



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA  
DIRECCION DE EDUCACION MÉDICA  
SUBDIRECCION DE EDUCACION MÉDICA

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
INFECTOLOGÍA

**“EFECTO DE LA TERAPIA ANTIMICROBIANA SOBRE EL BIOFILM GENERADO  
POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* MDR IN VITRO”**

ESTUDIO EXPERIMENTAL

PRESENTA  
DR. LÓPEZ VÉJAR CÉSAR EMMANUEL

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN  
INFECTOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. PATRICIA RODRÍGUEZ ZULUETA

2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“EFECTO DE LA TERAPIA ANTIMICROBIANA SOBRE EL BIOFILM  
GENERADO POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* MDR IN VITRO”**

Autor: Dr. López Véjar César Emmanuel

Vo. Bo.  
Dra. Patricia Amalia Volkow Fernández

---

Titular del curso de especialización en Infectología

Vo. Bo.  
Dra. Silvia Verónica Villavicencio Valencia

---

Subdirección de educación médica  
Instituto Nacional de Cancerología

Vo. Bo.  
Dra. Patricia Rodríguez Zulueta

---

Directora de Tesis  
Médico Adscrito al departamento de Infectología

## **AGRADECIMIENTOS.**

Nuevamente doy un paso más en mi formación medica, pues esta tesis es conclusión de uno de los eventos que declaran el logro en mi formación como infectólogo. Aprovecho unas líneas para agradecer a todos esos seres que han dado cabida a la formación del ente que soy.

Primero, agradezco a mis padres por el ejemplo a triunfar, el apoyo incondicional y la bendición de saberme contar con su cariño.

Segundo, agradezco a mi hijo, por ser una imagen en mi mente, que ha alimentado mi animo día tras día, para vencer el cansancio y los retos que trae la vida, y llegar a ser así vivo ejemplo de que es bueno siempre seguir por un buen camino sin importar el entorno.

Tercero, agradezco a esos pilares importantes que son los amigos, a Jorge Santiago, Raúl Meraz, Román Alonso, Nadia Fernández, Luis David Chora, Grace Salazar, Amy Peralta y tantos más, que han dado semilla buena en mi.

Cuarto, agradezco a Karla Cruz por ser figura emergente a una mente positiva, por abrir puertas, y por querer buscar nuevas metas.

Quinto, agradezco a todos mis maestros, por enseñanzas, consejos y amistad, por ser estructura en mi formación, Marco Antonio López Hernández, Patricia Rodríguez, Mónica Delgado, Amparo Moreno Herrera, al grupo de químicos que también me han dado amistad, cariño y enseñanzas Sugheyli Zarco, Adriana Díaz, Consuelo, Esaú López, Eduardo Escamilla, y tantos más que viven en mi.

Un agradecimiento especial al Dr. Rigoberto Hernández Castro y MVyZ Luis Fernández Maya, Dra. Patricia Rodríguez Zulueta, quienes sin su apoyo, este trabajo nunca hubiera podido concluirse.

## ÍNDICE.

Resumen .....	5
Caratula .....	6
Antecedentes .....	9
Marco de referencia .....	18
Planteamiento del problema .....	19
Pregunta de investigación .....	20
Justificación .....	21
Hipótesis .....	22
Objetivos .....	23
Diseño del estudio .....	24
Metodología .....	25
Resultados .....	33
Discusión.....	40
Conclusiones .....	41
Bibliografía .....	42

## RESUMEN.

Cepas de *Acinetobacter baumannii* MDR formadoras de biofilm, confieren resultados distintos a esquemas antimicrobianos respecto de cepas en estado planctónico.

Se propone la realización de un modelo experimental in vitro para evaluar el efecto de diversos esquemas de antimicrobianos basados, sobre la producción del biofilm generado por *Acinetobacter baumannii* MDR.

**Objetivo.** Evaluar el efecto de la terapia antimicrobiana sobre la producción de biofilm de *Acinetobacter baumannii* MDR in vitro, de acuerdo al esquema antimicrobiano empleado.

**Metodos.** Se analizó el efecto de cuatro regímenes antimicrobianos, sobre la producción de biofilm de cepas de *A baumannii* MDR que expresaban fenotipo productor biofilm, previamente identificado. Las cepas, fueron tomadas del archivo del laboratorio de investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea González, las cuales a su vez provenían de aislamientos clínicos de pacientes hospitalizados en el año 2011. Todas las cepas mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos, quinolonas y aminoglucósidos.

Todas las fueron sometidas a una primera etapa, con monoterapia con colistina. Posteriormente, en una segunda etapa, las cepas que continuaron produciendo biofilm, fueron sometidas a una segunda etapa de experimentación, con 3 combinaciones de fármacos, y una monoterapia con tigeciclina, con la finalidad de evaluar el efecto sobre la producción del biofilm formado por *Acinetobacter baumannii* MDR. Las combinaciones de antimicrobianos fueron: grupo 1 colistina + meropenem; grupo 2 colistina + rifampicina; grupo 3 colistina + tigeciclina; grupo 4 monoterapia con tigeciclina. Para la generación de la biopelícula se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos en "U". La formación de biopelícula fue determinada mediante cristal violeta a una OD<sub>630</sub> nm. Cada experimento se realizó por triplicado.

**Resultados.** Se mostró que para el grupo 1, combinación colistina + meropenem a dosis de 2 µg/ml/2 µg/ml, 11 de 20 cepas (55 %) continuaron produciendo biofilm, y a dosis de 2 µg/ml/4 µg/ml en 5 de 20 cepas (25 %); para el grupo 2, combinación colistina + rifampicina a dosis de 2 µg/ml/2 µg/ml, 3 de 20 cepas (15 %) continuaron produciendo biofilm, y a dosis de 2 µg/ml/4 µg/ml en 1 de 20 cepas (5 %); para el grupo 3, combinación colistina + tigeciclina a dosis de 2 µg/ml/1 µg/ml, ninguna cepa (0 %) produjo biofilm; y para el grupo 4, monoterapia con tigeciclina a dosis de 1 µg/ml, también, se encontró que ninguna cepas (0 %) produjo biofilm.

**Conclusiones.** La terapia combinada que incluye colistina más tigeciclina, se mostró como la más efectiva para evitar la formación del biofilm de *A baumannii* MDR in vitro en nuestro estudio. La monoterapia con tigeciclina se mostró tan efectiva como su combinación con colistina, no obstante, no recomendamos el uso de tigeciclina como monoterapia en la práctica clínica. La respuesta obtenida en los grupos que usaron combinación de colistina más meropenem y rifampicina, mostraron un efecto dosis dependiente a favor de mayores dosis de carbapenémico y rifampicina. Se requieren estudios que evalúen el impacto clínico de estos hallazgos en modelos in vivo.

**EFFECTO DE LA TERAPIA ANTIMICROBIANA SOBRE EL BIOFILM GENERADO POR  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* MDR IN VITRO**

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:**

Básica experimental.

**2. INVESTIGADORES:**

2.1 Investigadores principales:

Nombre: Rodríguez Zulueta Patricia.

Cargo: Medico adscrito al departamento de Infectología. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud. México, DF.

Correo electrónico: [rozu76@hotmail.com](mailto:rozu76@hotmail.com)

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Hernández Castro Rigoberto.

Cargo: Investigador adscrito al Departamento de Ecología de Agentes Patógenos. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud. México, DF.

Correo electrónico: [rigo31@yahoo.com](mailto:rigo31@yahoo.com)

Firma: \_\_\_\_\_

2.2 Investigador asociado principal:

Nombre: López Véjar César Emmanuel.

Cargo: Residente de segundo año del departamento de Infectología. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud. México, DF.

Correo electrónico: [pambolero8@hotmail.com](mailto:pambolero8@hotmail.com)

Firma: \_\_\_\_\_

2.3 Investigadores asociados:

Nombre: Fernández Maya Luis Enrique.

Cargo: Investigador adscrito al Departamento de Ecología de Agentes Patógenos. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud. México, DF.

Correo electrónico: [@hotmail.com](mailto:@hotmail.com)

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: David Moncada Barrón.

Cargo: Jefe del Laboratorio de Microbiología. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud. México, DF.  
Correo electrónico: [davidmoncadabarrón@hotmail.com](mailto:davidmoncadabarrón@hotmail.com)

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Carrillo Casas Erika.

Cargo: Investigadora adscrita al Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Secretaría de Salud. México, DF.

Correo electrónico: [@hotmail.com](mailto:@hotmail.com)

Firma: \_\_\_\_\_

**3. SEDE:**

Laboratorio de investigación. Hospital General Dr. Manuel Gea González.



#### **4. ANTECEDENTES.**

##### **BIOFILM.**

###### **Definición e historia.**

Los biopelículas han sido descritos en muchos sistemas. Van Leeuwenhock fue uno de los pioneros, al examinar “los animaculos” en la placa de sus dientes en el siglo XVII. No obstante, el concepto de biofilm fue promulgado hasta 1978 **(1)**.

Otro de los conceptos originales para el estado de biofilm, fue el estado teórico, en el cual, la mayoría de las bacterias pueden crecer en biopelículas adherentes de matriz cerrada, en toda superficie de un ecosistema acuático con suficientes nutrientes, y que difieren de manera profunda con respecto a su contraparte plantónica (flotante) **(2)**.

La definición de biofilm ha evolucionado a lo largo de 25 años, con técnicas que permitieron ampliar su descripción. En 1976, en su trabajo, Marshall noto el involucro de “fibrillas extracelulares poliméricas muy finas”, que anclaban bacterias a las superficies. Costerton y colaboradores, observaron comunidades de bacterias encerradas en una matriz “glicocalix”, el cuál resulto ser un polisacárido natural, y que este material de matriz confería adhesión **(2)**. En 1987, el mismo Costerton **(4)**, declaro que el biofilm consistía de simples células y microcolonias, todas embebidas en una matriz predominantemente de un exopolímero aniónico altamente hidratado.

En 1995, Costerton y Lappin-Scott **(5)**, demostraron el involucro de genes en la adhesión activa y formación de biopelícula. Ejemplo de esto, son los estudios de Davies y Geesey con *Pseudomonas* **(6)**, donde se demuestra la presencia del gene “algC” como responsable de la producción de fosfomanomutasa, involucrada en la síntesis de alginato, exopolisacárido de matriz, que es sobrerregulado dentro de minutos posterior a la adhesión a una superficie solida.

Definiciones más novedosas, lo comentan, ser un derivado microbiológico sésil, caracterizado por células adheridas a un sustrato o interface o entre si, incrustadas en una matriz de sustrato polimérico extracelular que han producido, y exhibido un fenotipo alterado con respecto al índice de crecimiento y transcripción de genes **(1)**. Esta definición ha sido usada, debido a que algunas poblaciones bacterianas que llenan las características de definiciones previas para células formadoras de biopelícula, con formación de matriz y crecimiento en superficie, no cumplen el real fenotipo de biopelícula. Estas poblaciones “no biofilm”, las cuales incluyen colonias de bacterias que crecen en superficies de agar, se comportan como células planctónicas “varadas” en una superficie y no exhiben ninguna característica de resistencia de un biofilm verdadero **(1)**.

###### **Impacto clínico.**

El concepto de que las bacterias pueden crecer de manera preferencial en biopelículas adherentes en sistemas naturales o industriales, no fue aceptado de manera inmediata en el área medica y dental a pesar de la aceptación universal de que la placa dental es un tipo de biofilm **(3)**.

Nuevos métodos para el examen directo de biopelículas, han mostrado que algunos organismos pueden causar infecciones relacionadas a dispositivos y otras infecciones crónicas **(3)**.

