que la esperada por separado. Y por último, **la indiferencia**, cuya actividad de ambos antibióticos en conjunto es la actividad del antibiótico más activo.

Existen diferentes métodos para evaluar la interacción entre antibióticos, ellos son: los métodos tradicionales (en los cuales nos vamos a centrar), métodos farmacocinéticos y otras técnicas con potencial aplicación, como la citometría de flujo (Cercenado *et al.*, 2020).

2.6.1 Método tradicional.

Existen diferentes métodos tradicionales para el estudio de sinergias, entre ellos destacamos: el método del tablero, las curvas de letalidad, los métodos de gradiente y los de dilución.

El método del tablero estudia la actividad *in vitro* de la combinación de dos antibióticos a diferentes concentraciones, que se encuentran dentro de un rango establecido a partir de la CMI. Para ello se emplean placas (microtitulación), tubos (macrotitulación) o placas de agar en el que en cada pocillo/tubo contiene una determinada dilución. Estas diluciones seriadas se realizan de la siguiente manera, una misma fila de una placa tiene la misma dilución para el antibiótico A y una misma columna tiene la misma dilución para el antibiótico B, obteniendo así en cada pocillo combinaciones únicas de ambas concentraciones (Figura 6) (Cercenado *et al.*, 2020).

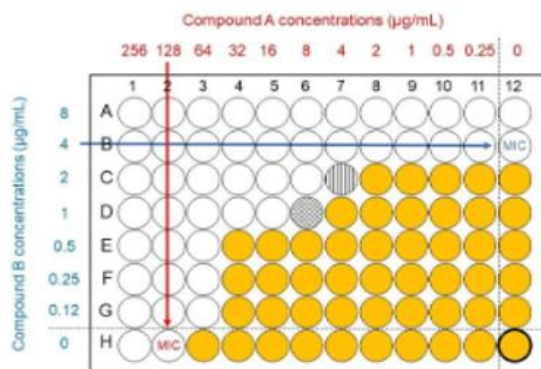


Figura 6. Representación del método del tablero.

De este método se obtiene tanto la CMI de los antibióticos como la relación de la interacción entre ambos antibióticos. Sin embargo, esta técnica no es del todo adecuada puesto que no está estandarizada y es muy costosa. Además, las CMIs que se usan como referencia no están validadas por EUCAST y CLSI para combinaciones de antibióticos.

Respecto a la segunda, las curvas de letalidad miden la cinética de muerte bacteriana estudiado en un periodo de tiempo, normalmente 24 horas (Figura 7). Para ello se toman alícuotas del inóculo y se siembran en un medio sólido, finalmente pasadas las 24 horas se hace un recuento de las colonias que quedan viables tras su exposición a una determinada concentración de antibiótico (CMI). Esta técnica permite observar la dinámica de muerte y la interacción entre ambos antibióticos; sin embargo tiene ciertas limitaciones para la extrapolación de los resultados *in vitro* a *in vivo* (Cercenado *et al.*, 2020).

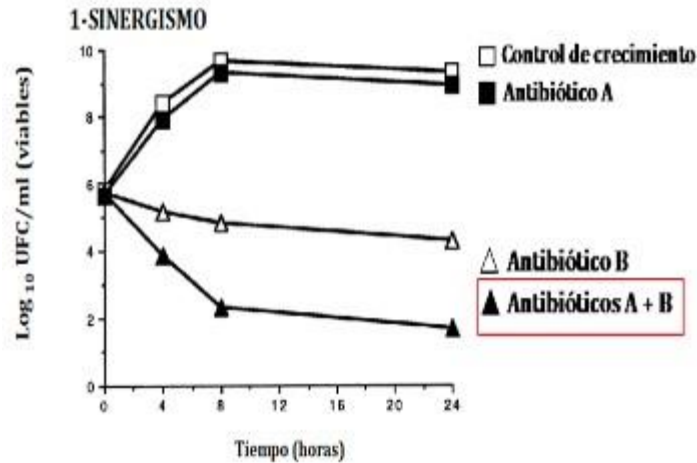


Figura 7. Representación de una curva de muerte de un microorganismo frente a una combinación de antibióticos con actividad sinérgica.

Ambas técnicas son tediosas y costosas en tiempo es por ello las técnicas más empleadas en los laboratorios de microbiología son las tiras de gradiente y los métodos basados en dilución, a pesar de que estos métodos no están estandarizados, numerosos artículos publicados determinan el proceso a realizar. Estos métodos son más rápidos y sencillos que los anteriores o que hace que se hayan instaurado en la rutina de trabajo en los laboratorios de microbiología (Cercenado *et al.*, 2020).

2.6.1.1 Método tiras de gradiente.

Estas tiras son soportes de plástico no poroso o de papel impregnados con un antibiótico con una escala de 15 diluciones seriadas que permite determinar la CMI de cada antibiótico (Figura 8).



Figura 8. Imagen de una tiras de gradiente.

Existen diferentes métodos basados en las tiras de gradiente, entre los que destacan el método de tiras cruzadas (TC), el método de las tiras paralelas (TP) y el método tira-disco (TD).

El primero de ellos es el más estandarizado, ya que permite, a partir de sus resultados, el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (iCIF) mediante el cual podemos clasificar la interacción de los dos antibióticos evaluados en 4 categorías: sinergia, adición, indiferencia y antagonismo. Para ello, es necesario conocer las CMI de cada antibiótico y las CMI de la interacción de ambos antibióticos. Para conocer estas, se cruzan las dos tiras de gradiente en el punto de la CMI de cada antibiótico obtenida por separado (Figura 9) (Cercenado *et al.*, 2020).

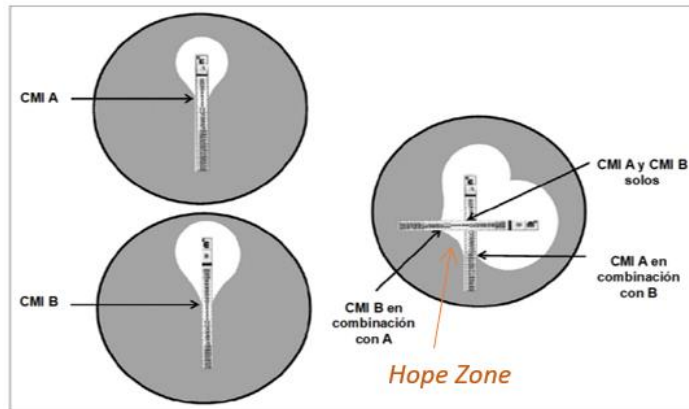


Figura 9. Representación de método de tiras cruzadas (TC).

El halo de inhibición producto de la combinación de ambos antibióticos se denomina Hope Zone y nos determina las nuevas CMI para cada antibiótico. A partir de estos resultados se puede calcular este índice iCIF en el que un valor de $\leq 0,5$ indica sinergia, de 0,6-1 adición, de 1,1-4 indiferencia y superior a 4 antagonismo (Cercenado *et al.*, 2020).

$$\text{CIF TOTAL} = \text{iCIF} = \text{CIF A} + \text{CIF B} = (A/\text{CMI A}) + (B/\text{CMI B})$$

Fórmula 1. Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional.

