

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO DE LA AZITROMICINA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y SU COMPOSICIÓN EN
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

Por

Dr. Reynaldo Lara Medrano

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA CLÍNICA

Febrero, 2017.

EFFECTO DE LA AZITROMICINA EN LA PRODUCCIÓN Y
COMPOSICIÓN DE BIOPELÍCULA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Acinetobacter baumannii*

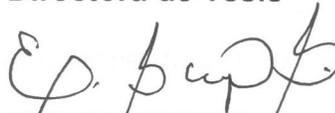
Aprobación de la tesis:



Dr. Michel Fernando Martínez Reséndez
Director de la tesis



Dra. C. Soraya Mendoza Olazarán
Co-Directora de Tesis



Dra. C. Elvira Garza González
Co-Directora de Tesis



Dr. Pedro Alberto Hernández Rodríguez
Coordinador de Enseñanza



Dr. Michel Fernando Martínez Reséndez
Coordinador de Investigación



Dr. med. Javier Ramos Jiménez
Coordinador del Servicio de Infectología



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Dedico la elaboración de este trabajo a mi hijo Gael, quien a lo largo de 2 años me ha acompañado en cada momento, brindándome a través de su sonrisa la fuerza necesaria para salir adelante de cada dificultad, y a través de su tierna mirada me ha impulsado a ser una mejor persona, tanto en el ámbito personal como profesional.

Gracias a mi esposa Edna, por apoyarme durante el desarrollo de mi residencia en Infectología, alentándome a alcanzar todas y cada una de mis metas profesionales. Te amo.

Gracias a mi amigo y maestro Michel Martínez, por guiarme y aconsejarme no solo para la elaboración de esta tesis, sino a lo largo de la residencia, alcanzando grandes logros.

Gracias Soraya, por toda tu paciencia conmigo y tu entusiasmo para la culminación de este trabajo.

Gracias Dr. Camacho, porque sé que su puerta siempre estará abierta para brindar ayuda cuando la necesite.

Gracias Dr. Pedro, porque más que un maestro, es un amigo.

Gracias Dr. Ramos, por todas sus enseñanzas y sus consejos.

Gracias Dra. Elvira, por mostrarme como el pensamiento científico debe enfocarse en el servicio de los pacientes.

Gracias a María del Rosario, Rey David, Viridiana, Gabriela, Nathalí y Renata, porque aunque he sacrificado muchos momentos a su lado, sé que siempre piensan en mí, y celebran cada uno de mis logros.

Gracias a mis compañeros, Sandra e Hiram, porque a lo largo de 6 años, hemos vivido muchas experiencias juntos, formando lazos que nos acompañarán siempre.

Finalmente, gracias a Dios, por permitirme la oportunidad de despertar cada día rodeado de mis seres amados, y con la motivación de trabajar y triunfar”.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo I | Página |
|-----------------------------|--------|
| 1. RESUMEN. | 1 |
| Capítulo II | |
| 2. MARCO TEÓRICO. | 4 |
| Capítulo III | |
| 3. HIPÓTESIS. | 28 |
| Capítulo IV | |
| 4. OBJETIVOS. | 29 |
| Capítulo V | |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS. | 31 |
| Capítulo VI | |
| 6. RESULTADOS. | 39 |
| Capítulo VII | |
| 7. DISCUSIÓN. | 48 |
| Capítulo VIII | |

| | |
|--------------------|----|
| 8. CONCLUSIÓN..... | 53 |
|--------------------|----|

Capítulo IX

| | |
|----------------|----|
| 9. ANEXOS..... | 55 |
|----------------|----|

| | |
|------------------------------|----|
| 9.1 Carta de Aprobación..... | 56 |
|------------------------------|----|

Capítulo X

| | |
|-----------------------|----|
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |
|-----------------------|----|

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1. Descripción fenotípica de las especies del género | |
| Acinetobacter con mayor relevancia | 12 |
| 2. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos | |
| por <i>A. baumannii</i> | 19 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1. Sitio de origen de los aislamientos clínicos de <i>A. baumannii</i> | 33 |
| 2. Distribución de los aislamientos de <i>A. baumannii</i> por producción de biopelícula | 40 |
| 3. Curva de crecimiento de <i>A. baumannii</i> en 24 horas tras exposición a diferentes concentraciones de azitromicina | 41 |
| 4. Comparación del índice de biopelícula entre los aislamientos de <i>A. baumannii</i> con y sin azitromicina | 43 |
| 5. Comparación del porcentaje de desprendimiento de la biopelícula de <i>A. baumannii</i> con DNasa con y sin azitromicina | 45 |
| 6. Comparación del porcentaje de desprendimiento de la biopelícula de <i>A. baumannii</i> con Proteinasa K con y sin azitromicina | 46 |
| 7. Comparación del porcentaje de desprendimiento de la biopelícula de <i>A. baumannii</i> con NaIO ₄ con y sin azitromicina | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

BAP: Proteína asociada a biopelícula.