La producción de biofilm, protege a estos organismos celulares de sustancias químicas antimicrobianas, bacteriófagos ambientales y amebas fagocíticas. Comparadas con las células planctónicas que causan infección bacteriana aguda, las células sésiles inmersas en biofilm, pueden llevar a infecciones crónicas por algunas características: la presencia de una población que ha sobrevivido por mecanismos no relacionados a la rápida multiplicación, incremento en la resistencia a agentes antimicrobianos e incremento en las interacciones celulares como la transmisión de genes de manera horizontal y co-metabolismo entre poblaciones bacterianas, que permite, resistan aún más la terapia antimicrobiana y resistan fenomenalmente los mecanismos de aclaramiento del huésped, tales como anticuerpos y fagocitos **(1, 17)**.

### **Métodos de identificación de biofilm.**

El procedimiento usado de manera más común para la medición de biofilm es el procedimiento de cuenta en placa de organismos viables dentro de un medio microbiológico sólido, incubado y contabilizado. Así mismo se han utilizado otros métodos como la densidad óptica por espectrofotometría y algunas técnicas por microscopia **(1, 8, 17)**

El entendimiento del biofilm se ha desarrollado a la par de métodos para su evaluación y caracterización. Muchos de los primeros trabajos de investigación sobre biofilm, fueron generados en el microscopio de barrido electrónico, técnica que utiliza la degradación con solventes (alcohol, acetona y xileno) para deshidratar la muestra previo al examen. Ya que la hidratación con agua no es compatible con el vacío usado con el microscopio de barrido electrónico. Este proceso de deshidratación resulta en una distorsión significativa de la muestra y genera artefactos **(8)**.

La microscopia por transmisión de electrón y tinciones polisacáridas específicas como el rojo de rutenio ha permitido identificar la naturaleza de las fibras extracelulares en los biofilms, y elucidar la asociación entre fibras y células. La microscopia electrónica ha sido usada para el examen y caracterización de biofilm en dispositivos médicos **(9, 10)** y en infecciones humanas **(11, 12)**. La microscopia electrónica tiene excelentes características de resolución.

La microscopía de barrido confocal (CLSM), otorga la habilidad de examinar biofilm de manera in situ sin las limitaciones encontradas con el uso del microscopio de barrido electrónico, aunque con menor aumento. La pérdida en la resolución fue mas que compensada por la capacidad para examinar el estado de la matriz del biofilm, alterada o intacta **(1)**.

Tanto la CLSM y el microscopio de epifluorescencia requiere que el organismo en el biofilm sea teñido con tinciones fluorescentes. El uso de tales tinciones ha permitido a investigadores en biofilm, cuantificar la viabilidad celular dentro de los biofilms **(13)**.

### ***ACINETOBACTER BAUMANNII***

### **Descripción.**

El genero *Acinetobacter*, como actualmente se define, comprende a una bacteria de tipo cocobacilo-bacilo, gram negativa, aerobia estricta, que se le han atribuido características bioquímicas el no ser fermentadora, no fastidiosa, no móvil, catalasa positiva, oxidasa negativa **(15)**.

Causa infecciones nosocomiales severas primariamente en pacientes inmunocomprometidos. El espectro clínico incluye algunas afecciones como neumonía, meningitis y bacteremia. Se le encuentra en lugares como las terapias intensivas, y frecuentemente se le aísla en dispositivos médicos **(14, 16)**.

Se ha mostrado que tiene la capacidad de supervivencia ambiental, por mecanismos que incluyen la capacidad a resistir a la desecación, antimicrobianos de amplio espectro y desinfectantes, y producción de biofilm **(1, 14, 16)**.

### **Impacto clínico.**

Debido a su alta prevalencia hospitalaria y el gran numero de infecciones relacionadas, y su alta capacidad de resistencia intrínseca y adquirida, se han estudiado diversas estrategias y combinaciones de fármacos enfocada a su eliminación **(16)**, en donde, pareciese que la terapia combinada pudiera ser al momento, nuestra única opción terapéutica práctica (82).

Se han desarrollado algunos estudios in vitro sobre combinaciones de fármacos encaminados a evaluar sinergia antimicrobiana (82), modelos animales y estudios de cohorte retrospectiva que buscan comprobar esta respuesta. Algunos de estos estudios serán descritos más adelante.

### **Habitad.**

Algunas cepas de *Acinetobacter sp.*, que han sido recuperadas en muestras clínicas humanas, pueden contar con al menos un grado de significancia como agente patógeno en el hombre **(14)**.

*Acinetobacter sp.*, puede llegar a formar parte de la flora dérmica humana. En estudios epidemiológicos, se han aislado como cepas colonizantes hasta en 43 %, especies de *Acinetobacter* en individuos no hospitalizados. Siendo las más frecuentes *A lwoffii*, (58 %), *A johnsonii* (20 %), *A junii* (10 %) y *Acinetobacter* especie genómica 3 (6 %) **(31)**. En contraste *A baumannii*, es la especie de *Acinetobacter* más importante a nivel nosocomial, rara vez aislada en la piel humana (0.5-3 %) y en heces humanas (0.8 %) **(15)**.

### **Aislamiento**

Las especies de *Acinetobacter* de origen humano son consideradas como organismos no fastidiosos, pues crecen bien en medios solidos rutinarios como el agar sangre de carnero o el agar soya tripticasa. Tiene una temperatura ideal de incubación de 37°C, pudiendo crecer a más bajas temperaturas. Forma colonias blanco grisáceas, en ocasiones mucoides con diámetros de 1.5-3 mm tras 24 horas de incubación **(14)**.

### **Mecanismos de resistencia a antimicrobianos**

El estudio realizado por Fournier, tipifica la habilidad genética y la amplia gama de resistencia de *Acinetobacter baumannii* **(24)**. Después de realizar la

secuenciación completa de una cepa epidémica de *A baumannii* aislada en Francia (AYE), se identificó un elemento genético móvil que le brinda resistencia, teniendo un peso de 86-kb, al momento una de las más largas identificadas. De los 88 marcos de lectura abiertos predichos (ORFs) dentro de esta región genómica, se piensa que 82 fueron originados otros organismos gram negativos, tales como *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, y *Escherichia coli*. Además, el contenido de G+C de esta región fue de 52.8 %, comparado con 38.8 % para el restante cromosoma, que indica una fuente externa probable. En general, se han identificado 52 genes de resistencia, 45 de ellos (86.5 %), localizados en la isla de resistencia AbaR1 (24).

El entorno genético que rodea esta determinante de resistencia, provee más evidencia de promiscuidad genética, con una serie de elementos genéticos móviles identificados, incluyendo tres clases de integrones 1, trasposones, y una secuencia de inserción de elemento (IS). Curiosamente, no se identificaron marcadores de plásmidos en este punto de resistencia, y de los tres plásmidos que se encontraron en la cepa AYE, ninguno contenía ningún marcador de resistencia conocida (24).

Se han identificado diversos mecanismos de resistencia para *A baumannii* para diferentes antimicrobianos, destacando para:

**$\beta$ -lactámicos** – se cuenta con cuatro tipos de mecanismos, clasificados en enzimáticos y no enzimáticos

1. Mecanismos enzimáticos.

a. Por degradación a través de  $\beta$ -lactamasas. (25, 26, 27).

2. No enzimáticos. Cambios en las proteínas de membrana externa (OMPs), bombas de eflujo (28, 29, 30), alteraciones en la afinidad o expresión de proteínas de unión a penicilinas (31, 32), y de canales de porina.

**Aminoglucosidos** – Por enzimas modificadoras de aminoglucosidos dentro de la clase 1 de integrones, por metilación de a subunidad 16S rRNA (33, 34, 35), deteriorando la unión de aminoglucosidos a su sitio blanco. Un mecanismo más aparte, viene a través de la bomba de eflujo AdeABC.

**Quinolonas** – Modificaciones a la DNA girasa o topoisomerasa IV a través de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, interfiriendo con la unión al sitio de acción. Muchas quinolonas también son sustratos para bombas de eflujo (36), incluyendo la bomba tipo RND AdeABC (37, 30) y la bomba MATE AdeM.

**Tetraciclinas y glicilciclinas** – La resistencia a tetraciclinas y sus derivados pueden ser mediados por bombas de eflujo o protección ribosomal (38). Bombas de eflujo específicas para tetraciclinas incluyen aquellas codificadas por las determinantes *tet(A)* a *tet(E)*. Esta clase de antimicrobianos también son susceptibles a los sistemas de bomba de eflujo de sistemas multifármaco como la bomba AdeABC (39).

**Polimixinas** – Se han revelado algunos mecanismos de resistencia a polimixinas a nivel molecular (40, 41), estos incluyen: 1) modificaciones específicas en porinas de membrana y reducción del total de cargas negativas de los lipopolisacáridos (LPS); 2) sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo; 3) sobreproducción de polisacáridos capsulares; 4) mecanismos enzimáticos (reportados en *Paenibacillus polymyxa*) (83). De manera específica, poco se sabe en *Acinetobacter baumannii*, acerca de sus mecanismos. La resistencia a colistina es

relativamente rara, pero se han descrito cepas con deficiencia o pérdida del lípido A del LPS, por inactivación de la biosíntesis por el gen *lpxA*, *lpxC* o *lpxD*, con resistencia de alto nivel a colistina. La pérdida o disminución de la expresión de la porina OmpW ha sido reportada como mecanismo de resistencia en *A baumannii*, a través de mutaciones del sistema *pmrA* y *pmrB*, en el cual la infra regulación del blanco PmrC cataliza la adición de PEtn al componente lipídico A del LPS.

### **Susceptibilidad antimicrobiana**

CLSI (por sus siglas en ingles: Clinical and Laboratory Standards Institute) recomienda que la medición de la concentración mínima inhibitoria (MIC), para antimicrobianos contra *Acinetobacter* spp., debe ser determinada en caldo, usando el medio en caldo Mueller-Hinton con ajuste catiónico, o en agar, usando al agar Mueller-Hinton **(42)**.

La United States, Food and Drug Administration (FDA), el CLSI y la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), han establecido puntos de susceptibilidad de antimicrobianos de primera línea con espectro para *Acinetobacter baumannii*. No obstante, no se han declarado puntos para tigeciclina y rifampicina, y, la determinación de estos puntos de susceptibilidad, ha sido determinada mediante pruebas con organismos en estado planctónico.

De esta manera, es obvio que cualquier método que se propone para estimar la eficacia de un tratamiento contra biofilm, debe usar biofilm y no las células planctónicas. Los métodos estándar de microdilución en caldo NCCLS para pruebas de droga susceptibilidad, no pueden precisar con exactitud la eficacia antimicrobiana, ya que estas técnicas son basadas sobre la exposición de organismos en estado planctónico.

### **Multidrogo-resistencia**

Se han dado algunas definiciones para la determinación de fármaco resistencia múltiple con respecto a *Acinetobacter baumannii*, dentro de las cuales, se consideran como la resistencia a dos o más de las siguientes clases de fármacos: cefalosporinas antipseudomonas (ceftazididima o cefepime), carbapenémicos antipseudomonas (imipenem o meropenem), ampicilina-sulbactam, fluoroquinolonas (ciprofloxacino o levofloxacino), y aminoglucosidos (gentamicina, tobramicina o amikacina).

Debido a que el termino “pan” hace referencia a “todo”, panresistencia a menudo es definido como la resistencia a todo antimicrobiano sometido a primera línea de susceptibilidad. Esto puede incluir a todo b-lactámico (incluyendo carbapenémicos y sulbactam [MIC de >4mcg/ml]), fluoroquinolonas y aminoglucosidos.

Los índices de no susceptibilidad a meropenem, imipenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacino y gentamicina en América Latina parecen ser los más altos en el mundo **(43)**. Tan solo, el 71 % de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* fueron susceptibles a meropenem e imipenem, evaluados en un programa de surveillance en el periodo de 2002-2004 **(43)**.