El problema de esta técnica es que requiere un mínimo de 48h para conocer el resultado. Por ello han surgido métodos como las tiras paralelas y el método de la tira-disco que, pese a no estar estandarizados, nos permiten conocer el resultado en 24h.

El método de las TP se basa en poner en contacto las tiras de gradiente de los dos antibióticos para observar si mediante su interacción existe una resensibilización de alguno de ellos (Figura 10). Esto ocurre si hay una disminución de 3 diluciones en la CMI con respecto a las que tenía ese antibiótico en solitario. Para ello es necesario conocer previamente la CMI de ambos antibióticos por separado (Cercenado *et al.*, 2020).

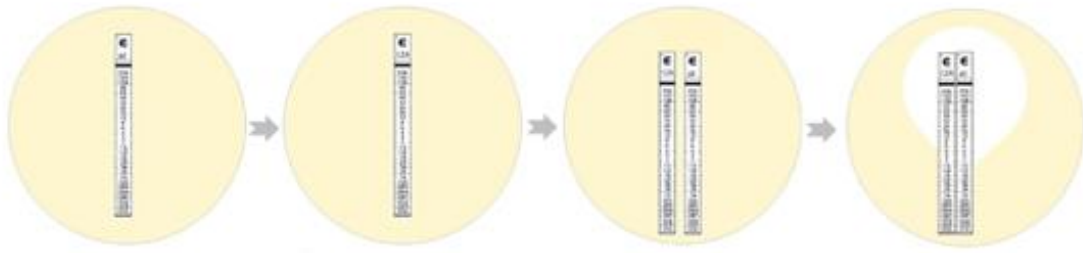


Figura 10. Representación de método de tiras paralelas (TP).

Por otro lado, en el método de la TD, la interacción se realiza utilizando una tira de gradiente de uno de los antibióticos y dos discos del otro. Uno de estos se encuentra en contacto con la tira de gradiente a una distancia de 1,5 cm y el otro alejado de ella (Figura 11). El efecto sinérgico se puede visualizar desde un punto de vista cualitativo con la presencia de un halo de inhibición en forma de D invertida entre la tira de gradiente de un antibiótico y el disco del otro antibiótico que está en contacto o desde el punto de vista cuantitativo mediante el incremento de >5 mm del halo de inhibición entre el disco que no está en contacto con la tira de gradiente y el que sí (Taha *et al.*, 2023).

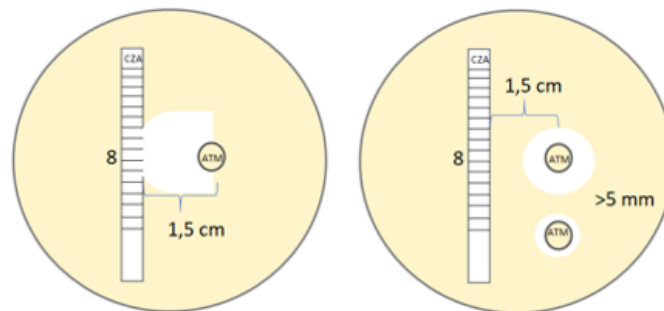


Figura 11. Representación de método de tira-disco (TD).

2.6.1.2 Métodos basados en dilución.

Esta novedosa técnica es actualmente de las más empleadas en los laboratorios de microbiología permitiendo el estudio múltiple de antibacterianos, debido a su sencillez y a su adaptabilidad a numerosos estudios; sin embargo, presenta importantes limitaciones tales como la falta de estandarización y la información que aporta, siendo esta técnica semicuantitativa ya que no ofrece información sobre la CMI (Navarro & Mirelis, 2007).

Para este método se preparan cuatro tubos con 2 ml caldo Mueller-Hinton o caldo cerebro-corazón (CC) junto con 12 μ l de una suspensión bacteriana de 0,5 McFarland, a los que se les añaden una combinación diferente de discos de antibióticos (Figura 12):

- Tubo control: sin antibiótico
- Tubo reacción: antibiótico A + antibiótico B
- Tubo antibiótico A
- Tubo antibiótico B

La determinación del efecto sinérgico se realiza de forma visual si existe crecimiento en todos los tubos excepto en el tubo reacción, aunque también se puede determinar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano mediante la identificación bacteriana por espectrometría de masas MALDI-TOF MS o la medida de la turbidez determinada por los estándares de McFarland.

Recientemente, el CLSI ha propuesto un método provisional en su edición de 2024 para la detección del efecto sinérgico entre ceftazidima/avibactam (CZA-AVI) y aztreonam (ATM), opción terapéutica utilizada en las infecciones producidas por bacterias productoras de metalo β -lactamasas. En este, determinan que se deben preparar 4 tubos con 12 μ l de una suspensión bacteriana (0,5 McFarland) y 2 ml del caldo Mueller-Hinton, en el cual a un tubo se le añade solo CZA-AVI, a otro solo ATM, a otros ambos discos de antibióticos y al último no se le añade nada puesto que es el control de crecimiento. Para observar el efecto del sinergismo, se testa con el MALDI-TOF la presencia de la cepa bacteriana que se está evaluando. En el caso de que haya sinergismo en todos los tubos sería posible la identificación correcta de dicha cepa mientras que en el tubo en el cual ambos antibióticos están presentes no debería ser posible su identificación (Bakthavatchalam *et al.*, 2022).

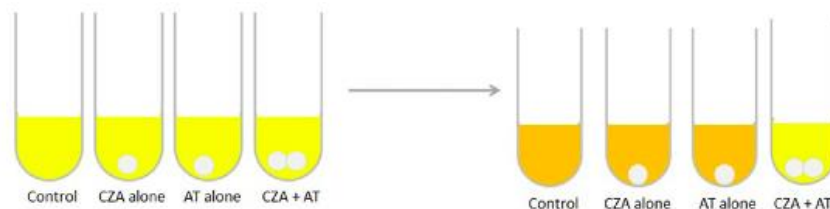


Figura 12. Representación del método de elución con disco (ED).

2.6.2 Ceftazidima/avibactam y aztreonam.

El objetivo de la combinación de ambos antibióticos como posible tratamiento de bacterias productoras de metalo β -lactamasas es debido al espectro de actividad de estos.

El aztreonam, el cual es estable a la hidrólisis por las metalo β -lactamasas, sería en principio un buen tratamiento frente a bacterias productoras de metalo β -lactamasas. Sin embargo, muchas de estas bacterias también son productoras de serinas β -lactamasas de clase A y C, a las cuales el aztreonam es susceptible de hidrólisis; siendo este antibiótico ineficiente como monoterapia (Wilhelm *et al.*, 2023). Por otro lado, el avibactam tiene un amplio espectro de actividad frente a las β -lactamasas de clase A, D y C, pero no presenta actividad frente a las metalo β -lactamasas. Es por ello que, la combinación de ambos antibióticos, aztreonam con

ceftazidima/avibactam sería una buena opción de tratamiento para las infecciones causadas por bacterias productoras de metalo β -lactamasas, destacando el orden Enterobacteriales y *Stenotrophomona maltophilia* (Wenzler *et al.*, 2017).

