

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA COMBINACIÓN DE ACOLISTÍN CON DIFERENTES ANTIBIÓTICOS CONTRA CEPAS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN ALGUNOS HOSPITALES DE CHILE

René Guillermo Santos Herrera
Investigación realizada en Concepción-Chile, 2013

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología, UEES

CONTENIDO	
RESUMEN	III- RESULTADOS
INTRODUCCIÓN	IV- DISCUSIÓN
I- RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	V- CONCLUSIONES
II- METODOLOGÍA	VI- PROYECCIONES
1. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y MATERIALES	VII- FUENTES CONSULTADAS
1.A HIPÓTESIS	ANEXOS
1.B OBJETIVO GENERAL	
1.C OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
2. MATERIALES Y MÉTODOS	

RESUMEN

El aumento de cepas bacterianas patógenas resistentes a la mayoría de los antibióticos, incluyendo carbapenémicos, ha generado la necesidad de buscar alternativas de nuevos protocolos de tratamientos. Las bacterias Gram negativas multirresistentes representan un verdadero reto clínico, sobre todo en infecciones de origen intrahospitalario, debido a la alta mortalidad asociada. Entre estos microorganismos multirresistentes se encuentran *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*, de difícil tratamiento por el grado de resistencia mostrado ante los diferentes protocolos terapéuticos establecidos, determinado por diversos mecanismos de resistencia. Debido al surgimiento de resistencia a carbapenémicos en estas bacterias, quedan muy pocas opciones terapéuticas, por lo que se ha recurrido al uso de antibióticos antiguos que mostraron eficacia contra estos patógenos, pero con limitaciones de actividad y toxicidad, descontinuados por la falta de evidencia clínica respecto a sus efectos secundarios y sólo recuperados nuevamente en la actualidad. Uno de estos antibióticos es colistín, un fármaco que surgió en los años cincuenta para ser utilizado contra bacterias Gram negativas y, actualmente, de uso restringido para infecciones intrahospitalarias multirresistentes. En la actualidad se carece de estudios modernos sobre farmacocinética y farmacodinamia de este agente y la experiencia actual se basa, fundamentalmente, en experiencias clínicas con resultados poco concluyentes respecto a modo de uso, efectividad y toxicidad, lo que genera controversia respecto a la utilidad de la combinación con otros antibióticos para lograr mayor efectividad.

Se plantea el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de colistín, para determinar si se produce o no efecto sinérgico entre las diferentes combinaciones ensayadas.

Para esto se estudiaron 44 cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos y 48 cepas de *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), resistentes a diferentes antibióticos y no relacionadas genéticamente, provenientes de hospitales de Chile. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de colistín, ampicilina /sulbactam, vancomicina, tigeciclina, rifampicina e imipenem, por el método de microdilución; posteriormente, mediante el método de tablero de ajedrez, se estudió el efecto producido al asociar colistín con cada uno de estos antimicrobianos. Además, en cepas seleccionadas de acuerdo a su multiresistencia, y sobre las que diferentes combinaciones actuaron en forma sinérgica, se estudió la cinética de muerte en el tiempo, empleando los correspondientes antibióticos combinados con colistín. Se encontraron cepas bacterianas con diferentes grados de resistencia a los distintos antibióticos ensayados. Se detectó, mayormente, efecto sinérgico al asociar colistín con los distintos antibacterianos y, además, una muerte

bacteriana en menor tiempo al utilizar la asociación. Sin embargo, tanto para *K. pneumoniae* como para *A. baumannii* las diferentes combinaciones presentaron recrecimiento a las 24 horas, salvo la combinación de tigeciclina con colistín en *A. baumannii*, que continuó sin crecimiento después de 24 horas, pero en este caso la cepa era susceptible a tigeciclina. Se concluye que la sinergia es el efecto más frecuente que se produce al combinar colistín con otros antibacterianos, especialmente en *A. baumannii*, y que lleva a muerte bacteriana antes de las 12 h, con un posterior recrecimiento.

