

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



70.

Métodos microbiológicos para la
determinación *in vitro* de la actividad
de combinaciones de antimicrobianos

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinadora

María Isabel Morosini Reilly

Autores

Andrés Canut Blasco
Ana Collazos Blanco
María Díez Aguilar
María Isabel Morosini Reilly
Alicia Rodríguez Gascón
Cristina Seral García



ISBN: 978-84-09-25992-2

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Canut Blasco A, Collazos Blanco A, Díez Aguilar M, Morosini Reilly MI, Rodríguez-Gascón A, Seral García C. Métodos microbiológicos para la determinación *in vitro* de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. 2020. 70.
María Isabel Morosini Reilly (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.

AVISO:

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

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

70. Métodos microbiológicos para la determinación *in vitro* de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. 2020

Coordinadora:

María Isabel Morosini Reilly¹

Autores:

Andrés Canut Blasco²

Ana Collazos Blanco³

María Díez Aguilar¹

María Isabel Morosini Reilly¹

Alicia Rodríguez Gascón⁴

Cristina Seral García⁵



¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Álava, Instituto de Investigación Biosanitaria, BioAraba, Vitoria-Gasteiz. ³Servicio de Microbiología, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid. ⁴Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Centro de Investigación Lascaray Ikergunea, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Vitoria (Álava). ⁵Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza.

1. Introducción.....	5
2. Conceptos básicos de la combinación de antimicrobianos <i>in vitro</i>.....	5
3. Métodos de laboratorio para determinar la actividad de las combinaciones de antimicrobianos....	6
3.1. Métodos tradicionales.....	6
3.1.1. Método del tablero (<i>checkerboard test</i>).....	6
3.1.1.1. Introducción.....	6
3.1.1.2. Consideraciones generales.....	8
3.1.1.3. Método del tablero para la determinación de sinergias antibióticas.....	9
3.1.2. Método de curvas de muerte.....	10
3.1.2.1. Introducción.....	10
3.1.2.2. Consideraciones generales.....	10
3.1.2.3. Método de curvas de muerte para la determinación de sinergias antibióticas.....	11
3.1.3. Métodos con tiras de gradiente de concentración.....	13
3.1.3.1. Introducción.....	13
3.1.3.2. Consideraciones generales.....	14
3.1.3.3. Métodos de tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergias antibióticas.....	14
3.1.3.4. Valoración de los métodos de sinergia con tiras de gradiente: correlación con otros métodos <i>in vitro</i> y extrapolación a la clínica: aplicaciones y limitaciones.....	15
3.2. Métodos farmacocinéticos.....	15
3.2.1. Modelos estáticos.....	17
3.2.2. Modelos dinámicos.....	17
3.2.3. Diseño de experimentos con los modelos <i>in vitro</i>	20
3.2.4. Análisis de datos e interpretación de los resultados.....	21
3.3. Nuevos métodos con potencial aplicación al estudio de sinergias antibióticas.....	23
3.3.1. Consideraciones generales.....	23
3.3.2. Microfluídica.....	23
3.3.3. Citometría de flujo.....	24
3.3.4. Calorimetría.....	25
3.3.5. Otras tecnologías: bioimpresoras.....	25
4. Bibliografía.....	26

DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-CA-01. Técnica del tablero (*checkerboard test*) mediante microdilución

PNT-CA-02. Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica

PNT-CA-03. Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica

1. INTRODUCCIÓN

La administración clínica de antimicrobianos en combinación es una práctica terapéutica que busca varios fines como son la sinergia antimicrobiana (esencialmente bactericida), la ampliación del espectro antibiótico, principalmente en pacientes con infecciones graves (endocarditis, meningitis, shock séptico, osteomielitis) y/o aquellas causadas por patógenos multirresistentes (MR) (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* MR en fibrosis quística), la disminución del tiempo de tratamiento y la reducción de la dosis de uno de los antimicrobianos en el caso de que su uso pudiese conllevar toxicidad (siempre que dicha reducción no comprometiese su actividad intrínseca), entre otros. Desde el punto de vista microbiológico, el uso de combinaciones de antimicrobianos puede contribuir a prevenir la aparición de subpoblaciones resistentes.

Actualmente, debido al aumento progresivo de la resistencia, muy pocos antimicrobianos pueden utilizarse en monoterapia frente a las infecciones causadas por microorganismos MR. Asimismo, existe un número creciente de pacientes de riesgo, tanto por su edad avanzada y en muchos casos con patologías subyacentes, como aquellos que están sometidos a diversos tratamientos inmunosupresores, que requieren una respuesta antibiótica potente y rápida ante una infección bacteriana, puesto que la capacidad de respuesta inmunitaria para la resolución del cuadro infeccioso puede ser prácticamente irrelevante. Los tratamientos combinados son, en la mayoría de los casos, empíricos, están basados en los resultados de estudios clínicos previos y pueden requerir la confirmación de su adecuación según la evolución del paciente.

2. CONCEPTOS BÁSICOS DE LA COMBINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS *IN VITRO*

En la elección de los antimicrobianos a combinar *in vitro* (generalmente con diferentes mecanismos de acción) y con el fin de elegir adecuadamente los compuestos a estudiar, se deben considerar el espectro y el mecanismo de acción de cada uno de ellos, así como las concentraciones máximas que alcanzan en suero, ya que en su estudio podrían utilizarse estos valores, así como las eventuales contraindicaciones de su administración conjunta, entre otros.

Se debe tener en cuenta que para toda combinación antibiótica el grado de correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la eficacia *in vivo* será variable y que, en la mayoría de los casos, el uso de tales combinaciones estará basado principalmente en estudios clínicos previos que avalen la eficacia de las mismas. De todos modos, los métodos *in vitro* aportan una aproximación al escenario real y que puede ser de utilidad, con la principal limitación que impone el hecho de que las propiedades farmacocinéticas de cada antibiótico no pueden quedar evidenciadas en este tipo de estudios.

Las definiciones de las interacciones *in vitro* son independientes del método empleado para su determinación y comprenden, esencialmente, dos conceptos:

Sinergia: interacción positiva en la que la suma de la actividad de los antibióticos es significativamente mayor que la actividad esperada para cada uno por separado.

Antagonismo: interacción negativa en la que el efecto de la combinación es significativamente menor que el efecto de cada compuesto cuando actúa por separado.

Otras posibles interacciones pueden ser:

Adición: el resultado de la combinación es la suma de los efectos de cada antibiótico por separado, sin que dichos compuestos interactúen entre sí (el resultado es igual a la sumatoria de la respuesta de los fármacos, sin ser esta potenciada). Este concepto ha sido abandonado en la práctica totalidad de las publicaciones debido a que su interpretación no es concluyente y puede resultar clínicamente irrelevante.

Indiferencia: la actividad de ambos antibióticos se limita a ser igual a la del más activo de la combinación.

La definición de adición y de indiferencia por separado han sido abandonadas por muchos autores, algunos solo se refieren a indiferencia y otros mencionan a ambos de manera conjunta con el concepto de “ausencia de interacción”, incluyéndolos dentro de un mismo intervalo de valores del índice de la concentración inhibitoria fraccional (siglas en inglés FIC: *fractional inhibitory concentration*) según se detalla en el apartado 3.1.1.2. de este procedimiento.

3. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LAS COMBINACIONES DE ANTIMICROBIANOS

El comportamiento de las combinaciones de antibióticos se puede medir mediante diferentes técnicas: 1) **métodos tradicionales** (entre los que se incluyen las técnicas del tablero, curvas de muerte y técnicas con tiras de gradiente de concentración); 2) **métodos farmacocinéticos y sinergia antibiótica**, que incluye los modelos de un compartimento y de dos compartimentos (modelo de fibras huecas o *hollow fiber*) y 3) **nuevas técnicas con potencial aplicación al estudio de sinergias antibióticas** (citometría de flujo, microfluídica y calorimetría isotérmica, principalmente).

Los métodos que se realizan en el laboratorio para el estudio de las interacciones antibióticas, particularmente los que en este Procedimiento se denominan “tradicionales” (3.1.), han sido y aún continúan siendo motivo de cierto debate en lo que se refiere a su precisión, puntos finales de lectura y criterios de interpretación. Aspectos tales como el uso de concentraciones fijas y de diluciones dobles (algunos autores han recomendado el uso de intervalos de concentración menores para lograr mayor precisión) y los tiempos a los que se miden los resultados son muchas veces cuestionados. Asimismo, hay publicaciones que indican que se deben hacer al menos 5 determinaciones diferentes (réplicas) en el caso de la técnica del tablero y que los datos obtenidos deberán tener $\geq 80\%$ de concordancia para dar validez a los resultados obtenidos. Un aspecto destacado que hay que tener en cuenta es que la técnica de curvas de muerte permite medir la actividad bactericida de la combinación si esta está presente, mientras que la del tablero solo aporta datos de inhibición, al igual que la técnica que emplea tiras de gradiente de concentración. Otro aspecto a considerar es la difícil extrapolación de los resultados entre una técnica y otra, como por ejemplo tablero *versus* curvas de muerte, que según algunas publicaciones no supera el 50% o en el caso de tiras de gradiente *versus* curvas de muerte, en los que la correspondencia de sus resultados es muy variable y oscila alrededor del 60%. Sin embargo, y aun teniendo en cuenta estas limitaciones, estos métodos, realizados con estricta rigurosidad, pueden contribuir a tener una idea del comportamiento esperable de la asociación de dos antibióticos, particularmente en el caso de que dicho resultado indique sinergia o antagonismo, que son las interacciones más relevantes desde el punto de vista clínico.

De todos modos, hay que recordar que ningún método de sinergia *in vitro* está estandarizado y por ello sus resultados pueden ser controvertidos, deben ser analizados con cautela y, en lo posible, conociendo los datos y la realidad clínica concomitantes.

3.1. MÉTODOS TRADICIONALES

3.1.1. Método del tablero (*checkerboard test*)

3.1.1.1. Introducción

El **método del tablero** es una de las técnicas que se utilizan para determinar la actividad *in vitro* de una combinación de antibióticos y para su realización se pueden emplear placas de microtitulación, tubos (macrodilución) o placas de agar, y debe su nombre al patrón de crecimiento que generan las diferentes diluciones dobles y seriadas al ser combinadas (tablero), tanto por encima como por debajo de las respectivas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de ambos compuestos. El intervalo de concentraciones estudiadas debe abarcar un rango relevante desde el punto de vista clínico y suele ir desde cuatro o cinco

diluciones por debajo de la CMI a dos o tres diluciones por encima. Una vez decidido el rango de diluciones a estudiar, el método consiste en filas en las que cada pocillo (o tubo) contiene la misma cantidad del antibiótico A diluido a lo largo del eje Y, y columnas, en las que cada pocillo (o tubo) contiene la misma cantidad del antibiótico B diluido a lo largo del eje X. El resultado es que cada cuadrado del tablero (que representa un pocillo o un tubo) contiene una única combinación de los dos antibióticos. Es obvio que, al tratarse de una combinación, se deberá considerar el factor de dilución al añadir ambos antibióticos para calcular su concentración final (ver figura 1).

Figura 1. Esquema de tablero: ejemplo de diluciones seriadas de la combinación de dos antibióticos en los distintos pocillos de una microplaca.

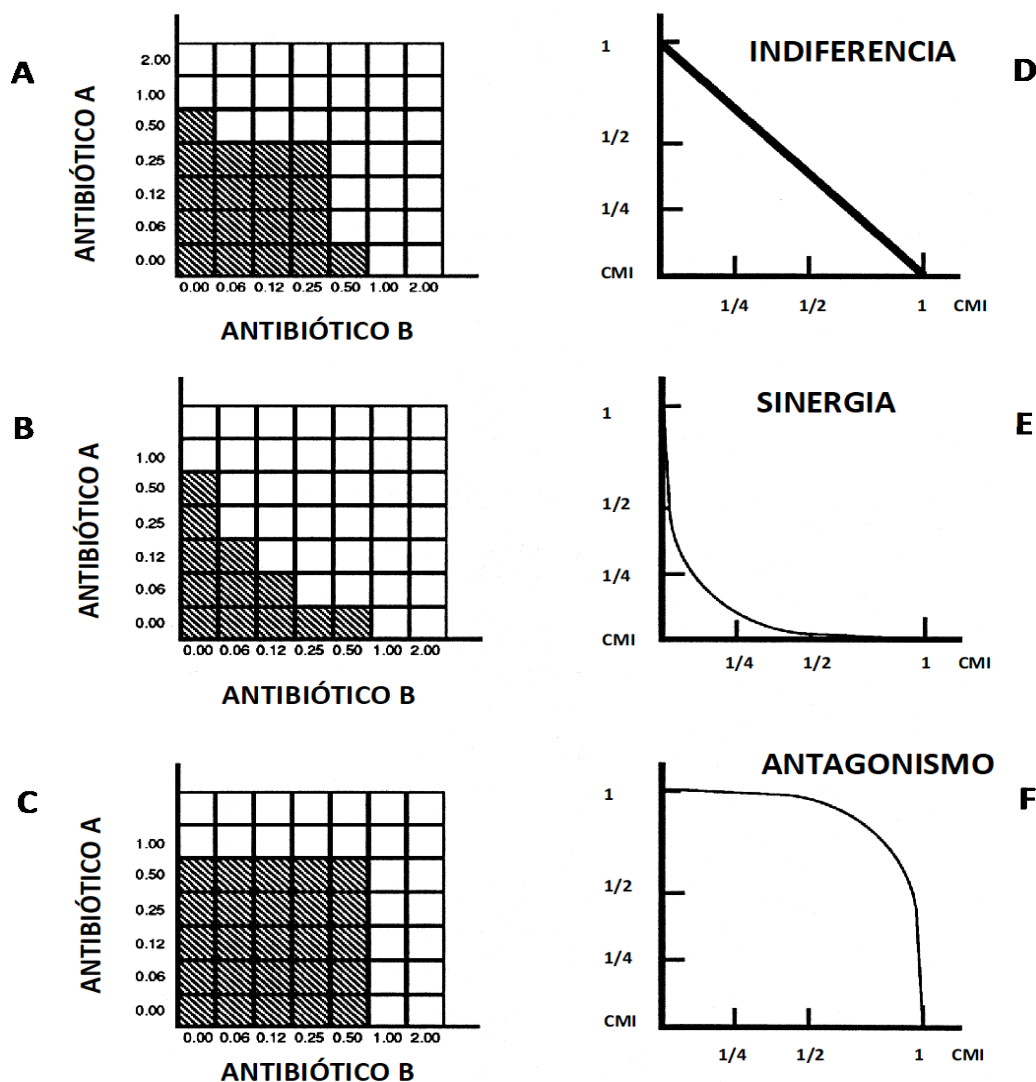
ANTIBIÓTICO A ($\mu\text{g/ml}$)	2	2/0	2/0,06				2/1	
	1	1/0						
	0,5					0,5/0,5	0,5/1	
	0,25							
	0,12	0,12/0						
	0,06							0,06/2
	0		0/0,06					
		0	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2
		ANTIBIÓTICO B ($\mu\text{g/ml}$)						

Tras el periodo de incubación, los resultados se transfieren a un esquema, indicando en cada casilla si ha habido un crecimiento visible o no. Asimismo, estos resultados se pueden transferir a una gráfica de forma aritmética denominada isoblograma. En ambos casos, la representación permite, mediante una apreciación visual, complementar los datos numéricos que definen el tipo de efecto obtenido (ver figura 2).

Figura 2. Representación de los diferentes comportamientos posibles de una combinación de dos antibióticos observados mediante el método del tablero. (Modificado de: *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition (2016). Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods.* 5.16.)

Paneles A, B y C: diferentes resultados posibles de la combinación de dos antibióticos (diluidos en escala logarítmica en base 2). Los cuadros sombreados indican crecimiento visible.

Paneles D, E y F: isobologramas, representación en escala aritmética de los tableros mostrados en A, B y C.



3.1.1.2. Consideraciones generales

Los estudios de asociación de antibióticos permiten calcular el índice de concentración inhibitoria fraccional (CIF) para cada compuesto. Este índice se calcula de la siguiente manera:

Cálculo de la CIF (concentración inhibitoria fraccional) para cada antibiótico:

- CIF del antibiótico A: $\frac{\text{CMI del antibiótico A en combinación con el B}}{\text{CMI del antibiótico A}}$
- CIF del antibiótico B: $\frac{\text{CMI del antibiótico B en combinación con el A}}{\text{CMI del antibiótico B}}$

La suma de los dos CIF permite obtener el CIF conjunto o **índice de la concentración inhibitoria fraccional de la combinación, ICIF**.

Cálculo del ICIF (de la combinación):

- $\sum \text{CIF (ICIF)} = \text{CIF A} + \text{CIF B}$

Interpretación de los resultados:

$\sum \text{CIF} \leq 0,5$: la combinación es sinérgica

$\sum \text{CIF} = 1$: la combinación es aditiva. Esta categoría de interacción, definida en los trabajos iniciales de la técnica del tablero, ha sido abandonada casi por completo ya que el valor fijado para su definición está sujeto a las posibles variaciones inherentes al método de determinación de la CMI (limitaciones propias del método).

$\sum \text{CIF} > 0,5 - \leq 4$: la combinación es indiferente (según algunos autores, “ausencia de interacción”).

$\sum \text{CIF} > 4$: la combinación es antagónica.

Si se realizan subcultivos a partir de los pocillos o tubos que no muestran crecimiento visible, se puede determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de la combinación y, conociendo la CMB de cada compuesto individual (determinada previamente), se puede calcular el índice CBF (concentración bactericida fraccional).

Cuando se realizan las gráficas de las CIF, se ve el perfil de la interacción. Una curva con forma cóncava es característica de sinergia, con forma convexa es característica de antagonismo, pero si en lugar de una curva se obtiene una recta de pendiente negativa, se debe a que la combinación de antibióticos no presenta interacción (ver figura 2).

3.1.1.3. Método del tablero para la determinación de sinergias antibióticas

Los pasos a seguir para la realización de la técnica como para el gráfico de los datos obtenidos son:

- En el eje X se colocan las diluciones de uno de los antibióticos en las siguientes concentraciones: 0; 1/8 CMI, 1/4 CMI, 1/2 CMI, CMI, 2x CMI, 4 x CMI. Estas diluciones pueden incrementarse si se considera necesario o existe la posibilidad de que exista antagonismo.
- En el eje Y se colocan las mismas diluciones para el otro antibiótico, de forma que la primera casilla es la correspondiente a 0 x CMI de los dos antibióticos.

De esta manera quedan representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones de los dos antibióticos, además de un control en la casilla con la combinación 0/0. Si los resultados no son los esperados y no puede verse interacción entre los dos antibióticos probados, habrá que repetir el método rediseñando el panel con otras concentraciones de antibióticos. Por ejemplo, si la CMI del antibiótico A es >512 mg/l y la combinación con B resulta en una CMI >512 mg/l no es necesaria la repetición puesto que el microorganismo es resistente. Pero si la CMI del antibiótico B es 2 mg/l y la combinación con A da una CMI ≤ 1 mg/l habría que repetir el panel reconfigurando las concentraciones de B por debajo de 1 mg/l, por ejemplo: 0,12, 0,25, 0,5 y 1 mg/l.

La técnica del tablero también puede realizarse en placas con agar en el que se han agregado las distintas diluciones combinadas de cada antibiótico, con anterioridad a la gelificación del medio de cultivo. También se puede realizar combinando tres antibióticos, pero esta aproximación es compleja, no solo metodológicamente sino también para la realización de los cálculos y la comprensión del resultado final. Para la preparación de los antibióticos, diluciones, medio de cultivo, inóculo, incubación y lectura de la CMI individual de cada compuesto se sigue la norma ISO 20776 (microdilución estándar) y para la interpretación de las CMIs, los puntos de corte establecidos por los comités internacionales, EUCAST o CLSI.

En cuanto a los resultados, se debe informar el microorganismo estudiado, las CMI (mg/l) de los dos antibióticos individualmente y su categorización [sensible (S), sensible con dosis incrementada (I), resistente(R)]. Asimismo, se debe informar la actividad de la combinación de los dos antibióticos y su interacción, utilizando un formato similar al siguiente:

- Informar el tipo de interacción observada (sinergia, antagonismo, etc).
- Informar a qué concentración de cada antibiótico se ha producido dicha interacción.

La técnica del tablero tiene limitaciones ya que es un método que no está estandarizado y todas las determinaciones están basadas en trabajos consensuados. Además, los resultados de las CMI están validados para los antibióticos individualmente pero no están definidos para las combinaciones, por ello, los tipos de interacción se definen en base a los valores del índice CIF. Finalmente, las sinergias obtenidas *in vitro* pueden no predecir sinergias *in vivo*. Si bien la fiabilidad de los datos del método del tablero no ha sido validada en ningún estudio clínico, el 96% de los profesionales médicos que tratan a pacientes de fibrosis quística (CF Referral Center, EE.UU) han indicado que los estudios de sinergia *in vitro* les han sido de utilidad, el 89% ha empleado dichos resultados para tratar a sus pacientes y el 84% ha confirmado que sus pacientes mejoraron tras el empleo de los regímenes sugeridos por este método.