### **Manifestaciones clínicas**

En algunos estudios de vigilancia en EU, entre 5 a 10 % de los casos de neumonía adquirida en la UCI, fueron atribuidos a *Acinetobacter baumannii* (44). No obstante, es posible que en algunas otras instituciones esta proporción sea más alta.

De manera típica, los pacientes con infecciones por *Acinetobacter baumannii* han tenido tiempos de estancia prolongada en la UCI, pero en algunas situaciones de brote, muestran una adquisición temprana (45).

Otro gran estudio de infecciones nosocomiales relacionadas a torrente sanguíneo en los EU (1995-2002), *Acinetobacter baumannii* fue el 10mo agente etiológico más común, siendo responsable del 1.3 % de todas las infecciones monomicrobianas nosocomial relacionadas a torrente sanguíneo (0.6 infecciones de torrente sanguíneo por 10,000 admisiones) (46). Además se ha mostrado una mortalidad relacionada del 34 al 43.4 % en la UCI y 16.3 % fuera de la UCI. La mortalidad por infección de torrente sanguíneo atribuida a *Acinetobacter baumannii* en la UCI, ocupa el tercer lugar, y solo es superada por *Pseudomonas aeruginosa* y por *Cándida sp.* (46). (tabla de estudios comparativos relacionados a mortalidad por *Acinetobacter*)

### **Biofilm y *Acinetobacter baumannii*.**

De manera similar a otros organismos *A baumannii*, tiene la capacidad de crecer en estructuras multicelulares conocidas como biofilm. El biofilm le permite tener acceso en un ambiente estancado, a altas cantidades de oxígeno y nutrientes. También puede incrementar la sobrevivencia bacteriana bajo la presión de antimicrobianos, así como sobrevivir bajo ambientes hostiles, tales como condiciones de sequía (16).

## **ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS**

Los carbapenémicos han sido los agentes de elección para infecciones severas por *A baumannii*. Sin embargo, aunque estos fármacos permanecen siendo activos en contra de la mayoría de cepas de *A baumannii* a nivel mundial, la utilidad clínica de esta clase de antimicrobianos ha sido cuestionada por la emergencia tanto de resistencia enzimática como de mecanismos basados en membrana.

Tigeciclina y polimixina B han mostrado alguna eficacia, tanto en experimentos in vivo e in vitro (18, 19). Sin embargo, debido a la falta de grandes ensayos clínicos, así como el alto costo de tigeciclina y la elevada nefrotoxicidad de la polimixina, su uso ha sido limitado. A menudo se han utilizado combinaciones de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por *A baumannii* MDR. Algunos estudios han reportado que meropenem, polimixina B y minociclina tienen efectos sinérgicos in vitro en contra de *A baumannii* (20, 21). Además, la combinación de sulbactam con imipenem exhibe actividad bactericida sinérgica en el parénquima pulmonar (22). La combinación de rifampicina con imipenem, sulbactam y colistina tiene la habilidad antimicrobiana de estos fármacos (21).

**Sulbactam.** Se le ha mostrado actividad antimicrobiana in vitro, clínicamente relevante, específicamente con *Acinetobacter* (47, 48) y *Bacteroides spp.* (49), mediante la unión a la proteína de unión a penicilina tipo 2 (50).

Usando estudios de tiempo de muerte, los autores han demostrado actividad bactericida en contra de cepas resistentes intermedias de *A baumannii* (51, 52). Modelos murinos de neumonía, que usaron aislados de *A baumannii* sensibles a imipenem y sulbactam, mostraron similitudes en eficacia cuando a dosis de sulbactam alcanzaba un tiempo por arriba de la MIC similar al de imipenem (1.84 vs 2.01 h, respectivamente), indicando actividad antimicrobiana tiempo dependiente (52). Un ensayo más de sulbactam durante un brote de *A baumannii* resistente a carbapenémicos, aminoglucósidos, y otros  $\beta$ -lactámicos, mostro que de los 10 pacientes quienes recibieron ampicilina-sulbactam por  $\geq 3$  días, 9 respondieron, logrando erradicación microbiológica (53). Otro estudio Español que soporta esto, muestra que 29/41 (95%) pacientes con infección por *A baumannii* que no comprometía la vida, curaban o mejoraban clínicamente con ampicilina-sulbactam o sulbactam solo. Todas las cepas eran multiresistentes, pero sensibles a imipenem y sulbactam y polimixinas (48). Esto muestra que un régimen que contenga sulbactam para infecciones leves, podría significar una estrategia para limitar el excesivo uso de carbapenémicos.

Esto es interesante, ya que no solo se ha mostrado una eficacia equivalente de sulbactam a la de imipenem para el tratamiento de infecciones leves por *A baumannii*, si no que también en bacteriemia (54). El tratamiento de bacteriemia por cepas de *A baumannii* con alta resistencia (susceptible solo a sulbactam y colistina) con ampicilina sulbactam fue comparable al tratamiento de otras cepas con mayor susceptibilidad con otras terapias, incluyendo imipenem, aminoglucósidos, y quinolonas (55). Esto indica que cuando *A baumannii* es susceptible a sulbactam, este agente es probablemente tan efectivo como cualquier otro.

**Rifampicina.** En un modelo murino de neumonía, la combinación de ticarcilina-clavulanato, sulbactam y rifampicina parecen ser más eficaces hacia una cepa de *A baumannii* resistente a sulbactam y carbapenem (MIC de rifampicina 4 mg/l); sin embargo, dichos efectos se perdieron cuando una cepa era menos sensible a rifampicina (MIC 8 mg/l) (56).

**Colistina.** La emergencia de cepas de *A baumannii* resistentes a todos los antimicrobianos rutinariamente evaluados, ha llevado a la necesidad de revivir el uso de antimicrobianos polipéptidos. Estos antimicrobianos polipéptidos positivamente cargados, descubiertos en 1947, producto de *Bacillus polymyxa*, tienen como diana las moléculas aniónicas de lipopolisacárido en la membrana celular externa de bacterias gram negativas, llevando a interacciones entre las membranas celular interna y externa, con recambio lipídico asociado, alteración de la membrana, inestabilidad osmótica y eventual muerte celular.

Actualmente existen dos formas comerciales de colistina: el sulfato de colistina para uso oral o tópico y el metanesulfonato de colistina sódico o colistina sulfometato sódico (CMS), para uso parenteral. In vitro, se le ha demostrado una actividad bactericida concentración dependiente en contra de *A baumannii* (57). Los índices de

resistencia para colistina han sido reportados tan altos como el 3.2 % para cepas MDR de *A baumannii* (58). Sin embargo, se ha observado un re-crecimiento significativo a las 24 horas, para cepas que presentan una heteroresistencia a colistina (59). Posiblemente, las subpoblaciones con MICs más elevados bajo la presión selectiva. Si este fenómeno ha sido relevante, no ha sido clínicamente determinado.

La eficacia de colistina para reducir la carga bacteriana en tejidos ha sido estudiada, y curiosamente, estudios en animales han mostrado que su efecto en los pulmones es variado. Un modelo de neumonía en roedores (con inoculación directa en la vía aérea superior) muestra un efecto no óptimo en la reducción de la carga microbiológica pulmonar (57), y en contraste con la excelente actividad de otro modelo de infección de muslo de ratas que lleva a diseminación hematogena hacia los pulmones (60). Esto puede ser explicado por la variada penetración de colistina en los compartimentos del pulmón o una modificación de la actividad en el fluido de revestimiento epitelial.

En general, la eficacia de colistina, ha sido alentadora tanto en población pediátrica y de adultos, con respuesta favorable o curativa que oscila desde el 57 % al 80 % (61, 62, 63, 64). Esto lo podemos apreciar en los resultados de algunas cohortes que evalúan diferentes tipos de infecciones, utilizando terapia con colistina para cepas solo susceptibles a colistina contra aquellos pacientes que recibieron otros tipos de combinaciones de antimicrobianos (predominantemente carbapenémicos solo o en combinación) para organismos más susceptibles (61, 65).

Algunos estudios, in vitro y animales, sustentan el uso de la terapia combinada con colistina, en particular con carbapenémicos y/o rifampicina (66, 67, 68, 69, 70), esto con resultados prometedores. No obstante, la mayoría de pacientes que han recibido un cumulo de otros antimicrobianos, más comúnmente carbapenémicos, pero también quinolonas, aminoglucósidos, sulbactam, rifampicina, y otros más, no permiten dejar tan claro el efecto de la terapia con solo colistina vs la terapia combinada.

**Tigeciclina.** Un derivado semisintético 9-t-butilglicilamido de minociclina, se ha mostrado como una nueva opción al tratamiento de *A baumannii*. Junto con otros derivados de tetraciclina, inhibe la subunidad ribosomal 30s, pero su única característica es la habilidad para evadir los mayores determinantes de la resistencia a tetraciclina, las bombas de eflujo *tet(A)* a *tet(E)* y *tet(K)*, y las determinantes *tet(M)* y *tet(O)* que proveen protección ribosomal (169, 430).

La actividad de tigeciclina en contra de *A baumannii* ha sido evaluada por pruebas de MIC, con reportes de MIC<sub>50</sub> de 1 µg/ml y una MIC<sub>90</sub> de 2 µg/ml (73, 74, 75), aunque otros más han mostrado MICs tan altas como 4 µg/ml, 8 µg/ml y 32 µg/ml (76, 77, 78). Cuando ha sido evaluada en contra de cepas no susceptibles a carbapenémicos, tigeciclina permitió un efecto bactericida máximo en concentraciones cercanas a MIC de 1 µg/ml, sin encontrar mayor beneficio al usar concentraciones mayores (79). Algo interesante, es que concentraciones justo por debajo de la MIC (0.5 µg/ml a 0.7 µg/ml), son consistentemente obtenidas con las dosis convencionales (0.63 µg/ml después de una dosis de carga IV de 100 mg seguidas de 50 mg IV dos veces día) (80), causando re-crecimiento a las 24 horas.

No se han observado diferencias para diferentes combinaciones de tigeciclina, incluyendo combinaciones con amikacina, meropenem, imipenem, ciprofloxacino,



levofloxacino, ampicilina-sulbactam, rifampicina y polimixina B **(81, 82)**. Estos datos expresaron su preocupación por el uso de tigeciclina para infecciones de torrente sanguíneo causadas por organismos con MICs > 1 µg/ml **(83, 84)**. En este punto, no se ha recomendado el uso de tigeciclina para bacteriemia por *A baumannii* si es que existe disponibilidad de otra opción. Contrario a lo anterior, se le ha encontrado buena concentración en tejido, incluyendo el parénquima pulmonar **(85)**. De esta forma, su utilidad para tratar neumonía por *A baumannii* u otros tejidos requiere mayor evaluación.

## 5. MARCO DE REFERENCIA.

### Estudios en biofilm.

Existen algunos estudios publicados, diseñados para evaluar estrategias farmacológicas encaminadas a la eliminación de *A baumannii* MDR, como se mencionan previamente, pero estos modelos de estudios están basados sobre el estado planctónico de *A baumannii*. Al momento, solo se ha publicado en la literatura, un modelo experimental *in vitro*, que evalúa la intervención farmacológica de varios regímenes antimicrobianos sobre la formación del biofilm de *A baumannii*.