INTRODUCCIÓN

Al descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, que marcó el auge de la era antibiótica, le siguió un gran número de nuevas moléculas naturales y sintéticas que revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas, proporcionándole a los pacientes, con cuadros clínicos ocasionados por bacterias, una mejor perspectiva de tratamiento.

Con el posterior apogeo en el uso de los antibióticos en medicina, surgió el fenómeno de resistencia a los diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de las infecciones y, en la medida que más y mejores antibióticos surgían, también los microorganismos fueron mostrando mayores niveles de resistencia, generados por una diversidad de mecanismos con los que cuentan las bacterias para superar el efecto de los antimicrobianos. Muchos de estos mecanismos han aparecido como parte del proceso evolutivo de las diferentes especies bacterianas, pero también pueden ser adquiridos de forma horizontal a través de procesos de transferencia de genes, como la conjugación, transformación y transducción (Fernández *et al.*, 2003; Diomedi, 2005; Hernández *et al.*, 2010).

La resistencia bacteriana no es un fenómeno nuevo. Muchos microorganismos han sobrevivido a condiciones adversas ambientales y a la exposición a elementos tóxicos a través de la expresión de mecanismos de resistencia. Estos mecanismos permiten la selección de poblaciones bacterianas resistentes mejor adaptadas al ambiente. Cuando un agente infeccioso es expuesto de manera frecuente a los diversos antibióticos, se van seleccionando subpoblaciones resistentes, fenómeno implícito en la utilización clínica de antibióticos. El ambiente hospitalario ejerce una mayor presión selectiva sobre los microorganismos, lo que genera una mayor demanda de opciones terapéuticas, sobre todo para agentes Gram negativos (Alpuche, 2002; Livermore, 2004; Lisazo *et al.*, 2008).

I. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El concepto de multiresistencia a antimicrobianos está definido por el espectro de antibióticos para los cuales las bacterias muestran disminución en la susceptibilidad. Sin embargo, existen diversos criterios que definen la diferencia entre las tres categorías de resistencia: multiresistencia (MDR), resistencia extendida (XDR) y panresistencia (PDR). En el consenso de *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) y de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) se definió MDR como susceptibilidad disminuida a, por lo menos, un agente de al menos tres categorías diferentes de antimicrobianos considerados para uso empírico en infecciones por el microorganismo en estudio. Por su parte, XDR se refiere a susceptibilidad disminuida a uno o más agentes en todas las categorías, menos dos de las propuestas para tratamiento empírico, y PDR corresponde a resistencia a todos los agentes de todas las categorías propuestas, utilizando los criterios del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como puntos de corte para establecer susceptibilidad (Magiorakos *et al.*, 2012).

En la actualidad, la necesidad de nuevos antimicrobianos se presenta en infecciones originadas en ambientes hospitalarios, donde un pequeño, pero cada vez más en aumento, número de microorganismos presenta resistencia extendida y panresistencia a los antibióticos de uso clínico, lo que genera una verdadera emergencia de salud pública. Dentro de estos microorganismos, las bacterias Gram negativas no fermentadoras, como *Acinetobacter baumannii* y enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, se presentan como parte de las principales causas de infecciones asociadas a la atención en salud por agentes multirresistentes (Livermore, 2004).

Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS)

Se define las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud como: “todo proceso infeccioso general o localizado que ocurre como consecuencia de la atención de salud y que no estaba presente ni incubándose al momento de hospitalizarse” (MINSAL, 2010). Se estima que para Chile, 3% de las IAAS deriva en muerte de pacientes, y en servicios de Cuidados Intensivos esta cifra se eleva a 20%. El costo de atención de pacientes con IAAS es cuatro veces mayor que el de aquellos con enfermedades similares, pero sin IAAS (Subsecretaría de Redes Asistenciales, 2011).