3.1.2. Método de curvas de muerte

3.1.2.1.Introducción

La curva de muerte o curva de letalidad es un método mediante el cual se determina la actividad *in vitro* de diferentes concentraciones de un antibiótico frente a un microorganismo durante un período de tiempo que suele ser de 24 horas. Se trata, por tanto, de una técnica que mide la cinética de muerte bacteriana mediante el recuento de colonias que permanecen viables tras la exposición al antibiótico en relación al inóculo original. Este método se ha usado tradicionalmente para evaluar el comportamiento de nuevos antibióticos y además puede ayudar a comprender la causa del fallo de un determinado tratamiento en el que resulte crucial una actividad bactericida. Esta técnica también permite poner de manifiesto ciertos comportamientos que pueden encontrarse en algunas poblaciones bacterianas como la tolerancia, la persistencia y el efecto paradójico.

Las curvas de muerte permiten determinar la actividad de dos o más antibióticos combinados y extrapolar, con las limitaciones propias de todo método *in vitro*, la posible efectividad o sinergia o bien, por el contrario, el efecto antagónico que dicha combinación podría tener *in vivo*.

3.1.2.2.Consideraciones generales

El método de curvas de muerte empleando un solo antimicrobiano está estandarizado en el documento NCCLS (CLSI) M26-A, 1999. Brevemente, los detalles esenciales para llevar a cabo esta técnica consisten en conocer la CMI del antibiótico a probar con la mayor precisión posible ya que se va a trabajar con dicho valor y con múltiplos (eventualmente también con submúltiplos) del mismo; por ello, tradicionalmente, se ha indicado que la determinación de la CMI se realice mediante el método de macrodilución, si bien sería aceptable también el de microdilución. Como norma general el recuento de microorganismos viables y del inóculo control se realizará a lo largo de 24 horas, a intervalos en horas que se ajustarán al tipo de actividad del antibiótico, ya sea tiempo o concentración dependiente. Habitualmente, la toma de alícuotas para la realización de los recuentos se hace en el momento inicial (t=0) y a las 2, 4, 8, (12) y 24 horas. Debe tenerse en cuenta que para determinados microorganismos de crecimiento lento se puede prolongar la curva hasta las 48 horas con la limitación que puede acarrear una incubación prolongada a la estabilidad de determinados antibióticos como los β -lactámicos.

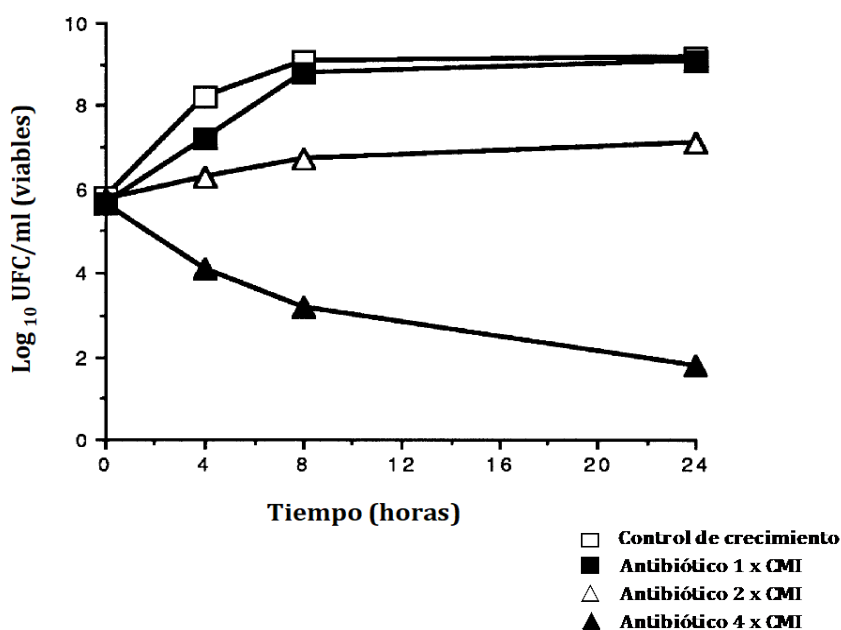
3.1.2.3. Método de curvas de muerte para la determinación de sinergias antibióticas

Este método permite establecer la actividad de dos antibióticos (el análisis de la dinámica de tres antibióticos es sensiblemente más complejo, pero también es factible) en combinación. Al igual que las otras técnicas que permiten determinar sinergias *in vitro*, el método de curvas de muerte también está basado en recomendaciones metodológicas consensuadas, ya que no existen normas de estandarización para métodos que emplean combinaciones de antibióticos.

Una vez determinadas las CMI y decididas las concentraciones a probar (múltiplos y submúltiplos de la CMI) se harán las curvas de muerte de cada antibiótico por separado y las de los compuestos que se haya decidido combinar. Para estas combinaciones se enfrentarán, en medio líquido, el inóculo bacteriano normalizado y las diferentes concentraciones elegidas de dos (eventualmente, tres) antibióticos. Se incluirá un tubo de control de crecimiento del microorganismo sin antibiótico que permitirá establecer los recuentos del inóculo frente a los cuales se harán, posteriormente, los cálculos para establecer el comportamiento de las diferentes concentraciones de la combinación a lo largo del tiempo. Las concentraciones que se estudian habitualmente corresponden a valores de 1xCMI, 2x y 4xCMI. En ciertos trabajos se incluyen valores subCMI, sin embargo, como el objetivo último de los ensayos *in vitro* en el laboratorio de Microbiología es obtener resultados que tengan aplicación clínica, en muchos casos se eligen las concentraciones que son más probables de alcanzar en el foco de la infección. Si esto no es posible, se utiliza la concentración máxima que se alcance en el suero del paciente tras administrarle el antimicrobiano ($C_{\text{máx}}$), que se emplea como valor subrogado.

Posteriormente, según los tiempos elegidos, se harán los recuentos de colonias, mediante diluciones del inóculo, incluyendo el tiempo inicial ($t=0$) y, sucesivamente, a las 2, 4, 8, (12) y 24 (o 48 horas). En esos puntos se sembrará, en el medio sólido apropiado, una alícuota del inóculo, debidamente diluido, que permita realizar el recuento tras la incubación requerida. Las placas se incubarán durante 24 horas (48 horas si fuera necesario) y posteriormente se realizará un recuento del número de unidades formadoras de colonias crecidas por mililitro (UFC/ml) teniendo en cuenta el factor de corrección debido a las diluciones realizadas. Los recuentos se representan gráficamente en escala semilogarítmica en el eje de ordenadas para las UFC/ml y el tiempo en escala aritmética en el eje de abscisas (ver figura 3).

Figura 3. Representación de una curva de muerte de un microorganismo frente a un antibiótico a las concentraciones de 1x, 2x y 4x el valor de su CMI. (Modificado de: *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition (2016). Time-kill assay.5.14.2*)



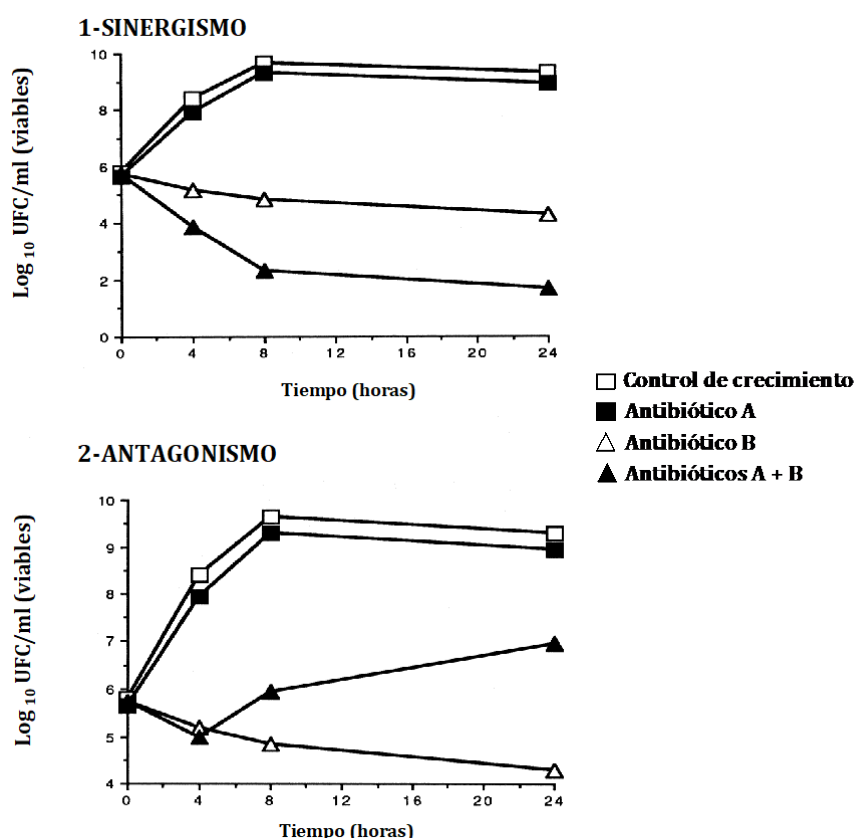
La **actividad bactericida**, tanto de un solo antibiótico como de una combinación se define como el descenso del inóculo original (tiempo 0) en $\geq 3\text{-log}_{10}$ en las UFC/ml ($\Delta \log 3$) en un tiempo determinado.

Según el comportamiento que tengan las combinaciones de antibióticos frente al inóculo original, se definen los siguientes efectos:

- **Sinergia:** si se produce una disminución de $\geq 2 \log_{10}$ UFC/ml (reducción de ≥ 100 veces del número de UFC/ml) con la combinación de antibióticos en comparación con el antibiótico más activo (ver figura 4-1).
- **Adición:** si se produce una disminución de 1 a $<2 \log_{10}$ UFC/ml con la combinación de antibióticos en comparación con el antibiótico más activo. Esta categoría ha sido prácticamente abandonada ya que el resultado puede deberse a una limitación del propio método y su significado clínico no ser concluyente.
- **Indiferencia:** si se produce una disminución o un aumento de $1 \log_{10}$ UFC/ml (reducción o incremento de 10 veces del número de UFC/ml) con la combinación de antibióticos en comparación con el antibiótico más activo
- **Antagonismo:** Si se produce un aumento de $\geq 2 \log_{10}$ UFC/ml (aumento de ≥ 100 veces del número de UFC/ml) con la combinación de antibióticos en comparación con el antibiótico más activo (ver figura 4-2).

Figura 4. Representación de dos curvas de muerte de un microorganismo frente a una combinación de antibióticos: con actividad sinérgica (1) y con actividad antagónica (2).

(Modificado de: *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition (2016). Time-kill assay for determining synergy. 5.14.3.*)



Como se ha indicado previamente, en el momento de interpretar los resultados de las curvas de muerte, es importante destacar que existen ciertos factores biológicos que pueden interferir en la capacidad de muerte ejercida por los antibióticos, ya sea cuando actúan solos o en combinación, y que tienen que ver con características propias de la población bacteriana en estudio. Tres de los principales factores o características a destacar son: la tolerancia, la presencia de células persistentes y el efecto paradójico (efecto Eagle). En este procedimiento no se describen estos fenómenos, pero deben conocerse y tenerse en cuenta si se observaran comportamientos inesperados al realizar las curvas de muerte o bien fallos en el tratamiento que no cabría esperar según los

datos de sensibilidad obtenidos *in vitro* para los antibióticos prescritos.

Como conclusión cabría indicar que las curvas de muerte con combinaciones de antibióticos permiten estudiar la dinámica de muerte y el tiempo en que esta ocurre y observar el tipo de interacción entre los compuestos combinados, ya sea sinérgica o antagónica. La realización de esta técnica implica los mismos pasos que requieren las curvas de muerte para un solo antibiótico, pero empleando varias concentraciones de una combinación previamente establecida. Con las limitaciones ya conocidas para la extrapolación confiable de resultados *in vitro-in vivo*, la búsqueda de sinergia o antagonismo mediante curvas de muerte con combinaciones antibióticas estaría justificada si la confirmación de cualquiera de los dos fenómenos pudiera predecir eficacia o fracaso clínico, respectivamente.

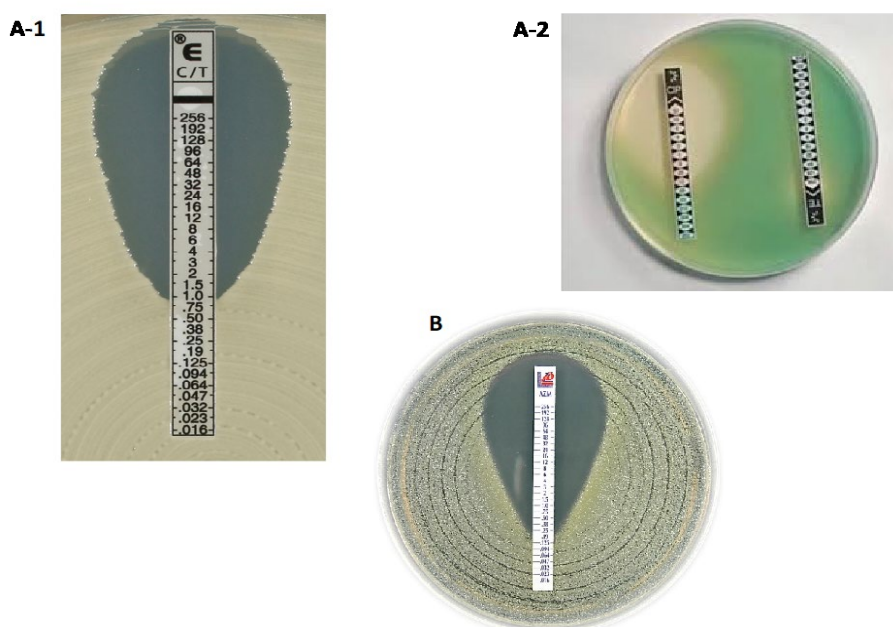
3.1.3. Métodos con tiras de gradiente de concentración

3.1.3.1. Introducción

Los métodos para el estudio *in vitro* de sinergia antibiótica son en su mayoría laboriosos, requieren tiempo para su realización y para el cálculo de los resultados finales. Esto ha limitado su uso y no constituyen por tanto métodos implementados en la rutina diaria del laboratorio de Microbiología. Sin embargo, los métodos que emplean tiras de gradiente de concentración (TG) para determinar el efecto de una combinación de antibióticos son relativamente sencillos y, aunque no están estandarizados, si se siguen las recomendaciones de los trabajos ya publicados y realizados con una metodología rigurosa, se puede obtener información útil, rápida (18-20 h) y con un grado aceptable de concordancia con los resultados obtenidos por métodos como las curvas de muerte y la técnica del tablero.

Actualmente existen TG de dos tipos de soporte distinto, unas de ellas son de plástico no poroso y otras, de papel. En ambos casos, la tira tiene un gradiente preformado del antibiótico en una de sus caras, en una escala que comprende generalmente 15 concentraciones, y debajo de ella una escala numérica serigrafiada que indica las diferentes concentraciones de dicho gradiente. Para la determinación de la CMI de un antibiótico frente a un microorganismo se realiza un antibiograma por difusión en la que un inóculo estandarizado (turbidez equivalente al valor 0,5 de la escala de McFarland) se aplica sobre la superficie de una placa de Mueller Hinton (MH) agar; sobre esta se dispone la tira con los números visibles hacia arriba y a las 18-20 horas, tras una incubación a 35 ± 2 °C, se mide el punto de la intersección de la elipse de inhibición del crecimiento bacteriano y ese valor se consigna como la CMI (ver figura 5 A-B).

Figura 5. Tiras de gradiente de CMI. A-1 y A-2: tiras de plástico. B: tira de papel



Los primeros trabajos publicados sobre la utilización de las TG para el cálculo de sinergias antibióticas datan de la década de 1990, destacando el de White RI *et al*, que en 1996 describió el método en el que ambas tiras se cruzan formando un ángulo de 90° a las concentraciones de las respectivas CMI (previamente conocidas) frente al microorganismo en estudio. Este trabajo se realizó con cepas patrón ATCC, y a partir de entonces se han desarrollado otras opciones para el uso de las TG y el estudio de sinergia antibiótica.

3.1.3.2. Consideraciones generales

Hasta el presente, para el estudio de sinergia mediante el empleo de TG se han descrito cuatro procedimientos. En todos los casos la determinación se debe realizar, al menos, por duplicado, ya que la lectura de las CMI cuando se emplean TG, particularmente si hay un crecimiento difuso en el borde de la elipse de inhibición o colonias en su interior, puede requerir una consideración especial a la hora de su interpretación.

En todos los casos, el resultado final se determinará tras la realización de los cálculos de las respectivas concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) y del índice de la concentración inhibitoria fraccional (ICIF), que definirá el comportamiento de la combinación.

Los cálculos para definir el comportamiento de una asociación *in vitro* de dos antibióticos utilizando TG se realizan del mismo modo que el que se ha indicado en el punto 3.1.1.2. de este Procedimiento. Aplicando estos cálculos se obtiene la CIF y el ICIF, y los comportamientos que se definen para la combinación a partir del valor de ICIF serán sinergia, indiferencia o antagonismo, del mismo modo que se ha indicado previamente.

3.1.3.3. Métodos de tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergias antibióticas

A) Método de TG cruzadas en ángulo recto

i) Una vez conocido el valor de las CMI de ambos antimicrobianos, las TG se cruzan en ángulo recto (90°) en el punto que corresponde a la CMI de cada uno de ellos. Si una de las CMI excede el rango de concentración de una de las tiras, la otra tira se cruzará a la altura de la máxima concentración de la primera. Tras la incubación pertinente (18-20 horas, $35 \pm 2^\circ\text{C}$) se leen las “nuevas” CMI. El tipo de interacción producida, particularmente sinergia o antagonismo, se calculará según lo indicado en el punto 3.1.1.2. de este Procedimiento. White RI *et al* (1996), autores del primer trabajo en el que se describe este método, encontraron un rango de concordancia muy variable entre esta técnica y la de curvas de muerte realizadas en paralelo (44%-88%) y de un 63%-75% con el método del tablero. Aun así, esta es la variante del método con TG que más se emplea en los laboratorios de Microbiología.

ii) Esta segunda técnica es una variación del método anterior que ha sido publicada recientemente (Motos A *et al*, 2019): en este caso las TG se cruzan en ángulo recto en los valores que corresponden a las respectivas concentraciones clínicas que cada antibiótico alcanza en el estado estacionario (C_{ss}, de las siglas en inglés) según los regímenes de dosificación recomendados. Esta aproximación tiene dos ventajas con respecto a la descrita en el apartado anterior, ya que no requiere del paso previo de conocer la CMI (24 horas a partir de tener el aislado) y se realiza teniendo en cuenta las concentraciones clínicamente representativas de aquellas que se alcanzan tras la exposición *in vivo* a las dosis estándar.

B) Método de la proporción fija

En esta técnica se inocula una placa de agar MH con un inóculo estandarizado y sobre esta se coloca la TG del antibiótico A y lo más separada posible, se coloca la tira del antibiótico B. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de manera que ambos antibióticos difundan en el medio. A la hora, se retiran ambas tiras con cuidado (con ayuda de unas pinzas) y se desechan. A continuación, se coloca una nueva TG del antibiótico A exactamente sobre la impronta dejada por B y una nueva tira de B sobre la impronta dejada por A y se incuban las placas 18-20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Es necesario también realizar las determinaciones de la CMI utilizando cada uno de los dos antimicrobianos por separado. Teniendo en cuenta los valores de las CMI

individuales y los correspondientes valores obtenidos tras realizar la combinación, se hacen los cálculos del IFCI.

C) Método de la proporción CMI:CMI

Inicialmente se determinan las CMIs del antibiótico A y del antibiótico B mediante TG. Una vez conocidos estos valores, sobre una placa de agar MH inoculada con el microorganismo en estudio, se coloca la TG del antibiótico A y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente para que difunda todo el antibiótico. Se hace lo mismo con el antibiótico B. Transcurrida la hora, se retiran las tiras, se desechan y se hace una marca a la altura del valor de cada CMI ya conocidas previamente. A continuación, una nueva TG de B se coloca sobre la impronta dejada por A pero a la altura de la marca de su CMI y lo mismo se hace con la TG de A con respecto a la impronta dejada por B, colocándola a la altura de la marca de la CMI de B. La placa se incuba 18-20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Transcurrido ese tiempo se leen las elipses de inhibición resultantes, se calcula el IFCI y se interpreta el tipo de respuesta debida a la combinación.

D) Método en placas con antibiótico incorporado en el agar

Sobre placas inoculadas con el microorganismo y que contienen incorporadas concentraciones subinhibitorias del antibiótico A (por ejemplo: 0,25xCMI, 0,5xCMI) se coloca la TG del antibiótico B. Lo mismo se realiza sobre placas inoculadas pero que no contienen antibiótico A. Tras la incubación habitual (18-20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$), el comportamiento de la combinación se considerará sinérgico si hay una reducción de más de tres diluciones en aquellas placas que contienen el antibiótico A incorporado en el medio.