C: Centígrados.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

CFU: Unidades formadoras de colonias.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

DE: Desviación estándar.

DO: Densidad óptica.

FDA: Food and Drug Administration.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

IASS: Infecciones asociadas a la atención de la salud.

IDSA: Infectious Diseases Society of America.

IF: Interferon.

IL: Interleucina.

LADIME: Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad.

MBL: Metalo- β -lactamasa.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MDR: Multifarmacorresistente.

mg/mL: Miligramo por mililitro.

mM: Milimol.

mm: Milímetro.

NaIO₄: Meta-periodato.

NK: Células natural killer.

nm: nanómetro

OMP: Proteína de membrana externa.

OXA: Oxacilinas de serina.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

PMN: Células polimorfonucleares.

QS: Quórum sensing

μ g: Microgramo.

μ g/mL: Microgramo por mililitro

μ L: microlitro.

CAPÍTULO I

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto de la azitromicina en la producción de biofilm de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

Diseño: Estudio prospectivo, transversal, para evaluar el efecto de azitromicina en la producción de biofilm en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*

Materiales y Métodos: Los aislamientos de *A. baumannii* seleccionados se probarán a través de un método semi-cuantitativo de tinción de cristal violeta y se determinará el índice de biofilm. Los aislamientos se ensayarán de manera cuádruple en 2 experimentos diferentes llevado a cabo en diferentes días. Se inocularán alícuotas de suspensión bacteriana (100 uL) dentro de pocillos individuales e incubados a 37°C por 48 horas. Después de la incubación, las

células planctónicas serán transferidas a una nueva placa de microtitulación de fondo plano, y su DO será leída en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 600 nm. Posterior a esto, los biofilms serán lavados 2 veces con 200 uL de solución salina amortiguada con fosfato (pH 7.40). Cuando el biofilm esté seco, se teñirá con 100 uL de cristal violeta 0.1% por 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de cristal violeta será removido con 200 uL de solución salina amortiguada por 5 veces. Finalmente, el biofilm teñido será resuspendido en 200 uL de etanol al 95%, para que la medición sea homogénea. La DO de los pocillos será medida a 595 nm. Para determinar el nivel de producción de biofilm se utilizará la clasificación de Christensen *et al*, ya que a la fecha no existen métodos para definir la producción de biofilm por *A. baumannii*. Los aislamientos con $DO \geq 0.25$, de 0.15 a 0.24, y ≤ 0.14 serán considerados productores de biofilm fuerte, moderado y débil, respectivamente. El índice de biofilm se definirá con la relación entre células planctónicas y de biofilm (DO células planctónicas/DO células de biofilm). Este mismo ensayo se reproducirá añadiendo las concentraciones seleccionadas de azitromicina al caldo soya tripticaseína con 1% de glucosa. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (biofilm positivo) será usada como organismo de control de este ensayo.

Resultados:

De 140 aislamientos productores fuertes de biofilm, se seleccionaron 95 con los que se realizarían el resto de ensayos correspondientes. Se utilizaron concentraciones de 1, 2, 4 y 8 y 16 mcg/mL para determinar el MIC de nuestras cepas en células planctónicas a través del método de microdilución en caldo

propuesto por el CLSI (en caso que no se determinara el MIC, se incrementaría de manera progresiva las concentraciones de azitromicina). El MIC se estableció en 8 mcg/mL, y la concentración mínima subinhibitoria en 4 mcg/mL.

Conclusiones: El índice de biofilm fue más bajo cuando este se desarrolló en concentraciones subinhibitorias de azitromicina, por lo que este antibiótico podría ser útil como coadyuvante en el tratamiento de infecciones causadas por aislamientos *A. baumannii* productores de biopelícula.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

Marco teórico

Generalidades

Acinetobacter baumannii es un bacilo Gram negativo, no fermentador, no móvil, oxidasa negativo, responsable del 2 al 10% de las infecciones intrahospitalarias por bacterias gram negativas. *A. baumannii* es clasificado por Infectious Diseases Society of America como uno de los 6 microorganismos multi-fármaco resistentes más importantes en el ámbito hospitalario a nivel mundial (1).

Diversos factores han contribuido al aumento de casos de infección por *A. baumannii*, como son: el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, lo que ocasiona una presión positiva para la aparición de cepas multi-fármaco resistentes; la condición crítica del paciente, que conlleva a la realización de una amplia gama de procedimientos que incluyen la colocación de catéteres, tubos endotraqueales y otras formas de invasión a los pacientes que dan paso a infecciones asociadas al cuidado de la salud; y la falta de programas adecuados

para la prevención de infecciones, tales como higiene de manos, control de antibióticos, uso de clorhexidina, entre otros (2).

Entre el espectro de enfermedades causadas por *A. baumannii*, resaltan las infecciones de piel y tejidos blandos, las infecciones de heridas, las infecciones del tracto urinario, meningitis secundaria, bacteremia y la neumonía asociada al ventilador, siendo las dos últimas las más importantes no solo por la mayor frecuencia, sino también por el alto índice de morbilidad y mortalidad (3).

