

Concordancia entre la elución de discos en caldo y las tiras superpuestas para la prueba de sinergia de aztreonam con ceftazidima/avibactam: desempeño variable según especie

Agreement between disk elution in broth and overlay strips for the aztreonam–ceftazidime/avibactam synergy test: variable performance depending on species

Patricio Ross¹, Stephanie Henríquez², Francisca Caro², Juan Carlos Román², Carolina Núñez¹ y Patricia García^{2,3}

¹Departamento de Enfermedades Infecciosas del Adulto, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica. Santiago, Chile.

²Laboratorio de Microbiología, Red de Salud UC-CHRISTUS.

³Departamento de Laboratorio Clínico. Escuela de Medicina. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile.

Financiamiento: El estudio fue financiado con Fondos de Desarrollo Académicos (FDA) del Departamento de Laboratorios Clínicos.

Conflictos de interés: Sin conflictos de interés que declarar.

Recibido: 25 de agosto de 2024 / Aceptado: 4 de agosto de 2025

Resumen

Introducción: La prueba de elución de discos es una técnica novedosa recientemente recomendada por CLSI, para evaluar la actividad *in vitro* de la sinergia entre aztreonam (ATM) y ceftazidima/avibactam (CZA). **Objetivo:** Comparar la concordancia entre la prueba de tiras superpuestas y la elución de discos para evaluar sinergia entre ATM y CZA. **Métodos:** Se seleccionaron bacilos gramnegativos resistentes a carbapenémicos con resultado conocido de sinergia por tiras superpuestas. Posteriormente se realizó elución de discos, se evaluaron sus resultados y concordancia. **Resultados:** Se recuperaron 38 cepas (13 Enterobacterales, 13 *Pseudomonas aeruginosa* y 12 *Stenotrophomonas maltophilia*). El 81,6% fue productor de metalo- β -lactamasas. La positividad mediante tiras superpuestas y elución de discos fue de 78,9 y 71,0%, respectivamente, con una concordancia global de 84,2%. En Enterobacterales la positividad fue de 92% por ambos métodos, con 100% de concordancia. En *S. maltophilia* la positividad fue de 100% por ambos métodos, con 100% de concordancia. Los resultados para *P. aeruginosa* fueron inferiores: positividad por tiras superpuestas de 46,1%, por elución por discos de 25,0%, y concordancia de 76,9%. **Conclusión:** La elución de discos es una técnica estandarizada y reproducible, demostrando alta actividad y concordancia en Enterobacterales y *S. maltophilia*. El rendimiento es bajo para *P. aeruginosa* por lo que se desaconseja su uso.

Palabras clave: aztreonam; ceftazidima/avibactam; metalo- β -lactamasas.

Abstract

Background: The disk elution test is a novel technique recently recommended by CLSI to assess the *in vitro* activity of the synergy between aztreonam (ATM) and ceftazidime/avibactam (CZA). **Aim:** To compare the agreement between the overlay strip test and disk elution for evaluating synergy between ATM and CZA. **Methods:** Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli with known synergy results from overlay strip testing were selected. Subsequently, disk elution was performed, and the results and agreement were evaluated. **Results:** Thirty-eight strains were recovered (13 Enterobacterales, 13 *Pseudomonas aeruginosa*, and 12 *Stenotrophomonas maltophilia*). 81.6% were producers of metallo- β -lactamases. Positivity using overlay strips and disk elution was 78.9% and 71.0%, respectively, with an overall agreement of 84.2%. In Enterobacterales, positivity was 92% for both methods, with 100% agreement. In *S. maltophilia*, positivity was 100% for both methods, with 100% agreement. The results for *P. aeruginosa* were lower: positivity for overlay strips was 46.1%, by disk elution 25.0%, and agreement was 76.9%. **Conclusion:** Disk elution is a standardized and reproducible technique, demonstrating high activity and agreement in Enterobacterales and *S. maltophilia*. Performance is low for *P. aeruginosa*; therefore, its use is not recommended.

Keywords: aztreonam; ceftazidime/avibactam; metallo- β -lactamase.