3.1.3.4. Valoración de los métodos de sinergia con TG: correlación con otros métodos *in vitro* y extrapolación a la clínica: aplicaciones y limitaciones

Como se ha indicado previamente, ningún método de sinergia *in vitro* ha sido estandarizado, aun así, el método de curvas de muerte para el estudio de sinergia antibiótica, debido a que es el único que mide actividad bactericida, es considerado el más aproximado para correlacionar sus resultados con la situación *in vivo*.

Los 4 métodos que determinan sinergia con TG descritos en el punto anterior 3.1.3.3 tienen distinto grado de correlación con el de curvas de muerte y además, los datos publicados para cada uno de ellos difieren entre sí según las publicaciones. Globalmente, la mayor concordancia entre los resultados obtenidos con curvas de muerte y con TG, aunque variable según los antibióticos y los microorganismos estudiados, se da para el método de las TG cruzadas en ángulo recto (rango de concordancia: 67%-88%) y para el método de la proporción CMI:CMI (rango de concordancia: 63%-83%). Si se compara el grado de complejidad de la determinación de sinergia mediante una curva de muerte con el de una sinergia mediante TG, a pesar de algunos valores bajos de concordancia, esta última debe valorarse positivamente como una herramienta de utilidad para su uso en la rutina del laboratorio de Microbiología.

3.2. MÉTODOS FARMACOCINÉTICOS

Como se ha indicado en apartados previos, en la última década se ha producido un notable incremento en la utilización de combinaciones de antibióticos para el tratamiento de múltiples infecciones. Estas combinaciones pueden presentar mejores perfiles de eficacia y/o generar menos resistencias. Son varias las razones que justifican la combinación de antibióticos: 1) una infección puede estar causada por varios microorganismos que requieran la utilización de antibióticos con diferente espectro de actividad, 2) la infección puede deberse a un único microorganismo, pero hay una elevada probabilidad de que se genere resistencia si se utilizan antibióticos en monoterapia, y 3) en ocasiones, la utilización de una combinación de antibióticos reduce la toxicidad. Por otro lado, también es posible combinar un antibiótico con otra molécula que no tiene actividad antimicrobiana, por ejemplo, un β -lactámico y ciertos inhibidores de β -lactamasas.

A pesar del beneficio de las combinaciones de antibióticos, su utilización clínica no está libre de dificultades. No solo hay que establecer cuáles son las dosis más adecuadas de cada uno de los antibióticos, sino que también hay que optimizar los intervalos de dosificación y el periodo de tiempo entre la administración de uno y de otro. Es importante tener en cuenta que la contribución de cada uno de los antimicrobianos al efecto global y el grado de interacción entre ellos puede depender de las concentraciones.

Para optimizar la dosis de un antibiótico es esencial controlar las concentraciones a lo largo del tiempo, en la mayoría de los casos las concentraciones plasmáticas, aunque también sería deseable en tejidos y, especialmente, en el lugar de la infección (farmacocinética, PK), y además, en diferentes situaciones (dosis, vía de administración, edad, tipo de infección, interacciones con otros fármacos, etc.). Aunque el control de las concentraciones es necesario, no es suficiente. El conocimiento de la relación entre la concentración y el efecto (farmacodinamia) también resulta esencial. El análisis farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) relaciona la actividad de un antimicrobiano con las concentraciones que se alcanzan en el lugar de acción y con la sensibilidad del microorganismo al antibiótico, expresada generalmente como concentración mínima inhibitoria (CMI). La relación cuantitativa entre un parámetro PK y un parámetro farmacodinámico se conoce como índice PK/PD. Los principales índices PK/PD asociados con la eficacia son el tiempo durante el cual la concentración de fármaco libre permanece por encima de la CMI (expresado como porcentaje del intervalo de dosificación), la relación entre la concentración máxima de fármaco libre y la CMI (C_{max}/CMI) y la relación entre el área bajo la curva de concentración de fármaco libre-tiempo en un intervalo de 24 horas y la CMI (AUC_{24}/CMI).

Aunque el análisis PK/PD ha sido ampliamente utilizado en los últimos años para optimizar los regímenes de dosificación de antibióticos, apenas se ha utilizado para estudiar las combinaciones de antimicrobianos. Así, es difícil establecer si los valores de los índices PK/PD de los antibióticos administrados por separado serían o no los mismos cuando se administran en combinación. Aunque podría pensarse que la mejor opción es mantener el régimen de dosificación de cada antibiótico cuando se administra por separado, no hay evidencias científicas.

La caracterización de la actividad antimicrobiana de antibióticos administrados en combinación puede estudiarse utilizando modelos *in vitro* farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK/PD), que consideran los cambios en las concentraciones de los antibióticos a lo largo del tiempo y su interacción con la evolución de crecimiento y muerte bacteriana. En general estos modelos consisten en compartimentos que permiten poner en contacto la población bacteriana y los antibióticos, de tal forma que el efecto se puede expresar en función de la muerte o de la inhibición del crecimiento bacteriano. Los modelos *in vitro* tienen desventajas e imprecisiones. Por ejemplo, el crecimiento bacteriano no es igual en un medio líquido que en un organismo vivo y tampoco en superficies. Otro inconveniente es la agitación; en los modelos *in vitro*, los medios de cultivo deben agitarse para evitar la formación de biopelículas y la distribución desigual de las bacterias. Además, la agitación favorece la aireación, lo que estimula el crecimiento.

Estos estudios pueden llevarse a cabo mediante modelos en condiciones estáticas, si se pone en contacto un microorganismo con un antibiótico a concentraciones constantes a lo largo del tiempo, o en condiciones dinámicas, cuando se expone al microorganismo a concentraciones de antibiótico que cambian a lo largo del tiempo simulando el perfil farmacocinético *in vivo*. En la tabla 1 se recoge una comparación entre los modelos estáticos y los modelos dinámicos.

Tabla 1. Principales características de los modelos *in vitro* para estudiar el efecto de los antibióticos.

Características	Modelos estáticos	Modelos dinámicos
Sistema	Cerrado	Abierto
Concentración de antibiótico	Constante	Variable
Dilución del fármaco	No	Sí
Complejidad	Baja	Alta
Dosificación	Única	Única/múltiple
Duración	24-48 horas	Hasta 72 horas (podría ser más), según el régimen de dosificación
Volumen de medios	Bajo	Alto
Nº de cepas bacterianas	1	Varias
Pérdida de inóculo	No	Sí, dependiendo del sistema
Dilución de bacterias	-	-/+, dependiendo del sistema

3.2.1. Modelos estáticos

Los modelos estáticos suelen realizarse durante periodos de 24-48 horas. Si se necesitan tiempos más prolongados, se podría ampliar si se reemplaza el medio con medio fresco con el antibiótico. Si el antibiótico es poco estable, se pueden añadir pequeñas cantidades del antibiótico al medio de cultivo para compensar la degradación. Una ventaja de los modelos estáticos es la sencillez y el bajo coste, y que se pueden llevar a cabo con instrumentación básica, por lo que permiten evaluar un gran número de tratamientos en relativamente poco tiempo.

Los modelos estáticos permiten estudiar la dinámica del crecimiento y muerte bacteriana, el efecto del inóculo inicial sobre la muerte bacteriana y la probabilidad de seleccionar mutantes resistentes durante la exposición al antibiótico. También pueden utilizarse para evaluar las interacciones farmacodinámicas entre antibióticos y pueden servir de apoyo para establecer si la actividad de un antimicrobiano es dependiente del tiempo o de la concentración.

Debido a que las concentraciones constantes del antibiótico no representan la situación real en un paciente (salvo si se utiliza una infusión continua), la información que proporcionan los modelos estáticos tiene una relevancia limitada para optimizar los regímenes de dosificación. Además, un problema de los modelos estáticos es la depleción de nutrientes, que puede implicar cambios en el tamaño celular, la pared celular y la membrana, y estos cambios, debidos a la adaptación al medio, condicionan la sensibilidad a los antibióticos.

3.2.2. Modelos dinámicos

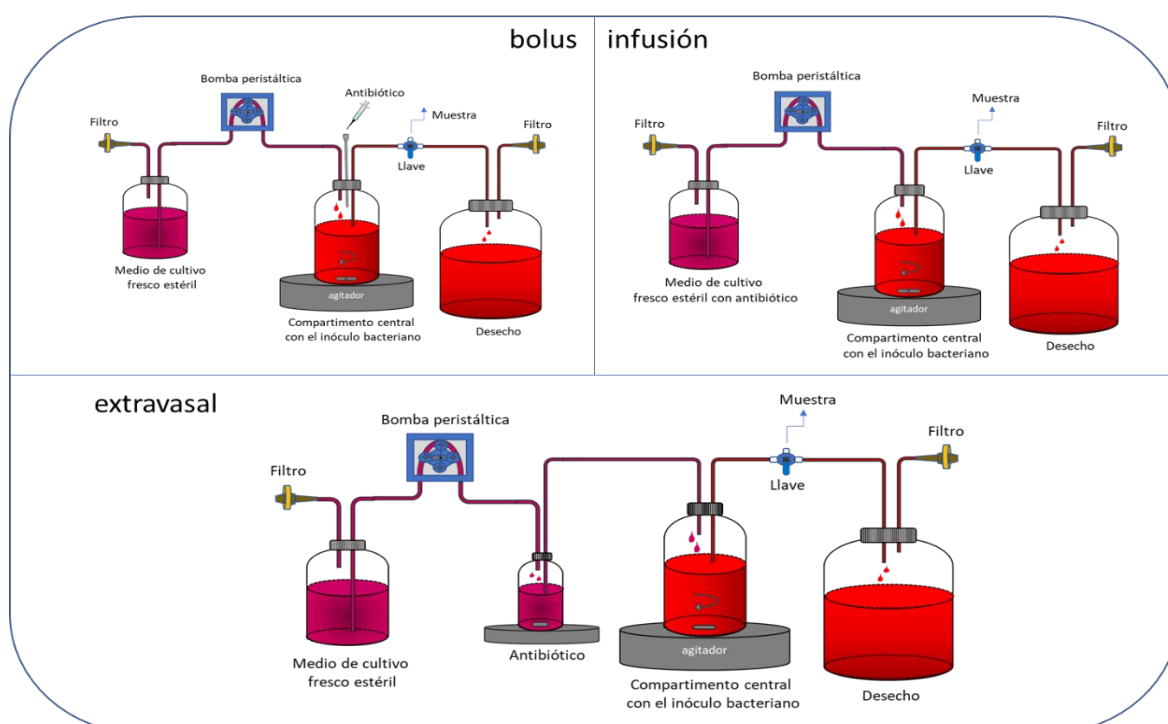
En los modelos dinámicos, la concentración del antimicrobiano va cambiando con el tiempo, simulando las concentraciones en el paciente. Se clasifican en dos categorías: modelos de un compartimento y modelos de dos compartimentos.

A) Modelo dinámico de un compartimento

Los modelos de un compartimento (Quimiostatos) consisten en un biorreactor central, generalmente con un volumen entre 100 y 250 mL en el que se añade de forma continua medio de cultivo fresco y se elimina,

también de forma continua, el medio (con la consiguiente eliminación de bacterias y de antibiótico). La velocidad de entrada y la velocidad de salida del medio se igualan para mantener el volumen constante. El antibiótico puede administrarse directamente en el compartimento (bolus) o incorporarse en el medio de cultivo fresco (en este caso se simula una infusión). También se puede simular una administración extravasal añadiendo un segundo recipiente con la solución del antibiótico que es bombeado al compartimento de acuerdo a una cinética de primer orden. Mediante este sistema, se puede evaluar el efecto antimicrobiano cuando se administra una dosis única o varias dosis, y también la influencia del régimen de dosificación. Al reemplazar continuamente el medio de cultivo, es posible mantener el sistema durante tiempos más largos que con los modelos estáticos. Además, con estos modelos se pueden estudiar las combinaciones de antibióticos. En la figura 6 se recoge un esquema con el modelo dinámico de un compartimento.

Figura 6. Modelo dinámico de un compartimento con administración del antibiótico en bolus, infusión o extravasal.



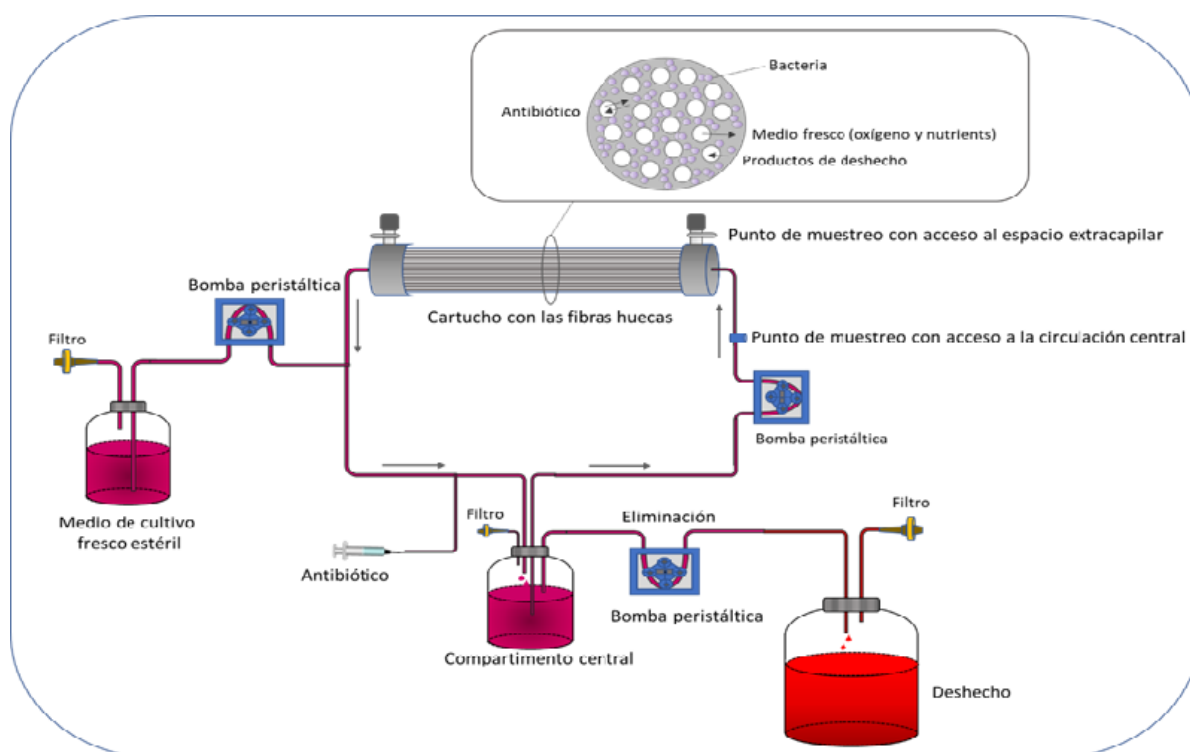
Uno de los inconvenientes de los modelos de un compartimento es la pérdida de inóculo y la posible contaminación del medio, especialmente si el ensayo es largo. En general, la duración de los experimentos puede ser de hasta 96 horas, pero a menudo suelen durar 24 horas. En los estudios con antibióticos de corta semivida de eliminación, hay una considerable pérdida de inóculo, lo que da lugar a una infraestimación de la concentración de fármaco necesaria para inducir la muerte bacteriana y la selección de mutantes resistentes, especialmente en el caso de bacterias o subpoblaciones de bacterias de replicación lenta. Para evitar esto, se pueden utilizar filtros, pero tienen el inconveniente de que suelen obstruirse. Tanto la eliminación de bacterias como una oxigenación incompleta pueden dar lugar a menores densidades de microorganismos que en el modelo estático y el modelo dinámico de dos compartimentos. Si la duración del ensayo es larga y la densidad bacteriana es alta, se pueden acumular productos de desecho procedentes de los microorganismos que limitan la utilidad de este modelo para evaluar el efecto del antimicrobiano sobre la muerte bacteriana y la selección de mutantes resistentes.

B) Modelo dinámico de dos compartimentos

Este modelo es similar al modelo de un compartimento, pero la eliminación de bacterias se evita separando las bacterias del compartimento central incorporando un compartimento periférico (normalmente de entre 10 y 20 mL).

El modelo de dos compartimentos más común es el **modelo de fibras huecas**, denominado en inglés *hollow fiber*, que además se considera el mejor modelo *in vitro* para evaluar los índices PK/PD y las concentraciones que mejor predicen la muerte bacteriana y la prevención de resistencias. Este dispositivo utiliza un cartucho constituido por miles de fibras huecas o capilares con un diámetro de aproximadamente 200 μm de diámetro, dispuestas en paralelo y que se unen en los extremos de tal forma que el medio que entra en el cartucho penetra en el interior de las fibras. El tamaño de poro de la pared de las fibras será tal que retenga al microorganismo, pero que deje pasar libremente el antibiótico y otras moléculas pequeñas. Las bacterias se inoculan en el exterior de las fibras, quedando retenidas en el espacio extracapilar (ECS), simulando una infección extravascular. El ECS es el espacio que queda entre las fibras y la pared del cartucho. El medio procedente de un reservorio central se hace recircular por el interior de las fibras, proporcionando oxígeno y soporte nutricional. Las moléculas pequeñas, como los antibióticos, la glucosa o los productos de deshecho pueden atravesar fácilmente la pared de las fibras. En la figura 7 se observa un esquema del sistema de fibras huecas.

Figura 7. Esquema del modelo dinámico de fibras huecas.



Una de las principales ventajas de este sistema es la elevada relación área/volumen, lo que proporciona una rápida y uniforme distribución del antibiótico en el ECS (puede llegar a ser de 150 cm^2/mL). Existen cartuchos comercializados, elaborados con diferentes polímeros y compatibles con diferentes tipos de fármacos, por ejemplo, polisulfona, celulosa y fluoruro de polivinilideno (PVDF). El diseño de un modelo de dos compartimentos es similar al modelo de un compartimento, excepto que los microorganismos quedan confinados en el ECS (unos 20 mL) y físicamente separados del reservorio central por la membrana semipermeable. La concentración de fármaco en el reservorio central se equilibra rápidamente con el medio del ECS en el que están las bacterias. El volumen del reservorio central puede ajustarse para conseguir cambios rápidos en la concentración del antibiótico.

Otra ventaja de este sistema es que las bacterias se disponen en un volumen pequeño (10-20 mL), similar a lo que ocurre en una infección *in vivo*. Se pueden obtener muestras fácilmente, sin afectar apenas al inóculo bacteriano. Además, es un sistema muy seguro, puesto que las bacterias están únicamente en el cartucho, lo que es muy importante cuando se manejan microorganismos peligrosos, como por ejemplo

Mycobacterium tuberculosis, *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis* o *Yersinia pestis*. Con el modelo de fibras huecas, se puede regular muy bien la cinética de absorción y la eliminación del antibiótico y permite evaluar varios antibióticos, lo que permite detectar interacciones entre fármacos y estudiar terapias de combinación.

A pesar de las ventajas, el modelo de fibras huecas también tiene inconvenientes, entre los que se incluye el alto coste, ya que los cartuchos son de un solo uso. Por ello, es importante hacer una correcta planificación y ejecución de los experimentos. Otro inconveniente es que algunos fármacos, especialmente si son lipófilos, se pueden unir a la membrana, lo que dificulta su estudio.

Debido al tamaño de poro de las membranas, las β -lactamasas se quedan retenidas en el espacio extracelular. En el caso de regímenes de dosificación subterapéuticos con limitada o nula capacidad de provocar la muerte bacteriana, las β -lactamasas se acumulan a lo largo del tiempo y pueden degradar los β -lactámicos. Esto es moderadamente controlado por las proteasas bacterianas, que rompen las β -lactamasas y puede ser mitigado con lavados de la suspensión bacteriana antes de ser inoculada en el cartucho. Por ello, la cuantificación de β -lactamasas en el ECS permitiría identificar las cepas hiperproductoras. Esto también es esencial en los estudios en los que se utilizan altos inóculos de cepas resistentes de microorganismos altamente permeables, como *Escherichia coli*. Estas cepas pueden provocar una rápida disminución de la concentración extracelular de los β -lactámicos debido a la actividad de las β -lactamasas en el espacio periplásmico de las bacterias, algo que también ocurre con los anteriores modelos.

3.2.3. Diseño de experimentos con los modelos *in vitro*

Para diseñar los experimentos con estos modelos *in vitro*, hay que tener en cuenta las siguientes variables:

1. Selección de la cepa. La cepa utilizada en los modelos debe ser relevante teniendo en cuenta la indicación clínica y el objetivo del estudio. En un estudio PK/PD robusto se debería incluir una cepa de referencia (por ejemplo, ATCC), una cepa sensible y dos, menos sensibles. Entre estas últimas, podría ser conveniente utilizar una cepa procedente de un paciente de UCI, que suelen tener valores de CMI más elevados dentro del rango de sensibilidad, así como otra de un paciente ingresado en un servicio que no sea la UCI. También es importante incluir cepas con diferentes mecanismos de resistencia.