Los índices de mortalidad atribuible por *A. baumannii* varían del 8 al 35%, dependiendo de la cepa y el tipo de infección (4). En la neumonía asociada al ventilador, la literatura ha reportado índices de mortalidad hasta del 75% (5).

Entre los antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* se encuentran: los carbapenémicos, siendo el imipenem el de mayor actividad; los inhibidores de la β lactamasa, como el sulbactam; los aminoglucósidos; la tigeciclina y la polimixina. Hasta hace algunos años, los carbapenémicos constituían una excelente opción terapéutica contra este patógeno, pero en la última década esta bacteria ha presentado un aumento considerable en los porcentajes de resistencia con índices de respuesta al tratamiento que van del 50 al 60% (2). Para el 2009, en los Estados Unidos de América hasta el 70% de las cepas aisladas de *A. baumannii* fueron reportadas como multidrogorresistentes, lo que significa resistencia a 3 o más antibióticos (1). Debido a esta disminución de susceptibilidad, se han investigado la utilidad de medicamentos antiguos, tales como fosfomicina y colistina siendo este último el más utilizado, y en algunas

ocasiones la única opción terapéutica contra este patógeno, pero su farmacocinética y farmacodinámica aún no es entendida del todo, además de ser un medicamento que se asocia de manera frecuente a falla renal aguda.

Entre los mecanismos de resistencia a los antibióticos que se han descrito para *A. baumannii* a antibióticos se encuentran:

- A. Expresión de β -lactamasas. *A. baumannii* posee la capacidad de expresar una amplia gama de β -lactamasas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar y, por tanto, conferir resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (2).
- B. Bombas de flujo. Consisten en proteínas que de manera activa remueven una amplia variedad de antibióticos que penetran dentro de la bacteria, lo que ocasiona que disminuya la capacidad de los mismos a alcanzar sus objetivos intracelulares y por tanto ejercer su efecto antibacteriano (2).
- C. Mutaciones que cambian el blanco o funciones celulares. *A. baumannii* tiene la capacidad de modificar la afinidad de sus componentes por antimicrobianos, o sobreexpresar algunas funciones celulares, tal como aumentar la producción de bombas de flujo u otras proteínas (2).
- D. Producción de biofilm. La producción de biofilm por *A. baumannii* le confiere la posibilidad de adherirse a múltiples superficies celulares y abióticas, así como protección contra antibióticos, dado que éstos no pueden penetrar a través de esta barrera (6).

Dada la resistencia de esta bacteria a múltiples antibióticos, actualmente se encuentra en estudio la terapia combinada, es decir, la utilización de dos o más antibióticos con la finalidad de lograr una sinergia para la erradicación del microorganismo. Entre las combinaciones más estudiadas se encuentran: a) colistina más fosfomicina, b) colistina más tigeciclina, c) imipenem más sulbactam, y d) minociclina y rifampicina, solo por mencionar algunas (7 – 11). Aunque algunos estudios han mostrado resultados alentadores, aún no se determina cual podría ser la mejor terapia de combinación para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii*.

Producción de biofilm

La capacidad de producción de biofilm por *A. baumannii* es uno de los mecanismos de virulencia principales por esta bacteria. El mecanismo por el cual se produce el biofilm no está bien definido, ya que participan expresión de genes como *bla_{PER-1}*, sistemas de ensamblaje como CsuA/BABCDE, proteínas como OmpA y Bap, factores del medio como temperatura, presencia de luz y tipo de superficie de adhesión y la densidad celular (6). La producción de biofilm le permite la adhesión a múltiples superficies abióticas tales como material endovascular, o tubo endotraqueal, lo que sirve como mecanismo de entrada y/o persistencia al cuerpo humano, de tal manera que *A. baumannii* puede escapar de la actividad de los antibióticos (13).

Además, tampoco se ha estudiado a detalle la composición química y la estructura del biofilm producido por *A. baumannii*, por lo que se desconoce si alguno de los

antibióticos actuales empleados en la terapéutica contra las infecciones por este agente tiene algún efecto sobre el biofilm, lo que sería una importante consideración al momento de elegir una terapia combinada al atacar un mecanismo de virulencia de la bacteria.

Azitromicina y biofilm

La azitromicina, un agente antibacteriano de amplio espectro, es un macrólido de segunda generación, con indicaciones sobre infecciones respiratorias, urogenitales y piel, entre otras. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de síntesis de proteínas bacterianas al interferir con el ensamblaje de la subunidad ribosomal larga 50S. Una característica importante de este antibiótico, es que a diferencia de otros macrólidos, se acumula en fagocitos, que después es liberado en altas concentraciones en el sitio de infección. Además de su actividad antibacteriana, la azitromicina también tiene efectos inmunomodulares en desórdenes inflamatorios crónicos, tales como panbronquiolitis difusa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y rosácea (14).