Correspondencia a:

Patricia García Cañete
pgarciacan@uc.cl

Introducción

Las infecciones por bacilos gramnegativos (BGN) productores de metalo- β -lactamasas (MBL) son una problemática relevante dada su incidencia en aumento y sus escasas alternativas terapéuticas. Dentro de los β -lactámicos, las alternativas son cefiderocol, una cefalosporina siderófora y aztreonam (ATM), un monobactámico no hidrolizable por las MBL¹. Dada la frecuente coexpresión de otras β -lactamasas que sí hidrolizan aztreonam en los BGN productores de MBL, ha surgido como alternativa su combinación con avibactam, un inhibidor de β -lactamasa con actividad sobre múltiples β -lactamasas, incluyendo carbapenemasas (con excepción de las MBL). Dado la ausencia de un producto coformulado de ambos compuestos disponible en nuestro medio, se sugiere la combinación de ATM con ceftazidima/avibactam (CZA), en la cual ceftazidima no tiene rol significativo².

La prueba de referencia de la actividad *in vitro* de la sinergia ATM-CZA es la microdilución en caldo; sin embargo, es laboriosa, costosa y difícil de implementar en un laboratorio clínico³. En nuestra institución se utilizó la prueba de superposición de tiras desde 2021, la cual evalúa la disminución de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ATM en presencia de avibactam. Recientemente se describió una prueba estandarizada mediante elución de discos en caldo con excelente rendimiento por lo que fue adoptada como técnica recomendada por el CLSI durante 2024, y reconocida por el Instituto de Salud Pública de Chile⁴⁻⁶.

El objetivo del presente trabajo es comparar la medición de sinergia de CZA y ATM mediante la superposición de tiras de difusión (prueba en uso) con la elución de discos.

Materiales y Métodos

Cepas

Se rescataron cepas de bacilos gramnegativos resistentes a carbapenémicos previamente aisladas de muestras clínicas, entre 2021 y 2023, de pacientes ambulatorios y hospitalizados de la Red de Salud UC-CHRISTUS, de cualquier edad y obtenidas de cualquier sitio anatómico. Se incluyeron Enterobacterales y bacilos gramnegativos no fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*) a las cuales se les había realizado prueba de sinergia de CZA y ATM por superposición de tiras previo a su congelamiento. Por protocolo, el laboratorio de microbiología congela todas las cepas de estos microorganismos a -80°C con posterioridad a su identificación por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF, Bruker®). La evaluación de

producción de carbapenemasas en Enterobacterales y *P. aeruginosa* se realizó por prueba de Carba-NP y luego la identificación de la carbapenemasa se realizó por inmunocromatografía (NG-TEST® CARBA-5). Para *S. maltophilia* no se realiza dicha prueba dado que cuenta intrínsecamente con una MBL llamada L1.

Prueba de sinergia por superposición de tiras de difusión

Realizada por indicación clínica, previo al inicio del estudio. Se preparó un estándar de Mc Farland 0,5 en 3 mL de solución salina para cada cepa. Luego, se inocularon dos placas de agar Mueller-Hinton (ThermoFisher Scientific®) mediante siembra en césped, cubriendo toda su superficie. En la primera placa se aplicó una tira de CZA y una tira de ATM, separadas entre ellas. En la segunda placa se colocó una tira de ATM por 10 minutos, luego fue retirada; en el mismo sitio se colocó una tira de CZA y posteriormente se colocó nuevamente la tira inicial de ATM sobre la tira de CZA (Figura 1)⁷. Luego ambas placas se incubaron a 35°C durante 16 a 18 horas. Se consideró como resultado positivo la obtención de una CIM dentro de la categoría susceptible para cada microorganismo asociado a un cambio de CIM de tres o más diluciones, dado el error inherente de la técnica^{8,9}. Los puntos de cortes para ATM en Enterobacterales son: susceptible $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; intermedio $8 \mu\text{g/mL}$; y resistente $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ y los puntos de cortes CLSI para *P. aeruginosa* son: susceptible $\leq 8 \mu\text{g/mL}$; intermedio $16 \mu\text{g/mL}$; y resistente $\geq 32 \mu\text{g/mL}$, de acuerdo al CLSI M100 de 2024⁵. Dado que *S. maltophilia* no cuenta con puntos de corte para ATM, se usaron los puntos de corte de *P. aeruginosa* para la interpretación de los resultados.