2. Inóculo y frecuencia de mutación. Para la selección del inóculo inicial de bacterias se debe tener en cuenta el objetivo del estudio y la indicación clínica. Por ejemplo, en estudios de neumonía adquirida en el hospital y asociada a ventilación mecánica, se utiliza un inóculo elevado, de aproximadamente $10^{8.5}$ UFC (equivalente a un volumen de 15 mL de una suspensión bacteriana de $10^{7.3}$ UFC/mL). También hay que tener en cuenta la probabilidad de que aparezcan mutantes resistentes en función del tamaño del inóculo.

3. Duración de la terapia y prevención de resistencias. Dependerá del objetivo del estudio. Para establecer los índices de eficacia PK/PD, la duración de los experimentos de entre 1 y 3 días suele ser suficiente. Se suelen utilizar estudios más largos en el caso de bacterias que se dividen lentamente. La duración debe ser suficiente para determinar la exposición de antibiótico necesaria para conseguir una reducción en el número de bacterias de 1-log_{10} y 2-log_{10} o bacteriostasis a las 24 horas y al final del estudio. También hay que tener en cuenta la probabilidad de selección de mutantes resistentes.

4. Estabilidad de los antibióticos. Es fundamental asegurar la estabilidad y la solubilidad de los antimicrobianos en los medios y en las condiciones en las que se desarrollan los estudios. Muchos antibióticos son hidrosolubles, pero otros tienen una solubilidad limitada en medios acuosos, por lo que pueden precipitar. También es importante evitar la adsorción a las superficies de los tubos, frascos, membranas y filtros.

5. Perfil de concentración de antibióticos. Se debe tener en cuenta el perfil farmacocinético y la unión a proteínas plasmáticas del antibiótico en los pacientes para simular las concentraciones del antibiótico en el sistema (es importante simular las concentraciones de fármaco libre en plasma, o idealmente, en el lugar de la infección). Si un metabolito contribuye significativamente al efecto antibacteriano, deben simularse las concentraciones del antibiótico y del metabolito por separado y de ambos juntos. En el caso de profármacos, que son inactivos y/o rápidamente transformados en la molécula activa, como es el caso de tedizolid, ceftarolina, o colistina, se debe evaluar el compuesto activo, ya que la velocidad de transformación a la molécula activa puede ser diferente *in vitro* e *in vivo*. Para estudiar las combinaciones de antibióticos y obtener información sobre las interacciones que puedan darse, deben ensayarse diferentes concentraciones de cada molécula por separado y en combinación, excepto si se sabe que una de las moléculas no tiene efecto antibacteriano. En el caso de la combinación de un β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasas, es importante estudiar el β -lactámico y el valor de la CMI frente a la cepa utilizada, junto con el inhibidor de β -lactamasas a la concentración adecuada. En este sentido, es muy importante hacer un buen diseño de los estudios para minimizar el número de combinaciones a ensayar. Por ejemplo, en un reciente estudio, Sy SKB *et al.* han evaluado aztreonam y avibactam a dos niveles de concentración para cubrir el rango de 0,5-8.192 mg/L en incrementos del doble. Esto implica 16 niveles de concentración de aztreonam para cada concentración de avibactam, lo que supone un total de 80 niveles. Sin embargo, aplicando un diseño matricial, consiguieron reducir a 20 combinaciones, más 7 niveles de concentración de avibactam solo, más 5 niveles de aztreonam solo, más dos controles (total 34). Estos estudios se pueden abordar utilizando los modelos estáticos, pero son mucho más difíciles de llevar a cabo en los modelos dinámicos; de hecho, hay muy pocos estudios publicados sobre la combinación de antibióticos utilizando modelos dinámicos.

6. Cuantificación de la concentración de antibiótico. La concentración de fármaco en el sistema se debe confirmar tomando muestras a diferentes tiempos y midiendo la concentración.

7. Cuantificación del inóculo bacteriano. Es necesaria para caracterizar el perfil de inhibición del crecimiento y la muerte bacteriana, así como para detectar la aparición de mutantes resistentes. Generalmente la muerte de las bacterias predominantes se mide contando las bacterias viables en agar libre de antibiótico. Por el contrario, la cuantificación de las bacterias menos sensibles se realiza en agar con antibiótico.

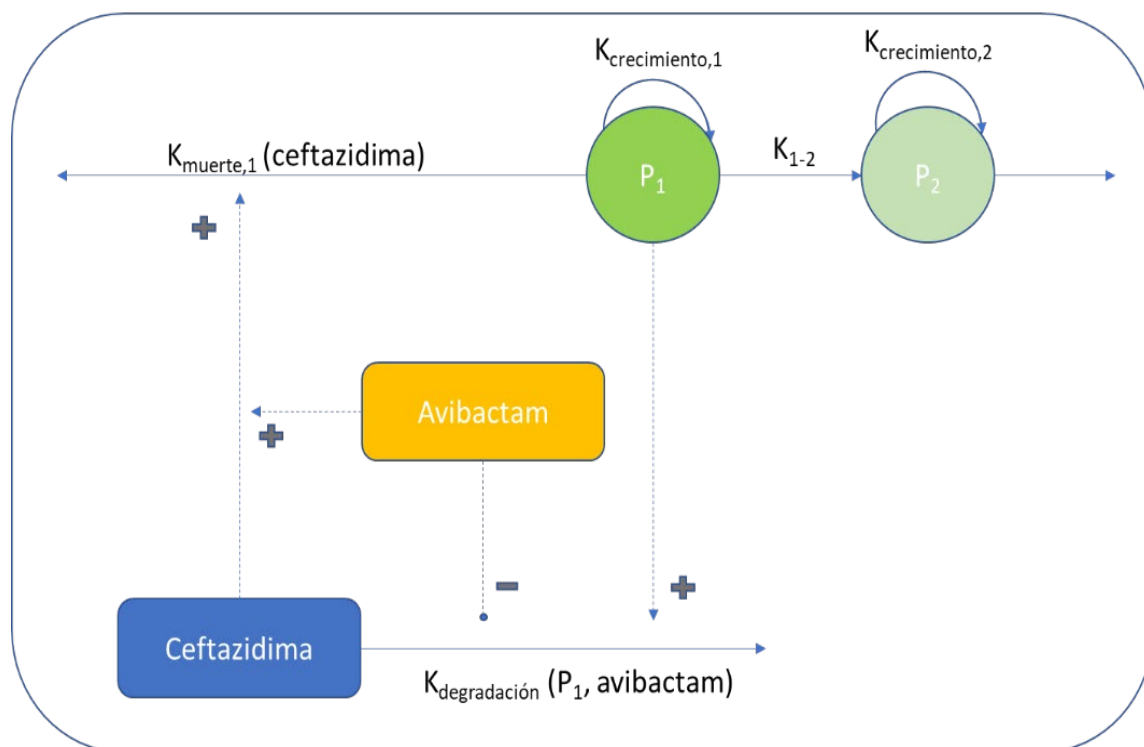
3.2.4. Análisis de datos e interpretación de los resultados

Existen diferentes modelos empíricos, semi-mecanísticos y mecanísticos basados en aproximaciones matemáticas para analizar los datos obtenidos en los estudios PK/PD *in vitro*.

Los **modelos empíricos** generalmente analizan el número de bacterias viables al final de la terapia o el área bajo las curvas de muerte bacteriana durante diferentes intervalos de tiempo. Los modelos empíricos son capaces de describir los perfiles de concentración y de bacterias viables a lo largo del tiempo, pero no tienen en cuenta información sobre los mecanismos de acción. En concreto, para la combinación de antibióticos, los modelos empíricos no son útiles para evaluar el efecto si los antibióticos actúan en lugares diferentes o tienen mecanismos de acción distintos, o si tienen diferentes grados de sinergia.

Los modelos **semi-mecanísticos** son modelos empíricos que tienen en cuenta los aspectos generales del crecimiento bacteriano y el efecto de los antibióticos, así como la selección de resistencias y son frecuentemente utilizados para tratar los datos experimentales obtenidos, tanto con modelos estáticos como dinámicos. En la figura 8 se recoge, a modo de ejemplo, el esquema del modelo utilizado para describir el efecto de ceftazidima/avibactam frente a *P. aeruginosa*.

Figura 8. Representación esquemática de un modelo que explica el efecto de la ceftazidima y avibactam sobre el crecimiento y muerte de *Pseudomonas aeruginosa* en un sistema cerrado con una densidad bacteriana dependiente de la degradación de ceftazidima.



Los **modelos mecanísticos** tienen en cuenta el ciclo del crecimiento bacteriano, la sensibilidad, interacciones fármaco-receptor, y el mecanismo de acción. Este tipo de modelos utilizan conceptos de modelización matemática en biología y se han aplicado tanto a antibióticos en monoterapia como en combinación. En el futuro, estos modelos permitirán incorporar información “ómica” que describa las interacciones hospedador-microorganismo, proporcionarán información adicional que nos ayudará a entender mejor los mecanismos que subyacen en un proceso infeccioso y a diseñar mejor las terapias de combinación de antibióticos. Existen numerosos estudios que aplican estos modelos a diferentes combinaciones de antibióticos, como por ejemplo ceftazidima/avibactam, tigeciclina con meropenem, meropenem con tobramicina, aminoglucósidos con carbapenemas. Recientemente se ha publicado un estudio en el que se aplican estos modelos a la combinación de tres moléculas: colistina, ceftolozano y tazobactam.

Una vez desarrollado un determinado modelo y obtenidos los datos experimentales, el siguiente paso es la optimización de los regímenes de dosificación para incrementar la eficacia, reducir los efectos adversos y la probabilidad de generación de resistencias. Para ello, es fundamental tener en cuenta los cambios en el perfil cinético de los antibióticos que se pueden dar en determinadas situaciones, por ejemplo, en el paciente crítico, en el paciente pediátrico, en el paciente obeso, etc. Desafortunadamente, todavía no está perfectamente establecida la traslación de los resultados obtenidos con estos modelos a la clínica. De hecho, pocos estudios incluyen simulaciones para pacientes o recomendaciones de regímenes de dosificación.

3.3. NUEVOS MÉTODOS CON POTENCIAL APLICACIÓN AL ESTUDIO DE SINERGIAS ANTIBIÓTICAS

3.3.1. Consideraciones generales

Los métodos clásicos para la determinación de sinergia antibiótica se basan en estudios del crecimiento de la cepa incubada con los antibióticos a estudiar, tanto en medio líquido (curva de muerte bacteriana, técnica del tablero), como en medio sólido (difusión con tiras de gradiente de concentración, doble difusión con discos). En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías con aplicación en el campo de la Microbiología para el estudio de la actividad de los antibióticos, basados en distintos principios como la microfluídica, la calorimetra, o la citometra de flujo. Estas metodologías se emplean con el fin de aumentar la automatización y con ello el rendimiento, el tiempo de respuesta y la eficiencia a la hora de proporcionar resultados. Su utilidad incluye el estudio tanto de la actividad de nuevos fármacos como de combinaciones de antibióticos. Aunque su aplicación se limita fundamentalmente al ámbito de la investigación, en un futuro próximo es posible que pueda ser una realidad adaptada a los laboratorios de Microbiología Clínica.

Estos métodos innovadores para abordar la sinergia antibiótica podrían facilitar el establecimiento de una técnica que se complementara con estudios clínicos para determinar la utilidad de las combinaciones en pacientes concretos.

3.3.2. Microfluídica

Las plataformas basadas en la microfluídica permiten determinar la sensibilidad fenotípica a los antibióticos mediante el uso de pequeños volúmenes de reacción, lo que permite un manejo preciso, automatización, acortamiento en el tiempo de respuesta y alto rendimiento. Estos métodos utilizan distintas tecnologías como bolas magnéticas, hidrogeles o *microarrays* en formato de microchips, algunos de ellos diseñados concretamente para trabajar con combinaciones de antibióticos a distintas concentraciones. Existe un microchip que incluye dos antimicrobianos colocados en ángulo recto, donde se pueden establecer gradientes ortogonales de concentración de ambos compuestos mediante difusión y que se enfrenta a bacterias fijadas en un gel de agarosa (ver figura 9). La plataforma genera de forma automática múltiples combinaciones con lo que se establece una matriz dosis-repuesta que permite calcular el índice Loewe. Este índice es un valor que se obtiene al emplear el modelo matemático de referencia del mismo nombre y que permite definir sinergia o antagonismo, comportamientos que dependerán del tipo de acción conjunta de dos antibióticos, con la condición de que estos actúen sobre las mismas dianas bacterianas y no de manera independiente. El modelo de Loewe se utiliza habitualmente en las plataformas basadas en la microfluídica para definir el comportamiento de las asociaciones antibióticas.

La densidad celular se mide por un análisis de imagen en una escala de grises. Con este chip se puede alcanzar el máximo crecimiento bacteriano en 7 horas a diferencia de las microplacas donde se necesita un mínimo de 16 horas. Como limitaciones, el sistema no permite el análisis bacteriano posterior y además el crecimiento de las bacterias en el gel puede ser diferente del que se produce en medio líquido. Asimismo, existe un sistema basado en microfluídica para el desarrollo de biopelículas bacterianas. Consiste en una placa con pocillos de entrada y salida de medio de cultivo unidos por microcanales donde se desarrolla la biopelícula (ver figura 10). Estos canales se pueden observar al microscopio y se pueden tetrar diferencialmente para cuantificar células vivas y muertas. El hecho de que sea un sistema dinámico, en el que se controla el flujo de nutrientes y la temperatura, hace que se aproxime de una forma más exacta a un sistema *in vivo* que los sistemas de microplacas. Una vez formado el *biofilm* se pueden ensayar tanto combinaciones antibióticas como monoterapias. Se han desarrollado *biofilms* de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e incluso *biofilms* polimicrobianos simulando la microbiota bucal.

Figura 9. Representación esquemática de la plataforma en formato microchip que permite generar gradientes de concentración ortogonales del antibiótico A y B en un cultivo bacteriano crecido en gel de agarosa. (Adaptado de: Kim S *et al.* 2019)

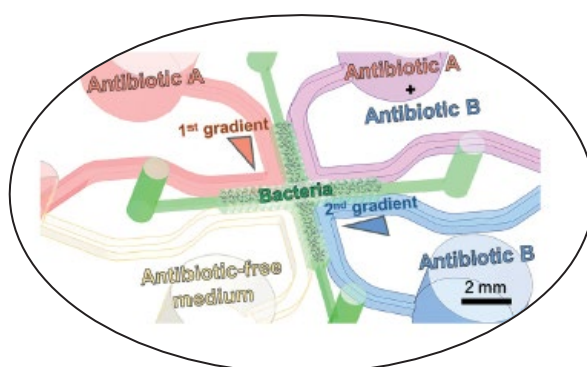
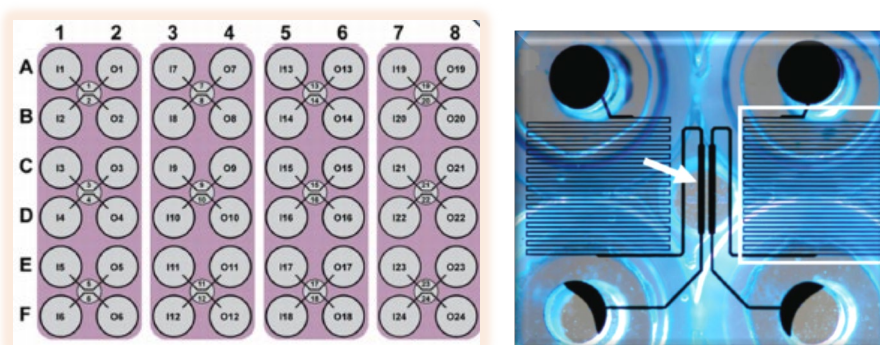


Figura 10. Esquema de la placa de Bioflux en la que se pueden generar hasta 24 biopelículas. (Adaptado de: Benoit MR *et al.* 2010)



3.3.3. Citometría de flujo

El principio de la citometría de flujo consiste en transferir células en suspensión de manera individual a través de una celda que es impactada por una o más fuentes de luz monocromáticas, de manera que se detecta la señal dispersada y la emisión de fluorescencia de cada elemento dentro de la suspensión; de este modo es posible caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares que se engloban en un conjunto. Con esta técnica es posible obtener información sobre la sensibilidad bacteriana a los antibióticos mediante el uso simultáneo de varios fluorocromos, que permiten la obtención de distintos parámetros como potencial de membrana, tamaño celular, actividad enzimática, actividad de bombas de flujo, integridad de la membrana celular y concentración bacteriana. La citometría de flujo puede, por tanto, diferenciar las subpoblaciones dañadas por un antibiótico, así como células viables, pero no cultivables que aún presentan metabolismo activo.

Existen varios estudios que han utilizado este sistema para determinar la actividad de combinaciones anti-bióticas: en *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas se comparó la actividad de la combinación de ertapenem con otra carbapenema (imipenem, meropenem, doripenem) mediante curvas de muerte y citometría de flujo, obteniendo un análisis de resultados con esta última herramienta a las 2 horas de incubación.

Vázquez-Muñoz R *et al* (2019) estudiaron la actividad de nanopartículas de plata combinadas con distintos antibióticos frente a grampositivos y gramnegativos. Mediante citometría de flujo se observó de qué manera estas partículas son capaces de alterar la integridad de la membrana celular incrementando la permeabilidad a antibióticos con dianas intracelulares.

Asimismo, esta técnica se ha utilizado para el estudio de combinaciones de antifúngicos, como anidulafungina con anfotericina B y azoles frente a distintas especies de *Candida*. Con un marcador para detectar metabolismo y uno de potencial de membrana, se demostró un buen acuerdo comparado con el método de sinergia del tablero.

3.3.4. Calorimetra

La calorimetría permite detectar los cambios térmicos causados por reacciones químicas o eventos físicos. La microcalorimetría es una técnica muy sensible que permite determinar mínimos cambios de calor en pequeños volúmenes de muestra. Aplicada a la Microbiología, permite detectar de forma precisa el calor producido relacionado con el crecimiento y el metabolismo bacteriano. La microcalorimetría isotérmica mide el calor de una reacción a temperatura constante. El cultivo bacteriano se inocula en ampollas selladas que permiten alcanzar una temperatura constante. Tiene una alta sensibilidad, permite la monitorización a tiempo real del flujo de calor y obtener resultados en menos de 10 horas. Los estudios microcalorimétricos permiten, por tanto, conocer la evolución del metabolismo bacteriano en presencia de diferentes antibióticos y/o combinaciones y determinar la concentración mínima inhibitoria calorimétrica (concentración más baja que permite inhibir la producción de calor metabólico). También permite estudiar la actividad metabólica de micobacterias, protozoos, *Schistosoma* spp. y hongos. Asimismo, tiene una gran aplicabilidad para determinar el efecto de los antibióticos sobre un *biofilm* bacteriano, formado a partir de un cultivo en presencia de bolas porosas de cristal, antes de ser sometido a la acción antibiótica. Se ha estudiado el efecto de fosfomicina, ciprofloxacino, gentamicina y sus combinaciones frente a *biofilms* de *P. aeruginosa* y *E. coli*, la actividad de distintos antibióticos y combinaciones frente a *biofilms* de *Abiotrophia defectiva* y *Granulicatella elegans* y *biofilms* de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus oralis*. En todos ellos se observaron buenas concordancias cuando se compararon con métodos tradicionales de cultivo.

3.3.5. Otras tecnologías: bioimpresoras

La tecnología que utiliza bioimpresoras de inyección permite desarrollar el método del tablero para establecer sinergias de forma automática. Esta tecnología incrementa la eficacia y la exactitud de la técnica, ya que permite dispensar pequeños volúmenes de forma precisa en una microplaca de dilución que puede contener hasta 384 pocillos

Las bioimpresoras HP-D300 adaptadas utilizan casetes en los que se pueden dispensar hasta 8 diferentes soluciones de stock de antibióticos, a partir de las cuales se pueden diseñar sinergias en el formato y concentraciones deseadas. Gracias a este sistema se evitan los errores manuales, cálculos y diluciones laboriosas que conlleva el método del tablero. El *software* del sistema calcula y dispensa los volúmenes apropiados y hace posible que se puedan evaluar numerosas combinaciones al mismo tiempo. Se han establecido sinergias para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas con 56 parejas de combinaciones antibióticas, así como combinaciones dobles y triples frente a *Legionella pneumophila*.

En definitiva, todos estos sistemas descritos permiten acelerar el tiempo de respuesta y aumentar el rendimiento a la hora de determinar sinergias antibióticas, proporcionando de esta forma una rápida repuesta a una demanda clínica. La Microbiología Clínica se adapta así a las nuevas necesidades y de la mano del desarrollo de novedosas tecnologías logra obtener resultados más rápidos y, por tanto, de mayor utilidad para los pacientes.