El estudio fue realizado en Corea, y diseñado por Joon Young Song y cols.. Este podríamos considerarlo como el pionero en la evaluación del efecto antimicrobiano sobre la formación de biofilm. El estudio fue elaborado con un punto primario el cual comparar el efecto de rifampicina, colistina, imipenem, tigeciclina y sus combinaciones, sobre la formación de biofilm *in vitro* por cepas de *A baumannii* recopiladas de muestras clínicas. Dentro del estudio, se utilizaron tres cepas de *A baumannii* resistentes a carbapenémicos, las cuales tenían diversos mecanismos de resistencia ( $\beta$ -lactamasas tipo OXA-51 con IS*Aba1*, IMP-1, y VIM-2), identificados por PCR. La susceptibilidad de las cepas fueron identificadas con el sistema semi-automatizado Vitek2, y finalmente confirmadas por secuencias del gen *rpoB* (11). El biofilm fue creado en micro-placas de poliestireno con 24 posos planos, llenados con 600  $\mu$ l con un inóculo estándar en caldo, sellados con parafina e incubados por 48-96 horas; el medio de cultivo fue cambiado cada 24 horas. Para visualizar el biofilm, el contenido de los posos fue aspirado con un inyector, y posteriormente lavado el poso tres veces con 200  $\mu$ l de una solución buffer de fosfato (PBS). Paso seguido, el poso fue secado a aire ambiente, y el interior teñido con 100  $\mu$ l de solución de cristal violeta al 1% por 5 minutos a temperatura ambiente; más tarde, el biofilm fue resolubilizado con 300  $\mu$ l de una solución de etanol/ácido acético (1:1), y el contenido, transferido a una nueva micro-placa de poliestireno de 96 posos para ser cuantificado por medio de densidad óptica, por espectrofotometría a una densidad óptica de 570 nm. Para elucidar el efecto de los antimicrobianos sobre el biofilm, se incubó en micro-placa de poliestireno el mismo inóculo estándar y adheridas cada uno de los fármacos en monoterapia (imipenem, sulfato de colistina, tigeciclina y rifampicina), y las combinaciones de imipenem/rifampicina y colistina/rifampicina. En el estudio, los autores encontraron que solo las cepas productoras de VIM-2 tuvieron una producción significativa en la formación de biofilm ( $8.04 \pm 2.16$  (VIM-2), a  $0.66 \pm 0.73$  (IMP-1) y  $0.73 \pm 0.62$  (OXA-51), comparadas con  $0.75 \pm 0.35$  en los controles negativos. Tomando en cuenta las cepas VIM-2, la monoterapia con imipenem, colistina y rifampicina, tuvieron reducciones de no más del 30 %. En cambio, tigeciclina, imipenem/rifampicina, colistina/rifampicina, mostraron inhibición significativa en la producción de biofilm de más del 80 % (17).

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Las bacterias inmersas en biofilm pueden presentar respuestas al tratamiento antimicrobiano, que difieran de las causadas por bacterias en estado planctónico.

Cepas de *Acinetobacter baumannii* han sido encontradas como capaces de producir biofilm.

No se cuenta con un gold standard en el tratamiento antimicrobiano para evitar la formación de biofilm por cepas de *A baumannii* MDR, pero se ha escrito sobre el uso de regímenes duales para mejorar los resultados en el tratamiento de organismos MDR.

Desconocemos cual es el efecto de diferentes regímenes antimicrobianos sobre la formación del biofilm generado por cepas de *A baumannii* MDR, puesto que existen pocos estudios desarrollados a evaluar el impacto del efecto de diversos antimicrobianos y sus combinaciones, sobre la formación de biofilm.

## **6.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Cuál es el efecto de la terapia antimicrobiana sobre el biofilm generado por *Acinetobacter baumannii* MDR in vitro, de acuerdo al esquema antimicrobiano empleado?

## 7. JUSTIFICACIÓN.

Las bacterias inmersas en biofilm pueden presentar respuestas al tratamiento antimicrobiano, que difieran de las causadas por bacterias en estado planctónico.

Cepas de *Acinetobacter baumannii* han sido encontradas como capaces de producir biofilm.

No se cuenta con un gold standard en el tratamiento antimicrobiano para evitar la formación de biofilm por cepas de *A baumannii* MDR, pero se ha escrito sobre el uso de regímenes duales para mejorar los resultados en el tratamiento de organismos MDR.

Desconocemos cual es el efecto de diferentes regímenes antimicrobianos sobre la formación del biofilm generado por cepas de *A baumannii* MDR.

Existen pocos estudios en la literatura medica que evalúen el efecto de la terapia antimicrobiana sobre la formación del biofilm generado por *A baumannii* MDR.

De esta manera, y ya que en nuestro medio, las infecciones producidas por cepas de *A baumannii* MDR productoras de biofilm son comunes, y generan un problemad de salud importante, proponemos la generación de un modelo in vitro, con el cual podamos obtener datos que nos permitan evaluar el efecto de diversos regímenes antimicrobianos sobre la formación del biofilm producido por cepas de *A baumannii* MDR, productor de biofilm, obtenido de muestras clínicas en nuestro centor hospitalario. Esto cobra importancia, ya que los métodos estándar de microdilución en caldo para pruebas de drogo susceptibilidad, fueron generados para evaluar la respuesta a la terapia antimicrobiana con organismos en estado planctónico y podrían no precisar el mismo efecto sobre la producción de biofilm y su células productoras.

## **8. OBJETIVO PRINCIPAL.**

Evaluar el efecto de la terapia antimicrobiana sobre la producción del biofilm de *Acinetobacter baumannii* MDR in vitro, de acuerdo al esquema antimicrobiano empleado.

## **9. HIPÓTESIS.**

No se requiere de hipótesis, puesto que se trata de un modelo experimental in vitro, con un mismo grupo de cepas recopiladas en muestras clínicas en un periodo de tiempo.

## 10. Diseño.

Se trata de un estudio experimental, que llevará a cabo el análisis del efecto de la intervención farmacológica de cinco diferentes esquemas de fármacos antimicrobianos sobre la formación de biofilm por cepas de *Acinetobacter baumannii* multidrogo resistente.

El estudio se llevara a cabo en las instalaciones del laboratorio de investigación del Hospital Manuel Gea González, en el periodo comprendido al mes de julio y agosto del año 2015.

## 11. MATERIALES Y MÉTODOS.

### Origen y características de las cepas bacterianas

Se tomarán 36 cepas de *Acinetobacter baumannii* multidrogo resistente, ya identificadas y sometidas a pruebas de susceptibilidad por medio del sistema automatizado MicroScan Walkaway®.

Para este estudio se considerará por definición de multidrogo resistencia, a la resistencia a quinolonas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos.

Las cepas a analizar, serán tomadas del archivo del laboratorio de investigación, las cuales provienen de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el periodo de enero del 2011 a septiembre del 2011.

Las cepas han sido identificadas ya como productoras de biofilm, por medio de un ensayo en microplaca de 96 pozos de fondo en "U", tras incubación a 37°C durante 48 horas, y posteriormente a la tinción con cristal violeta al 1% y al lavado de la placa con etanol al 95 %, la solución restante, sometida a la medición por densidad óptica (OD) por espectrofotometría a una OD de 630 nm de absorbancia.

Todas las cepas presentaron formación de biofilm, con una media de 0.167 OD (min 0.044 – máx 0.459). Estas fueron divididas de acuerdo a su capacidad de producción de biopelícula. Lo anterior acorde al ser comparadas dos controles: cepa *Escherichia coli* DH5 alfa como productor débil y *Pseudomonas aeruginosas* 27853 como productos fuerte. Se dio como definición, alta producción de biofilm a aquellas cepas con formación de/o más de 60 %, y baja producción a aquellas con menos de 60 %.

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria/Antimicrobianos

Se realizó la prueba de MIC a 36 cepas de *Acinetobacter baumannii*, mediante un sistema automatizado, MicroScan Walkaway®, en el que se evaluó la drogo



susceptibilidad, y determinó resistencia a: ceftazidima, piperacilina/tazobactam, imipenem, meropenem, amikacina.

La susceptibilidad a colistina se evaluó por el método de Kirby-Bauer, con un inóculo de  $10^5$  UFC (McFarlan 0.5), considerándose susceptibles todas las 36 cepas, al obtener un halo de inhibición de más de 11 mm.

### Fármacos a estudiar

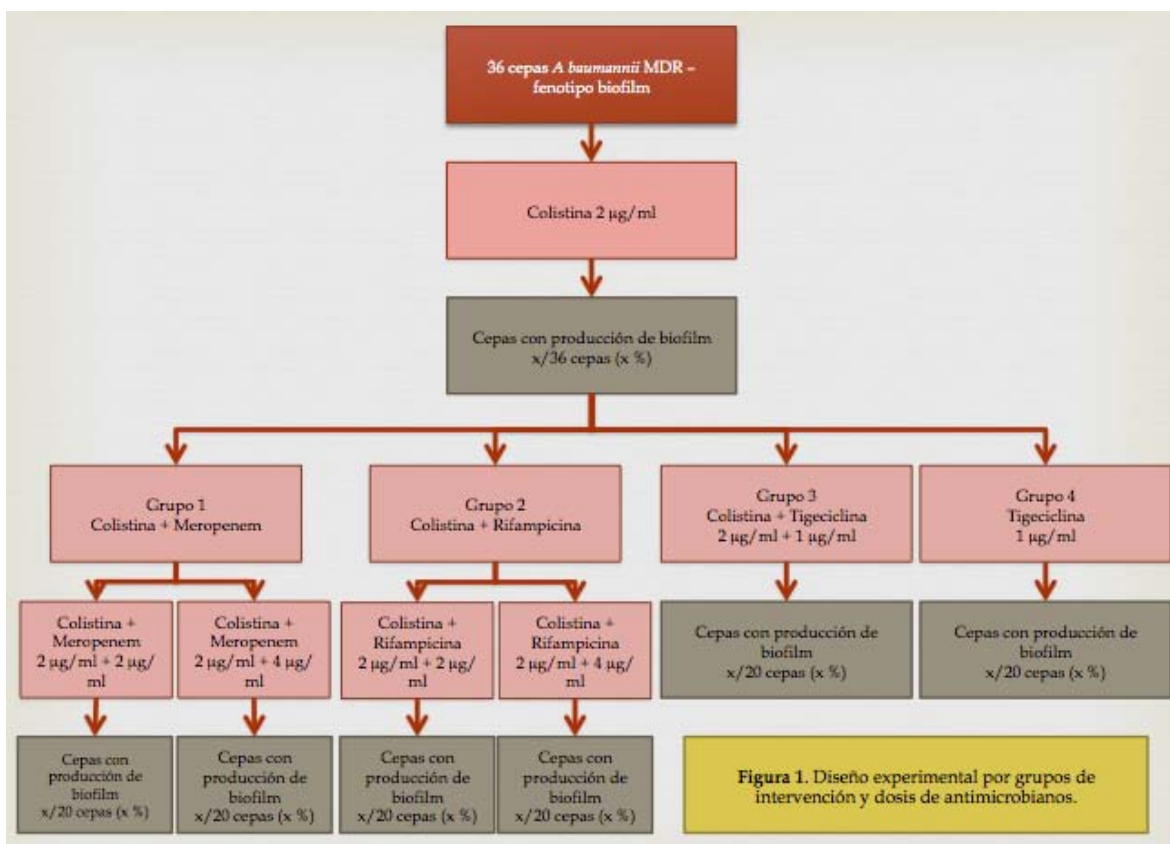
Todas las cepas serán sometidas en una **primera etapa**, a la monoterapia con colistina. Posteriormente, en una **segunda etapa**, las cepas que no se haya logrado inhibición de la formación de biofilm con la monoterapia de colistina, serán sometidas a experimentación con 3 combinaciones de fármacos, y una monoterapia con tigeciclina, con la finalidad de evaluar el efecto sobre la producción del biofilm formado por *Acinetobacter baumannii* MDR.