Otra característica importante de la azitromicina, es su capacidad para disminuir la producción de biofilm de diversas bacterias. Se ha observado que la azitromicina tiene la capacidad de realizar sinergia con otros antibióticos, ocasionando que bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* reduzcan la producción de biofilm, ocasionando que los antibióticos activos contra estas bacterias ejerzan su efecto de una mejor manera (15 – 18).

La azitromicina no tiene efecto antibacteriano sobre *A. baumannii*, ya que la concentración mínima inhibitoria (MIC) reportada es de 64 mcg/mL, y con las dosis terapéuticas que se usan se alcanza una concentración de 8 mcg/mL (19). Se han realizado 2 estudios sobre el efecto de azitromicina en infecciones pulmonares por *A. baumannii*, pero ambos valorando el efecto inmunomodulador de este fármaco: a) en un modelo animal se observó una disminución de citocinas proinflamatorias por azitromicina (18); y b) en un estudio *in vitro* se determinó que la azitromicina disminuye la producción de mucina por células de la vía respiratoria (20).

En nuestro hospital, Mendoza-Olazarán *et al.* realizaron un estudio en el que aislaron 149 cepas de *A. baumannii*, de las cuales 94% fueron productoras fuertes de biofilm, lo cual se planteó como uno de los principales mecanismos de persistencia de esta especie en el área hospitalaria (21).

Por lo anterior, un estudio que evalúe la capacidad de la azitromicina para disminuir la producción de biofilm por cepas de *A. baumannii* permitiría que, en caso de comprobarse, se diseñen estudios clínicos de sinergia con otros antibióticos ya establecidos para el tratamiento de este patógeno, permitiendo ampliar la gama de opciones terapéuticas contra este microorganismo, considerando un mecanismo de acción diferente que en este caso sería la disminución en la producción de biofilm.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

Hipótesis alterna.

La azitromicina disminuye la producción de biofilm *in vitro* en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

Hipótesis nula.

La azitromicina no disminuye la producción de biofilm *in vitro* en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

Objetivo primario:

Determinar si la azitromicina tiene actividad *in vitro* contra la producción de biofilm en cepas de *Acinetobacter baumannii*.

Objetivos secundarios:

1. Determinar el nivel producción de biofilm en aislamientos clínicos de *A. bau*
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a azitromicina en cepas productoras fuertes de biofilm de *A. baumannii*.
3. Determinar la concentración subinhibitoria de azitromicina en cepas productoras fuertes de biofilm de *A. baumannii*.
4. Definir la composición del biofilm producido por *A. baumannii*.
5. Determinar el efecto de la azitromicina en los componentes del biofilm de *A. baumannii*

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

Se cuenta con un banco de 149 cepas de *A. baumannii* recabadas en la sala de terapia intensiva (Unidad de Cuidados Intensivos Adultos y Unidad de Cuidados Intensivos Post-Quirúrgicos) de enero a diciembre de 2012, obtenidas de pacientes hospitalizados en esa área, las cuales se encuentran almacenadas en caldo Brucella con 15% de glicerol a -80°C. Como primer paso se reactivarán metabólicamente las cepas (lo cual se logra descongelando las muestras y cultivándolas en agar sangre por 3 veces consecutivas) y se determinará la producción de biofilm a través de un método semi-cuantitativo de tinción de cristal violeta, y se seleccionaran aquellos aislamientos con producción fuerte de biofilm de acuerdo a la clasificación de Christensen *et al.* Se evaluará posteriormente la susceptibilidad a la azitromicina en células planctónicas y de biofilm, y se determinará el índice de biofilm con y sin azitromicina. Además, se realizarán ensayos en los que se expondrá el biofilm a meta-periodato (NaIO_4), proteinasa K y Dnasa para determinar su composición, y las alteraciones en su expresión al exponerse a azitromicina. Por medio de análisis estadístico se comparará el nivel

del índice de biofilm con y sin azitromicina para probar la hipótesis verdadera planteada en este proyecto. Los ensayos se realizarán en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

Susceptibilidad a la azitromicina en células planctónicas y de biofilm

Para determinar la CMI a azitromicina en células planctónicas se realizará el método de microdilución en caldo propuesto por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) y se comparará con los puntos de corte del mismo. La CMEB se determinará por el método de microdilución en caldo utilizando el dispositivo Calgary que permite en un primer paso el desarrollo de biofilm para la posterior exposición del mismo a diferentes concentraciones de la azitromicina. Posterior a estos ensayos, se seleccionarán las concentraciones del antibiótico a evaluar en el ensayo de producción de biofilm.