4. BIBLIOGRAFÍA

4.1. BIBLIOGRAFÍA TABLERO

1. Aaron SD, Vandemheen KL, Ferris W, Fergusson D, Tullis E, Haase D, Berthiaume Y, Brown N, Wilcox P, Yozghatlian V, Bye P, Bell S, Chan F, Rose B, Jeanneret A, Stephenson A, Noseworthy M, Freitag A, Paterson N, Doucette S, Harbour C, Ruel M, MacDonald N. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, double-blind, controlled clinical trial. *Lancet*. 2005; 366: 463-471.
2. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, White RL. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000; 38:43-50.
3. Carrara E, Bragantini D, Tacconelli E. Combination versus monotherapy for the treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Infect Dis*. 2018; 31:594-599.
4. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Leber AL, Ed. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods. 5.16. ASM Washington Press. 2016.
5. Jenkins SG, Schuetz AN. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy, *Mayo Clin Proc*. 2012; 87:290-308.
6. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:4124-4128.
7. Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. Antimicrobial combinations. En: Lorian V. (Ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. 4ª edición. Williams and Wilkins. Baltimore. 1991. pp. 432-492.
8. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: should they be tested? *Clin Microbiol Rev*. 1988; 1:139-156.
9. Hamilton-Miller JMT. Rationalization of terminology and methodology in the study of antibiotic interaction. *J Antimicrob Chemother*. 1985; 15:655-658.
10. Lee H, Roh KH, Hong SG, Shin HB, Jeong SH, Song W, Uh Y, Yong D, Lee K. *In vitro* synergistic effects of antimicrobial combinations on extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Ann Lab Med*. 2016; 36:138-144.
- Moellering RC Jr. Antimicrobial synergy. An elusive concept. *J Infect Dis*. 1979; 140:639-641.
11. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52:1.
12. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57:573-576.
13. Rand KH, Houck HJ, Brown P, Bennett D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37:613-615.
14. Saiman L. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. *Ped Resp Rev*. 2007; 8:249-255.

4.2 BIBLIOGRAFÍA CURVAS DE MUERTE

1. Belley A, Neesham-Grenon E, Arhin FF, McKay GA, Parr TR, Moeck G. Assessment by time-kill methodology of the synergistic effects of oritavancin in combination with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 3820-3823.
2. Brennan-Krohn T, Kirby JE. When one drug is not enough: context, methodology, and future prospects in antibacterial synergy testing. *Clin Lab Med*. 2019; 39:345-358.
3. Cantón R, Elías Sánchez J, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos. 12. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. García Rodríguez JA (Coordinador). Picazo JJ (Editor). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. M26-A. Methods for determining the bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne. PA, 1999.
5. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Time-kill assay. 5.14.2. Leber AL Ed. ASM Washington Press. 2016.
6. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Time-kill assay for determining synergy. 5.14.3. Leber AL Ed. ASM Washington Press. 2016.
7. Davis H, Brown R, Ashcraft D, Pankey G. *In vitro* synergy with fosfomycin plus doxycycline against linezolid and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Glob Antimicrob Resist. 2020; pii: S2213-7165 (20) 30015-1.
8. Díez-Aguilar M, Morosini MI, Tedim AP, Rodríguez I, Aktaş Z. Antimicrobial activity of fosfomycin-tobramycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolates assessed by time-kill assays and mutant prevention concentrations. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59:6039-6045.
9. Galani I, Nafplioti K, Chatzikonstantinou M, Souli M. *In vitro* evaluation of double-carbapenem combinations against OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates using time-kill studies. J Med Microbiol. 2018; 67:662-668.
10. Handwerger S, Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Ann. Rev Pharmacol. Toxicol. 1985; 25:349-380.
11. Jenkins SG, Schuetz AN. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. Mayo Clin Proc. 2012; 87:290-308.
12. Kuehl R, Morata L, Meylan S, Mensa J, Soriano A. When antibiotics fail: a clinical and microbiological perspective on antibiotic tolerance and persistence of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2020; 75:1071-86.
13. López Díaz MC, Ríos E, Rodríguez-Avial I, Simaluiza R, Picazo JJ, Culebras E. *In-vitro* activity of several antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates expressing aminoglycoside-modifying enzymes: potency of plazomicin alone and in combination with other agents. Int J Antimicrob Agents. 2017; 50:191-196.
14. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, Rybak MJ. Evaluation of the synergy of ceftazidime-avibactam in combination with meropenem, amikacin, aztreonam, colistin, or fosfomycin against well-characterized multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63(8). pii: e00779-19. doi: 10.1128/AAC.00779-19.
15. Okanda T, Matsumoto T. *In vitro* effect of an antimicrobial combination therapy without colistin and tigecycline for CPE and non-CPE. J Infect Chemother. 2020; 26: 322-330.
16. Pillai SK, Moellering RC, Jr, Eliopoulos GM. 2005. Antimicrobial combinations, pp. 365–440. En Lorian V (ed), Antibiotics in laboratory medicine, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA.
17. Prasetyoputri A, Jarrad AM, Cooper MA. The Eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin? Trends Microbiol. 2019; 27:339-354.
18. Ract P, Compain F, Robin F, Decre D, Gallah S, Podglajen I. Synergistic *in vitro* activity between aztreonam and amoxicillin-clavulanate against *Enterobacteriaceae*-producing class B and/or class D carbapenemases with or without extended-spectrum β -lactamases. J Med Microbiol. 2019; 68:1292-1298.
19. Tan TY, Lim TP, Lee WH, Sasikala S, Hsu LY, Kwa AL. *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55:436-438.
20. Thwaites M, Hall D, Stoneburner A, Shinabarger D, Serio AW, Krause KM, Marra A, Pillar C. Activity of plazomicin in combination with other antibiotics against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018; 92:338-345.
21. Veram P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. En: Schwalbe R, L Steele-Moore & AC Goodwin. (Eds.). Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press. Taylor and Francis Group. 2007. pp. 275-298.
22. Wistrand-Yuen P, Olsson A, Skarp K-P, Friberg LE, Nielsen EI, Lagerbäck P, Tängdén T. Evaluation of polymyxin B in combination with 13 other antibiotics against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in time-lapse microscopy and time-kill experiments, Clin Microbiol Infect. 2020; Mar 26; doi: 10.1016/j.cmi.

4.3. BIBLIOGRAFÍA GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN

1. Avery LM, Nicolau DP. Feasibility of routine synergy testing using antibiotic gradient diffusion strips in the clinical laboratory. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:2264-2265.
2. Avery LM, Nicolau DP. Assessing the *in vitro* activity of ceftazidime/avibactam and aztreonam among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Defining the zone of hope. *Int J Antimicrob Agents*. 2018. 52: 688-691.
3. Balke B, Hogardt M, Schmoldt S, Hoy L, Weissbrodt H, Häussler S. Evaluation of the E test for the assessment of synergy of antibiotic combinations against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25:25-30.
4. Gómara M, Ramón-García S. The FICI paradigm: Correcting flaws in antimicrobial *in vitro* synergy screens at their inception. *Biochem Pharmacol*. 2019; 163:299-307.
5. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5316-5322.
6. Hellmark B, Unemo M, Nilsdotter-Augustinsson Å, Söderquist B. *In vitro* antimicrobial synergy testing of coagulase-negative staphylococci isolated from prosthetic joint infections using Etest and with a focus on rifampicin and linezolid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:591-595.
7. Laishram S, Pragasam AK, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Clin Microbiol*. 2017; 35:445-468.
8. Manno G, Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the Etest to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia*-complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:28-34.
9. Motos A, Avery LA, DeRonde KJ, Elias M, Mullane EM, Kuti JL, Nicolau DP. Where should antibiotic gradient diffusion strips be crossed to assess synergy? A comparison of the standard method with a novel method using steady-state antimicrobial concentrations. *Int J Antimicrob Agents*. 2019; 53:698-702.
10. Pankey GA, Ashcraft DS. *In vitro* synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:2959-2964.
11. Pankey GA, Ashcraft DS. *In vitro* synergistic/additive activity of levofloxacin with meropenem against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 67:297-300.
12. Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 77:220-226.
13. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM, Pancholi P. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:4678-4683.
14. 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. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017; 88:352-354.
15. White RI, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time kill, checkerboard, and Etest. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:1914-1918.

4.4. BIBLIOGRAFÍA MÉTODOS FARMACOCINÉTICOS

1. Aguilar L, Canut A, Cobo Reinoso J, Giménez Mestre MJ, Rodríguez Gascón A. Análisis farmacocinético/farmacodinámico en Microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. 46. Procedimientos en Microbiología Clínica. Canut Blasco A (Coordinador). Cercenado E y Cantón R (Editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2013.
2. Brill MJE, Kristofferson AN, Zhao C, Nielsen EI, Friberg LE. Semi-mechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibiotic drug combinations. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:697-706.
3. Bulitta JB, Hope WW, Eakin AE, Guina T, Tam VH, Louie A, Drusano GL, Hoover JL. Generating robust and informative nonclinical *in vitro* and *in vivo* bacterial infection model efficacy data to support translation to humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(5): e02307-18.

4. Bulitta JB, Landersdorfer CB, Forrest A, Brown SV, Neely MN, Tsuji BT, Louie A. Relevance of pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling to clinical care of critically ill patients. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011; 12: 2044-2061.
5. Cadwell J. The hollow fiber infection model. *Principles and practice*. *Adv Antibiotics Antibodies* 2015; 1:1.
6. Canut Blasco A, Aguilar Alfaro L, Cobo Reinoso J, Giménez Mestre MJ, Rodríguez-Gascón A. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33:48–57.
7. Couet W. Pharmacokinetics/pharmacodynamics characterization of combined antimicrobial agents: a real challenge and an urgent need. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:687-688.
8. Drusano GL, Bonomo RA, Bahniuk N, Bulitta JB, Vanscoy B, Defiglio H, Fikes S, Brown D, Drawz SM, Kulawy R, Louie A. Resistance emergence mechanism and mechanism of resistance suppression by tobramycin for cefepime for *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:231-242.
9. Drusano GL, Corrado ML, Girardi G, Ellis-Grosse EJ, Wunderink RG, Donnelly H, Leeper KV, Brown M, Malek T, Hite RD, Ferrari M, Djureinovic D, Kollef MH, Mayfield L, Doyle A, Chastre J, Combes A, Walsh TJ, Dorizas K, Alnuaimat H, Morgan BE, Rello J, Torre CAM, Jones RN, Flamm RK, Woosley L, Ambrose PG, Bhavnani S, Rubino CM, Bulik CC, Louie A, Vicchiarelli M, Berman C. Dilution factor of quantitative bacterial cultures obtained by bronchoalveolar lavage in patients with ventilator-associated bacterial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62:e01323-17.
10. Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. *In vitro* pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65:186-201.
11. Landersdorfer CB, Rees VE, Yadav R, Rogers KE, Kim TH, Bergen PJ, Cheah SE, Boyce JD, Peleg AY, Oliver A, Shin BS, Nation RL, Bulitta JB. Optimization of a meropenem-tobramycin combination dosage regimen against hypermutable and nonhypermutable *Pseudomonas aeruginosa* via mechanism-based modeling and the hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(4): e02055-17.
12. Lim TP, Cai Y, Hong Y, Lim, T P, Cai, Y, Hong Y, Chan E C, Suranthran S, Teo J Q, Lee W H, Tan T Y, Hsu, L Y, Koh T H, Tan T T, Kwa A L. *In vitro* pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: 2515-2524.
13. *In vitro* pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: 2515-2524.
14. Michael J, Barth A, Kloft C, Derendorf H. Pharmacodynamic *in vitro* models to determine the effect of antibiotics. In: *Fundamentals of antimicrobial pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Vinks AA, Derendorf H, Mouton JW, editors. New York: Springer; 2014; pp: 81-112.
15. Montero M, Domene Ochoa S, López-Causapé C, VanScoy B, Luque S, Sorlí L, Campillo N, Angulo-Brunet A, Padilla E, Prim N, Pomar V, Rivera A, Grau S, Ambrose PG, Oliver A, Horcajada JP. Efficacy of ceftolozane-tazobactam in combination with colistin against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, including high-risk clones, in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64:e02542-19.
16. Rao GG, Li J, Garonzik SM, Nation RL, Forrest A. Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 689-696.
17. Sy SK, Derendorf H. Pharmacometrics in bacterial infections. In: Schmidt S, Derendorf H, editors. *Applied pharmacometrics*. 1st ed. New York: Springer; 2014; pp. 229e58.
18. Sy SKB, Derendorf H. Experimental design and modelling approach to evaluate efficacy of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:707-715.
19. Sy SK, Zhuang L, Derendorf H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibiotic dose optimization. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016; 12:93-114.
20. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. A mathematical model-based analysis of the time-kill kinetics of ceftazidime/avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2018 ; 73 :1295-1304.
21. Tängdén T, Ramos Martín V, Felton T W, Nielsen E I, Marchand S, Brüggemann R J, Bulitta J B, Bassetti M, Theuretzbacher U, Tsuji B T, Wareham D W, Friberg L E, De Waele J J, Tam V H, Roberts J A, & Infection Section for the European Society of Intensive Care Medicine, the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Study Group of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, the International Society of Anti-Infective Pharmacology and the Critically Ill Patients Study Group of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. The role of infection models and PK/PD modelling for optimising care of critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med*. 2017; 43:1021-1032.

22. Velkov T, Bergen PJ, Lora-Tamayo J, Landersdorfer CB, Li J. PK/PD models in antibacterial development. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16:573-579.
23. Yadav R, Bulitta JB, Elena K Schneider EK, Shin BS, Velkov T, Nation RL, Landersdorfer CB. Aminoglycoside concentrations required for synergy with carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa* determined via mechanistic studies and modeling. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(12):e00722-17.
24. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017; 15:519-526.

4.5. BIBLIOGRAFÍA NUEVOS MÉTODOS

1. Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Matin A. New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76:4136-4142.
2. Bou-Abdallah, F. Microcalorimetry in the BioSciences - Principles and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1860: 859-860.
3. Braissant O, Theron G, Barnard, M, Friedrich SO, Diacon A., Bonkat G. Comparison of isothermal microcalorimetry and BACTEC MGIT960 for detection of the metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. *J Appl Microbiol.* 2020; 128:1497-1502.
4. Brennan-Krohn T, Kirby J.E. Antimicrobial Synergy Testing by the inkjet printer-assisted automated checkerboard array and the manual time-kill method. *J Vis Exp.* 2019; 176:139-148.
5. Brennan-Krohn T, Truelson, KA, Smith KP, Kirby JE. Screening for synergistic activity of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* using inkjet printer-based technology. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:2775-2781.
6. Cai Y, Fan Y, Wang R, An MM, Liang BB. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:563-566.
7. Chiaraviglio L, Kirby JE. High-throughput intracellular antimicrobial susceptibility testing of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:7517-7529.
8. Díez-Aguilar M, Morosini M I, Köksal E, Oliver A, Ekkelenkamp M, Cantón R. Use of Calgary and microfluidic BioFlux systems to test the activity of fosfomycin and tobramycin alone and in combination against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(1):e01650-17.
9. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect.* 2015; 3:e00149.
10. Kim S, Masum F, Kim JK, Chung HJ, Jeon JS. On-chip phenotypic investigation of combinatory antibiotic effects by generating orthogonal concentration gradients. *Lab Chip.* 2019; 19:959-973.
11. Léonard L, Chibane LB, Bouhedda BO, Degraeve P, Oulahal N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front Microbiol.* 2016; 7:1225.
12. Maiolo EM, Tabin UF, Borens O, Trampuz A. Activities of fluconazole, caspofungin, anidulafungin, and amphotericin B on planktonic and biofilm *Candida* species determined by microcalorimetry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58:2709-2717.
13. Manneck T, Braissant O, Haggenmüller Y, Keiser J. Isothermal microcalorimetry to study drugs against *Schistosoma mansoni*. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:1217-1225.
14. March Rosselló GA, Bratos Pérez, MÁ. Antibiógrama rápido en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34:61-68.
15. Martínez-Martínez L. El futuro de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:64-71.
16. Moreno MG, Trampuz A, Di Luca M. Synergistic antibiotic activity against planktonic and biofilm- embedded *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus oralis*. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:3085-3092.
17. Moreno MG, Wang L, Masi M, De Winkler T, Trampuz A, Di Luca, M. *In vitro* antimicrobial activity against *Abiotrophia defectiva* and *Granulicatella elegans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74:2261-2268.
18. Nance WC, Dowd SE, Samarian D, Chludzinski J, Delli J, Battista J, Rickard AH. A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68:2550-2560.

19. Pina-Vaz C, Silva AP, Faria-Ramos I, Teixeira-Santos R, Moura D, Vieira TF, Sousa SF, Costa-de-Oliveira S, Cantón R, Rodrigues AG. A flow cytometric and computational approaches to carbapenems affinity to the different types of carbapenemases. *Front Microbiol.* 2016; 7:1-6.
20. Smith KP, Kirby JE. How inkjet printing technology can defeat multidrug-resistant pathogens. *Future Microbiol.* 2016; 11:1375-1377.
21. Teixeira-Santos R, Rocha R, Moreira-Rosário A, Monteiro-Soares M, Cantón E, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Novel method for evaluating *in vitro* activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or azoles. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2748-2754.
22. Tremblay YDN, Vogeeler P, Jacques M, Harel J. High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:2827-2840.
23. Vanhommerig E, Moons P, Pirici D, Lammens C, Hernalsteens JP, De Greve H, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2014; 9(8):e104561.
24. Vázquez-Muñoz R, Meza-Villezcás A, Fournier PGJ, Soria-Castro E, Juárez-Moreno K, Gallego-Hernández AL, Bogdanchikova N, Vázquez-Duhalt R, Huerta-Saquero A. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One.* 2019; 14: 1-18.
25. Wang L, Di Luca M, Tkilaishvili T, Trampuz A, Moreno MG. Synergistic activity of fosfomycin, ciprofloxacin, and gentamicin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2522.
26. Wenzler T, Steinhuber A, Wittlin S, Scheurer C, Brun R, Trampuz A. Isothermal microcalorimetry, a new tool to monitor drug action against *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(6):e1668.6.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 1	Página 1 de 10

PNT- CA-01
Técnica del tablero (*checkerboard test*)
mediante microdilución

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 10

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Este procedimiento describe el método del tablero (*checkerboard test*) para evaluar la actividad *in vitro* de dos antibióticos combinados a distintas concentraciones frente a un microorganismo, mediante su realización por la técnica de microdilución.

2. FUNDAMENTO

El método del tablero (*checkerboard test*) determina, a un tiempo fijo, la actividad *in vitro* de dos antibióticos en combinación y permite establecer si dicha combinación es más activa que cualquiera de los dos antibióticos utilizados de forma individual. Las interacciones *in vitro* de dos antibióticos se calculan a través de una fórmula algebraica y se interpretan como sinérgicas, indiferentes o antagónicas dependiendo de si la actividad antibacteriana de la combinación es mayor, equivalente o menor que la suma de actividades por separado. Estas interacciones pueden representarse además a través de gráficos denominados isobogramas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Cantón R, Elías Sánchez J, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avil C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos. 12. Procedimientos en Microbiología Clínica. García Rodríguez JA (Coordinador). Picazo JJ (Editor). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000.
2. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Leber AL, Ed. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods. 5.16. ASM Washington Press. 2016.
3. Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. Antimicrobial combinations. En: Lorian V. (Ed.). Antibiotics in laboratory medicine. 4ª edición. Williams and Wilkins. Baltimore. 1991. pp. 432-492.

4. MUESTRAS

Colonias aisladas (3-5 colonias) de morfología similar crecidas en medio de cultivo líquido básico no selectivo durante toda la noche.

En el caso de cepas congeladas, liofilizadas, o conservadas en medios de transporte será necesario, al menos, dos subcultivos previos de las mismas.

Las cepas de control ATCC serán seleccionadas de acuerdo a los antibióticos que vayan a ser probados en la combinación como control de las CMI's individuales.

5. REACTIVOS Y MEDIOS

- Medio de cultivo líquido Mueller Hinton (MH) con concentración ajustada de cationes, alicuotado en volúmenes apropiados (por ejemplo, tubos de 5 ml). Guardar a 2-8°C.
- Diluyentes para preparar la solución stock de antibióticos. Guardar a 2-8°C.
- Agua destilada en alícuotas de 25 ml en tubos con tapón. Guardar a 25°C.
- Preparar las placas de microdilución conteniendo 100 µl de solución de antibiótico por pocillo. Guardar a -70°C
- Placa de cultivo (dependerá del microorganismo en estudio). Guardar a 2-8°C.
- Tubos de 5 ml con solución salina estéril.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 10

6. APARATOS Y MATERIAL

- Placas de microdilución con pocillos de fondo en U de 96 pocillos (12 x 8).
- Tapas o film transparente para cerrar las placas de microdilución.
- Bandejas para disponer del inóculo o placas de Petri estériles.
- Puntas de micropipeta de 50 y 100 µl.
- Asas calibradas de 10 µl.
- Hisopos estériles.
- Tubos de 5 ml, 10 ml o 50 ml.
- Gradillas para tubos.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Pipetas multicanal que dispensen 50 y 100 µl.
- Turbidímetro o escala para ajustar el inóculo a la escala 0,5 McFarland.
- Balanza de precisión para pesar antibióticos.
- Agitador tipo Vórtex.
- Congelador de -70°C.
- Estufa de 35 ± 2 °C (puede ser necesario CO₂ para algunos microorganismos).