#### Primera etapa:

Colistina a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Segunda etapa:** Las combinaciones de antimicrobianos a evaluar, serán:

1. colistina + meropenem,
2. colistina + rifampicina,
3. colistina + tigeciclina,
4. Monoterapia con tigeciclina



Para cada uno de los antimicrobianos a evaluar se calculara y pesara la cantidad de sal pura necesaria para realizar las diluciones (**cuadro 1**), dicha cantidad fue expresada en mg, utilizando la siguiente formula.

$$\text{Peso mg} = \frac{(\text{volumen/ml})(\text{concentración mcg/ml})}{\text{Potencia -g/mg}}$$

Dónde:

Volumen=volumen final de la dilución del antimicrobiano (siempre 8 ml)

Concentración=la concentración inicial a partir de la cual se comenzaron las diluciones para la prueba

Potencia=la potencia del quimioterapéutico proporcionada por el fabricante (Sigma-Aldrich) (Colistina, sulfato C4461-100mg)

**Cuadro 1. Listado de quimioterapéuticos, potencia y peso utilizados en la prueba de MIC**

Antimicrobiano	Potencia (UI/mg)	Peso (mg)
Colistina, sulfato	>1500 UI/mg	50 mg/ml
Meropenem	99.9 %	100 mg/ml
Rifampicina	99.9 %	80 µg/ml
Tigeciclina	99.9 %	100 mg/ml

**Cuadro 2. Listado de quimioterapéuticos y sus respectivos disolventes y diluyentes**

Antimicrobiano	Disolvente	Diluyente
Colistina	Agua destilada desionizada	Agua destilada desionizada
Meropenem	Agua destilada desionizada	Agua destilada desionizada
Rifampicina	Agua destilada desionizada	Agua destilada desionizada
Tigeciclina	Agua destilada desionizada	Agua destilada desionizada

### Concentración farmacológica a evaluar

Para la evaluación inicial, se utilizara una dosis fija de 2 µg/ml de colistina, la cual será la misma dosis, para los grupos de intervención 1, 2 y 3 (**figura 1**).

Para el grupo 1, se utilizará la combinación colistina a dosis fija de 2 µg/ml + meropenem, el cual será evaluado a 2 diluciones, a 2 µg/ml y 4 µg/ml.

Para el grupo 2, se utilizará la combinación colistina a dosis fija de 2 µg/ml + rifampicina, la cual será evaluada a 2 diluciones, a 2 µg/ml y 4 µg/ml.

Para el grupo 3, se utilizará la combinación colistina a dosis fija de 2 µg/ml + tigeciclina, la cual será evaluada a 1 dilución fija de 1 µg/ml.

Para el grupo 4, se utilizará la monoterapia con tigeciclina, a una dosis fija de 1 µg/ml.

### **Producción de Biofilm en microplaca de 96 pozos (método cuantitativo)**

Se resembrarán las cepas en agar McConkey, que se mantienen almacenadas bajo congelación a - 72°C, esto con la finalidad de obtener colonias jóvenes de 12-24 horas.

Del cultivo en placa se realizará una dilución de 1:100 en el medio BHI. De cada dilución, se transferirán 100 µl a 3 pozos, para cada combinación de antimicrobianos, esto en una microplaca de poliestireno de 96 pozos de fondo en "U". De esta manera, se tendrá por triplicado cada experimento.

Se añadirán en cada triplete de pozos, cada combinación de fármaco, y se someterá a incubación a 37°C por 48 horas.

### **Evaluación del biofilm**

Una vez transcurrido este tiempo se removerán las células planctónicas mediante decantación y tres lavados sumergiendo la microplaca en agua destilada estéril. Posteriormente se adicionaron 125 µl de cristal violeta al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente. Después se removerá el excedente de colorante mediante dos lavados. A la microplaca se le agregará 200 µl de etanol al 95% durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se transferirán 125 µl de etanol y la biopelícula teñida a otra microplaca estéril de fondo plano en donde se efectuará la lectura en espectrofotómetro a una densidad óptica de OD<sub>630</sub> nm de absorbancia, con la finalidad de evidenciar la formación de biofilm.

### **Definición operacional de variables.**

Variable independiente.

- Grupo de tratamiento – Variable cualitativa, nominal – Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4.
- Dosis de tratamiento por grupo – variable cuantitativa, continua – µg/ml.

Variable dependiente.

- Formación de biofilm – producción de más de 0.059 OD<sub>360</sub> – si o no – variable cualitativa nominal.

Variable (Índice/indicador)	Tipo	Definición Operacional	Escala de medición.
Grupo de tratamiento	Cualitativa nominal	Independiente	Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4
Dosis de tratamiento	Cuantitativa discreta	Independiente	µg/ml
Formación de biofilm	Cualitativa nominal	Dependiente	Si No

### Hoja de recolección de datos.

Para la recolección de datos, se utilizarán los siguientes formatos a manera de tabla, para cada una de las etapas de intervención.

Tabla 1. Tabla de recolección de datos. Primera etapa – Colistina 2 µg/ml, producción de biofilm (media; si/no)			
Cepa	Media OD <sub>630</sub>	Producción de biofilm	Observación
667			
678			
681			
685			
701			
704			
707			
710			
713			
715			
728			
738			
739			
741			
756			
762			
764			
765			
768			
773			
783			
785			
787			
790			
806			
817			
811			
851			
858			
859			
870			
873			
892			
898			
909			
794			

**Tabla 2. Tabla de recolección de datos. Segunda etapa. Valor de media OD<sub>630</sub> por grupo y cepa, y presencia de biofilm (si = +, no = espacio en blanco).**

Cepa	Colistina 2 µg/ml	C+R 2/2 µg/ml	Producción de biofilm	C+R 2/4 µg/ml	Producción de biofilm	C+M2/2 µg/ml	Producción de biofilm	C+M2/4 µg/ml	Producción de biofilm	C+T 2/1 µg/ml	Producción de biofilm	T 1 µg/ml	Producción de biofilm
667													
678													
681													
685													
701													
704													
707													
710													
713													
715													
728													
738													
739													
741													
756													
762													
764													
765													
768													
773													
783													
785													
787													
790													
806													
817													
811													
851													
858													
859													
870													
873													
892													
898													
909													
794													

## Calendario.

<b>Cronograma.</b>		
Evento	Periodo	Tiempo dedicado semana
Obtención de información	01.03-31.03.2015	10 h
Revisión bibliografica	01.04-30.04.2015	15 h
Elaboración del protocolo	01.05-31.05.2015	15 h
Experimentación	01.07-31.07.2015	15 h
Procesamiento y analisis de datos	01.08-15.08.2015	15 h
Elaboración del informe	15.08-30.08.2015	15 h
Divulgación de resultados	01.09-15.09.2015	6 h

## Recursos humanos.

<b>Recursos humanos.</b>		
Nombre/Titulo	Actividad asignada	Horas semana dedicadas a realizar la actividad asignada
Nombre: Rodríguez Zulueta Patricia. Titulo: Investigadora principal.	Dirección de tesis.	3 h.
Nombre: Hernández Castro Rigoberto.	Dirección de tesis. Experimentación.	6 h.

Titulo: Investigador principal.		
Nombre: López Véjar César Emmanuel. Titulo: Investigador asociado principal.	Elaboración de protocolo. Experimentación. Redacción y analisis de resultados.	15 h.
Nombre: Fernández Maya Luis Enrique. Titulo: Investigador asociado.	Preparación de medios de cultivos. Siembra de cepas. Experimentación.	8 h.
Nombre: David Moncada. Titulo: Investigador asociado.	Identificación de cepas. Pruebas de susceptibilidad.	5 h.
Nombre: Carrillo Casas Erika. Titulo: Investigador asociado.	Experimentación.	2 h.

### Recursos Materiales.

Se utilizaran sales de fármacos antimicrobianos de: meropenem, colistina, tigeciclina, rifampicina.

Se utilizaran placas de poliestireno con 96 posos en "U", en filas de 8 posos, cada una desmontable: 10 placas (**fotos 1 y 2**).

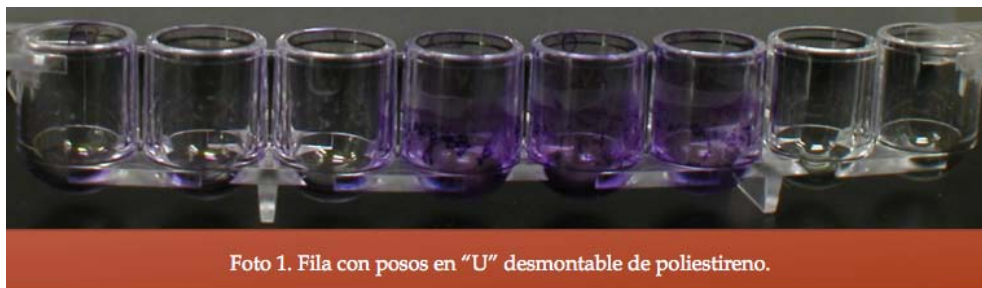


Foto 1. Fila con posos en "U" desmontable de poliestireno.

Se utilizaran placas de poliestireno con 96 posos planos, en fila de 8 posos, sin ser desmontables: 10 placas

Para la lectura de la densidad óptica, se utilizara: un espectrofotómetro.

Como reactivos serán utilizados: cristal violeta 0.1%, etanol al 95 %, agua destilada.

Como medios de cultivo, serán utilizados: placas de agar Mc Conkey, Muller-Hinton, caldo BHI.

Se utilizaran para manejo de soluciones: pipeta de 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.

Otros materiales de laboratorio: guantes esteriles, cubrebocas, mechero de Bunsen, asas calibradas, bata clínica, lentes.

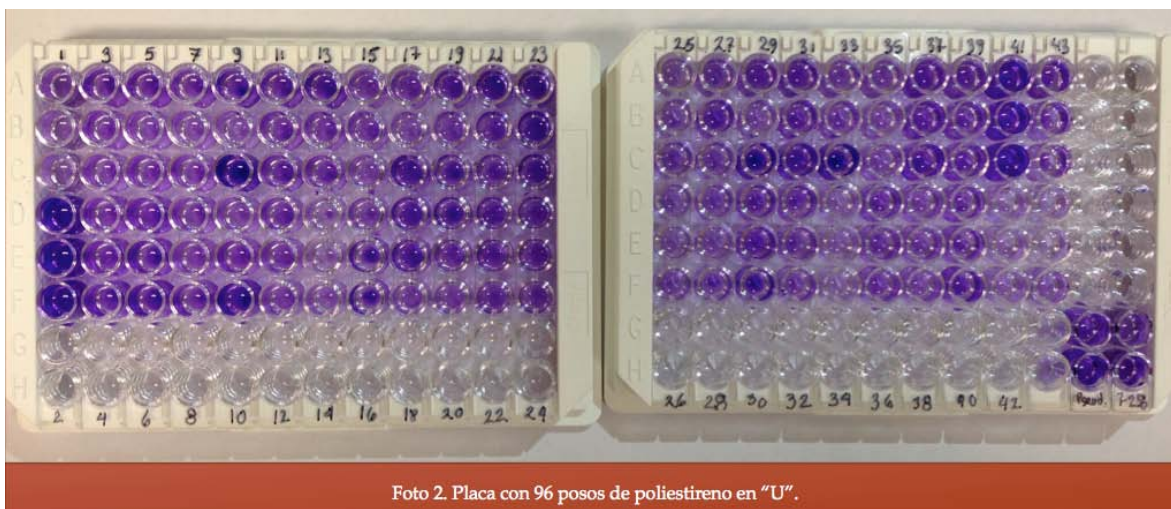


Foto 2. Placa con 96 posos de poliestireno en "U".

## 12. VALIDACIÓN DE DATOS.

### Analisis estadístico.

#### Estadística descriptiva.

Se obtendrá la media de OD<sub>630</sub> de cada prueba por cepa, realizada por triplicado. Se considerará como ausencia de producción de biofilm a mediciones de OD<sub>630</sub> inferiores a 0.059 nm. Se sumarán el número de cepas con producción de biofilm, y por medio de la prueba estadística de  $\chi^2$  se evaluará la significancia estadística general de la intervención farmacológica antimicrobiana sobre la formación de biofilm.