Cabe destacar que esta combinación solo presenta utilidad clínica frente infecciones causadas por enterobacterias que expresan metalo β -lactamasas. Sin embargo, en el caso de infecciones causadas por *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas esta combinación puede ser menos efectiva como consecuencia del mecanismo de resistencias por bombas de eflujo y la hiperexpresión de β -lactamasas ampC frente al aztreonam, disminuyendo su efectividad (Bakthavatchalam *et al.*, 2022).

Se ha visto que la ceftazidima no tiene un efecto adicional *in vitro* e *in vivo* en esta combinación de antibióticos, por lo que recientemente ha sido aprobado por la FDA el nuevo antibiótico aztreonam/avibactam (AZA). (Vlaspolder *et al.*, 2023) EUCAST ya ha establecido puntos de corte de interpretación de sensibilidad/resistencia para realizar mediante tiras de gradiente, pero solo para Enterobacterias por el momento (≤ 4 mg/L).

3 OBJETIVOS.

El objetivo de este trabajo es analizar el grado de concordancia que presentan los métodos de tiras paralelas, tira-disco y elución con disco para determinar el efecto sinérgico entre ceftazidima/avibactam y aztreonam en aislamientos de *Pseudomonas* spp. y Enterobacterias productoras de metalo- β -lactamasa utilizando como método de referencia las tiras cruzadas.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Aislados bacterianos.

Para este trabajo se han empleado 78 cepas bacterianas criopreservadas en el servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia procedentes de muestras clínicas de pacientes atendidos en el Departamento de Salud Clínico-Malvarrosa entre enero de 2017 y diciembre de 2023. Estos aislamientos bacterianos utilizados corresponden a Enterobacterias (28) y *Pseudomonas* spp. (50) productoras de carbapenemasa de clase B (metalo β -lactamasas); junto con otros aislados pertenecientes a estudios de colonización (axilar-rectal, faríngeo y/o nasal).

Cabe destacar que para llevar a cabo este estudio se ha obtenido el consentimiento informado de los pacientes para el uso de las muestras clínicas en este estudio.

4.2 Ensayos para realizar estudios de sensibilidad y detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Previamente a la realización de los estudios de sinergismo, todas estas cepas bacterianas han sido identificadas y caracterizadas en el momento de su aislamiento. Para ello, en el laboratorio de Microbiología se utilizó el sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, USA) para la identificación y el sistema semiautomatizado de microdilución en caldo MicroScan WalkAway plus (Beckman Coulter, USA) para los estudios de susceptibilidad antibiótica utilizando los paneles NM44. Para la caracterización y confirmación del mecanismo de resistencia detectado en los estudios de sensibilidad antibiótica se utilizaron, directamente de la colonia aislada, la técnica inmunocromatografía NG-Test Carba 5 (NG-Biotech Laboratories, Francia) que permite la detección de las carbapenemasas más prevalentes (VIM, IMP, NDM, OXA-48 y KPC) y el ensayo de microarrays de ADN MDR Direct Flow Chip (Máster Diagnóstica, Granada, España) que permite la detección de una gran cantidad de genes de resistencia a los antimicrobianos entre los que se incluyen las carbapenemasas de clase B tipo SIM, GIM, SPM, NDM, VIM e IMP (Torres Fink *et al.*, 2019).

4.3 Estudio de sinergismo entre CAZ-AVI y ATM.

Para cada cepa incluida en el estudio, se ha evaluado el efecto sinérgico entre ceftazidima/avibactam y aztreonam mediante los cuatro métodos mencionados anteriormente: el método de las tiras cruzadas, el método de las tiras paralelas, el método de tira-disco y el método de dilución. Para los métodos basados en tiras de gradiente de concentración (E-test, Liofilchem). Primeramente se prepara una suspensión bacteriana de 0,5 McFarland (equivalente aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ ufc/ml), la cual es sembrada en un agar Mueller Hinton (BD Mueller Hinton Agar). Dependiendo del método, las tiras de gradiente de concentración se disponen de manera diferente. En el caso del método basado en TP estas se colocan contiguamente; en el caso del método basado en TC estas se intersectan en el punto de las CMIs de CZA-AVI y ATM y en el método basado en TD se pone la tira de gradiente de CZA-AVI y el disco de ATM a la altura del punto de corte de CZA-AVI a una distancia de 1,5 cm. Respecto al método basado en dilución, se prepara la suspensión de 0,5 McFarland en caldo CC, al cual se le añade los discos de ATM y CZA-AVI de Oxoid (Thermo Scientific™). Pasado el tiempo de incubación, se evalúa como se ha explicado anteriormente el efecto sinérgico de las diferentes técnicas comparando los resultados empleando el método TC como *Gold Standard*.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para llevar a cabo este trabajo se analizaron 78 cepas, de las cuales 50 (64,1%) de ellas pertenecen al género *Pseudomonas* spp. y 28 (35,9%) bacterias a la familia *Enterobacteriaceae*. De las 50 cepas de *Pseudomonas* spp., 47 fueron pertenecientes a las especies *Pseudomonas aeruginosa* y 3 a *Pseudomonas putida* siendo en 47 de las 50 productoras de metalo β -lactamasa de tipo VIM, en 2 casos de tipo NDM y en 1 casos que presentaba ambas carbapenemasas. Dentro de las 28 Enterobacterias, se incluyeron 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 8 de *Escherichia coli*, 6 del complejo *Enterobacter cloacae* y 2 del género *Citrobacter* spp., siendo 17 productoras de carbapenemasa tipo NDM y 11 de tipo VIM (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución de las cepas bacterianas productoras de metalo β -lactamasas utilizadas y los marcadores de resistencia detectados.

Microorganismo (n)	Marcador resistencia	N.º aislados (%)
BGNMF (50)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (47)	VIM	46 (59)
	VIM + NDM	1 (1,3)
<i>Pseudomonas putida</i> (3)	VIM	2 (2,6)
	NDM	1 (1,3)
Enterobacterales (28)		
<i>Citrobacter</i> spp. (2)	VIM	1 (1,3)
	ampC + NDM	1 (1,3)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex (6)	VIM	3 (3,8)
	NDM	3 (3,8)
<i>Escherichia coli</i> (8)	VIM	1 (1,3)
	BLEE + NDM	6 (7,7)
	KPC + NDM	1 (1,3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (12)	VIM	2 (2,6)
	ampC + VIM	1 (1,3)
	BLEE + VIM	3 (3,8)
	BLEE + NDM	5 (6,4)
	KPC + NDM	1 (1,3)
BGNMF, bacilos Gram-negativos no fermentadores; BLEE β -lactamasa de espectro extendido		

5.1 Estudios de sinergismo.

Para cada cepa estudiada se realizó un estudio de sinergismo mediante los cuatro métodos mencionados anteriormente: el método de las tiras cruzadas, usado como método de referencia, el método de las tiras paralelas, el método de tira CZA – Disco ATM y el método de elución con disco. Previamente a la realización de de estos métodos, para la correcta interpretación de los resultados, se adquirieron las CMI de todas las cepas a CZA y ATM; así como también se testó aztreonam-avibactam mediante tiras de gradiente (E-test).