7. PROCEDIMIENTO

Para la preparación del medio de cultivo, de la solución de antibiótico y las concentraciones intermedias de los antibióticos, los tiempos y condiciones de incubación, las cepas utilizadas como control de calidad, la preparación del inóculo y la adopción de los puntos de corte se seguirán las recomendaciones del EUCAST o del CLSI.

7.1 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE MICRODILUCIÓN

7.1.1 Planificar las concentraciones finales de antibiótico del panel (ver figura 1).

- Determinar la CMI (mg/l) de cada uno de los dos antibióticos individualmente.
- Una vez conocida la CMI de cada antibiótico, incluir en el panel del tablero al menos las concentraciones entre 1/16 y 8 veces la CMI.
- Se preparará un panel por microorganismo.

7.1.2 Preparar la solución stock de antibiótico y las soluciones intermedias para el tablero (ver tabla 1)

- Una vez disuelto el antibiótico a partir de la sustancia pura valorada, se realizarán las diluciones apropiadas para conseguir las concentraciones intermedias deseadas. El volumen que se dispensará en los pocillos será de 50 µl de cada antibiótico a estudiar (antibióticos A y B).
- Para preparar las concentraciones intermedias de antibiótico hay que tener en cuenta que tienen que ser 2x (al doble) de la concentración final deseada porque al añadir cada antibiótico las concentraciones de estos se diluirán a la mitad.
- Preparar suficientes alícuotas de solución intermedia de antibiótico para rellenar los pocillos de las filas X (abscisas) e Y (ordenadas).
 - o Ejemplo: antibiótico A: piperacilina 512 mg/L: 12 pocillos x 50 µl = 0,6 ml de piperacilina a 1024 mg/l
 - o Ejemplo: antibiótico B: amicacina 64 mg/L: 12 pocillos x 50 µl = 0,6 ml de amicacina a 128 mg/l

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 10

7.1.3 Dispensar las soluciones de antibiótico en el panel (volumen final 100 µl por pocillo)

- Una vez preparadas las soluciones intermedias de antibiótico siguiendo el esquema de la tabla 1, dispensar cada antibiótico a su concentración adecuada en los pocillos correspondientes según las siguientes recomendaciones:
- Dispensar el antibiótico A (ejemplo, piperacilina) con la pipeta multicanal de la siguiente manera:
 - o Añadir 50 µl del antibiótico A (1/16 CMI) en todos los pocillos de la columna 2: A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2.
 - o Añadir 50 µl del antibiótico A (1/8 CMI) en todos los pocillos de la columna 3: A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3, H3.
 - o Añadir 50 µl del antibiótico A (1/4 CMI, 1/2 CMI, CMI, 2x CMI, 4x CMI, 8 x CMI...) en todos los pocillos de la columna 4,5,6,7,8,9... respectivamente como anteriormente.
 - o Dejar libre de antibiótico el pocillo H12.
- Dispensar el antibiótico B (ejemplo, ampicilina) con la pipeta multicanal de la siguiente manera:
 - o Añadir 50 µl del antibiótico B (1/16 CMI) en todos los pocillos de la fila 2: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11 y B12.
 - o Añadir 50 µl del antibiótico B (1/8 CMI) en todos los pocillos de la fila 3: C1-C12.
 - o Añadir 50 µl del antibiótico B (1/4 CMI, 1/2 CMI, CMI, 2x CMI, 4x CMI) en todos los pocillos de la fila 4,5,6,7,8, respectivamente, como anteriormente.
 - o Dejar libre de antibiótico el pocillo H12.
- Añadir 50 µl de medio de cultivo en la fila 1 (A2-A12) y columna 1 (B1-H1).
- Añadir 100 µl de medio de cultivo en los pocillos A1 y H12 (pocillos sin antibiótico).
- Cerrar las placas con tapa o film y guardarlas en bolsas de plástico selladas a 70°C durante un máximo de 6 meses.
- La determinación se podrá realizar en el momento, por lo que no se requerirá conservar las placas preparadas.

7.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- Utilizando un asa estéril, se toman 3-5 colonias de la misma morfología y se transfieren a un tubo con 5 ml de caldo MH.
- Incubar hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland. Esta suspensión equivale a aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. Ajustar la turbidez en un turbidímetro. El inóculo se puede realizar logrando dicha turbidez al suspender directamente las colonias necesarias a partir de las colonias.
- A partir de este punto se procederá de la siguiente manera:
 - o Diluir 1/10 en agua destilada estéril para obtener una concentración de $1-2 \times 10^7$ UFC/ml.
 - o Añadir 100 µl de inóculo a cada pocillo ($1-2 \times 10^6$ UFC/ml) y como el volumen final de pocillo será de 200 µl, el inóculo final será aprox. $4-5 \times 10^5$ UFC/ml.

7.3. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

- Volcar todo el contenido del tubo con el inóculo ya diluido en una placa de Petri estéril.
- Inocular la placa de microdilución con una pipeta multicanal o pipeta manual dispensando 100 µl de inóculo en todos los pocillos excepto en el pocillo de control H12.
- Inocular 10 µl en una placa de cultivo como control de crecimiento (la recomendada para cada tipo de microorganismo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 10

- Tapar las placas de microdilución e incubarlas en una estufa de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 h (a la atmósfera requerida por cada tipo de microorganismo).

7.4. LECTURA DE LAS PLACAS DE MICRODILUCIÓN

- Examinar las placas de agar en las que se ha hecho el control de pureza del inóculo. Si el cultivo es puro, continuar con la lectura.
- Examinar el pocillo de control de crecimiento (pocillo A1).
- Examinar el pocillo de control del medio de cultivo (control estéril o control negativo) (pocillo H12).
- Leer la CMI del antibiótico A y la CMI del antibiótico B en la fila A y en la columna 1, respectivamente.
- Leer la CMI de la combinación de los antibióticos A y B y rellenar la plantilla de la figura 2 A y 2 B.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Calcular la **CIF** (concentración inhibitoria fraccional) para cada antibiótico de la siguiente manera:

- CIF del antibiótico A: $\frac{\text{CMI del antibiótico A en combinación con el B}}{\text{CMI del antibiótico A}}$
- CIF del antibiótico B: $\frac{\text{CMI del antibiótico B en combinación con el A}}{\text{CMI del antibiótico B}}$

Calcular el **Índice de la concentración inhibitoria fraccional, ICIF**, para cada combinación de la siguiente manera:

- $\sum \text{CIF (ICIF)} = \text{CIF A} + \text{CIF B}$

Interpretación de los resultados:

- $\sum \text{CIF} \leq 0,5$: la combinación es sinérgica
- $\sum \text{CIF} > 0,5 - \leq 4$: la combinación es indiferente
- $\sum \text{CIF} > 4$: la combinación es antagónica

Algunos autores incluyen el concepto de efecto aditivo si la $\sum \text{CIF}=1$. Este concepto ha sido prácticamente abandonado porque la obtención de dicho valor podría deberse a limitaciones propias de la técnica.

Informe de resultados:

- Informar las CMIs (mg/l) de los dos antibióticos individualmente frente al microorganismo estudiado y su categorización (sensible, sensible con dosis incrementada, resistente)
- Informar la actividad de la combinación de los dos antibióticos y su interacción utilizando un formato similar al siguiente:
 - o Informar el tipo de interacción observada (según el valor de CIF: sinergia, antagonismo, etc).
 - o Informar a qué concentración de cada antibiótico (mg/l) se ha producido dicha interacción.

• RESPONSABILIDADES

Deben estar detalladas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N°1	Página 6 de 10

técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- El tratamiento de pacientes graves con combinación de antibióticos es muy frecuente y está indicado en la práctica habitual. Los tratamientos combinados son la mayoría de las veces empíricos y están basados en los resultados de estudios clínicos previos.
- Las ventajas de combinar antibióticos es aumentar su espectro, mejorar la actividad en caso de efecto sinérgico y disminuir el desarrollo de resistencias bacterianas.
- Las desventajas de combinar antibióticos es que pueda existir un efecto antagónico que retrase o impida el tratamiento eficaz.
- Este método *in vitro* está diseñado para estudiar la combinación de dos antibióticos. Aunque pueden estudiarse más de dos, los cálculos resultan complejos y de difícil extrapolación.
- Algunos autores difieren en la interpretación de resultados. Es importante indicar qué recomendaciones se han seguido para la realización de la técnica y la interpretación de los resultados.
- Se puede calcular la concentración bactericida si se subcultivan los 100 µl de cada pocillo sin crecimiento visible, tanto a partir de la CMI para los antibióticos individualmente como de la combinación (en placas de cultivo recomendado para cada tipo de microorganismo). Los valores obtenidos corresponderán a la actividad bactericida (concentración mínima bactericida, CMB) y a la concentración bactericida fraccional (CBF).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El método del tablero no está estandarizado. Los puntos de corte están definidos para los antibióticos individuales, pero no para las combinaciones. Por ello los tipos de interacción se definen en base a los valores del índice CIF.
- La lectura de los resultados es a punto final transcurrido el tiempo establecido de incubación, esto implica definir crecimiento o ausencia de crecimiento siendo por lo tanto un método estático.
- Si no se determina también la actividad bactericida de la combinación (algo que se realiza de manera infrecuente), los resultados aportan solamente datos de inhibición.
- Por su diseño y metodología la utilización de este método no puede predecir el comportamiento en biopelículas.
- Las interacciones que se producen *in vitro* y su significación clínica pueden ser inciertas ya que este método no tiene en cuenta las fluctuaciones de la concentración antibiótica en el organismo (la farmacocinética) ni la actividad del compuesto activo en el lugar de acción (la farmacodinámica).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: should they be tested? Clin Microbiol Rev. 1988; 1:139-56.
2. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Leber AL, Ed. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods. 5.16. ASM Washington Press. 2016.
3. Rahal JJ, Jr. Antibiotic combinations: the clinical relevance of synergy and antagonism. Medicine. 1978; 57:179-195.
4. Veram P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. En: Schwalbe R, L Steele-Moore & AC Goodwin. (Eds.). Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press. Taylor and Francis Group. 2007. pp. 275-298.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución		PNT- CA-01
		Edición N° 01	Página 7 de 10

Figura 1. Ejemplo de preparación de la placa de microdilución con los antibióticos A (piperacilina) y B (amicacina). Pocillo A1, control de crecimiento; pocillo H12, control negativo (estéril).

Abreviaturas del ejemplo: Piperacilina (PP) 0,5: (0,5 µg/l de piperacilina); amicacina (AK) 1: (1 µg/l de amicacina), etc. AB: antibiótico.

(Modificado de: *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Leber AL, Ed. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods. 5.16. ASM Washington Press. 2016*).

A1 No ATB	A2 PP 0.5	A3 PP 1	A4 PP 2	A5 PP 4	A6 PP 8	A7 PP 16	A8 PP 32	A9 PP 64	A10 PP 128	A11 PP 256	A12 PP 512
B1 AK 1	B2 AK 1 + PP 0.5	B3 AK 1 + PP 1	B4 AK 1 + PP 2	B5 AK 1 + PP 4	B6 AK 1 + PP 8	B7 AK 1 + PP 16	B8 AK 1 + PP 32	B9 AK 1 + PP 64	B10 AK 1 + PP 128	B11 AK 1 + PP 256	B12 AK 1 + PP 512
C1 AK 2	C2 AK 2 + PP 0.5	C3 AK 2 + PP 1	C4 AK 2 + PP 2	C5 AK 2 + PP 4	C6 AK 2 + PP 8	C7 AK 2 + PP 16	C8 AK 2 + PP 32	C9 AK 2 + PP 64	C10 AK 2 + PP 128	C11 AK 2 + PP 256	C12 AK 2 + PP 512
D1 AK 4	D2 AK 4 + PP 0.5	D3 AK 4 + PP 1	D4 AK 4 + PP 2	D5 AK 4 + PP 4	D6 AK 4 + PP 8	D7 AK 4 + PP 16	D8 AK 4 + PP 32	D9 AK 4 + PP 64	D10 AK 4 + PP 128	D11 AK 4 + PP 256	D12 AK 4 + PP 512
E1 AK 8	E2 AK 8 + PP 0.5	E3 AK 8 + PP 1	E4 AK 8 + PP 2	E5 AK 8 + PP 4	E6 AK 8 + PP 8	E7 AK 8 + PP 16	E8 AK 8 + PP 32	E9 AK 8 + PP 64	E10 AK 8 + PP 128	E11 AK 8 + PP 256	E12 AK 8 + PP 512
F1 AK 16	F2 AK 16 + PP 0.5	F3 AK 16 + PP 1	F4 AK 16 + PP 2	F5 AK 16 + PP 4	F6 AK 16 + PP 8	F7 AK 16 + PP 16	F8 AK 16 + PP 32	F9 AK 16 + PP 64	F10 AK 16 + PP 128	F11 AK 16 + PP 256	F12 AK 16 + PP 512
G1 AK 32	G2 AK 32 + PP 0.5	G3 AK 32 + PP 1	G4 AK 32 + PP 2	G5 AK 32 + PP 4	G6 AK 32 + PP 8	G7 AK 32 + PP 16	G8 AK 32 + PP 32	G9 AK 32 + PP 64	G10 AK 32 + PP 128	G11 AK 32 + PP 256	G12 AK 32 + PP 512
H1 AK 64	H2 AK 64 + PP 0.5	H3 AK 64 + PP 1	H4 AK 64 + PP 2	H5 AK 64 + PP 4	H6 AK 64 + PP 8	H7 AK 64 + PP 16	H8 AK 64 + PP 32	H9 AK 64 + PP 64	H10 AK 64 + PP 128	H11 AK 64 + PP 256	H12 No ATB

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 10

Tabla 1. Preparación de soluciones de antibiótico en un tablero.

Se indican los pasos a seguir para preparar las soluciones de antibiótico en un tablero en el que se combi-
nan dos antibióticos. El medio de cultivo (caldo MH) se combina con 1 ml de la solución antibiótica original.
La concentración intermedia tiene que prepararse dos veces más concentrada que la deseada en el pocillo
del panel.

Paso	Conc. (mg/l)	Solución antibiótica original	Medio de cultivo (ml)	Concentración intermedia de trabajo (mg/l)
Antibiótico A				
1	10.240	Stock	9	1.024
2	1.024	Paso 1	1	512
3	1.024	Paso 1	3	256
4	1.024	Paso 1	7	128
5	128	Paso 4	1	64
6	128	Paso 4	3	32
7	128	Paso 4	7	16
8	16	Paso 7	1	8
9	16	Paso 7	3	4
10	16	Paso 7	7	2
11	2	Paso 10	1	1
Antibiótico B				
1	1.280	Stock	9	128
2	128	Paso 1	1	64
3	128	Paso 1	3	32
4	128	Paso 1	7	16

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 9 de 10

Figura 2 A. Ejemplo de sinergia. Antibiótico A, piperacilina (PP); antibiótico B, ampicilina (AK). Microorganismo: *P. aeruginosa*. Inóculo final $4,5 \times 10^5$ UFC/ml. El crecimiento está representado por el sombreado. Abreviaturas: SIN: sinergia; IND: indiferencia.

		A2 A0.5	A3 A1	A4 A2	A5 A4	A6 A8	A7 A16	A8 A32	A9 A64	A10 A128	A11 A256	A12 A512
										CMI A		
B1 B1										IND		
C1 B2									IND			
D1 B4							SIN	SIN				
E1 B8					SIN	SIN						
F1 B16		IND	IND	IND								
G1 B32	CMI B											
H1 B64												

	A (Piperacilina)		B (Ampicilina)		Σ CIF	Interpretación
Poc.	Conc.	CIF A	Conc.	CIF B		
A10	128	CMI de A	0	CMI de A	CMI de A	CMI de A
B10	128	1	1	0,03	1,03	IND
C9	6	0,5	2	0,06	0,56	IND
D8	3	0,25	4	0,125	0,375	SIN
D7	1	0,125	4	0,125	0,25	SIN
E6	8	0,06	8	0,25	0,31	SIN
E5	4	0,03	8	0,25	0,28	SIN
F4	2	0,016	16	0,5	0,516	IND
F3	1	0,008	16	0,5	0,508	IND
F2	0.5	0,004	16	0,5	0,504	IND
G1	0	CMI de B	32	CMI de B	CMI de B	CMI de B

Poc.: pocillo; Conc.: concentración; CIF A: Concentración inhibitoria fraccional antibiótico A; CIF B: Concentración inhibitoria fraccional antibiótico B; Σ CIF: CIF A + CIF B

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica del tablero (<i>checkerboard test</i>) mediante microdilución	PNT- CA-01	
		Edición N° 01	Página 10 de 10

Figura 2 B. Ejemplo de antagonismo. Antibiótico A, piperacilina (PP); antibiótico B, ampicilina (AK). Microorganismo: *P. aeruginosa*. Inóculo final: 4.5×10^5 UFC/ml. El crecimiento está representado por el sombreado. Abreviaturas: IND: indiferencia; ANT: antagonismo

		A2 A0.5	A3 A1	A4 A2	A5 A4	A6 A8	A7 A16	A8 A32	A9 A64	A10 A128	A11 A256	A12 A512
	□									CMI A		
B1 B1											ANT	
C1 B2											ANT	
D1 B4										ANT		
E1 B8										ANT		
F1 B16							IND	IND	IND			
G1 B32	CMI B	IND	IND	IND	IND	IND						
H1 B64												

A (Piperacilina)			B (Ampicilina)		Σ CIF	Interpretación
Poc.	Conc.	CIF A	Conc.	CIF B		
A10	128	CMI de A	0	CMI de A	CMI de A	CMI de A
B12	512	4	1	0,03	4,03	ANT
C12	512	4	2	0,06	4,06	ANT
D10	128	1	4	0,125	1,125	IND
E10	128	1	8	0,25	1,25	IND
F9	64	0,5	16	0,5	1	IND
F8	32	0,25	16	0,5	0,75	IND
F7	16	0,125	16	0,5	0,625	IND
G6	8	0,06	32	1	1,06	IND
G5	4	0,03	32	1	1,03	IND
G4	2	0,015	32	1	1,015	IND
G3	1	0,008	32	1	1,008	IND
G2	0.5	0,004	32	1	1,004	IND
G1	CMI de B	CMI de B	32	CMI de B	CMI de B	CMI de B

Poc.: pocillo; Conc.: concentración; CIF A: Concentración inhibitoria fraccional antibiótico A; CIF B: Concentración inhibitoria fraccional antibiótico B; Σ CIF: CIF A + CIF B.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 1	Página 1 de 10

PNT-CA-02

**Técnica de curvas de muerte para la
determinación de sinergia antibiótica**

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 10

1. PROPSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es describir las etapas esenciales del procedimiento para el estudio de la actividad combinada de antimicrobianos mediante el empleo de curvas de muerte. No existen recomendaciones estándar para el estudio de sinergia mediante esta técnica, sin embargo, las curvas con asociaciones se realizan sobre la base del método empleado cuando se evalúan antibióticos individualmente, pero con la adaptación de determinados parámetros propios de una combinación.

2. FUNDAMENTO

Mediante el uso de curvas de muerte se puede determinar el efecto de la actividad combinada de dos (incluso tres) antibióticos, definir la actividad bactericida o poner de manifiesto otros comportamientos posibles de una asociación, si bien, por su trascendencia clínica, pueden resumirse principalmente en sinergia o antagonismo.

Inicialmente se harán las curvas de muerte para cada antibiótico individual según lo establecido en la norma, documentos y recomendaciones consensuados (ver apartado de documentos de consulta y de bibliografía de este PNT-CA-02 y Figuras 1A y B). Tras valorar el comportamiento de cada compuesto, y según el valor de la CMI y de la CMB de cada uno de ellos, se establecerán las concentraciones (múltiplos y submúltiplos) de cada CMI a las que se realizarán las curvas con la combinación, así como los tiempos a los que se efectuarán los recuentos de inóculo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Cantón R, Elías Sánchez J, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avil C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos. 12. Procedimientos en Microbiología Clínica. García Rodríguez JA (Coordinador). Picazo JJ (Editor). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000.
2. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Time-kill assay. 5.14.2. Leber AL Ed. ASM Washington Press. 2016.
3. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th Edition. Time-kill assay for determining synergy. 5.14.3. Leber AL Ed. ASM Washington Press. 2016.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline. NCCLS Document M26-A. Wayne. PA, 1999.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Third edition; Approved standard. NCCLS document M7-A3, Vol. 13, No. 25. 1993. NCCLS, Villanova, PA.
6. Pillai SK, Moellering RC, Jr, Eliopoulos GM. 2005. Antimicrobial combinations, p 365–440. In Lorian V (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA.
7. Veram P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. En: Schwalbe R, L Steele-Moore & AC Goodwin. (Eds.). Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press. Taylor and Francis Group. 2007. pp. 275-98.