Producción de biofilm

Los aislamientos de *A. baumannii* seleccionados se probarán nuevamente a través de un método semi-cuantitativo de tinción de cristal violeta y se determinará el índice de biofilm. Los aislamientos se ensayarán de manera cuádruple en 2 experimentos diferentes llevado a cabo en diferentes días. Estos ensayos se llevarán a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos, no tratadas (sin antibiótico), de fondo plano. Durante una noche previa se preparará una solución de caldo de tripticasa de soya (suplementada con glucosa al 1%) para el cultivo de *A. baumannii*, ajustadas a una densidad óptica (DO) de 0.1 ($\sim 10^7$ CFU/mL). Se

inocularán alícuotas de suspensión bacteriana (100 uL) dentro de pocillos individuales e incubados a 37°C por 48 horas. Después de la incubación, las células planctónicas serán transferidas a una nueva placa de microtitulación de fondo plano, y su DO será leída en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 600 nm. Posterior a esto, los biofilms serán lavados 2 veces con 200 uL de solución salina amortiguada con fosfato (pH 7.40). Cuando el biofilm esté seco, se teñirá con 100 uL de cristal violeta 0.1% por 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de cristal violeta será removido con 200 uL de solución salina amortiguada por 5 veces. Finalmente, el biofilm teñido será resuspendido en 200 uL de etanol al 95%, para que la medición sea homogénea. La DO de los pocillos será medida a 595 nm. Para determinar el nivel de producción de biofilm se utilizará la clasificación de Christensen *et al*, ya que a la fecha no existen métodos para definir la producción de biofilm por *A. baumannii*. Los aislamientos con $DO \geq 0.25$, de 0.15 a 0.24, y ≤ 0.14 serán considerados productores de biofilm fuerte, moderado y débil, respectivamente. El índice de biofilm se definirá con la relación entre células planctónicas y de biofilm (DO células planctónicas/DO células de biofilm). Este mismo ensayo se reproducirá añadiendo las concentraciones seleccionadas de azitromicina al caldo soya tripticaseína con 1% de glucosa. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (biofilm positivo) será usada como organismo de control de este ensayo.

Composición del biofilm

Para determinar los componentes del biofilm se realizaran ensayos de separación de biofilm con meta-periodato (NaIO_4) para degradar B-1,6-polisacáridos,

proteínasa K para degradar proteínas y DNasa para degradar DNA. Una vez que se produzca biofilm en placas de 96 pocillos en cultivos de *A. baumannii* en caldo de tripticasa de soya con glucosa al 1%, se lavaran 3 veces y serán tratados con: a) 40 mM NaIO₄ en agua doblemente destilada, b) 0.1 mg/mL de proteínasa K en 20 mM Tris-HCL (pH 7.5) con 100 mM NaCl, o c) 0.5 mg/mL Dnasa en 5 mM MgCl₂; cada uno permanecerá 24 horas a 37 °C. Posteriormente, los biofilms serán teñidos con cristal violeta como se describió previamente. Tres pocillos con caldo de tripticasa de soya con glucosa al 1% sin inocular servirán como controles de esterilidad del ensayo en cada placa; la DO de estos pocillos de control se determinará como espacios en blanco en la espectrofotometría. Para cada corrida en paralelo, los valores extremos (el valor más alto y el más bajo) de la DO serán removidos, y los valores restantes se promediarán. El porcentaje de separación será calculado por la diferencia promedio entre los pocillos tratados y los no tratados. Los resultados de la separación se clasificarán como no separado (< 10%), separación intermedia (10 – 50%), separación intermedia fuerte (51 – 75%), y separación fuerte (>75%). Todos los aislamientos se analizarán en tres ensayos paralelos. Una cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 se incluirá como control (PIA como el componente más abundante).