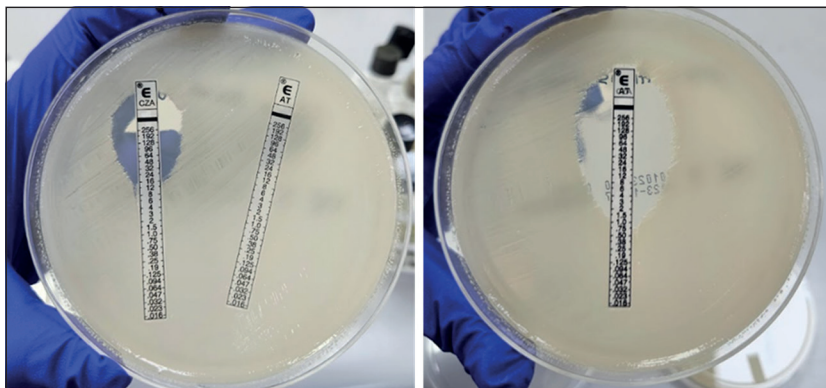


Figura 1. Prueba de sinergia de ceftazidima/avibactam y aztreonam por método superposición de tiras. A la izquierda, tiras de ceftazidima/avibactam (CZA) y aztreonam (AT) sobre agar Mueller-Hinton, demostrando una CIM de CZA de $16 \mu\text{g/mL}$ y de AT sobre $256 \mu\text{g/mL}$. A la derecha, tiras superpuestas de CZA y AT sobre agar Mueller-Hinton sembrado con la misma cepa, mostrando una reducción de la CIM de AT hasta $1,0 \mu\text{g/mL}$.

Prueba de sinergia por elución de discos

Para cada una de las muestras se utilizaron cuatro tubos con caldo Mueller Hinton rotulados como A, B, C y D (Figura 2)⁴. El tubo A no contiene antimicrobiano alguno y corresponde al control de crecimiento. El tubo B contiene un disco de ATM Oxoid™ de 30 µg, el tubo C contiene un disco de CZA Oxoid™ de 50 µg (30/20 µg, respectivamente), y el tubo D que contiene ambos discos. Posteriormente se incubaron por 30-60 min a temperatura ambiente permitiendo la difusión de los antimicrobianos desde el disco al caldo. Las concentraciones finales en los tubos eran de 6 µg/mL de ATM y 6/4 µg/mL de CZA, individualmente o en combinación. La relación contenida en los discos con la cantidad de caldo Mueller-Hinton tenía una concentración final de ATM-CZA de 6/6/4 µg/mL en el tubo D para proporcionar una concentración de AZT alrededor del punto de corte susceptible para Enterobacterales (4 µg/mL) y *P. aeruginosa* (8 µg/mL). La cepa escogida, posteriormente a ser descongelada, se sembró en serie dos veces en subcultivos de agar sangre. A partir del segundo subcultivo se preparó un estándar de McFarland 0,5 en tubos de solución salina de 1,8 mL. Se agregaron alícuotas (25 µL) del cultivo a cada tubo (concentración bacteriana final en cada tubo de $7,5 \times 10^5$ ufc/mL), se agitaron vigorosamente para asegurar una distribución uniforme y se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo aire ambiente durante 16 a 20 horas para Enterobacterales y *P. aeruginosa*, o 20 a 24 horas para *S. maltophilia*. Después de la incubación se evaluó la ausencia de crecimiento bacteriano (susceptible) o el crecimiento bacteriano (no susceptible) de los tubos a 6/6/4 µg/mL de ATM-CZA. Se consideró como positivo si hubo crecimiento en los tubos A, B y C asociado a ausencia de crecimiento en el tubo D. En caso de existir crecimientos en todos los tubos se consideró como negativo. De no haber crecimiento en los tubos B y/o C, se consideró como indeterminado, pues no se considera que exista actividad sinérgica si solo uno de los componentes es capaz de lograr la inhibición del crecimiento bacteriano. Como control de calidad se utilizó la cepa *Escherichia coli* AR348 de los CDC, Atlanta, E.U.A., que es resistente tanto a CZA como a ATM y no presenta sinergia.

Discordancia

En caso de discordancia entre el resultado histórico de la superposición de tiras y la elución de discos, se realizó nuevamente la prueba de superposición de tiras con la misma cepa descongelada, en forma simultánea.