Para evaluar la variable cualitativa nominal (si o no) sobre la formación de biofilm, y el impacto que tiene la intervención farmacológica por grupo de tratamiento, se utilizará una prueba de regresión logística.

Se considerara significancia estadística a valores de  $p < 0.05$ .

#### Estadística inferencial.

El analisis de variables cualitativas nominales entre dos grupos, será realizado por medio de la prueba estadística de  $\chi^2$ .

El analisis de variables cualitativas nominales entre más de dos grupos, será realizado por medio de la prueba estadística de regresión logística.

Para el analisis de datos, se utilizara como paquete estadístico el sistema SPSS Statistics versión 15.

## 13. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Para la presentación de resultados, se utilizarán:

- Tablas – Mostrarán las medias obtenidas por grupo de intervención y cepa; la presencia o no de biofilm.

- Cuadros – Mostraran a forma de flujograma, el modelo seguido por etapa de intervención. análisis de datos, se utilizara como paquete estadístico el sistema SPSS Statistics versión 15.

#### **14. CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.



## 15. RESULTADOS

El estudio incluyó 36 cepas de *Acinetobacter baumannii* MDR. A todas las cepas se les evaluó la susceptibilidad a:

- 1) Meropenem, imipenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacino, amikacina mediante un sistema automatizado, MicroScan Walkaway®, todas ellas mostrando resistencia a ceftazidima, piperacilina/tazobactam, meropenem, imipenem, ciprofloxacino (Tabla 1).
- 2) Colistina por el método de Kirby-Bauer mostro a las 36 cepas como susceptibles (Figura 1).

Cepa	Meropenem MIC	Imipenem MIC	Colistina (mm)
667	32	64	14
678	>32	64	14
681	>32	64	12
685	>32	64	13
701	>32	64	14
704	32	64	14
707	>32	64	11
710	>32	64	13
713	>32	64	13
715	>32	64	14
728	>32	64	12
738	>32	64	11
739	>32	64	13
741	>32	64	12
756	32	64	13
762	>32	64	13
764	>32	64	13
765	32	64	13
768	>32	64	13
773	>32	64	11
783	>32	64	11
785	32	64	11
787	32	64	11
790	>32	64	13
806	>32	64	13
817	32	64	11
811	32	64	11
851	32	64	14
858	>32	64	11
859	32	64	13
870	>32	64	11
873	>32	64	11
892	>32	64	11
898	>32	64	13
909	32	64	11
794	>32	64	13

Todas las cepas de *A baumannii* expresaban el fenotipo biofilm (Figura 2).

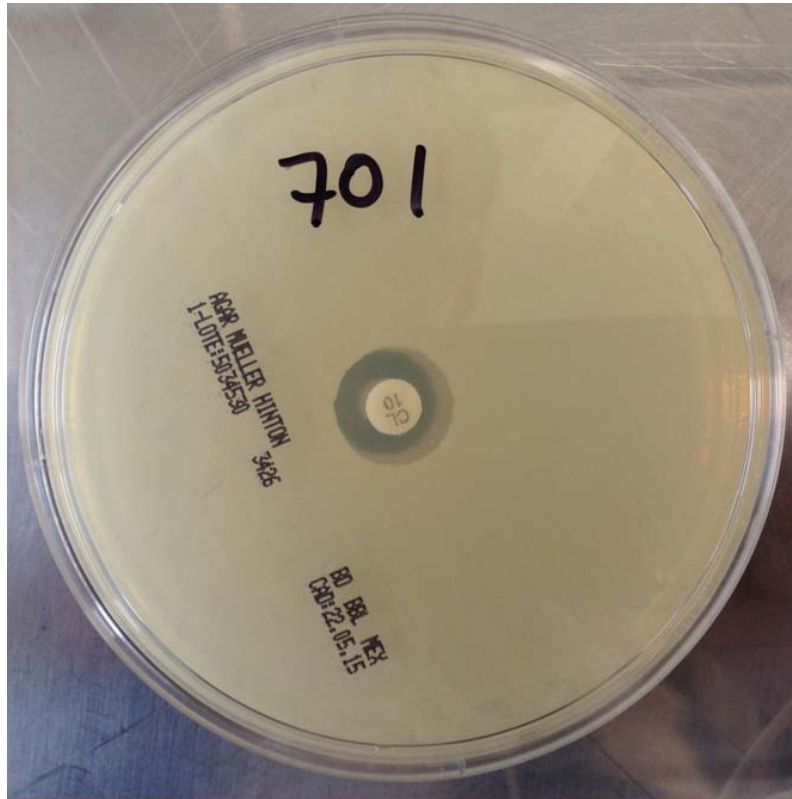


Figura 1. Susceptibilidad por método de Kirby-Bauer

A todas las cepas se les realizó detección de beta lactamasas tipo OXA 24, 51, y 58 (Tabla 2).

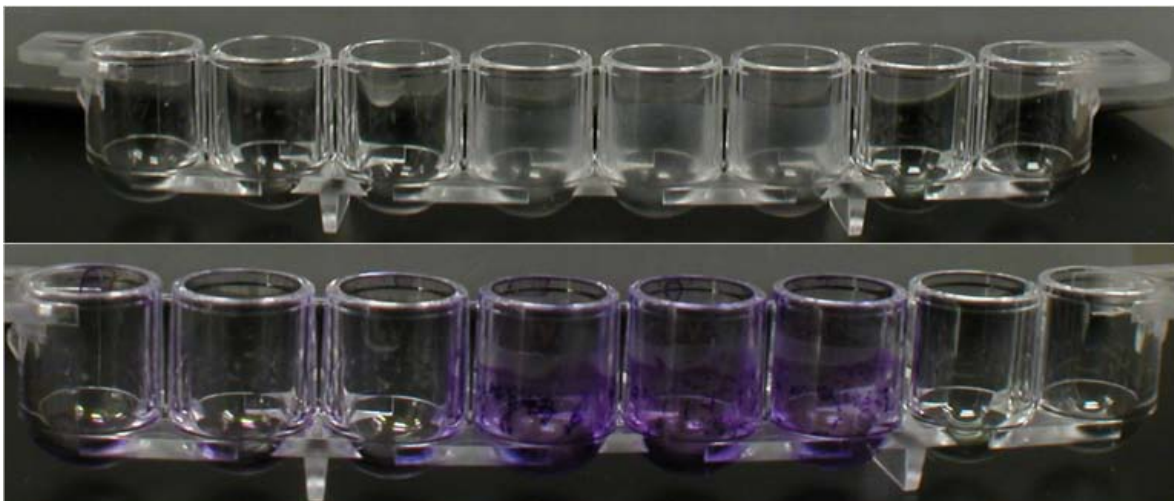
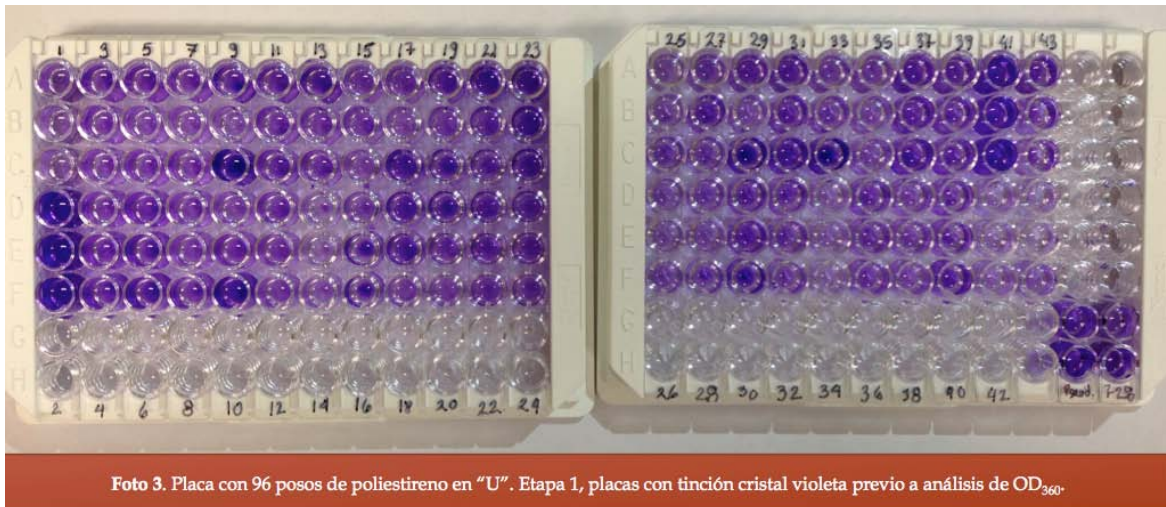


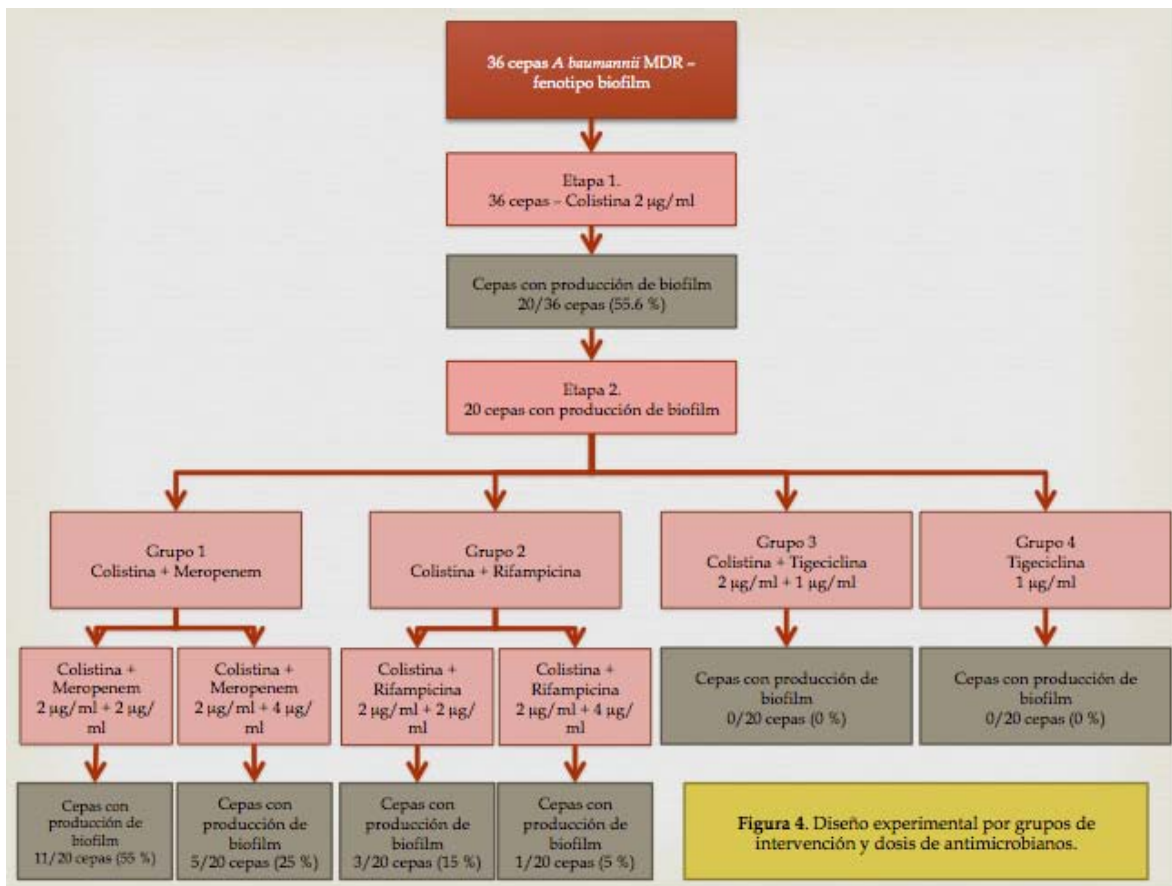
Figura 2. Fila con posos en "U" desmontable de poliestireno. A) muestra una tira de 8 posos en "U" después de 48 horas de incubación, posterior al lavado y previo a la tinción con cristal violeta. B) Muestra la misma tira posterior a la tinción con cristal violeta

<b>Tabla 2. Beta lactamasas tipo OXA</b>			
<b>Cepa</b>	<b>OXA 24</b>	<b>OXA 51</b>	<b>OXA 58</b>
667	+	+	+
678	+	+	+
681		+	+
685		+	+
701	+	+	+
704	+	+	+
707	+	+	+
710		+	
713		+	+
715		+	+
728	+	+	+
738	+	+	+
739		+	+
741	+	+	+
756	+	+	+
762	+	+	+
764	+	+	+
765	+	+	+
768	+	+	+
773	+	+	+
783	+	+	+
785	+	+	+
787	+	+	+
790	+	+	+
806	+	+	+
817	+	+	+
811	+	+	+
851	+	+	+
858	+	+	+
859	+	+	+
870	+	+	+
873	+	+	+
892	+	+	+
898	+	+	+
909	+	+	+
794	+	+	+

En la primer etapa, las 36 cepas fueron retadas a una dosis fija de 2 µg/ml de colistina como monoterapia, para evaluar la producción o no de biofilm, analizado por densidad óptica a 630 nm (OD<sub>630</sub>) (Figura 3).