5.2 Estudios de sinergismo para *Pseudomonas* spp.

Centrándonos primeramente en las *Pseudomonas* spp., acorde al método de referencia de TC en 9 (18%) de las cepas estudiadas se detectó efecto sinérgico (la mediana de iCIF 0,5; rango 0,1-0,5), siendo todas ellas *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemas tipo VIM. De acuerdo con este método, se observó el valor de una mediana de CMI frente a CZA de 24 mg/L (16-256) y para el ATM de 12 mg/L (1,5-24). Adicionalmente, en las 41 cepas restantes (82%), no se detectó efecto sinérgico según este método; de las cuales 34 (68%) de ellas presentaron un resultado de adición (mediana iCIF 0,8; rango 0,6-1) y 7 (14%) de ellas de indiferencia (mediana iCIF 1,5; rango 1,2-2). En el caso de estas cepas, la mediana de CMI para CZA es 16 mg/L (4-256) y para ATM de 12 mg/L (2-256).

Respecto al método de las TP solo se detectó efecto sinérgico en 1 (11,1%) cepa de las 9 detectadas por el método de referencia al observar una disminución de 3 diluciones la CMI de ATM (reduciéndose de 16mg/L a 6 mg/L). En las 8 (88,9%) de las cepas restantes no se observó resensibilización a ATM por lo que se consideraron como no sinérgicas de acuerdo con este método. Por otro lado, en 2 (4,9%) de las 34 cepas que anteriormente habían mostrado un resultado de adición por el método de TC, se detectó efecto sinérgico por este método al observar una disminución de la CMI de ATM en contacto con CZA de 3 diluciones; siendo concretamente *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasa tipo VIM. En cuanto a las cepas restantes, 39 (95,1%) no se detectó efecto sinérgico.

Resumiendo, este método detectó efecto sinérgico en 3 cepas (6%) y no se detectó en 47 (94%) de los 50 totales (Tabla 2). Presentó una sensibilidad de 11,1% (IC95 2-43,5), una especificidad del 95,1% (IC95 83,9-98,7), un valor predictivo positivo (VPP) del 33,3% (IC95 6,1-79,2) y un valor predictivo negativo (VPN) del 83% (IC95 69,9-91,1). Tras estos datos se establece que la concordancia con el método de referencia fue mala con un índice Kappa de 0,08 (0-0,59) (Tabla 3).

Referente al método de elución con disco MALDI, de las 9 cepas detectadas como sinérgicas en el método TC, en 3 de ellas (33,3%) sí que se detectó efecto sinérgico al haber sido identificados todos los tubos excepto el de reacción por el MALDI. En otras 3 (33,3%), el MALDI no identificó ni el tubo de reacción ni el del ATM considerándose incongruentes y en las 3 cepas restantes (33,3%) el MALDI logró identificar todos los tubos interpretándose como no sinérgicas por este método. Por otra parte, de las 41 cepas sin efecto sinérgico detectado por el método de TC, se detectó efecto sinérgico en 3 (7,3%) cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasa tipo VIM las cuales se había detectado adición mediante el método de referencia. Cabe destacar que ninguna de estas 3 cepas coincidió con las cepas las cuales se había detectado sinergia mediante el método de TP. Adicionalmente, el resultado de 10 (24,4%) cepas fue incongruente puesto que el MALDI no fue capaz de identificar el tubo de reacción y el ATM; y de las 28 (68,3%) restantes el MALDI logró identificar todos los tubos.

Resumiendo, este método detectó efecto sinérgico en 6 cepas (12%) mientras que no se detectó en 44 (88%) (Tabla 2). Presentó una sensibilidad de 33,3% (IC95 12,1-64,6), una especificidad del 92,7% (IC95 80,6-97,5), un valor predictivo positivo (VPP) del 50% (IC95 18,8-81,2) y un valor predictivo negativo (VPN) del 86,4% (IC95 73,3-93,6). Tras estos datos se establece que la concordancia con el método de referencia fue débil con un índice Kappa de 0,30 (0-0,71) (Tabla 3).

Respecto al método de elución con disco McFarland se estudió estadísticamente, empleando un análisis de U de Mann-Whitney, la comparación de las medianas de la diferencia entre el tubo control y el tubo reacción de las cepas sinérgicas (0,46) y de cepas no sinérgicas, donde incluye aquellas con efecto aditivo e insignificante (0,37). El resultado demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P=0,55$) (Tabla 6).

Adicionalmente se testó aztreonam-avibactam y se observó que las cepas con efecto sinérgico tenían una mediana de CMI de 6 mg/L (1-12), mientras que aquellas que no resultaron sinérgicas (adición e indiferencia), presentaban una mediana de CMI 8 mg/L (2-64).

En relación con el método tira-disco, para ninguna de las cepas se detectó efecto sinérgico, puesto que no se observó un aumento en 5mm ni se observó la D invertida, es por ello que este método queda descartado como medio para la detección del efecto sinérgico en *Pseudomonas* spp.

Tabla 2. Detección del efecto sinérgico para ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas de *Pseudomonas* spp. por diferentes métodos.

Métodos	Sinergia n (%)	Adición n (%)	Indiferencia n (%)
Tiras cruzadas	9 (18)	34 (68)	7 (14)
Tiras paralelas	3 (6)	47 (94)	
Elución con disco (MALDI)	6 (12)	44 (88)	
Tira-disco	0 (0)	100 (0)	

Tabla 3. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) e índice de concordancia Kappa de cada método para la detección del efecto sinérgico para ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas de *Pseudomonas* spp. con respecto al método de referencia de tiras cruzadas

Métodos	%S (IC95)	%E (IC95)	%VPP (IC95)	%VPN (IC95)	Índice Kappa (IC95)
TP	11,1 (2-43,5)	95,1 (83,9-98,7)	33,3 (6,1-98,7)	83 (69,9-91,1)	0,08 (0-0,59)
ED (MALDI)	33,3 (12,1-64,6)	92,7 (80,6-97,5)	50 (18,8-81,2)	86,4 (73,3-93,6)	0,3 (0-0,71)
TD	-	100	-	82	-
TP, tiras paralelas; ED, Elución con disco; TD, Tira-disco					

Estos resultados obtenidos, muestran que solo en un pequeño porcentaje de las cepas de *Pseudomonas* spp. se observa sinergismo según el método de referencia (18%), algo superior a lo documentado en otros trabajos en los que se ha observado que solo en el 6% de las cepas se presenta un efecto sinérgico demostrado (Mauri C *et al.*). Este hallazgo, frecuente sobre

todo en los aislamientos productores de carbapenemasas de tipo VIM, podría estar relacionado con la alta resistencia intrínseca de este género bacteriano a múltiples antibióticos entre los que destaca la hiperexpresión de β -lactamasas de tipo ampC. Por otro lado, las cepas en las que se detecta un efecto de adición suponen un reto para el microbiólogo y médico a la hora de su interpretación y opción terapéutica en las infecciones producidas por estas bacterias, que en la mayoría de los casos son bastante escasas. En este trabajo, el porcentaje de estas cepas con efecto de adición mediante el método de referencia fue del 68%. Considerando estas cepas como una opción terapéutica al igual que aquellas en las que se detecta un efecto sinérgico, el porcentaje de cepas ascendería al 86%, tasa similar a la documentada en la literatura (Montero MM *et al.*, 2021).