Resultados

Cepas

Se rescataron 38 cepas correspondientes a 13 Enterobacterales (8 *Klebsiella pneumoniae* complex, 3

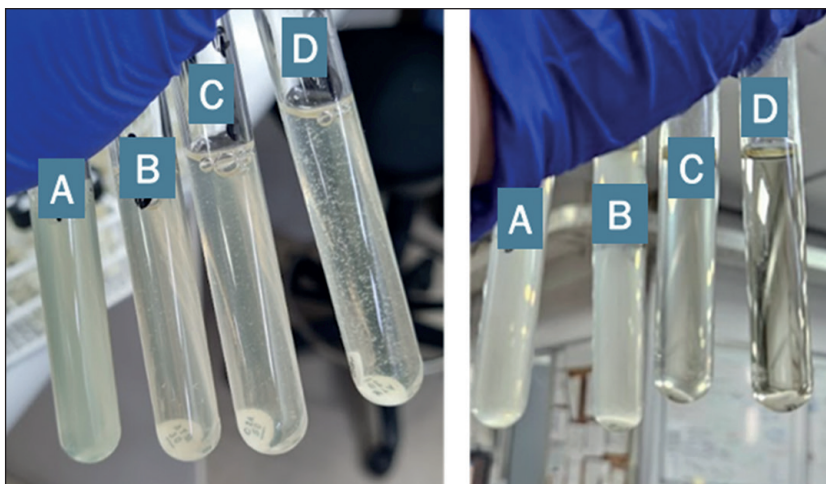


Figura 2. Prueba de sinergia de ceftazidima/avibactam y aztreonam con método de elución de discos. En ambas imágenes, de izquierda a derecha los tubos corresponden a: **A** (control de crecimiento), **B** (ATM), **C** (CZA) y **D** (sinergia). En la imagen de la izquierda se observa turbidez de todos los tubos, por lo tanto, corresponde a sinergia negativa. En la imagen derecha se observa turbidez en los tubos A, B y C, mientras que en el tubo D no hay turbidez, por lo tanto, corresponde a sinergia positiva.

Enterobacter cloacae complex y 2 *Citrobacter* spp.), 13 *P. aeruginosa* y 12 *S. maltophilia* (Tabla 1). El 81,6% fue productora de MBL. Doce de las 13 cepas de Enterobacterales fueron productoras de carbapenemasas (11 NDM y 1 KPC). Ocho de las 13 cepas de *P. aeruginosa* eran productoras de carbapenemasas, todas VIM. Todas las cepas de Enterobacterales fueron resistentes a ATM, mientras que en *P. aeruginosa* se encontraron siete cepas de susceptibilidad intermedia y cinco cepas resistentes. En *S. maltophilia* la CIM_{50/90} de ATM fue mayor a 256/256 µg/mL.

Prueba de superposición de tiras

En Enterobacterales se observó que 12/13 cepas (92,3%) fueron susceptibles con cambio de CIM de dos o más diluciones, con una CIM_{50/90} de 0,5/4 µg/mL (Tabla 1). Tanto en la cepa productora de KPC como en la no productora de carbapenemasa se observó una reducción de la CIM de más de 256 µg/mL a 0,5 y 2,0 µg/mL. En *P. aeruginosa*, la prueba de tiras de difusión de ATM tuvo una CIM_{50/90} fue de $16 \geq 256$ µg/mL, con una cepa susceptible, siete intermedias y cinco resistentes. La prueba de tiras superpuestas mostró que 9/13 cepas fueron susceptibles, con una CIM_{50/90} de 8/16 µg/mL. Sin embargo, el cambio de tres o más diluciones se observó en solo 4/13 cepas, por lo que se consideraron como positivas para sinergia 30,8% de las cepas (Tabla 2). Para *S. maltophilia* la CIM_{50/90} fue de 1/2 µg/mL, logrando una disminución de dos o más diluciones en todas las cepas (Tabla 3).