CAPÍTULO VI

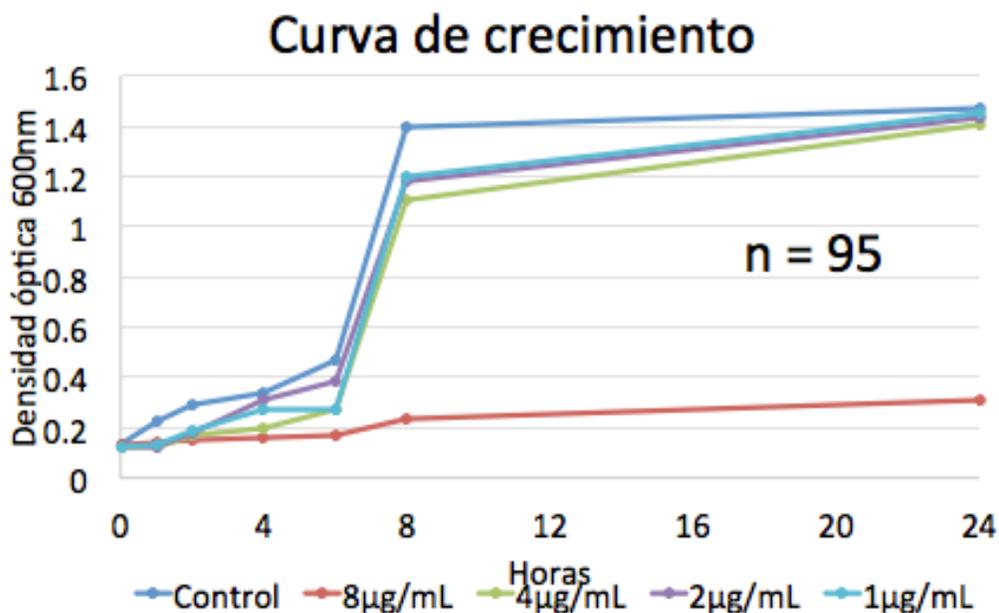
RESULTADOS

Del banco de 149 cepas de *A. baumannii* recabadas en la sala de terapia intensiva (Unidad de Cuidados Intensivos Adultos y Unidad de Cuidados Intensivos Post-Quirúrgicos) de enero a diciembre de 2012 en nuestro hospital, se realizó el ensayo correspondiente para determinar la producción de biofilm a través de DO. Se determinó que, de acuerdo a la clasificación de Christensen et al., el 97% de los aislamientos fueron productores de biofilm fuertes ($DO > 0.25$) y el 3% restante fueron productores débiles ($DO < 0.15$).

De los 140 aislamientos productores fuertes de biofilm, se seleccionaron 95 con los que se realizarían el resto de ensayos correspondientes. El siguiente paso fue determinar la concentración mínima inhibitoria de los aislamientos. Se utilizaron concentraciones de 1, 2, 4 y 8 y 16 mcg/mL para determinar el MIC de nuestras cepas en células planctónicas a través del método de microdilución en caldo propuesto por el CLSI (en caso que no se determinara el MIC, se incrementaría de manera progresiva las concentraciones de azitromicina). El MIC se estableció en 8 mcg/mL, y la concentración mínima subinhibitoria en 4 mcg/mL. Como se puede

observa en la figura 1, en la curva de crecimiento bacteriano se observa que a dosis menores a 8 mcg/mL continuá el desarrollo de bacterias.

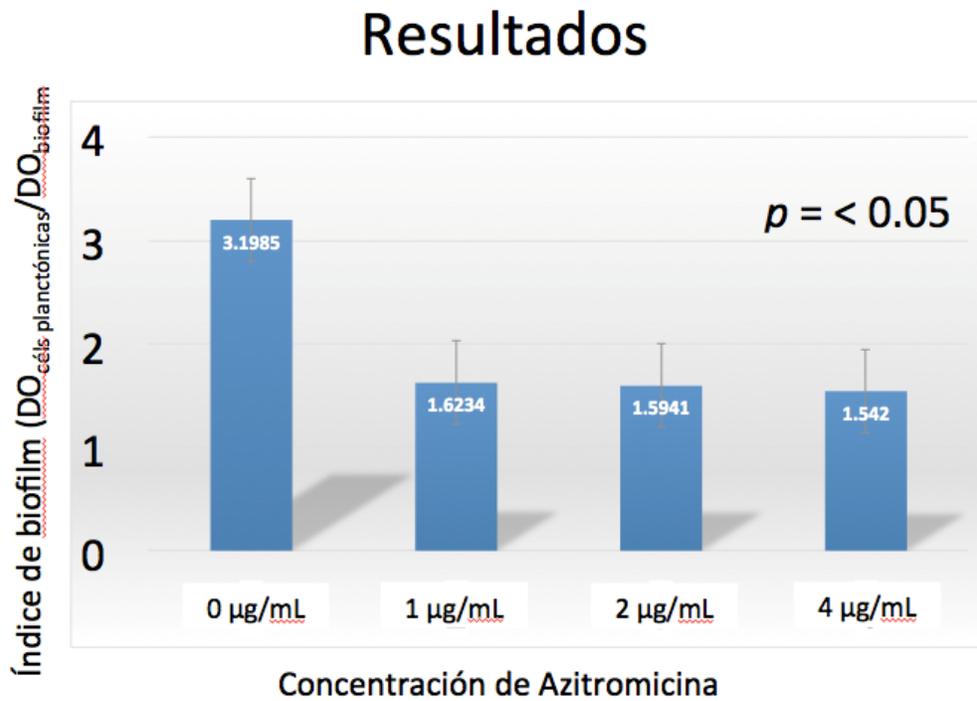
Figura 1. Curva de crecimiento de *Acinetobacter baumannii* con diversas concentraciones de azitromicina.



Dado lo anterior, se realizó el ensayo para valorar el efecto de azitromicina sobre la producción de biofilm, con concentraciones de 1, 2 y 4 mcg/mL como dosis subinhibitorias. Tras la exposición de los aislamientos a azitromicina, se demostró una menor producción de biofilm de manera proporcional a la concentración de azitromicina. Sin embargo, al hacer el ajuste comparativo por índice de biofilm, se determinó que la disminución de biofilm fue menor de manera significativa en los aislamientos expuestos a azitromicina, de manera uniforme, sin importar la concentración de azitromicina. El promedio del índice de biofilm en los ensayos sin azitromicina fue de 2.554, mientras que los promedios en presencia de 1, 2 y 4

mcg/mL de azitromicina fueron de 1.599, 1.537 y 1.504, respectivamente (figura 2).