Una de las principales limitaciones de los diagnósticos microbiológicos en muchas ocasiones es la demora en la obtención del resultado, algo intrínseco en muchos casos al tiempo de crecimiento de las bacterias. Es por ello que la mayoría de las innovaciones en este campo busquen reducir estos tiempos pudiendo impactar de forma directa en la administración de una terapia precoz más adecuada a los pacientes. El principal problema del método de tiras cruzadas es que se necesitan entre 48-72 horas para la obtención de un resultado definitivo. Por este motivo, han aparecido métodos alternativos que permiten reducir ese tiempo a 24 horas desde la detección de las cepas como productoras de metalo β -lactamasa. Entre los métodos evaluados en este trabajo, el método de tiras paralelas mostró una baja sensibilidad (11,1%) para detectar sinergismo en aislamientos de *Pseudomonas spp.*, sugiriendo que este método podría no ser adecuado para estas cepas. Esta conclusión se ve reforzada con el índice Kappa, que es de 0,08 reflejando esta baja concordancia con el método de referencia. En cambio, el método de elución con disco mostró una mayor sensibilidad (33,3%), aunque su concordancia con el método de referencia también fue limitada (Kappa 0,30). Y por último, el método de tira-disco no logró detectar sinergismo en ninguna cepa de *Pseudomonas spp.*, descartándolo como una opción viable para estas bacterias.

5.3 Estudios de sinergismo para Enterobacterias.

Centrándonos en las enterobacterias, según lo determinado por el método de referencia de TC, en 23 (82,1%) de las cepas estudiadas se detectó efecto sinérgico (la mediana de iCIF 0,2; rango 0,1-0,5) con valores de CMI frente a CZA de 256 mg/L para todas las cepas y frente al ATM una mediana de 64 mg/L (0,19-256). Sin embargo en las cepas restantes, 5 cepas (17,9%), no se detectó efecto sinérgico según este método; de las cuales 3 (10,7%) de ellas presentaron un resultado de adición (mediana iCIF 0,6; rango 0,6-1) y 2 (7,1%) de ellas de indiferencia (mediana iCIF 1,3; rango 1,1-5). En el caso de estas cepas, la CMI para CZA es 256 mg/L para todas las cepas y la mediana para ATM de 0,25 mg/L (0,016-256).

Respecto al método de las TP se detectó efecto sinérgico en las 23 (100%) cepas detectadas por el método de referencia. Adicionalmente, solo en 1 (20%) cepa, específicamente un *Escherichia coli* productor de BLEE + NDM; la cual había sido detectada como efecto de adición mediante el método de referencia, se observó efecto sinérgico mediante este método al observar una disminución de 3 diluciones la CMI de ATM en contacto con CZA (reduciéndose de 256 mg/L a 24 mg/L). En las 4 (80%) de las cepas restantes no se observó resensibilización a ATM considerándose como no sinérgica.

En resumen, este método detectó efecto sinérgico en 24 de las 28 cepas totales (85,7%) y no se detectó en 4 (14,3%) (Tabla 4). Presentó una sensibilidad de 100% (IC95 85,7-100), una especificidad del 80% (IC95 37,6-96,4), un valor predictivo positivo (VPP) del 95,8% (IC95 79,8-99,3) y un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (IC95 51-100). La concordancia de este método con el método de referencia fue notable con un índice Kappa de 0,87 (0,61-1) (Tabla 5).

Con respecto al método de elución con disco MALDI, de las 23 cepas detectadas como sinérgicas en el método TC, en 21 de ellas (91,3%) sí que se detectó efecto sinérgico al haber sido identificados todos los tubos excepto el de reacción por el MALDI. En cuanto a las otras dos restantes (8,7%), el MALDI no identificó ni el tubo de reacción ni el del ATM considerándose el resultado incongruente. Por otra parte, de las 5 cepas sin efecto sinérgico detectado por el método de TC, en 4 (80%) cepas el MALDI no fue capaz de identificar el tubo de reacción y el ATM siendo incongruente también. Estas cepas presentaron una mediana de CMI frente a ATM de 0,25 mg/L (0,016-0,5), todas en el rango de sensible. De la cepa restante (20%), todos los tubos fueron identificados, determinándose como efecto no sinérgico.

Por lo tanto, este método detectó efecto sinérgico en 21 del total de 28 cepas (75%) y no se detectó en 7 de 28 (25%) (Tabla 4). Presentó una sensibilidad de 91,3% (IC95 73,2-97,6), una especificidad del 100% (IC95 56,6-100), un valor predictivo positivo (VPP) del 100% (IC95 84,5-100) y un valor predictivo negativo (VPN) del 71,4% (IC95 35,9-91,8). Tras estos datos se establece que la concordancia con el método de referencia fue buena con un índice Kappa de 0,79 (0,51-1) (Tabla 5).

En cuanto al método de elución de disco McFarland se estudió estadísticamente, empleando un análisis de U de Mann-Whitney, la comparación de las medianas de la diferencia entre el tubo control y el tubo reacción de las cepas sinérgicas (0,54) y de cepas no sinérgicas, donde incluye aquellas con efecto aditivo e insignificante (0,52). El resultado demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P=0,83$) (Tabla 6).

Respecto al método de tira-disco, de las 23 cepas detectadas como sinérgicas en el método TC, en 22 de ellas (95,7%) sí que se detectó efecto sinérgico tanto mediante el análisis cuantitativo, al observarse <5 mm del halo de inhibición; como mediante el análisis cualitativo observándose la D invertida. Excepto en un *Enterobacter hormaechei* productor de carbapenemasa de tipo VIM, que no se detectó efecto sinérgico por ningún análisis, resultando tener una CMI frente a ATM de 0,19 mg/L, en el rango de sensible. Por otra parte, de las 5 cepas sin efecto sinérgico detectado por el método de TC, en 4 (80%) no se detectó efecto sinérgico y en la cepa restante (20%), detectada como efecto aditivo mediante el método de referencia, se observó efecto sinérgico al observarse la presencia de un halo de inhibición en forma de D invertida.

A diferencia de en las cepas de *Pseudomonas* spp. este método detectó efecto sinérgico en 23 de 28 cepas (82,1%) y no se detectó en 5 de 28 (17,9%) (Tabla 4). Presentó una sensibilidad de 95,7% (IC95 79-99,2), una especificidad del 80% (IC95 37,6-96,4), un valor predictivo positivo (VPP) del 95,7% (IC95 79-99,2) y un valor predictivo negativo (VPN) del 80% (IC95 37,6-96,4). Tras estos datos se establece que la concordancia con el método de referencia fue buena con un índice Kappa de 0,76 (0,43-1) (Tabla 5).

Se testaron todas las cepas con aztreonam-avibactam, de las cuales se detectó efecto sinérgico en 27 cepas siendo todas ellas sensibles al antibiótico, con una mediana de CMI 0,25 mg/L (0,047-1,5). En la cepa restante, no se observó efecto sinérgico con una CMI >4mg/L, con una mediana de CMI 0,25 mg/L (0,016-16).

Mediante la determinación de la CMI de aztreonam-avibactam y siguiendo los puntos de corte EUCAST para Enterobacterias comentados previamente, se detectó sensibilidad en 27 de 28 cepas (96,4%) y no se detectó en 1 de 28 (3,6%). Presentó una sensibilidad de 100% (IC95 83,9-100), una especificidad del 14,3% (IC95 2,6-51,3), un valor predictivo positivo (VPP) del 76,9% (IC95 57,9-89) y un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (IC95 20,7-100). La concordancia con el método de referencia fue débil con un índice Kappa de 0,2 (0-0,76).