Tabla 1. Enterobacteriales y resultado de prueba de sinergia

Especie	Carbapenemasa	Prueba de tiras superpuestas			Prueba de elución de discos	Concordancia
		CIM ATM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ATM + CZA ($\mu\text{g/mL}$)	Resultado de sinergia	Resultado de sinergia	
<i>Citrobacter</i> spp.	NDM	≥ 256	0,125	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Citrobacter</i> spp.	NDM	8	$\leq 0,06$	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	≥ 256	8	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	≥ 256	4	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM	≥ 256	2	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	≥ 256	1	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	≥ 256	0,50	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	≥ 256	0,50	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	≥ 256	0,50	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	≥ 256	0,25	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	≥ 256	0,25	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	16	0,25	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	--	≥ 256	2	Positiva	Positiva	Concordante

Puntos de cortes CLSI para Enterobacteriales: Susceptible $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; Intermedio $8 \mu\text{g/mL}$; Resistente $\geq 16 \mu\text{g/mL}$.Tabla 2. *Pseudomonas aeruginosa* y resultado de prueba de sinergia

Especie	Carbapenemasa	Prueba de tiras superpuestas			Prueba de elución de discos	Concordancia
		CIM ATM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ATM + CZA ($\mu\text{g/mL}$)	Resultado de sinergia	Resultado de sinergia	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	≥ 256	8	Positiva	Negativa	Discordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	128	16	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	32	16	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	16	16	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	16	8	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	16	4	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	16	4	Negativa	Positiva	Discordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM	8	8	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	≥ 256	64	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	≥ 256	8	Positiva	Negativa	Discordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	16	8	Negativa	Negativa	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	16	2	Positiva	Positiva	Concordante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	16	2	Positiva	Positiva	Concordante

Puntos de cortes CLSI para *P. aeruginosa*: Susceptible $\leq 8 \mu\text{g/mL}$; Intermedio $16 \mu\text{g/mL}$; Resistente $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 3. *Stenotrophomonas maltophilia* y resultado de prueba de sinergia

Especie	Carbapenemasa	Prueba de tiras superpuestas			Prueba de elución de discos Resultado de sinergia	Concordancia
		CIM ATM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ATM + CZA ($\mu\text{g/mL}$)	Resultado de sinergia*		
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	4	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	2	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	2	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	2	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	1	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	1	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	≥ 256	0,5	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	32	1	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	16	1	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	16	0,5	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	16	0,5	Positiva	Positiva	Concordante
<i>S. maltophilia</i>	L1	8	0,5	Positiva	Positiva	Concordante

*Dado que no hay puntos de corte de aztreonam para *S. maltophilia*, se usaron los puntos de corte de *P. aeruginosa* para interpretar los resultados de la CIM por tiras superpuestas. Puntos de cortes CLSI para *P. aeruginosa*: Susceptible $\leq 8 \mu\text{g/mL}$; Intermedio $16 \mu\text{g/mL}$; Resistente $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

Prueba de elución de discos

Se objetivó sinergia en 71,0% de las cepas probadas. En Enterobacterales se observó que 12 de las 13 cepas tuvieron sinergia positiva (92,3%) (Tabla 1). La cepa que fue negativa correspondió al mismo *E. cloacae* NDM que no logró una CIM susceptible con la prueba de superposición de tiras. En *P. aeruginosa* solo tres de las 13 cepas tuvieron sinergia positiva (23,0%) (Tabla 2). En *S. maltophilia* todas las cepas tuvieron sinergia positiva (100%) (Tabla 3).

Concordancia

La concordancia global fue de 92,1%. En Enterobacterales y *S. maltophilia* la concordancia fue de 100% (Tabla 1 y 3). En *P. aeruginosa* la concordancia fue de 76,9% (10/13 cepas), explicada por dos cepas en que la prueba de elución fue negativa mientras que la prueba de tiras superpuestas fue positiva, y una cepa con elución positiva y tiras superpuestas negativas (Tabla 2).

Discusión

La prueba de elución de discos es la técnica actualmente recomendada por el CLSI para la evaluación de sinergia entre ATM y CZA, dado que es reproducible,

fácil de realizar, leer e interpretar^{4,5}. Este estudio confirma un alto porcentaje de actividad contra bacilos gramnegativos resistente a carbapenémicos, incluyendo aquellos productores de MBL. Además, la prueba tiene una excelente concordancia categórica en Enterobacterales y *S. maltophilia* respecto la prueba de tiras superpuestas. Al igual que lo descrito en estudios internacionales, el rendimiento *in vitro* de la sinergia es mucho menor en *P. aeruginosa*, lo que es más evidente en la prueba de elución en discos que en la prueba de tiras superpuestas.