Figura 2. Comparación del índice de biofilm en aislamientos sin y con azitromicina en diversas concentraciones.



CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

El entendimiento de los diversos factores de virulencia de *A. baumannii* es crucial para entender el potencial patogénico de esta bacteria, dada la relevancia que ha adquirido en los últimos años debido a su multi-fármacorresistencia. En cuanto al biofilm, es uno de los factores de virulencia más importantes dado que le permite a este organismo la capacidad de adhesión a material inerte que se utiliza en múltiples procedimientos invasivos en los pacientes e impide que los antibióticos alcancen las bacterias inmersas en el biofilm o lo hagan en una concentración mínima, permitiendo que *A. baumannii* subsista. Xinlong He et al. realizaron un ensayo in vitro en el que demostraron que las bacterias productoras de biofilm presentaban una mayor resistencia a antibióticos al compararse con células planctónicas, con incremento en el MIC de 4 veces o más. Por tanto, nuestro estudio adquiere relevancia dado que es el único a la fecha en el que se demuestra que azitromicina disminuye la producción de biofilm de manera significativa, abriendo una nueva área de investigación para utilizarlo de manera clínica.

En las últimas dos décadas se ha presentado un mayor interés en la investigación tanto de la expresión y composición de biofilm de bacterias y *Candida* spp, como en la búsqueda de agentes que puedan disminuirlo. En un intento por unificar la información disponible, se publicaron en el 2014 las primeras guías para el diagnóstico y tratamiento de biofilm, en las que se recomienda evitar el uso de antibióticos como profilaxis para la producción de biofilm cuando se sospecha colonización por un organismo multi-fármacorresistente, y se sugiere la utilización de quinolonas (especialmente el uso de levofloxacino) como adyuvante en el tratamiento de infecciones con producción de biofilm por bacterias Gram negativas, pero no se hace alguna recomendación específica para el caso de *A. baumannii* ni se menciona el papel que pudieran tener los macrólidos para evitar la producción de biofilm.

Aunque se han realizado diversos ensayos en los que la utilización de eritromicina y claritromicina han mostrado eficacia en la disminución de producción de biofilm tanto en bacterias Gram positivas y negativas, nosotros decidimos valorar el uso de azitromicina por las siguientes razones: a) la azitromicina tiene efecto bacteriostático sobre bacterias Gram negativas a diferencia de otros macrólidos y, aunque está reportado en la literatura que tiene poco efecto sobre *A. baumannii*, nuestro estudio mostró MICs que en la mayoría de los aislamientos pudieran ser alcanzados con la dosis estándar; b) la azitromicina es el macrólido con menores interacciones en el citocromo P450, por lo que es una adecuada opción considerando que la mayoría de los pacientes con infecciones por *A. baumannii* se encuentran en terapia intensiva, por lo que cuenta con un perfil de seguridad

adecuado; c) es el macrólido con menores efectos adversos (los macrólidos suelen causar alteraciones gastrointestinales como dispepsia, náusea, vómito, diarrea y también existen reportes de ototoxicidad por eritromicina y claritromicina). Además de las ventajas mencionadas que presenta azitromicina frente a otros macrólidos, Yamada et al. ha estudiado el efecto de la azitromicina como inmunomodulador en las infecciones por *A. baumannii*, con evidencia, al menos in vitro y en modelos animales, de una disminución de la cascada inflamatoria.

Actualmente existen pocas opciones terapéuticas contra *A. baumannii*. La Food and Drug Administration (FDA) ha advertido de un mayor riesgo de mortalidad con el uso de tigeciclina en infecciones causadas por esta bacteria; el tratamiento a base de fosfomicina requiere dosis de 20 a 24 gramos diarios que muy pocos pacientes llegan a tolerar por eventos adversos principalmente gastrointestinales; la colistina, que es el antibiótico que ha resurgido en algunos casos como la única opción terapéutica, es un medicamento costoso (en nuestro hospital un día de tratamiento representa un gasto de \$3,500.00 aproximadamente) y suele causar nefrotoxicidad. El uso de azitromicina como adyuvante, representa una oportunidad real de contar con una opción terapéutica a través de un mecanismo de acción diferente, con un perfil de seguridad adecuado, y a un costo accesible.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones: es necesario realizar ensayos en los que se evalúe la sinergia con otros antibióticos, para determinar la combinación que tenga un mejor efecto. Además, es necesario traspolar los resultados a estudios in vivo, ya sea en modelos animales o ensayos clínicos en humanos, con

la finalidad de confirmar los resultados presentados. Sin embargo, nuestro estudio es la base para que dichas áreas de investigación puedan ser abordadas.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIÓN

Los aislamientos de *A. baumannii* incluidos en este estudio mostraron una baja concentración subinhibitoria a la azitromicina y un nivel fuerte de producción de biofilm con y sin azitromicina. El índice de biofilm fue más bajo cuando este se desarrolló en concentraciones subinhibitorias de azitromicina, por lo que este antibiótico podría ser útil como coadyuvante en el tratamiento de infecciones causadas por aislamientos *A. baumannii* productores de biopelícula.