4. MUESTRAS

Inóculo directo: se suspenden en solución salina colonias aisladas (4-5), de morfología similar, de un cultivo puro del microorganismo, de 18-20 horas de incubación. Si las curvas se van a realizar de un cultivo congelado, este deberá ser subcultivado previamente dos veces antes de la realización de la técnica.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 10

Inóculo a partir de caldo: cultivo en caldo Mueller-Hinton en fase semi-logarítmica de crecimiento (turbidez apenas visible que requerirá una medición y control previo para ajustar esta condición). Dada la relativa dificultad de ajustar este tipo de inóculo, es más habitual el uso del inóculo directo.

5. REACTIVOS Y MEDIOS

- Placas de agar sangre o del medio de cultivo necesario para el adecuado crecimiento del microorganismo en estudio.
- Medio líquido de Mueller-Hinton (MH) con concentración ajustada de cationes. Los microorganismos exigentes requieren otros medios con suplementos específicos.
- Disolvente necesario para la reconstitución de los antibióticos a estudiar.
- Diluciones stock de los antibióticos: concentraciones según rangos de CMI a estudiar. Preparación en el día de trabajo o conservada a -70°C.
- Solución salina (0,9%) estéril para efectuar las diluciones de las alícuotas para el recuento de UFC/ml. Generalmente se utilizan tubos con tapa y con 0,9 ml.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Tubos estériles de cristal con tapa (25 x 150 mm u otros).
- Matraces estériles de cristal (100-200 ml, u otros) con tapa (o papel de aluminio para tapar) .
- Agitador tipo Vórtex.
- Turbidímetro o estándares de 0,5 y 1 McFarland.
- Micropipetas de 100 µl con puntas desechables.
- Asas de siembra desechables.
- Dispositivos de incubación; estufa 35 ± 2°C; otros, ejemplo: incubador de CO₂.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

El estudio de la actividad combinada de antimicrobianos mediante el análisis de curvas de muerte es un procedimiento laborioso que debe hacerse, al menos, por duplicado, ya que existen numerosos factores técnicos y metodológicos que pueden condicionar los resultados.

Previamente a la realización de las curvas de muerte con combinaciones de antibióticos se debe conocer con precisión el valor de la CMI de cada compuesto y en este caso está indicado utilizar el método de ma-crodilución (ver documento de consulta n° 4 de este PNT-CA-02). Dicha CMI se realizará en paralelo con las cepas de control ATCC adecuadas para cada caso.

Una vez conocida la CMI, se harán las curvas de muerte para cada antibiótico por separado a diferentes múltiplos y submúltiplos del valor de la CMI. Para determinados casos se puede elegir la concentración de antimicrobiano que se alcanza en tejidos o la concentración máxima en sangre (C_{máx}). Para la realización de las curvas de muerte para un solo antibiótico referirse a los documentos de consulta n° 4, 6 y 7 indicados en este PNT-CA-02.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 10

7.2 REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CURVAS DE MUERTE CON COMBINACIONES ANTIBIÓTICAS

7.2.1. Preparación de las soluciones antibióticas de trabajo para la combinación y agregado de cada solución en los tubos según las concentraciones finales.

Desde el punto de vista metodológico, las curvas de muerte con combinaciones de antibióticos se realizan exactamente de la misma forma que aquellas que solo llevan un único compuesto, pero teniendo en cuenta, en el momento de los cálculos previos, las concentraciones finales que se requieren de cada uno de los antibióticos.

Las curvas de muerte se pueden realizar en tubos o en matraces, en ambos casos de cristal, para evitar que las bacterias se adhieran a las paredes a lo largo de la incubación. Es más frecuente realizarlas en tubos que contengan un volumen final de 10 ml de caldo MH, en los que estarán contenidos los antibióticos a combinar a sus correspondientes concentraciones finales y el inóculo bacteriano. Se harán tantos tubos como concentraciones se decidan probar, siempre referidas al valor de la CMI de la cepa en estudio o, eventualmente, utilizando el valor de la $C_{máx}$ de cada compuesto. También se procesará un tubo con 10 ml de caldo MH con el inóculo y sin antibióticos (control de crecimiento) y un tubo con 10 ml de caldo MH sin antibióticos y sin inóculo (control de esterilidad).

- i) Inicialmente se prepara una solución stock (en caldo MH) de cada uno de los antibióticos, 100 veces más concentrada que el valor final buscado en la combinación.
- ii) A partir de esa dilución stock se obtendrán, mediante diluciones, las soluciones que una vez dispensadas en los tubos correspondientes (100 μ l de cada antibiótico), permitirán tener las concentraciones elegidas para cada tubo de la curva: 1xCMI, 2xCMI, 4xCMI y, eventualmente, 1/2 CMI, 1/4 CMI.
- iii) A cada tubo con 9,7 ml de caldo MH (excepto el de control de inóculo y el de control de esterilidad) se añadirán 100 μ l de la solución 100 veces más concentrada de cada uno de los dos antibióticos de la combinación que, en el volumen final (10 ml), permita tener las concentraciones elegidas y citadas previamente: 1xCMI, 2xCMI, etc.

7.2.2. Preparación del inóculo e inoculación de los tubos de las curvas.

El inóculo se preparará a partir de una suspensión directa de colonias o de un cultivo previo en caldo MH, en ambos casos de cultivo en placa de agar de 18-20 horas de incubación. El inóculo se ajustará en solución salina o en MH a una turbidez equivalente al 1 de la escala McFarland (3×10^8 UFC/mL) y a continuación se realizará una dilución 1:5 en caldo MH (6×10^7 UFC/ml); al añadir 0,1 ml (100 μ l) de esta dilución en cada tubo de la curva con 9,9 ml de MH (ya contiene los dos antibióticos añadidos en volúmenes de 100 μ l cada uno (ver 7.2.1. iii) (excepto al tubo de control de esterilidad), la concentración final del inóculo será de aprox. 6×10^5 UFC/mL. Mezclar suavemente.

❖ No se deben estudiar las sinergias antibióticas por curvas de muerte en aquellos microorganismos que no crecen adecuadamente en medio líquido.

7.2.3. Incubación

- i) Antes de proceder a la incubación de todos los tubos, se toma una alícuota de 100 μ l del tubo de control de inóculo en el momento del inicio de las determinaciones para realizar el recuento correspondiente al

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 10

tiempo=0 (tiempo cero), introduciendo dicho volumen en un tubo (usualmente del tipo eppendorf, con 0,9 ml de solución salina) y realizando diluciones sucesivas que permitan efectuar el recuento posterior de colonias. Este recuento se hará en las placas de agar sobre las que se habrán extendido y estriado, a su vez, 100 µl de cada dilución. Realizar este recuento por duplicado. (ver figuras 1B y 2)

ii) Incubar de inmediato todos los tubos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Si se trabaja con volúmenes finales de más de 10 ml, ya sea en tubos o en matraces, estos deberán incubarse con agitación.

iii) En el momento de la siguiente toma de muestras para recuento (por ejemplo, 2 h) se retiran los tubos de la estufa (excepto del tubo de control de esterilidad), se agitan suavemente (mediante movimientos giratorios) y de cada uno de ellos se toman 100 µl para realizar las diluciones seriadas y el consiguiente cultivo en placa. Realizar todos los recuentos por duplicado (ver figura 2 B). Los tubos se reincuban de inmediato.

iv) Se repite el paso iii a las horas establecidas previamente (por ejemplo, 4-8-[12] y 24 h).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

i) A las 24 horas de incubación, se leen las placas y se realizan los recuentos de colonias. Los correspondientes a los últimos subcultivos pueden requerir algunas horas más para una correcta visualización de las colonias.

ii) Confirmar la esterilidad del tubo destinado a tal fin.

iii) Confirmar, mediante el recuento de colonias de las placas de recuento que corresponden, que el inóculo inicial ($t=0$) se corresponde con la densidad bacteriana requerida: aproximadamente 6×10^5 UFC/ml.

iv) Hacer el recuento de colonias de cada tiempo y anotar los datos obtenidos (al igual que el del tiempo inicial) en una hoja diseñada para tal fin (ver figura 2). Consignar el valor promedio de UFC/ml que haya en las placas que muestren entre 30 y 300 colonias.

v) Realizar las conversiones pertinentes del recuento teniendo en cuenta todas las diluciones realizadas con el fin de que el valor final de UFC esté referido a 1 ml.

vi) Convertir el número de UFC/ml en un valor expresado como $\log_{10}$.

vii) Graficar $\log_{10}$ UFC/ml en el eje de las ordenadas y el tiempo (en h) en el eje de las abscisas.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar detalladas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Las curvas de muerte para determinar sinergia mediante el uso de combinaciones de antibióticos constituyen una técnica laboriosa; sin embargo, permiten estudiar la dinámica de la sinergia o del antagonismo mediante el único método *in vitro* que evalúa la tasa y el grado de muerte de un inóculo bacteriano. Este método se emplea sobre todo en casos de infecciones graves (meningitis, endocarditis, osteomielitis) en las que se objetiva que el tratamiento, instaurado en muchos casos de forma empírica, no resulta eficaz, incluso en el caso en que cabría esperar una respuesta favorable de acuerdo a los parámetros de sensibilidad *in vitro* del microorganismo implicado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N°1	Página 6 de 10

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

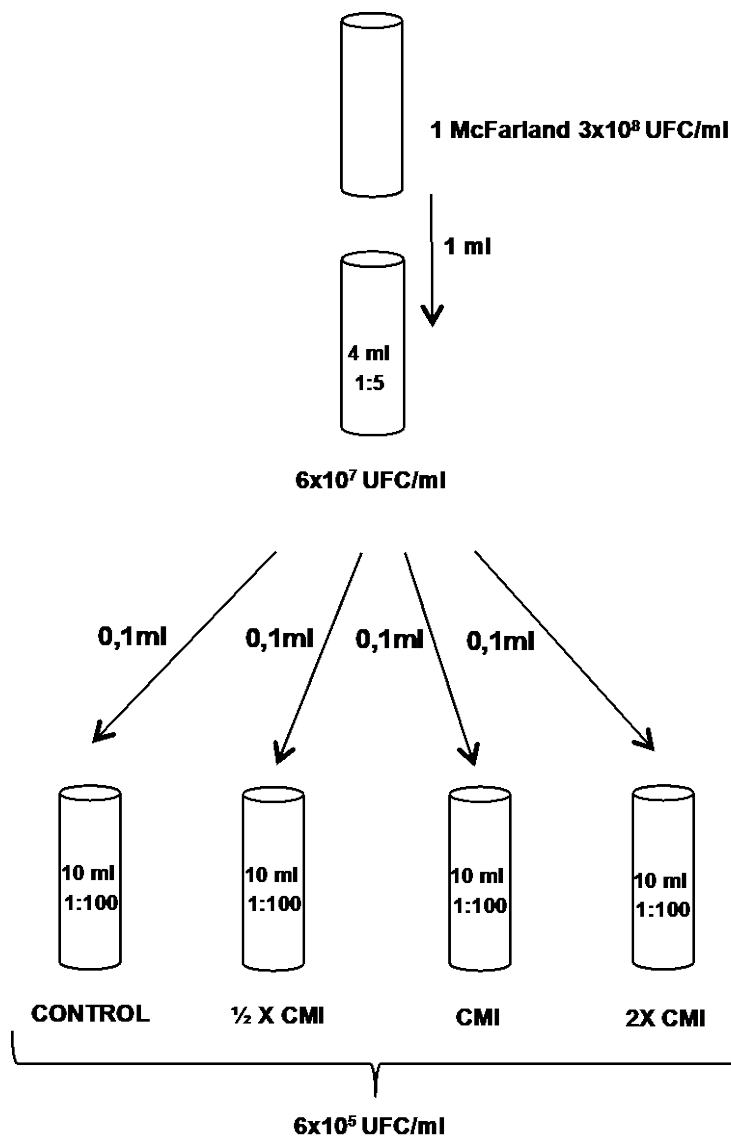
- En la realización de curvas de muerte, particularmente con combinaciones de antibióticos, hay que tener en cuenta numerosos factores técnicos, así como realizar un cálculo riguroso de diluciones antibióticas, inóculo y recuentos de colonias.
- El método de sinergia no está estandarizado y se realiza en base a recomendaciones consensuadas en la literatura.
- Por cada antibiótico incluido en la combinación será necesario realizar previamente una curva de muerte para el compuesto individual por lo que en el mismo estudio de sinergia es factible evaluar un número limitado de combinaciones.
- Las determinaciones se deben realizar por duplicado.
- Las sinergias obtenidas *in vitro* pueden no predecir las sinergias obtenidas *in vivo*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bremmer DN, Bauer KA, Pouch SM, Thomas K, Smith D, Goff DA, Pancholi P, Balada-Llasat JM. Correlation of checkerboard synergy testing with time-kill analysis and clinical outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:6892-95.
2. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:1757-62.

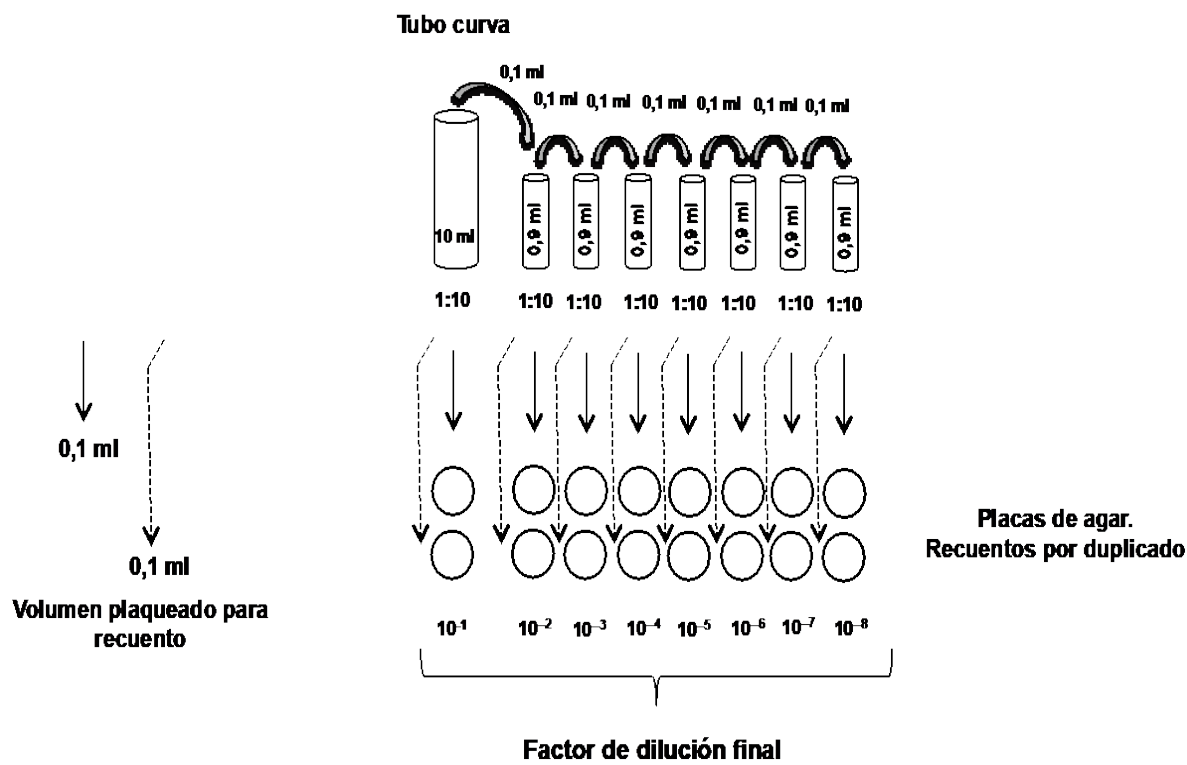
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 10

Figura 1 A. Preparación del inóculo para una curva de muerte.
(Modificado de: documento de consulta n° 2 de este PNT-CA-02)



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 10

Figura 1 B. Curva de muerte: esquema de dilución para el recuento de colonias.(Modificado de: documento de consulta nº 2 de este PNT-CA-02).



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica		PNT-CA-02
		Edición N° 01	Página 9 de 10

Figura 2. Ejemplo de hoja de trabajo para consignar los resultados obtenidos durante la realización de las curvas de muerte con combinación de antibióticos. (Modificado de: documento de consulta n° 3 de este PNT-CA-02).

Concentración de antibióticos (µg/ml)	Tiempo (h)	UFC en las placas de recuento correspondientes a cada dilución de la combinación A+B (0,1 ml, por duplicado)								UFC		Log ₁₀ UFC	
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Promedio UFC/ml	Δ UFC/ml (Control vs. A+B)	Promedio UFC/ml	Δ UFC/ml (Control vs. A+B)
Control inóculo	0												
Control inóculo	2												
Control inóculo	4												
Control inóculo	8												
Control inóculo	24												
1xCMI A + 1xCMI B	2												
1xCMI A + 1xCMI B	4												
1xCMI A + 1xCMI B	8												
1xCMI A + 1xCMI B	24												

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica de curvas de muerte para la determinación de sinergia antibiótica		PNT-CA-02
		Edición N° 01	Página 10 de 10

Figura 2. Continuación

2xCMI A + 2xCMI B	2												
2xCMI A + 2xCMI B	4												
2xCMI A + 2xCMI B	8												
2xCMI A + 2xCMI B	24												
4xCMI A + 4xCMI B	2												
4xCMI A + 4xCMI B	4												
4xCMI A + 4xCMI B	8												
4xCMI A + 4xCMI B	24												

NOTA: en el ejemplo mostrado se ha eliminado el recuento en el tiempo inicial (t=0) de los tubos con antibióticos y se ha realizado un único recuento a partir del tubo destinado al control de inóculo. Asimismo, se ha asumido que ambos antibióticos se han combinado, simultáneamente, a las mismas concentraciones de sus respectivas CMIs, por ejemplo.: 1xCMI-1xCMI, 2xCMI-2xCMI-4xCMI-4xCMI.

Fecha

Número del aislado

Identificación

CMI (µg/ml) antibiótico A

CMI (µg/ml) antibiótico B

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N° 1	Página 1 de 10

PNT-CA-03

Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 10

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es describir las distintas modalidades para el estudio de la actividad combinada de antimicrobianos mediante el empleo de tiras de gradiente de concentración (TG). No existen recomendaciones estándar para estas técnicas, sin embargo, la amplia experiencia publicada, la facilidad para su realización en el laboratorio de Microbiología debido a su sencillez y el grado aceptable de concordancia con otros métodos (curvas de muerte, método del tablero), avalan su utilización.

2. FUNDAMENTO

Mediante el uso de las TG se puede determinar el efecto de la actividad combinada de dos antibióticos y, aunque se trata de una técnica que mide el grado de inhibición (no de muerte) de un determinado inóculo bacteriano, permite poner de manifiesto los comportamientos de mayor trascendencia clínica como son la sinergia o el antagonismo.

Existen diferentes modalidades de esta técnica, que en todos los casos permiten obtener un perfil de la actividad de la combinación que contribuye a orientar la terapia *in vivo* basándose en el hecho de que todo tratamiento combinado busca lograr, esencialmente, un efecto sinérgico. De todos modos, aun no se dispone de trabajos que correlacionen los resultados obtenidos mediante estas técnicas *in vitro* con el éxito o el fracaso de los tratamientos clínicos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. 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.
2. White RI, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time kill, checkerboard, and Etest. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40:1914-8.

4. MUESTRAS

Inóculo bacteriano: colonias aisladas (4-5), de morfología similar, de un cultivo puro del microorganismo, de 18-20 horas de incubación en placas de agar. Si las determinaciones se van a realizar de un cultivo congelado, este deberá ser subcultivado previamente dos veces antes de la realización de la técnica. 4.2.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Placas de agar Mueller Hinton o, eventualmente, de un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo en estudio.
- Solución salina (0,9%) estéril para efectuar las diluciones requeridas para el ajuste de la densidad del inóculo a depositar en las placas de agar.
- Tiras de gradiente de concentración de los diferentes antimicrobianos.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Asas de siembra desechables
- Vórtex.
- Turbidímetro.
- Torundas secas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 10

- Pinzas o aplicadores de TG.
- Estufa $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Jarra con atmósfera de CO_2 (si se requiere).

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

El estudio de la actividad combinada de antimicrobianos mediante el uso de TG debe hacerse, al menos, por duplicado, ya que las elipses de inhibición pueden presentar zonas difusas o colonias en su interior que requirieran una estimación rigurosa en el momento de la lectura de la CMI para definir correctamente la interacción que ha tenido lugar.

En todos los casos, el **inóculo** que se emplea para la realización de las determinaciones, tanto para conocer las CMIs de los compuestos individuales como en las distintas técnicas para estudiar la sinergia, es el que corresponde a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml).

7.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE SINERGIA CON COMBINACIONES ANTIBIÓTICAS MEDIANTE EL USO DE TIRAS DE GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN (TG).