Tabla 4. Detección del efecto sinérgico para ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas de Enterobacterias por diferentes métodos.

Métodos	Sinergia n (%)	Adición n (%)	Indiferencia n (%)
Tiras cruzadas	23 (82,1)	3 (10,7)	2 (7,1)
Tiras paralelas	24 (85,7)	4 (14,3)	
Elución con disco (MALDI)	21 (75)	7 (25)	
Tira-disco	23 (82,1)	5 (17,9)	

Tabla 5. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) e índice de concordancia Kappa de cada método para la detección del efecto sinérgico para ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas de Enterobacterias con respecto al método de referencia de tiras cruzadas.

Métodos	%S (IC95)	%E (IC95)	%VPP (IC95)	%VPN (IC95)	Índice Kappa (IC95)
TP	100 (85,7-100)	80 (37,6-96,4)	95,8 (79,8-99,3)	100 (51-100)	0,87 (0,61-1)
ED (MALDI)	91,3 (73,2-97,6)	100 (56,6-100)	100 (84,5-100)	71,4 (35,9-91,8)	0,79 (0,51-1)
TD	95,7 (79-99,2)	80 (37,6-96,4)	95,7 (79-99,2)	80 (37,6-96,4)	0,76 (0,43-1)
TP, tiras paralelas; ED, Elución con disco; TD, Tira-disco					

Tras llevar a cabo este estudio con los datos obtenidos para las Enterobacterias, se observó que aquellas cepas que eran sensibles a ATM (CMI ≤1 mg/L), presentaban unos resultados erróneos o difíciles de interpretar; es por ello que se decidió hacer un subanálisis excluyendo estas cepas correspondientes a: *Enterobacter cloacae complex* (n=2), *K. pneumoniae* (n=2), *Escherichia coli* (n=1) y *Citrobacter amalonaticus* (n=1) todos productores de carbapenemasa de tipo VIM.

En el subanálisis realizado a las enterobacterias no sensibles a ATM, se observaron 22 cepas de las cuales; en 21(95,5%) cepas fue detectado efecto sinérgico según el método de referencia (mediana iCIF 0,2; rango 0,1-0,4) con una CMI a CZA de 256 mg/L para todas las cepas y una mediana de CMI para el ATM de 256 mg/L (3-256). Mientras que en la cepa restante (4,5%) no se detectó efecto sinérgico según el método de referencia obteniendo un resultado de adición (mediana iCIF 0,6) y con una CMI para ambos antibióticos de 256 mg/L.

Según el método de TP, se detectó el efecto sinérgico en las 23 (100%) cepas en las que se observó el efecto sinérgico en el método de referencia; así como también se detectó efecto sinérgico en la cepa detectada como adición por el método de referencia siendo esta un *Escherichia coli* productor de BLEE + NDM. En este caso se observó una disminución de la CMI de ATM con CZA de 3 diluciones (de 256 mg/l a 24 mg/L).

Este método detectó efecto sinérgico en todas las cepas (100%) (Tabla 7). Presentó una sensibilidad de 100% (IC95 85,1-100) y un valor predictivo positivo (VPP) del 95,7% (IC95 79-99,2) (Tabla 8).

Respecto al método de elución con disco con MALDI, se detectó efecto sinérgico en 20 (95,2%) cepas al ser detectado por el MALDI todos los tubos excepto el de reacción. La cepa (4,8%) detectada como adición por el método de referencia, se consideró como incongruente debido a que el MALDI no fue capaz de identificar el tubo de reacción ni el de ATM; la cual era un *Enterobacter asburiae* productor de carbapenemasa tipo NDM con una CMI a ATM de 3 mg/L, en el rango de sensible a exposición incrementada. La cepa restante fue detectada como efecto no sinérgico al ser identificado por el MALDI en todos los tubos.

Resumiendo, este método detectó efecto sinérgico en 20 de 22 cepas (90,9%) y no se detectó en 2 de 22 (9,1%) (Tabla 7). Presentó una sensibilidad de 95,2% (IC95 77,3-99,2), una especificidad del 100% (IC95 20,7-100), un valor predictivo positivo (VPP) del 100% (IC95 83,9-100) y un valor predictivo negativo (VPN) del 50% (IC95 9,5-90,5). Tras estos datos se establece que la concordancia con el método de referencia fue buena con un índice Kappa de 0,65 (0-1) (Tabla 8).

En cuanto al método de elución con disco McFarland se estudió estadísticamente, empleando un análisis de U de Mann-Whitney, la comparación de las medianas de la diferencia entre el tubo control y el tubo reacción de las cepas sinérgicas (0,55) y de cepas no sinérgicas, donde incluye aquellas con efecto aditivo e insignificante (0,23). El resultado demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P=0,13$) sin embargo sí que se observó una tendencia significativa de valores en las cepas sinérgicas superiores a las no sinérgicas (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de absorbancia obtenidos en el método de elución con disco mediante la diferencia de turbidimetría entre el tubo control (sin antibiótico) y el tubo reacción (con discos de ceftazidima/avibacatam + aztreonam) para la determinación del efecto sinérgico.

Aislados	Mediana de absorbancia (rango)		
	Sinergia	No sinergia	P
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,46 (0,1-0,69)	0,37 (0-0,71)	0,55
Enterobacterias	0,54 (0,2-0,77)	0,52 (0,23-0,75)	0,83
Enterobacterias (excluyendo sensibles a aztreonam)	0,54 (0,2-0,77)	0,23	0,13

Según el método tira-disco, se detectó efecto sinérgico en las 21 (100%) cepas mediante ambos análisis, cuantitativo y cualitativo, y la cepa restante en la que se observaba efecto de adición con el método de referencia, no se observó efecto sinérgico.

Este método detectó efecto sinérgico en 21 de 22 cepas (95,5%) y no se detectó en 1 de 22 (4,5%) (Tabla 7). Presentó una sensibilidad de 100% (IC95 84,5-100), una especificidad del 100% (IC95 20,7-100), un valor predictivo positivo (VPP) del 100% (IC95 84,5-100) y un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (IC95 20,7-100). Tras estos datos se establece que la concordancia con el método de referencia fue perfecta con un índice Kappa de 1 (Tabla 8).

A través de la detección de la CMI de aztreonam-avibactam mediante tira de E-test se detectó efecto sinérgico en 21 cepas siendo todas ellas sensibles al antibiótico, con una mediana de CMI 0,38 mg/L (0,047-1,5). En la cepa restante, no se observó efecto sinérgico con una mediana de CMI 16 mg/L.

En general, este método detectó efecto sinérgico en 21 de 22 cepas (95,5%) y no se detectó en 1 de 22 (4,5%). Presentó una sensibilidad de 100% (IC95 84,5-100), una especificidad del 100% (IC95 20,7-100), un valor predictivo positivo (VPP) del 100% (IC95 84,5-100) y un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (IC95 20,7-100). La concordancia con el método de referencia fue perfecta con un índice Kappa de 1.

Tabla 7. Detección del efecto sinérgico para ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas de Enterobacterias por diferentes métodos excluyendo las sensibles al aztreonam.