CAPÍTULO IX

ANEXOS

ANEXO 1

Carta de aprobación por el Comité de Ética

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. Antunes, L., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*, 71(3), 292-301.
2. Eliopoulos, G. M., Maragakis, L. L., & Perl, T. M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical infectious diseases*, 46(8), 1254-1263.
3. Badave, G. K., & Dhananjay, K. (2015). Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge.
4. Gil-Perotin, S., Ramirez, P., Marti, V., Sahuquillo, J. M., Gonzalez, E., Calleja, I., ... & Bonastre, J. (2012). Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Critical Care*, 16(3), R93.
5. Gurung, J., Khyriem, A. B., Banik, A., Lyngdoh, W. V., Choudhury, B., & Bhattacharyya, P. (2013). Association of biofilm

production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 17(4), 214.

6. Longo, F., Vuotto, C., & Donelli, G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*, 37(2), 119-127.
7. Sirijatuphat, Rujipas, and Visanu Thamlikitkul. "Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58.9 (2014): 5598-5601.
8. Zhang, Y., Chen, F., Sun, E., Ma, R., Qu, C., & Ma, L. (2013). In vitro antibacterial activity of combinations of fosfomycin, minocycline and polymyxin B on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Experimental and therapeutic medicine*, 5(6), 1737-1739.
9. Li-Wan, W., Lin, Z., Hong-Xia, L., & Tian-Zhi, L. (2014). Preliminary Analysis on the Treatment of Ventilator-associated Pneumonia Caused by Pandrug-resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 36(2), 185-188.
10. Santimaleeworagun, W., Wongpoowarak, P., Chayakul, P., Pattharachayakul, S., Tansakul, P., & Garey, K. W. (2011). In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomycin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23

carbapenemases. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(4), 890.

11. Song, J. Y., Cheong, H. J., Noh, J. Y., & Kim, W. J. (2015). In vitro Comparison of Anti-Biofilm Effects against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Imipenem, Colistin, Tigecycline, Rifampicin and Combinations. *Infection & chemotherapy*, 47(1), 27-32.
12. Lee, Je Chul, et al. "Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells." *Research in microbiology* 157.4 (2006): 360-366.
13. Yoon, Eun-Jeong, et al. "Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*." *mBio* 6.2 (2015): e00309-15.
14. Parnham, M. J., Haber, V. E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G. M., & Vos, R. (2014). Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*, 143(2), 225-245.
15. Starner, T. D., Shrout, J. D., Parsek, M. R., Appelbaum, P. C., & Kim, G. (2008). Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(1), 137-145.
16. Mulet, X., Maciá, M. D., Mena, A., Juan, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2009). Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of nfxB

- mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(4), 1552-1560.
17. Gui, Z., Wang, H., Ding, T., Zhu, W., Zhuang, X., & Chu, W. (2014). Azithromycin reduces the production of α -hemolysin and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Indian journal of microbiology*, 54(1), 114-117.
 18. Saini, H., Chhibber, S., & Harjai, K. (2014). Azithromycin and ciprofloxacin: A possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. *International journal of antimicrobial agents*.
 19. Cuenca, F. F., Pascual, A., Martínez, L. M., & Perea, E. J. (2003). Actividad in vitro de azitromicina frente a aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Rev Esp Quimioterap*, 16(2), 204-208.
 20. Yamada, K., Morinaga, Y., Yanagihara, K., Kaku, N., Harada, Y., Uno, N., ... & Kohno, S. (2014). Azithromycin inhibits MUC5AC induction via multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in human airway epithelial cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 28(2), 165-170.
 21. Yamada, K., Yanagihara, K., Kaku, N., Harada, Y., Migiyama, Y., Nagaoka, K., ... & Kohno, S. (2013). Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8), 3883-3888.
 22. Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Martínez-Reséndez, M. F., Llaca-Díaz, J. M., Pérez-Rodríguez, E., & Garza-

González, E. (2014). Influence of whole-body washing of critically ill patients with chlorhexidine on *Acinetobacter baumannii* isolates. *American journal of infection control*, 42(8), 874-878.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Reynaldo Lara Medrano

Candidato para el grado de

Especialista en Infectología Clínica

Tema: EFECTO DE LA AZITROMICINA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y SU
COMPOSICIÓN EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
ACINETOBACTER BAUMANNII

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

BIOGRAFÍA:

Datos Personales: Nacido en Matehuala, San Luis Potosí, el 31 de diciembre de 1985; hijo de Rey David Lara Vega y María del Rosario Medrano de León.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Cirujano y Partero en 2009. Grado de especialista en Medicina Interna en 2015, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Experiencia Profesional: Residente de Medicina Interna del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, UANL, del año 2011 a 2015.
Residente de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, UANL, desde marzo de 2015.