7.2.1. Método de TG cruzadas en ángulo recto

i) El primer paso consiste en realizar la determinación de la CMI con la TG para cada antibiótico individual. Una vez conocido el valor de ambas CMIs, se inocula una placa de agar MH con el inóculo ajustado al 0,5 de la escala de McFarland, las TG se cruzan en ángulo recto (90°) en el punto que corresponde a la CMI de cada compuesto. Si una de las CMIs excede el rango de concentración de una de las tiras, la otra tira se cruzará a la altura de la máxima concentración de la primera. Tras la incubación pertinente (18-20 horas, $35 \pm 2^\circ\text{C}$) se leen nuevamente ambas CMIs y, si ha habido cambio con respecto a los valores iniciales, se podrá consignar el tipo de interacción ocurrida: sinergia o antagonismo calculando la concentración inhibitoria fraccional (CIF) y el ICIF (índice de la concentración inhibitoria fraccional). Eventualmente, podría no observarse ningún cambio y se asumiría indiferencia (ver figuras 1 A y 1 B).

Los cálculos a realizar para definir la interacción son:

$$\text{CIF del antibiótico A: } \frac{\text{CMI del antibiótico A en combinación con el B}}{\text{CMI del antibiótico A}}$$

$$\text{CIF del antibiótico B: } \frac{\text{CMI del antibiótico B en combinación con el antibiótico A}}{\text{CMI del antibiótico B}}$$

$$\text{ICIF (índice de la concentración inhibitoria fraccional)} = \sum \text{CIF} = \text{CIF A} + \text{CIF B}$$

ii) Una segunda técnica es una variación del método anterior que ha sido publicada recientemente (Motos A *et al*, 2019): en este caso las TG se cruzan en ángulo recto en los valores que corresponden a las respectivas concentraciones clínicas que cada antibiótico alcanza en el estado estacionario (C_{ss} , de las siglas en inglés) según los regímenes de dosificación recomendados. Esta aproximación tiene dos ventajas con respecto a la descrita en el punto anterior, ya que no requiere del paso previo de conocer la CMI (24 horas a partir de tener el asilado) y se realiza considerando las concentraciones clínicamente representativas de aquellas que se alcanzan tras la exposición *in vivo* a las dosis estándar (ver figura 1 C).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 10

7.2.2. Método de la proporción fija

En esta técnica se inocula una placa de agar MH con un inóculo estandarizado y sobre esta se coloca la TG del antibiótico A y lo más separada posible, se coloca la tira del antibiótico B. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de manera que ambos antibióticos difundan en el medio. A la hora, se retiran ambas tiras con cuidado (con ayuda de unas pinzas) y se desechan. A continuación, se coloca una nueva TG del antibiótico A exactamente sobre la impronta dejada por B y una nueva tira de B sobre la impronta dejada por A y se incuban las placas 18-20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Es necesario también poner una TG del antibiótico A y otra del B por separado para determinar las CMI's individuales de cada antibiótico. Teniendo en cuenta los valores de las CMI's individuales y los correspondientes valores obtenidos tras realizar la combinación, se hacen los cálculos del IFCI (ver figura 2).

7.2.3. Método de la proporción CMI:CMI

Inicialmente se determinan las CMI's del antibiótico A y del antibiótico B mediante la técnica de la TG. Al día siguiente, sobre una nueva placa de medio MH inoculada, se colocan las TG del antibiótico A y del B y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente para que difundan ambos antibióticos. Transcurrida la hora, se retiran las tiras, se desechan y se hace una marca a la altura del valor de cada CMI, ya conocidas previamente. A continuación, una nueva TG de B se coloca sobre la impronta dejada por A pero a la altura de la marca de la CMI de A y lo mismo se hace con la TG de A con respecto a la impronta dejada por B, colocándola a la altura de la marca de la CMI de B. La placa se incuba 18-20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Transcurrido ese tiempo se leen las elipses de inhibición resultantes, se calcula el IFCI y se interpreta el tipo de respuesta debida a la combinación (ver figura 3).

7.2.4. Método en placas con antibiótico incorporado en el agar

Sobre placas inoculadas con el microorganismo y que contienen incorporadas concentraciones subinhibitorias del antibiótico A (por ejemplo, 0,25 x CMI, 0,5 x CMI) se coloca la TG del antibiótico B. Lo mismo se realiza sobre placas inoculadas pero que no contienen antibiótico A. Tras la incubación habitual (18-20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$), el comportamiento de la combinación se considerará sinérgico si hay una reducción de más de tres diluciones en aquellas placas que contienen el antibiótico A incorporado en el medio (ver figura 4).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- i) Las condiciones para la lectura están definidas en el apartado que describe cada uno de los métodos.
- ii) En general, el tiempo que conlleva el empleo de estas técnicas es de 3 días, desde que se dispone del cultivo bacteriano puro.

Día 1: determinación de las CMI's, mediante las TG, de los antibióticos a combinar.

Día 2: lectura de las CMI's y realización del método de sinergia que se elija.

Día 3: lectura de los valores de CMI para ambos antibióticos en la combinación, cálculo del ICIF.

En el caso del método de la proporción fija (7.2.2.) en el día 1 se pueden determinar las CMI's de cada antimicrobiano individualmente y realizar el método de sinergia en el mismo día y, por tanto, se pueden obtener los datos de las CMI's individuales y de la combinación de ambos el día 2.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 10

Los comportamientos que se pueden definir para la combinación a partir del valor de ICIF son:

- **Sinergia:** $\leq 0,5$
- **Indiferencia** (ausencia de interacción): $> 0,5 - \leq 4$
- **Antagonismo:** > 4

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar detalladas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La técnica de TG para la determinación del comportamiento *in vitro* de una combinación de dos antibióticos es sencilla y con un grado adecuado de reproducibilidad. Está indicado por los diferentes autores que las determinaciones se realicen por duplicado.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Una limitación de esta técnica es que no se pueden combinar más de dos antibióticos simultáneamente, si bien esta situación es común a todos los métodos de determinación de sinergia *in vitro*, aunque teóricamente, es factible combinar tres antibióticos en las curvas de muerte y en el método del tablero.

En aquellos casos en los que la CMI de uno de los compuestos es mayor que el valor más alto de la TG, el cálculo del ICIF puede resultar menos exacto y conducir a una interpretación errónea de la interacción. Algunos autores indican que, en estos casos, el valor que le asignan a esa CMI es el correspondiente al valor inmediato superior en la escala (una dilución doble). Por ejemplo, si el límite de concentración ($\mu\text{g/ml}$) de la tira es 32 y el resultado es >32 , se considera un valor de CMI de 64 para la realización de los cálculos de ICIF.

En el método de las TG cruzadas en ángulo recto, un antagonismo débil podría no detectarse si ese valor quedara definido por el comportamiento de ambos antibióticos justo en el punto en que ambas tiras se cruzan.

El cálculo del ICIF se ha definido para la técnica del tablero, en la que se utilizan diluciones dobles de cada antibiótico y este mismo índice se utiliza en los estudios de sinergia con TG, que incluyen concentraciones intermedias del antibiótico. Si el valor de CMI en la combinación decrece en un rango de $>0,5-1$, hay autores que definen este valor como adición en vez de indiferencia, que es el concepto consensuado en la mayoría de los trabajos y en el que estarían incluidos los valores de dicho rango. Por ejemplo: ICF A=0,5/0,75=0,66; ICF B=0,047/1= 0,047; ICIF= 0,71.

El uso de las TG de colistina (polimixina E) ha sido desaconsejado debido a numerosos fallos en la interpretación de la sensibilidad. El grado de correlación entre las CMIs obtenidas por las TG y el método de referencia de microdilución en caldo es bajo y podría, por tanto, dar resultados equívocos en los estudios

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N°1	Página 6 de 10

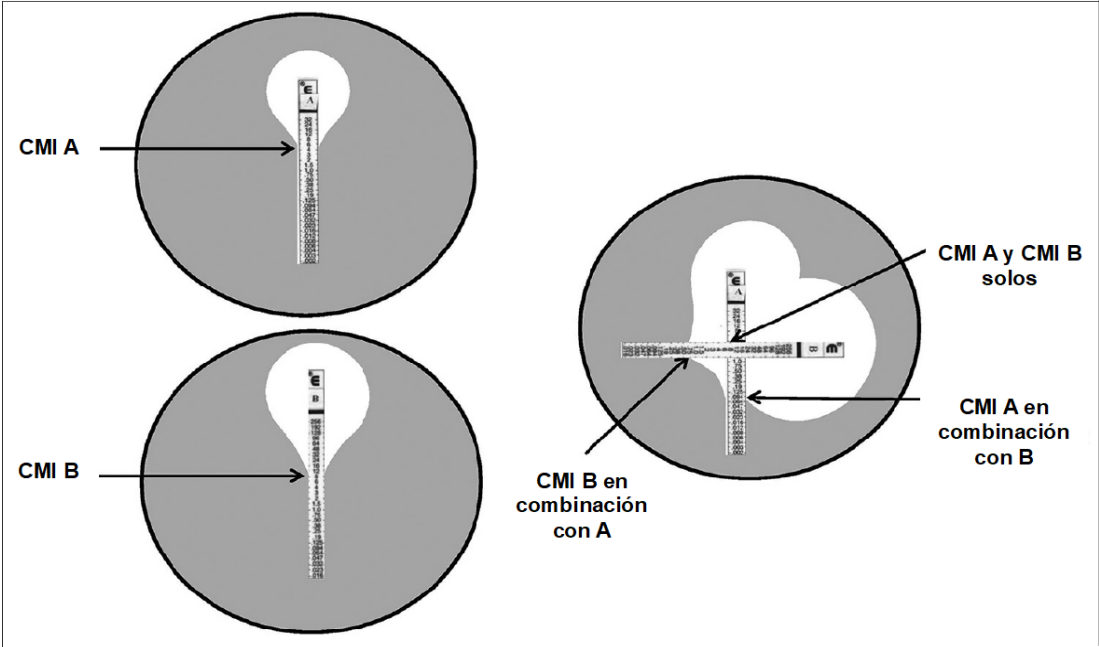
de combinaciones con TG en las que este antibiótico formara parte de las mismas. De todos modos, para una aproximación inicial, no se desestima su posible utilización.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. *In vitro* investigation of synergy among fosfomicin and parenteral antimicrobials against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019; 95: 216-20.
2. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5316-22.
3. Laishram S, Pragasa AK, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 35: 445-68.
4. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24:865-70.
5. Motos A, Avery LA, DeRonde KJ, Elias M, Mullane EM, Kuti JL, Nicolau DP. Where should antibiotic gradient diffusion strips be crossed to assess synergy? A comparison of the standard method with a novel method using steady-state antimicrobial concentrations. *Int J Antimicrob Agents*. 2019; 53:698-702.
6. Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 77: 220-6.
7. Tan TY, Lim TP, Lee WH, Sasikala S, Hsu LY, Kwa AL. *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 436-8.
8. Vardakas KZ, Athanassaki F, Pitiriga V, Falagas ME. Clinical relevance of *in vitro* synergistic activity of antibiotics for multidrug-resistant Gram-negative infections: A systematic review. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;17:250-9.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N°1	Página 7 de 10

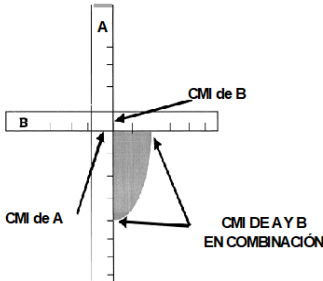
Figura 1 A. Método de TG cruzadas en ángulo recto



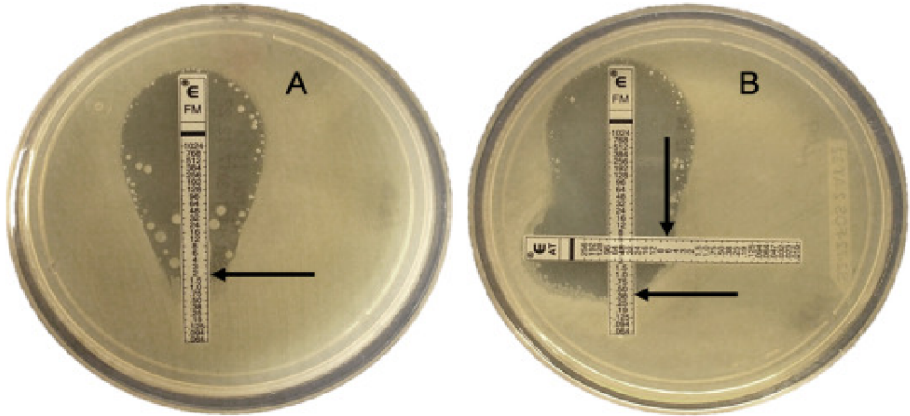
Adaptado de Laishram S et al. 2017

Figura 1 B. Método de TG cruzadas en ángulo recto

Aislado: *E. coli* productor de metalo-carbapenemasa
CMI fosfomicina (FOS): 2 µg/ml (A)
CMI aztreonam (AT): 32 µg/ml (no mostrado)
CIF FOS: 0,38/2= 0,19
CIF CZA: 6/32= 0,19 ΣCIF (ICIF)= 0,38: sinergia (B)



Traducido de White RI et al. 1996.



Avery ML et al. 2019

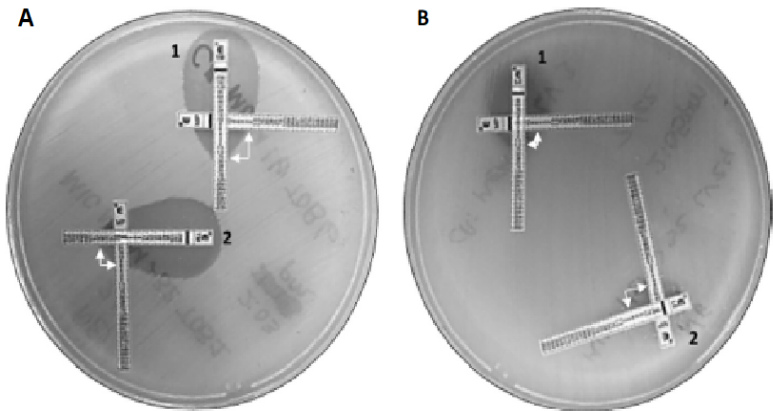
Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N°1	Página 8 de 10

Figura 1 C. Sinergia con tiras cruzadas en ángulo recto en el valor de las CMI y en el valor de las Css (concentraciones en estado estacionario)

Aislado: *P. aeruginosa*
CMI (µg/ml): tobramicina (TM): 1, levofloxacino (LE): 24, meropenem (MP): >32
CCS (mg/L): TM: 6, LE: 3, MP: 16
ICIF: índice de la concentración inhibitoria fraccional

A1 (Css): ICIF MP-TM: 0,51
A2 (CMI): ICIF MP-TM: 0,80
A1 y A2: indiferencia

B1 (Css): ICIF MP-LE: 0,44
B2 (CMI): ICIF MP-LE: 0,27
B1 y B2: sinergia

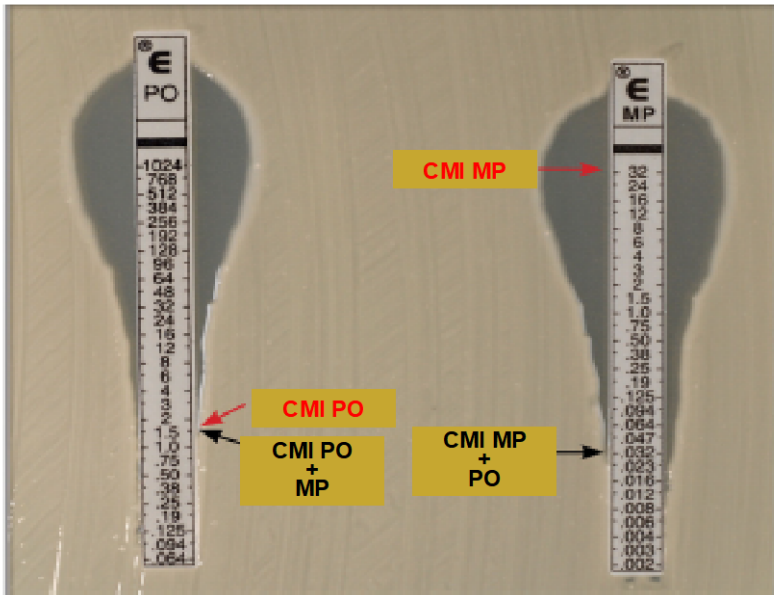


Adaptado de Motos A *et al.* 2019

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N°1	Página 9 de 10

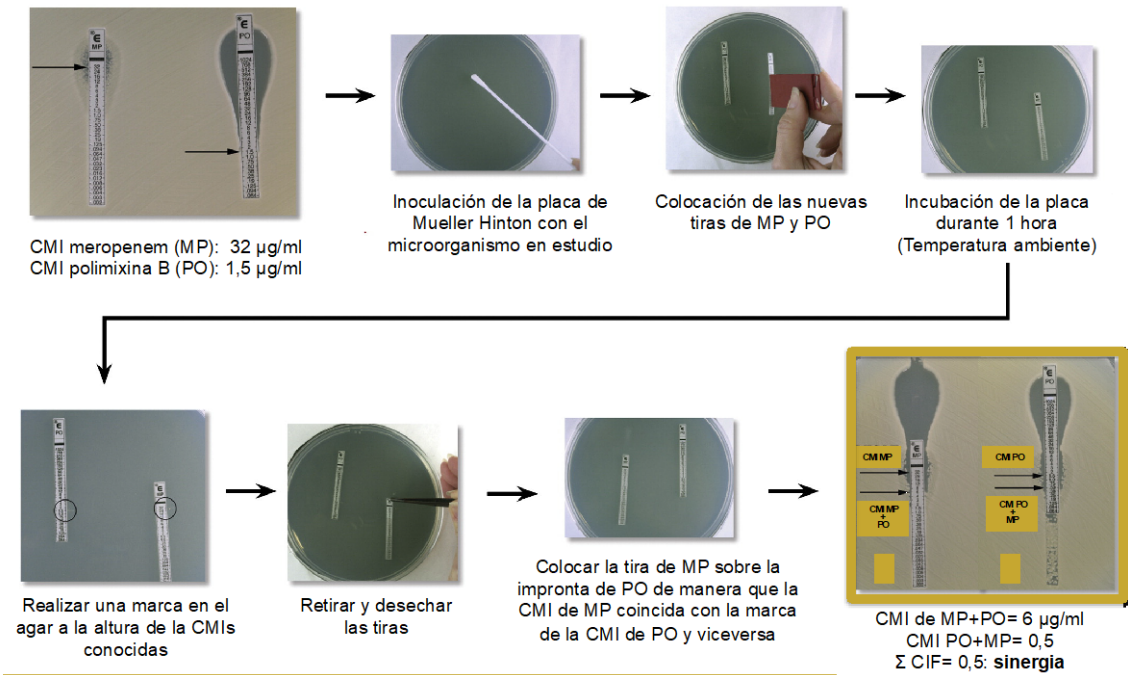
Figura 2. Método de la proporción fija

Aislado: *Klebsiella pneumoniae*
CMI polimixina B (PO): 1,5 µg/ml
CMI meropenem (MP): 32 µg/ml
CIF PO: 1,5/1,5= 1
CIF MP: 0,032/32= 0,0001 ΣCIF (ICIF)= 1: **indiferencia**



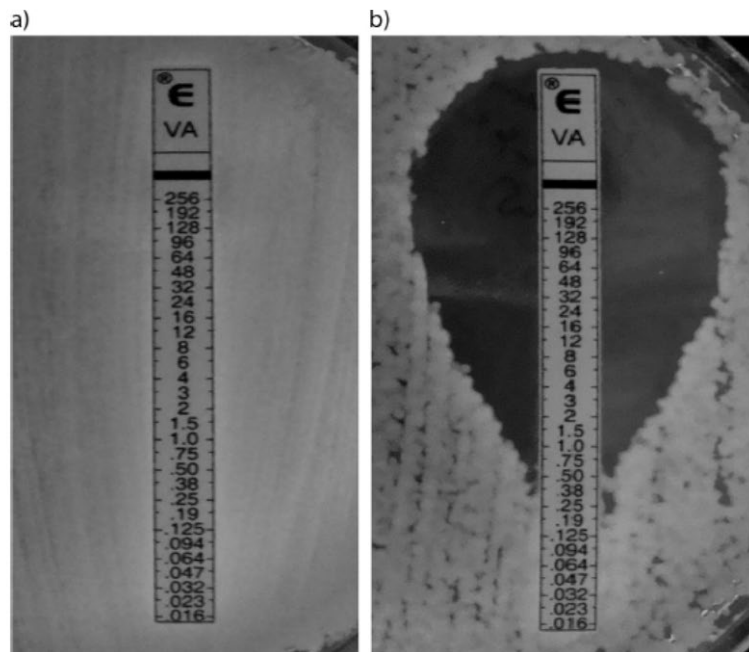
Adaptado de Pankey GA et al. 2013

Figura 3. Método de la proporción CMI: CMI- Adaptado de Pankey GA et al. 2013



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Técnica con tiras de gradiente de concentración para la determinación de sinergia antibiótica	PNT-CA-03	
		Edición N°1	Página 10 de 10

Figura 4. Método en placas con antibiótico incorporado en el agar



CMI de vancomicina para la cepa de *Acinetobacter baumannii* AB14 (OXA-23) en medio sin antibiótico, **a)** y en medio con 0,5 µ/ml de colistina, **b)**

Gordon NC *et al.* 2010