Métodos	Sinergia n (%)	Adición n (%)	Indiferencia n (%)
Tiras cruzadas	21 (95,5)	1 (4,5)	0 (0)
Tiras paralelas	22 (100)	0 (0)	
Elución con disco (MALDI)	20 (90,9)	2 (9,1)	
Tira-disco	21 (95,5)	1 (4,5)	

Tabla 8. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) e índice de concordancia Kappa de cada método para la detección del efecto sinérgico para ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas de Enterobacterias con respecto al método de referencia de tiras cruzadas excluyendo las sensibles al aztreonam.

Métodos	%S (IC95)	%E (IC95)	%VPP (IC95)	%VPN (IC95)	Índice Kappa (IC95)
TP	100 (85,1-100)	-	95,7 (79-99,2)	-	-
ED (MALDI)	95,2 (77,3-99,2)	100 (20,7-100)	100 (83,9-100)	50 (9,5-90,5)	0,65 (0-1)
TD	100 (84,5-100)	100 (20,7-100)	100 (84,5-100)	100 (20,7-100)	1
TP, tiras paralelas; ED, Elución con disco; TD, Tira-disco					

Comparando estos resultados obtenidos en el estudio con Enterobacterias con los interpretados anteriormente de las *Pseudomonas* spp., se observó que una mayor proporción de cepas de *Enterobacteriaceae* (82,1%) mostró sinérgismo según el método de referencia, lo que sugiere una mayor efectividad de la combinación CZA-AVI y ATM en estas bacterias. Este resultado es consistente con estudios previos que destacan la eficacia de esta combinación terapéutica en aislamientos productoras de metalo β -lactamasas con una tasa de sinérgismo de un 80-90% (Mauri C *et al.*, 2021).

El método de tiras paralelas demostró una alta sensibilidad (100%) y una buena concordancia con el método de referencia (Kappa 0,87) en *Enterobacteriaceae*, lo que sugiere que este método es fiable para detectar sinérgismo en estas cepas. Asimismo, el método de elución con disco presentó una sensibilidad del 91,3% y una concordancia elevada (Kappa 0,79), lo que lo convierte en una alternativa viable al método de referencia. El método de tira-disco también mostró buenos resultados, detectando sinérgismo en el 82,1% de las cepas, con una buena concordancia (Kappa 0,76).

Cabe destacar que en aquellas cepas de Enterobacterias que presentan sensibilidad al aztreonam por la ausencia de producción de otras β -lactamasas diferentes a las carbapenemasas de clase B resulta complicado interpretar los estudios de sinérgismo debido al desconocimiento de si la ausencia de crecimiento bacteriano es causada por el efecto de la combinación de ambos antibióticos o por la acción individual del aztreonam. El subanálisis realizado en este trabajo excluyendo las cepas con sensibilidad al aztreonam demuestra la elevada tasa de detección de efecto sinérgico (>90%) por todos los métodos evaluados. Entre ellos, destaca el método de tira-disco como método más fiable con una sensibilidad y especificidad del 100% y una concordancia perfecta con el método de referencia.

Nuestro trabajo presenta una serie de limitaciones que es necesario comentar. En primer lugar, el número de cepas evaluados es reducido, especialmente para las Enterobacterias en las que se han evaluado pocas cepas con resistencia documentada a la combinación de CZA-AVI y ATM. En segundo lugar, la falta de homogeneidad en la sensibilidad de los métodos

evaluados entre diferentes especies bacterianas hace necesario considerar las características específicas de las bacterias al seleccionar el método para evaluar el sinergismo. Y por último, la baja concordancia observada en *Pseudomonas* spp. sugiere que los métodos alternativos, como el de tiras paralelas y elución con disco, requieren optimización para mejorar su precisión en estas cepas.

En conclusión, aunque el método de tiras cruzadas sigue siendo el estándar de referencia, cualquiera de los métodos alternativos parece válido para la detección del efecto sinérgico entre CAZ-AVI y ATM en *Enterobacteriaceae*, destacando, en las cepas resistentes al aztreonam el método de la tira-disco. Sin embargo, en el caso de *Pseudomonas* spp., ninguno de los métodos alternativos evaluados ofreció una sensibilidad y especificidad adecuadas, lo que hace necesario continuar investigando métodos más fiables para esta especie. Es fundamental considerar estos hallazgos en la práctica clínica para garantizar un tratamiento antibiótico más efectivo y personalizado en infecciones causadas por bacterias productoras de metalo β -lactamasas.

6 CONCLUSIÓN.

En este trabajo se evalúa el grado de concordancia que tienen los métodos TD, TP y ED con el método de referencia TC para la detección del efecto sinérgico resultante de la combinación de antibióticos, concretamente CZA-AVI y AZT, en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp. Esto es de gran importancia puesto que los métodos alternativos al método de TP son más cortos, pudiendo así acelerar el proceso de tratamiento.

Los datos obtenidos del estudio sugieren que para el estudio de sinergismo CZA/ATM en *Pseudomonas* spp. productoras de metalo β -lactamasas se debería realizar en un primer paso el método de TP junto con el de ED y en caso de obtener resultados discordantes, se confirmaría con el método de referencia de TC. Mientras que para las *Enterobacteriaceae* sería suficiente con realizar el método de TD o el de EC, sin necesidad de confirmación con el método de referencia debido a la baja frecuencia de resultados discordantes.

7 ANEXO 1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	x			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				x
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	x			
ODS 10. Reducción de las desigualdades				x
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				x
ODS 12. Producción y consumo responsables	x			
ODS 13. Acción por el clima				x
ODS 14. Vida submarina				x
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				x
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				x
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.	x			

- A. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

Este trabajo se relaciona con cuatro de los objetivos ODS establecidos por la ONU, siendo estos el ODS 3: Salud y bienestar, ODS 9: Industria, Innovación e Infraestructura, ODS 12: Producción y Consumo Responsable y ODS 17: Alianzas para Lograr los Objetivos.

En primer lugar, el ODS 3, cuyo objetivo es garantizar cobertura sanitaria universal y acceso a medicamentos y vacunas; además de promover el bienestar para todos. Actualmente uno de los problemas de salud que más preocupa son las resistencias bacterianas a los antimicrobianos actuales; es por ello que una manera de combatir esta problemática es el uso de terapias de antibióticos combinadas. Para ello es imprescindible el estudio de los efectos sinérgicos de determinados antibióticos, en lo que está basado este proyecto.

En segundo lugar, el ODS 9 busca fomentar la innovación y el desarrollo de nuevas tecnologías, como es el caso del MALDI -TOF, empleado en este trabajo, que permite acelerar el proceso de detección con una elevada sensibilidad permitiendo así agilizar el proceso de tratamiento.

En tercer lugar, el ODS 12, cuyo objetivo es garantizar un consumo y una producción sostenible. Esto es de gran importancia a lo referente al consumo de antibióticos, puesto que la diseminación de las resistencias antibacterianas en gran medida es debido al incorrecto consumo de antibióticos. Por ello, la correcta detección del efecto sinérgico entre antibióticos es de gran importancia para hacer un buen uso de estos medicamentos.