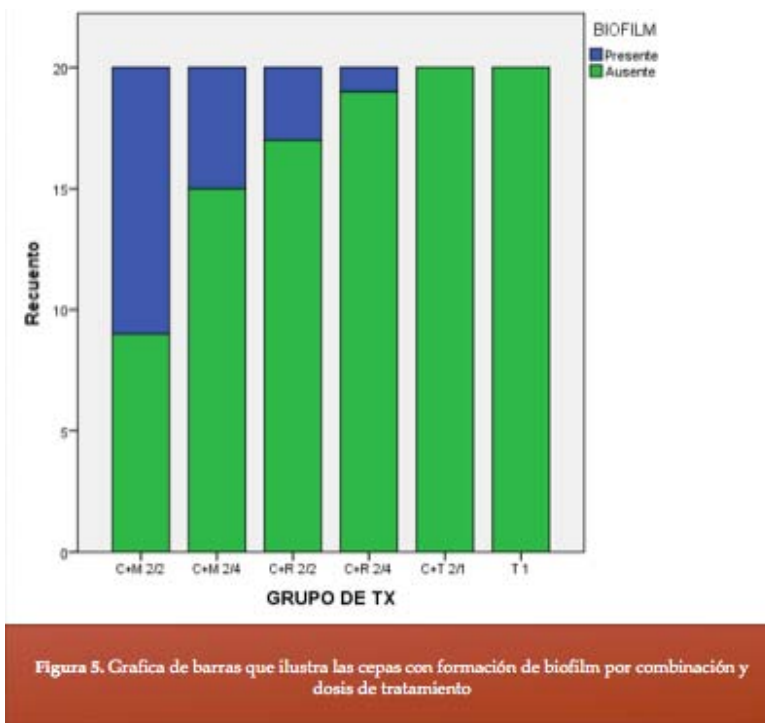


Se encontró que a esta dosis, la monoterapia con colistina impedía la formación de biofilm en 16 cepas (44.4 %), permaneciendo como productoras de biofilm 20 cepas (55.6 %) (Tabla 3), las cuales fueron evaluadas en la segunda etapa (Figura 4).



<b>Tabla 3. Experimento grupo 1. OD<sub>630</sub> Colistina monoterapia</b>			
<b>Cepa</b>	<b>Media</b>	<b>Biopelícula (%)</b>	<b>Producción de biofilm</b>
667	0.069	18.5	Si
678	0.096	170.3	Si
681	0.068	11.1	Si
685	0.088	122.2	Si
701	0.069	18.5	Si
704	0.075	50	Si
707	0.059	0	No
710	0.07	22.2	Si
713	0.068	14.8	Si
715	0.082	92.5	Si
728	0.059	0	No
738	0.059	0	No
739	0.074	46.2	Si
741	0.059	0	No
756	0.068	12.9	Si
762	0.072	35.1	Si
764	0.070	25.9	Si
765	0.076	59.2	Si
768	0.067	7.4	Si
773	0.055	0	No
783	0.056	0	No
785	0.059	0	No
787	0.059	0	No
790	0.073	38.8	Si
806	0.070	25.9	Si
817	0.059	0	No
811	0.057	0	No
851	0.058	0	No
858	0.059	0	No
859	0.076	57	Si
870	0.059	0	No
873	0.059	0	No
892	0.059	0	No
898	0.100	190	Si
909	0.052	0	No
794	0.069	18.5	Si

Se mostró que para el grupo 1, combinación colistina + meropenem a dosis de 2 µg/ml/2 µg/ml, 11 de 20 cepas (55 %) continuaron produciendo biofilm, y a dosis de 2 µg/ml/4 µg/ml en 5 de 20 cepas (25 %); para el grupo 2, combinación colistina + rifampicina a dosis de 2 µg/ml/2 µg/ml, 3 de 20 cepas (15 %) continuaron produciendo biofilm, y a dosis de 2 µg/ml/4 µg/ml en 1 de 20 cepas (5 %); para el grupo 3, combinación colistina + tigeciclina a dosis de 2 µg/ml/1 µg/ml, ninguna cepa (0 %) produjo biofilm; y para el grupo 4, monoterapia con tigeciclina a dosis de 1 µg/ml, también, se encontró que ninguna cepas (0 %) produjo biofilm (Tabla 4 y Figura 5 y 6).



Cepa	Colistina 2 µg/ml	C+R 2/2 µg/ml	Producción de biofilm	C+R 2/4 µg/ml	Producción de biofilm	C+M2/2 µg/ml	Producción de biofilm	C+M2/4 µg/ml	Producción de biofilm	C+T 2/1 µg/ml	Producción de biofilm	T 1 µg/ml	Producción de biofilm
667	0.069	0.050		0.048		0.067	+	0.067	+	0.049		0.053	
678	0.096	0.052		0.053		0.066	+	0.060	+	0.051		0.051	
681	0.068	0.051		0.048		0.077	+	0.066	+	0.047		0.054	
685	0.088	0.063	+	0.050		0.057		0.056		0.051		0.051	
701	0.069	0.052		0.052		0.068	+	0.059		0.053		0.050	
704	0.075	0.050		0.042		0.052		0.051		0.044		0.045	
710	0.070	0.054		0.050		0.065	+	0.059		0.052		0.055	
713	0.068	0.050		0.048		0.067	+	0.049		0.048		0.056	
715	0.082	0.050		0.047		0.052		0.050		0.05		0.053	
739	0.074	0.055		0.055		0.059		0.057		0.048		0.055	
756	0.068	0.055		0.057		0.086	+	0.068	+	0.046		0.048	
762	0.072	0.054		0.053		0.070	+	0.058		0.05		0.052	
764	0.070	0.061	+	0.064		0.074	+	0.054		0.046		0.048	
765	0.076	0.070	+	0.071	+	0.066	+	0.060	+	0.047		0.054	
768	0.067	0.047		0.051		0.062	+	0.051		0.046		0.051	
790	0.073	0.056		0.053		0.059		0.053		0.055		0.056	
806	0.070	0.054		0.053		0.057		0.047		0.048		0.051	
859	0.076	0.047		0.045		0.052		0.050		0.045		0.051	
898	0.100	0.056		0.055		0.057		0.056		0.043		0.049	
794	0.069	0.056		0.055		0.059		0.052		0.046		0.051	

Al evaluarse los resultados, se encontró que la intervención farmacológica tiene impacto en la formación de biofilm ( $p < 0.0001$ ), y acorde a la prueba estadística de regresión logística, se encontró que las combinaciones de fármacos en los grupos 2, 3 y 4, tienen una alta eficacia en la formación de biofilm, estos resultados con significancia estadística (Tabla 5).

Tratamiento	No cepas sin biofilm	Valor de p	OR (IC 95 %)
C + Mer 2/2 µg/ml	9	> 0.05	
C + Mer 2/4 µg/ml	15	0.058	0.273 (0.071, 1.043)
C + Rif 2/2 µg/ml	17	0.012	0.144 (0.032, 0.654)
C + Rif 2/4 µg/ml	19	0.005	0.043 (0.005, 0.387)
C + Tig 2/1 µg/ml	20	< 0.0001	
Tig 1 µg/ml	20	< 0.0001	

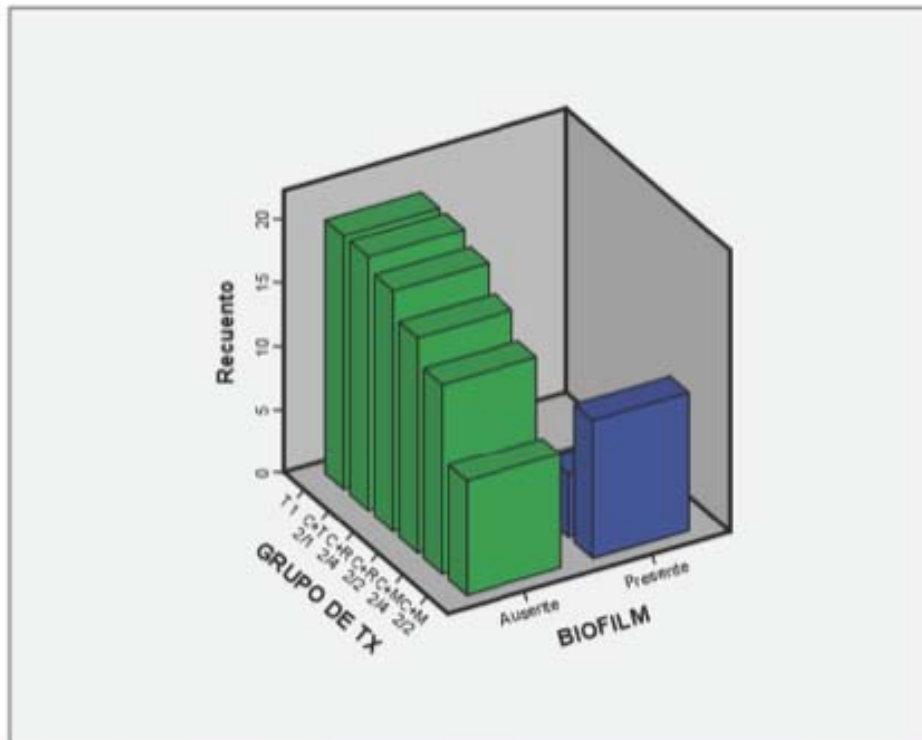


Figura 6. Grafica que ilustra en 3D las cepas con y sin formación de biofilm por combinación y dosis de tratamiento

## 16. DISCUSIÓN.

Las infecciones por *A baumannii* son comunes dentro del ámbito nosocomial, no siendo la excepción nuestro Hospital. El incremento en la incidencia de infecciones por cepas de *P aeruginosa*, algunas enterobacterias (*K pneumoniae*, *E coli*), y *A baumannii*, con perfil de MDR ha tenido un impacto clínico a nivel global, forzando la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos, la utilización de algunos anteriormente poco usados, o combinaciones de varios de ellos.