Las cepas seleccionadas fueron variadas y representativas de la realidad institucional, tanto en tipo bacteriano (Enterobacterales, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*) como en mecanismo de resistencia (NDM, VIM y L1, respectivamente)¹⁰. Dentro de *P. aeruginosa* se decidió incluir aislados no productores de MBL para poder comparar el efecto de la adición de avibactam a ATM entre ambas cepas, ya que series internacionales han demostrado escasa actividad *in vitro*, probablemente por mecanismos de resistencia distintos a Enterobacterales, como bombas de expulsión MexAB-OprM o mutación de la PBP3^{11,12}.

Dentro de las distintas pruebas para evaluación de sinergia entre ATM y CZA, la prueba de tiras de difusión se ha descrito como una alternativa de fácil implementación en el laboratorio clínico^{13,14}. Sin embargo, no está estandarizado cómo realizarla ni cómo reportar

su resultado. Puede realizarse con tiras cruzadas, tiras superpuestas (epsilometría) o tiras de ATM sobre agar con avibactam¹⁵. Históricamente, para evaluar sinergia entre dos antimicrobianos distintos se ha utilizado la concentración inhibitoria fraccional (CIF, o *FIC* en inglés), un índice complejo entre la CIM de ambos antimicrobianos con difícil traducción a la clínica¹⁶. Estudios previos han optado por reportar el resultado de la sinergia basado en el valor de la CIM combinada según puntos de corte², o bien, una disminución de la CIM de tres o más diluciones^{8,9}. Dado la ausencia de estandarización y posibilidad de error humano, en el presente estudio se optó por considerar como positivo aquellas cepas que cumplieran ambas. Adicionalmente, se debe considerar que la categoría de susceptible es distinta para Enterobacterales y *P. aeruginosa*, y no existe para *S. maltophilia*, lo cual dificulta su interpretación⁵.

La prueba de elución de discos es una alternativa novedosa, fácil, reproducible y estandarizada para la medición de sinergia de ATM con CZA, por lo cual la actual edición del CLSI la considera como prueba de elección⁵. Al compararlo contra la prueba de referencia, la microdilución en caldo ha demostrado una concordancia categórica de 98% y una tasa de errores mayores de 2%, sin errores muy mayores⁴. Dicho estudio observó cerca de 90% de susceptibilidad a la combinación de ATM con CZA en bacilos gramnegativos, a excepción de *P. aeruginosa* donde se demostró sinergia en 50%. Las discordancias con la prueba de tiras superpuestas pueden deberse a múltiples factores. A diferencia de la prueba de tiras superpuestas donde se objetivan CIM de ATM de 4 y 8 µg/mL, en la prueba de elución se alcanza una concentración de ATM en el caldo de 6 µg/mL. Esto permite usar la misma prueba para Enterobacterales y *P. aeruginosa*; sin embargo, es posible que cepas de *P. aeruginosa* con CIM de ATM cercanas a 8 µg/mL, que resultarían positivas por tiras superpuestas, pudiesen no ser inhibidas en la prueba de elución por tener una concentración menor, lo que se evidenciaría en crecimiento en el tubo D y,

por lo tanto, su interpretación como sinergia negativa. Adicionalmente, se debe considerar la dificultad en la lectura de la CIM en la prueba de tiras superpuestas, lo cual introduce error humano en su interpretación. La evaluación de sinergia entre ATM y CZA en *P. aeruginosa* tiene poco rendimiento por lo que su realización no aporta a tomar decisiones clínicas.

El presente estudio cuenta con fortalezas como un variado repertorio de bacterias, incluyendo Enterobacterales, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, con mecanismos de resistencia representativos de la realidad local. Este estudio también presenta limitaciones. Primero, el número de cepas es reducido especialmente si se desagrega por tipo; sin embargo, el aislamiento de bacilos gramnegativos productores de MBL es relativamente infrecuente en nuestro centro. En segundo lugar, en las cepas de *P. aeruginosa* no productoras de MBL no se esperaba la presencia de sinergia. No obstante, su inclusión permite comparar la escasa magnitud del efecto de la sinergia independiente de la presencia de MBL. Como tercer punto, llama la atención la presencia de una cepa de *E. cloacae* NDM con sinergia negativa. Esto puede deberse a alguna variante de NDM u otro mecanismo; sin embargo, la tipificación molecular del mecanismo de resistencia específico escapa de los objetivos del presente trabajo.