Dentro de los microorganismos predominantemente implicados en IAAS se encuentran *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, los cuales pertenecen a los microorganismos incluidos dentro del grupo ESKAPE, acrónimo que se refiere a *Enterococcus faecium* (VRE), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *A. baumannii*, *Pseudomo-*

nas aeruginosa y *Enterobacter* spp. (Rice, 2008; Boucher *et al*, 2009; Lisboa y Nagel, 2011). Estos comparten una prevalencia creciente, debido a que las prácticas de uso de antibióticos ejercen una presión selectiva sobre estos microorganismos, principalmente en los protocolos de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) donde el 70 % de los pacientes presenta infecciones por agentes multirresistentes (Lisboa y Nagel, 2011).

En estos pacientes las infecciones resultan, particularmente, de difícil tratamiento, ya que su compromiso fisiológico, ocasionado por la enfermedad asociada a su ingreso, deriva en una menor respuesta inmunológica. Así también, el nivel de resistencia a los antimicrobianos que estos microorganismos puedan presentar contribuye a elevar la morbilidad y mortalidad asociada a estas infecciones. *K. pneumoniae*, junto con *P. aeruginosa* y *E. coli*, son los tres agentes infecciosos más frecuentemente aislados en infecciones intrahospitalarias, tanto de los servicios de Cirugía como Medicina Interna, y es la primera causa de infecciones del tracto urinario de origen nosocomial en paciente crítico. Por su parte, *A. baumannii* es la primera causa de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) en pacientes adultos y neonatos con 30 % y 44 % del total de casos, respectivamente, según cifras del Informe de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias del Ministerio de Salud de Chile para del año 2007.

Acinetobacter baumannii, problema creciente de resistencia antimicrobiana.

El género *Acinetobacter*, descubierto en el año de 1911 por el microbiólogo holandés Martinus Willem Beijerinck, corresponde a bacterias Gram negativas, no fermentadoras, oxidasa negativo y aerobio estricto, cuyo hábitat natural es la tierra y agua, y también ha sido aislado de alimentos y artrópodos. En los humanos, coloniza piel, heridas, tracto respiratorio y gastrointestinal. Algunas cepas resisten la desecación, lo que favorece su transmisibilidad entre pacientes hospitalizados (Muñoz-Price y Weinstein, 2008). Rápidamente se identificó este agente como patógeno hospitalario importante que, sin embargo, hasta la década de 1980 fue tratado fácilmente con antibióticos, ya que resultaba susceptible a la mayoría de medicamentos disponibles (Camp y Tatum, 2010).

Sin embargo, reportes cada vez más frecuentes de casos de infecciones por *A. baumannii* resistentes a uno o más antibióticos han posicionado a este patógeno como uno de los principales agentes bacterianos asociados a infecciones intrahospitalarias por microorganismos multirresistentes (Hernández Torres *et al.*, 2010).

Las infecciones provocadas por cepas multirresistentes de *Acinetobacter* prolongan la estancia hospitalaria en UCI en 6 días y la estancia global en 18 días, con respecto a pacientes sin infección por *A. baumannii* (Sunenshine *et al.*, 2007).

De estas infecciones intrahospitalarias graves provocadas por *A. baumannii*, las más frecuentes son la NAVM y las bacteriemias primarias, ambas asociadas a una mortalidad de hasta 50 % (Hernández Torres *et al.*, 2010).

Este microorganismo exhibe una amplia gama de mecanismos de resistencia. Aparte de la resistencia intrínseca asociada a la baja permeabilidad a algunas moléculas de antibióticos, también puede presentar otros mecanismos como bombas de expulsión y la adquisición de elementos genéticos como islas de resistencia, las cuales pueden contener más de 45 genes de resistencia o secuencias de inserción que pueden contribuir a la expresión de genes cromosomales para enzimas inactivantes, como los genes *bla*_{ADC} y *bla*_{OXA-51} que codifican una cefalosporinasa cromosomal y una carbapenemasa respectivamente (Neonakis *et al.*, 2011; Villa y Pachon, 2011).