Además de la alza de cepas con mecanismos de resistencia a antimicrobianos, la virulencia de cada agente en particular, otorga variantes a la respuesta terapéutica, colonización, y recidivas. Tal es el caso de la infecciones causadas por *A baumannii* productor de biofilm, que en nuestra unidad, ocupa un importante lugar en la generación de infecciones nosocomiales, sobre todo en aquellas relacionadas a dispositivos médicos con grados de respuesta variable a la terapéutica antimicrobiana **(1, 5, 17)**.

Se ha promulgado por algunos autores, el uso de la combinación de colistina más carbapenémicos, como el regimen terapéutico más empleado para el tratamiento de infecciones por cepas de *A baumannii* MDR **(1, 5, 17)**. En nuestro hospital hemos encontrado una respuesta variable con la combinación de carbapenémicos más colistina a dosis terapéuticas, producto de lo cual hace interesante los resultados de nuestro estudio y otros más, sobre la superioridad de otros regímenes que no incluyen carbapenémicos, sobre la producción del biofilm y el biofilm ya formado.

En nuestro estudio se incubó una suspensión estándar de *A baumannii* junto con el régimen antimicrobiano preestablecido. Se ha descrito en la literatura, que la mayor parte de cepas de *A baumannii*, forman biofilm dentro de las primeras 24-48 horas de incubación **(83)**. Lo anterior pone de manifiesto la importancia del inicio de una terapéutica efectiva y temprana.

Respecto a lo anterior, en el estudio de Joon Young Song **(17)**, se analiza la adición del antimicrobiano posterior a la formación del biofilm de *A baumannii* MDR, encontrando respuestas favorables con el uso de tigeciclina, y los regímenes que incluían rifampicina en sus combinaciones con imipenem y colistina. Datos similares fueron obtenidos en nuestro estudio, en donde la terapia combinada con colistina más rifampicina y colistina más tigeciclina muestran buen efecto antibiofilm. Y al igual que el estudio Joon Young Song **(17)**, encontramos que por si sola, la monoterapia con colistina no es suficiente para erradicar la formación de biofilm en todas las cepas de *A baumannii* MDR de manera in vitro.

El estudio de Joon Young Song **(17)**, es uno de los ensayos pioneros dirigidos a comparar la actividad anti-biofilm de varios regímenes antimicrobianos en cepas de *A baumannii* MDR. En este encontraron resultados concordantes a los nuestros con el uso de tigeciclina, poniéndola como un fármaco atractivo dentro de la estrategia antibiofilm.

Otro punto importante a aclarar sobre de nuestro estudio, respecto a la monoterapia de tigeciclina, es que esta alta efectividad fue encontrada en cepas de *A baumannii* con presencia de beta-lactamasas tipo OXA 24,51 y 58 como mecanismos de resistencia comprobados, y aun no queda claro el efecto ante otras cepas con mecanismos de resistencia distintos.



Se considera que aun faltan más estudios que soporten nuestros hallazgos, y como perspectiva a futuro, estos puedan ser sometidos a ensayos en modelos animales y humanos para determinar el efecto de estos regímenes in vivo.

## **17. CONCLUSIONES.**

La terapia combinada que incluye colistina más tigeciclina, se mostró como la más efectiva para evitar la formación del biofilm de *A baumannii* MDR in vitro en nuestro estudio. La monoterapia con tigeciclina se mostró tan efectiva como su combinación con colistina, no obstante, no recomendamos el uso de tigeciclina como monoterapia en la práctica clínica. La respuesta obtenida en los grupos que usaron combinación de colistina más meropenem y rifampicina, mostraron un efecto dosis dependiente a favor de mayores dosis de carbapenémico y rifampicina. Se requieren estudios que evalúen el impacto clínico de estos hallazgos en modelos in vivo.

## 18. BIBLIOGRAFÍA.

1. Rodney M. Donlan and J. William Costerton. 2002. **Biofilms: Survival Mechanism of Clinically Relevant Microorganisms**. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15 (2): 167
2. Costerton, J. W., G. G. Geesey, and G. K. Cheng. 1978. **How bacteria stick**. *Sci. Am.* 238:86–95.
3. Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. *Science* 284:1318–1322.
4. Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. **Bacterial biofilms in nature and disease**. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435–464.
5. Costerton, J. W., and H. M. Lappin-Scott. 1995. Introduction to microbial biofilms, p. 1–11. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), **Microbial biofilms**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
6. Davies, D. G., and G. G. Geesey. 1995. **Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture**. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:860–867
7. Characklis, W. G., and K. C. Marshall (ed.). 1990. **Biofilms**. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
8. Characklis, W. G., and K. C. Marshall. 1990. **Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach**, p. 3–15. In W. G. Characklis and K. C. Marshall (ed.), **Biofilms**. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
9. Raad, I., W. Costerton, U. Sabharwal, M. Sacilowski, W. Anaissie, and G. P. Bodey. 1993. **Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement**. *J. Infect. Dis.* 168:400–407.
10. Stickler, D., N. Morris, M.-C. Moreno, and N. Sabbuba. 1998. **Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters**. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:649–652.
11. Ferguson, D. J. P., A. A. McColm, D. M. Ryan, and P. Acred. 1986. **A morphological study of experimental staphylococcal endocarditis and aortitis**. II. Interrelationship of bacteria, vegetation and cardiovascularity in established infections. *Br. J. Exp. Pathol.* 67:679–686.
12. Nickel, J. C., and J. W. Costerton. 1992. **Coagulase-negative staphylococcus in chronic prostatitis**. *J. Urol.* 147:398–401.
13. Bloemberg, G. V., G. A. O’Toole, B. J. J. Lugtenberg, and R. Kolter. 1997. **Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp.** *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4543–4551.
14. Anton Y Peleg, Harald Seifert, David L Paterson, **Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen**. *Clinical Microbiology Review*, July 2008, p. 538-582.
15. Rossau, R., A. van Landschoot, M. Gillis, and J. de Ley. 1991. **Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms**. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:310–319.
16. Giles et al. **Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii***. *BMC Microbiology* (2015) 15:116
17. Joon Young Song, Hee Jin Cheong, Ji Yun Noh, and Woo Joo Kim. **In vitro Comparison of Anti-Biofilm Effects against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Imipenem, Colistin, Tigecycline, Rifampicin and Combinations**. *Infect Chemother* 2015;47(1):27-32
18. Durante-Mangoni, E., Signoriello, G., Andini, R., Mattei, A., De Cristoforo, M., Murino P., et al. (2013). **Colistina and Rifampicina compared with colistin alone for the treatment of serious infection due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter, randomized clinical trial**. *Clin. Infect. Dis.* 57, 349–358.
19. Chuang Y C., et al. (2014). **Effectiveness of tigecycline-based versus colistin-based therapy for the treatment of pneumonia caused by multi-drug resistant *A baumannii* in a critical setting: a matched cohort analysis**. *BMC Infect. Dis.* 14:102.
20. Zusman, et al. 2013. **Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems**. *Antimicrob Chemother.* 57, 5104-5111.
21. Ning, et al. 2014. **A combination regimen of meropenem, cefoperazone-sulbactam and minocycline for extensive burns with pan-drug resistant *A baumannii* infection**. *Chin Med J.* 127, 1177-1179.
22. Dinc, et al. 2013. **Efficacy of sulbactam and its combination with imipenem, colistin and tigecycline in an experimental model of carbapenem-resistant *A baumannii* sepsis**. *Chemotherapy.* 59, 325-329.
23. Pachon-Ibanez, et al. 2010. **Efficacy of rifampicin and its combination with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *A baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 1165-1172.
24. Fournier, P. E., et al. 2006. **Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii***. *PLoS Genet.* 2:e7
25. Bou, G., et al. 2000. **Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases**. *J. Clin. Microbiol.* 38:3299–3305.

26. Fernandez-Cuenca, F., et al. 2003. **Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii***. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:565–574.
27. Quale, J., et al. 2003. **Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City**. *Clin. Infect. Dis.* 37:214–220.
28. Li, J., et al. 2006. **Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections**. *Lancet Infect. Dis.* 6:589–601
29. Higgins, P. G., et al. 2004. **Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii***. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:821–823.
30. Magnet, S., et al. 2001. **Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3375–3380.
31. Quale, J., et al. 2003. **Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City**. *Clin. Infect. Dis.* 37:214–220.
32. Siroy, A., et al. 2006. **Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain**. *J. Proteome Res.* 5:3385–3398.
33. Doi, Y., et al. 2007. **Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4209–4210.
34. Lee, H., et al. 2006. **Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea**. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56:305–312.
35. Yamane, K., et al. 2005. **Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes**. *Emerg. Infect. Dis.* 11:951–953.
36. Ribera, A., et al. 2002. **Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates**. *J. Antimicrob. Chemother.* 49:697–698.
37. Higgins, P. G., et al. 2004. **Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii***. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:821–823.
38. Fluit, A. C., et al. 2005. **Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1636–1638.
39. Ruzin, A., et al. 2007. ***AdeABC* multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex**. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:1001–1004.
40. Gales, A. C., et al. 2006. **Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54,731 clinical isolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004)**. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:315–321.
41. Li, J., et al. 2006. **Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2946–2950.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. **M7-A7. Dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. CLSI, Wayne, PA
43. Unal, S., et al. 2005. **Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004**. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53:265–271.
44. Gaynes, R., and J. R. Edwards. 2005. **Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli**. *Clin. Infect. Dis.* 41:848–854.
45. Garnacho-Montero, J., et al. 2005. ***Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings**. *Intensive Care Med.* 31: 649–655.
46. Wisplinghoff, H., et al. 2004. **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study**. *Clin. Infect. Dis.* 39:309–317.
47. Brauers, J., et al. 2005. **Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains**. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:24–30
48. Corbella, X., et al. 1998. **Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii***. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:793–802.
49. Williams, J. D. 1997. **Lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone**. *Clin. Infect. Dis.* 24:494–497.
50. Noguchi, J. K., and M. A. Gill. 1988. **Sulbactam: a beta-lactamase inhibitor**. *Clin. Pharm.* 7:37–51.
51. Obana, Y., and T. Nishino. 1990. **In-vitro and in-vivo activities of sulbactam and YTR830H against *Acinetobacter calcoaceticus***. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:677–682.

52. Rodriguez-Hernandez, M. J., et al. 2001. **Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains.** J. Antimicrob. Chemother. 47: 479–482.
53. Urban, C., et al. 1993. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. J. Infect. Dis. 167:448–451.
54. Jellison, T. K., P. S. McKinnon, and M. J. Rybak. 2001. **Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam.** Pharmacotherapy 21:142–148.
55. Smolyakov, R., et al. 2003. **Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment.** J. Hosp. Infect. 54:32–38.
56. Wolff, M., M. L. Joly-Guillou, R. Farinotti, and C. Carbon. 1999. **In vivo efficacies of combinations of beta-lactams, beta-lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model.** Antimicrob. Agents Chemother. 43:1406–1411.
57. Jellison, T. K., et al. 2001. **Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam.** Pharmacotherapy 21:142–148.
58. Gales, A. C., et al. 2006. **Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54,731 clinical isolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004).** Clin. Microbiol. Infect. 12:315–321.
59. Owen, R. J., et al. 2007. **In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates.** J. Antimicrob. Chemother. 59:473–477.
60. Pantopoulou, A., et al. 2007. **Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin.** Int. J. Antimicrob. Agents 29:51–55.
61. Falagas, M. E., et al. 2006. **Effectiveness and nephrotoxicity of intravenous colistin for treatment of patients with infections due to polymyxin-only-susceptible (POS) gram-negative bacteria.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25:596–599.
62. Garnacho-Montero, J., et al. 2003. **Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP.** Clin. Infect. Dis. 36:1111–1118.
63. 83 Wroblewska MM, et al. **Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals.** FEMS Immunol Med Microbiol 2008;53:140-4.