En último lugar, el ODS 17 busca la cooperación de diferentes infraestructuras para hacer frente las grandes problemáticas de este siglo. En este caso, para poder hacer frente al surgimiento de las resistencias antibióticas, es necesario una colaboración entre hospitales, laboratorios clínicos y centros de investigación.

8 BIBLIOGRAFÍA.

Astocondor-Salazar, L. (2018). Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación En Salud*, 2(2), 42–49. <https://doi.org/10.35839/repis.2.2.224>

Bakthavatchalam, Y. D., Walia, K., & Veeraraghavan, B. (2022). Susceptibility testing for aztreonam plus ceftazidime/avibactam combination: A general guidance for clinical microbiology laboratories in India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(1), 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.12.006>

Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch.

Boyd, S. E., Livermore, D. M., Hooper, D. C., & Hope, W. W. (2020). Metallo- β -lactamasas: estructura, función, epidemiología, opciones de tratamiento y proceso de desarrollo. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia*, 64(10), e00397-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00397-20>

Bridel, S., Watts, S. C., Judd, L. M., Harshegyi, T., Passet, V., Rodrigues, C., Holt, K. E., & Brisse, S. (2021). Klebsiella MALDI TypeR: a web-based tool for Klebsiella identification based on MALDI-TOF mass spectrometry. *Research In Microbiology (Paris)*, 172(4-5), 103835. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103835>

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

Canut Blasco, A., Collazos Blanco, et al. Métodos Microbiológicos para la Determinación *In Vitro* de la Actividad de Combinaciones de Antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2020.

Cercenado, E., Cantón Coordinador, R., Ferran, Autores, N., Calvo, J., Cantón, R., Cuenca, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2020). *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

Correa-Martínez, C. L., Idelevich, E. A., Sparbier, K., Kostrzewa, M., & Becker, K. (2019). Detección rápida de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β -lactamasas AmpC en *Enterobacterales*: Desarrollo de un panel de cribado mediante el ensayo de crecimiento de microgotas directo sobre el objetivo basado en MALDI-TOF MS. *Fronteras de la microbiología*, 10, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00013>

Figueroa, F. E., Carrión A, F., Valenzuela M, S., Turner G, E., Aceitón E, C., Hirigoyen P, C., Bogdanic W, K., Solís D, C., Mansilla A, K., & Urra G, S. (2007). Presencia de ADN bacteriano en el tejido valvular de pacientes con cardiopatía reumática crónica. *Revista Médica de Chile*, 135(8). <https://doi.org/10.4067/s0034-98872007000800001>

Galan-Sanchez, F., Del Castillo, B. R., Marin-Casanova, P., & Rodriguez-Iglesias, M. (2012). Caracterización de blaOXA-48 detectada en cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* aisladas en el sur de España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(9), 584-585. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.05.002>.

Gobernado, M. (2005). Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Revista Española de Quimioterapia*, 18(2), 115–117.

Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Resistencia y persistencia a los antibióticos: implicaciones para la salud humana y perspectivas de tratamiento. *Informes EMBO*, 21(12), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>

Lopardo, H. A. (2016). *Introducción a la microbiología clínica*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.

Madigan, M. T. (2015). *Brock, biología de los microorganismos, (14ª edición)*. Pearson.

March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>.

Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28, 4–9. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(10\)70035-5](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(10)70035-5)

Maugeri, G., Lychko, I., Sobral, R., & Roque, A. C. A. (2019). Identificación y perfil de susceptibilidad a los antibióticos de agentes bacterianos infecciosos: una revisión de las tendencias actuales y futuras. *Revista de biotecnología*, 14(1), E1700750. <https://doi.org/10.1002/biot.201700750>

Mauri, C., Maraolo, A. E., Di Bella, S., Luzzaro, F., & Principe, L. (2021). The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of *In Vitro* Studies and Clinical Cases. *Antibiotics*, 10(8), 1012. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081012>

Mella M,S.,Zemelman M,C., Bello T, H., Dominguez Y, M., Gonzalez R, G., & Zemelman Z, R. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista Chilena de Infectología*, 18(1). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182001000100002>.

Montero, M. M., Ochoa, S. D., López-Causapé, C., Luque, S., Sorlí, L., Campillo, N., Montesinos, I. L., Padilla, E., Prim, N., Angulo-Brunet, A., Grau, S., Oliver, A., & Horcajada, J. P. (2021). Time-Kill Evaluation of Antibiotic Combinations Containing Ceftazidime-Avibactam against Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Their Potential Role against Ceftazidime-Avibactam-Resistant Isolates. *Microbiology Spectrum*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00585-21>

Mühlhauser, P. M., & Rivas, J. (2014). Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica las Condes (Impresa)*, 25(3), 569-579. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70072-0).

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*, 4(2), 481–51. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical Microbiology*. Elsevier.

- Navarro, F., & Mirelis, B. (2007). Relevancia de la detección de los fenómenos de sinergias y antagonismos entre antimicrobianos en los sistemas automatizados de lectura de antibiogramas. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 25(2), 75–76. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(07\)74236-2](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(07)74236-2)
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524-534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>.
- Palomo, J. D. G., Balbín, J. A., Blanco, J., & Benito, M. (2010). Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine (Madrid. Ed. Impresa)*, 10(49), 3251-3264. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(10\)70027-5](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(10)70027-5)
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Pérez Faraldo, Bárbara, & González Isla, Fernando. (2017). Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores: agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención sanitaria. *Correo Científico Médico*, 21(4), 1197-1200.
- Taha, R., Kader, O., Sherine Shawky, & Rezk, S. (2023). Ceftazidime-Avibactam plus aztreonam synergistic combination tested against carbapenem-resistant Enterobacterales characterized phenotypically and genotypically: a glimmer of hope. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00573-3>.
- Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., Simner, P. J., & Antibacterial Resistance Leadership Group (2019). A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(8), 1446–1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>
- Torres Fink, I., Tormo Palop, N., Borrás Salvador, R., Buesa Gómez, J., Gimeno Cardona, C., & Navarro Ortega, D. (2019). Evaluation of the DNA microarray “AMR Direct Flow Chip Kit” for detection of antimicrobial resistance genes from Gram-positive and Gram-negative bacterial isolated colonies. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 37(7), 454–457. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.12.015>.
- Vlaspolder, G. L., Hughes, L. A., Huis In 't Veld, R. A. G., Kampinga, G. A., & Bathoorn, E. (2023). Enhancement and Comparison of (Ceftazidime-)Avibactam Plus Aztreonam Susceptibility Tests for *Stenotrophomonas maltophilia* in Clinical Diagnostics. *Current microbiology*, 81(1), 28. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03530-7>.
- Wenzler, E., Deraedt, M. F., Harrington, A. T., & Danizger, L. H. (2017). Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), 352–354. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.009>.

Wilhelm, C. M., Inamine, E., Martins, A. F., & Barth, A. L. (2023). Evaluación del sinergismo entre Aztreonam y Ceftazidima/Avibactam contra *Klebsiella pneumoniae* por MALDI-TOF MS. *Antibióticos (Basilea, Suiza)*, 12(6), 1063. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061063>.

World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024*. World Health Organization.

Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM metalo- β -lactamasas y sus productores bacterianos en entornos de atención médica. *Revisiones de microbiología clínica*, 32(2), e00115-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18>.