Las IAAS ocasionadas por *A. baumannii* han adquirido notoriedad en años recientes, sobre todo debido a la capacidad que tiene este microorganismo de expresar patrones de resistencia que incluyen a la mayoría de los antibióticos conocidos, reduciendo cada vez más las posibilidades terapéuticas. Dentro del armamento que le confiere resistencia a una gran variedad de antibióticos está el poseer un número alto de β -lactamasas, que incluyen TEM-1, SHV y CTX-M, que inactivan penicilinas y cefalosporinas (Pino *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2007). Además, metalo- β -lactamasas como VIM e IMP, las cuales hidrolizan un elevado número de antibióticos betalactámicos, incluyendo carbapenémicos. Sin embargo, las β -lactamasas más frecuentemente encontradas en este agente microbiano son las oxacilinasas con actividad de carbapenemasas las cuales, en su mayoría, son específicas de especie (Garnacho-Montero *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010; Hernández Torres *et al.*, 2010).

Las carbapenemasas tipo OXA han sido descritas alrededor del mundo, incluyendo Sudamérica. Enzimas pertenecientes al subgrupo tipo OXA-58 han sido detectadas en Chile en 38 cepas de *A. baumannii* (Opazo *et al.*, resultados no publicados, 2010). Los genes *bla*OXA han sido relacionados a diferentes estructuras genéticas, principalmente secuencias de inserción, específicamente ISAb1, ISAb2, ISAb3 o ISAb18 (Opazo *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de bombas de expulsión y la modificación de sitio blanco para algunos antibióticos como el colistín son los mecanismos de resistencia más frecuentemente mostrados por *Acinetobacter* (Villa y Pachón, 2011).

En este sentido, es necesario buscar alternativas de tratamiento viables ante aquellas infecciones provocadas por *A. baumannii* multirresistente. Los tratamientos actuales se basan en el uso de carbapenémicos, tigeciclina o polimixinas como colistín (Diomed, 2005); sin embargo, cepas de *A. baumannii* resistente a estos agentes requieren de otras estrategias de tratamiento. La creación de nuevos fármacos debería ser el

mecanismo ideal, pero ante la ausencia de nuevas moléculas, el uso de combinaciones de antibióticos que permitan contrarrestar los mecanismos de resistencia exhibidos por las bacterias, se convierte en una alternativa viable para el tratamiento por *A. baumannii* multirresistente (Díaz Jimenez, 2010; Shields *et al.*, 2011; Villa y Pachón, 2011).

Klebsiella pneumoniae (infecciones y resistencia)

Las infecciones por enterobacterias representan el 50 % a nivel mundial de todas las infecciones intrahospitalarias reportadas y 80 % de las infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas (Echeverri Toro *et al.*, 2012).

Dentro de la familia Enterobacteriaceae, el género *Klebsiella* es de gran importancia debido a la frecuencia con que produce infecciones, sobre todo la especie *K. pneumoniae* la cual, desde el punto de vista clínico, es la más importante por su relación con infecciones intrahospitalarias frecuentes como: infecciones del tracto urinario, neumonía, sepsis e infecciones de tejidos blandos (Echeverri *et al.*, 2009).

K. pneumoniae es un microorganismo bien adaptado al ambiente hospitalario y puede permanecer tiempo suficiente en las manos del personal de salud, facilitando su transmisibilidad entre pacientes (Gobernado, 2005).

Las bacterias pertenecientes a la especie *K. pneumoniae* poseen una cápsula que actúa como factor de virulencia, la cual la protege de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos, inhibiendo la activación del complemento, especialmente del C3b (Vargas y Echeverri, 2009).

Las infecciones producidas por *K. pneumoniae* han sido tratadas empíricamente con antibióticos betalactámicos, pero debido a la cada vez más frecuente resistencia mostrada a estos compuestos y a otros que son utilizados como segunda línea, como son los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, las últimas opciones de tratamiento que permanecen viables son el colistín, tigeciclina y fosfomicina (Endimiani *et al.*, 2010).