Conclusión

La concordancia entre la prueba de tiras superpuestas y la prueba de elución de discos para evaluación de sinergia entre ATM y CZA es excelente. Esta última es reproducible, fácil de realizar, leer e interpretar. Su implementación en la práctica habitual de un laboratorio clínico es factible y aconsejable en centros que manejan infecciones por bacilos gramnegativos-productores de MBL. Su rendimiento es óptimo en Enterobacterales y *S. maltophilia*, mientras que se desaconseja su realización en *P. aeruginosa* dado su bajo rendimiento.

Referencias bibliográficas

1. Tamma Pd, Heil El, Justo Ja, Mathers Aj, Satlin Mj, Bonomo Ra. Infectious Diseases Society of America 2024 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. Clin Infect Dis 2024;ciad428. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad428>.
2. Mauri C, Maraolo AE, Di Bella S, Luzzaro F, Principe L. 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 2021; 10:1012. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081012>.
3. Deschamps M, Dauwalder O, Dortet L. Comparison of ETEST® superposition method and the MTS™ Aztreonam-avibactam strip with the reference method for aztreonam/avibactam susceptibility testing. J Antimicrob Chemother 2024; 79: 685-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad407>.
4. Harris H, Tao L, Jacobs EB, Bergman Y, Adebayo A, Tekle T, et al. Multicenter evaluation of an MIC-based aztreonam and ceftazidime-avibactam broth disk elution test. J Clin Microbiol 2023; 61: e01647-22. <https://doi.org/10.1128/jcm.01647-22>.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. 2024.
6. Instituto de Salud Pública. Recomendaciones para la realización de estudios de sinergia ceftazidima/avibactam con aztreonam en cepas multiresistentes, Enterobacterales especialmente productores metalobetalactamasas 2024. <https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2024/10/Recomendaciones-para-la-Realizacion-de-Estudios-de-Sinergia-ceftazidimaavibactam.pdf>
7. Emeraud C, Escaut L, Boucly A, Fortineau

- N, Bonnin RA, Naas T, et al. Aztreonam plus clavulanate, tazobactam, or avibactam for treatment of infections caused by metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63: e00010-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00010-19>.
8. Wenzler E, Deraedt Mf, Harrington At, Danizger Lh. Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing Gram-negative pathogens. *Diag Microbiol Infect Dis* 2017; 88: 352-4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.009>.
9. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM, et al. Synergy testing by etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4678-83. <https://doi.org/10.1128/AAC.00497-10>.
10. Villamil A, Hormazábal JC, Rodas PI, Tapia T, Araya I, Iglesias R, et al. Vigilancia nacional de laboratorio de bacterias productoras de carbapenemasas en Chile: periodo 2012-2021. CO-09 XXXVIII Congreso Chileno de Infectología. Coquimbo, Chile; 2023. <https://s3.sochinf.plataform.cl/f30b7b96-0431-4497-be6e-82140c5068c5.pdf>
11. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, De Jonge BLM, Hackel MA, Sahm DF, Bradford PA. *In Vitro* Activity of aztreonam-avibactam against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated by clinical laboratories in 40 countries from 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: e00472-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00472-17>.
12. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arco-Suarez J, Vitkauskienė A, Jeannot K on behalf of ESGARS-ISARPAE members. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from esgars-escmid/isarpae group. *Clin Microbiol Infect* 2024; 30: 469-80. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.12.026>.
13. Davido B, Fellous L, Lawrence C, Maxime V, Rottman M, Dinh A. Ceftazidime-avibactam and aztreonam, an interesting strategy to overcome β -lactam resistance conferred by metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: e01008-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01008-17>.
14. Avery LM, Nicolau DP. Feasibility of routine synergy testing using antibiotic gradient diffusion strips in the clinical laboratory. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 2264-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dky165>.
15. Sreenivasan P, Sharma B, Kaur S, Rana S, Biswal M, Ray P, et al. In-vitro susceptibility testing methods for the combination of ceftazidime-avibactam with aztreonam in metallo-beta-lactamase producing organisms: Role of combination drugs in antibiotic resistance era. *J Antibiot* 2022; 75:454-62. <https://doi.org/10.1038/s41429-022-00537-3>.
16. Laishram S, Pragasam AK, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Medical Microbiol* 2017; 35: 445-68. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_17_189.