A pesar de haber sido dejado en desuso, el colistín actualmente se ha vuelto la terapia de salvamento para infecciones por *K. pneumoniae* multiresistente; sin embargo, ya existen reportes de resistencia a colistín. Por ejemplo, cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas han mostrado resistencia al colistín en tratamiento (Eleman *et al.*, 2010; Bogdanovich *et al.*, 2011).

De la misma manera que sucede con *A. baumannii*, las infecciones producidas por *K. pneumoniae* resistente a múltiples antibióticos han significado un alto costo para la atención de los pacientes, con un porcentaje de mortalidad elevado. Debido a la descripción de las primeras cepas de *Klebsiella* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en los años ochentas, y su diseminación alrededor del mundo, cada

vez más se utilizan carbapenémicos como opciones de tratamiento. Sin embargo, en los años noventas se reportó también cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas de tipo metalo- β -lactamasa clase A de Ambler (Bratu *et al.*, 2005), lo que reduce las posibilidades de éxito en la terapia de estas IAAS cuando se presentan cepas productoras de este tipo de enzimas. El problema se agudiza por la capacidad de los genes que codifican la producción de estas enzimas (genes bla_{KPC}) de ser transferidos a bacterias, incluso, de diferente especie (Arnold *et al.*, 2011; Nordmann *et al.*, 2011).

KPC en Chile

La resistencia de *K. pneumoniae* a carbapenémicos es un problema emergente alrededor del mundo, y desde el primer reporte de una cepa productora de carbapenemasa (KPC) en Chile, en el año 2012, aislada de un paciente proveniente de Italia en un hospital de la zona metropolitana (Cifuentes *et al.*, 2012), la preocupación por las implicaciones en el sistema de salud (debido a la disminución de la susceptibilidad a los carbapenémicos utilizados en clínica para la atención de pacientes críticos con infecciones intrahospitalarias relacionadas a estos microorganismos) pone en evidencia la prioridad de encontrar opciones terapéuticas viables que permitan enfrentar este problema, que ahora es una realidad en Chile.

El apareamiento cada vez más frecuente de IAAS ocasionadas por bacterias Gram negativas resistentes a todas las opciones antibióticas disponibles plantea la imperiosa necesidad de contar con nuevos fármacos que posibiliten hacerle frente a estas infecciones. Sin embargo, en los últimos años han surgido muy pocas nuevas moléculas que proporcionen diferentes opciones terapéuticas para las infecciones ocasionadas por bacterias multiresistentes, en gran medida determinado por lo poco atractivo que resulta para la industria farmacéutica la formulación de nuevos antibióticos. Si se compara el costo que representa el desarrollo de una nueva molécula con el tiempo relativamente corto que ésta será utilizada en el tratamiento de un cuadro infeccioso (7 a 14 días), con respecto a medicamentos dirigidos a enfermedades crónico-metabólicas que deben, muchas veces, ser utilizados de por vida, es comercialmente entendible que la industria de medicamentos perfile sus esfuerzos en obtener estos últimos más que la producción de nuevos antibióticos (Jian Li *et al.*, 2006).

Tigeciclina para tratamiento de bacterias multiresistentes

Una de las drogas en la que se ha enfocado el esfuerzo por demostrar eficacia como tratamiento es tigeciclina, antibacteriano que pertenece al grupo de las gliciliclinas, la cual es un derivado semisintético de la minociclina. Posee un amplio espectro de actividad con acción sobre patógenos de la comunidad e intrahospitalarios, incluyendo aquéllos resistentes a β -lactámicos (Pérez *et al.*, 2007; Chung-Hsing, 2008). Su mecanismo de acción está definido por la unión a la subunidad ribosomal

30S, bloqueando el sitio de entrada del aminoacil tRNA al sitio A del ribosoma y, por lo tanto, inhibiendo la síntesis de proteínas; aunque según algunas investigaciones, tigeciclina muestra actividad solo bacteriostática sobre cepas de *Acinetobacter* spp. (Curcio e Istúriz, 2006; Jones *et al.*, 2006). Además, la baja concentración tisular es una limitación a la hora de seleccionarla como tratamiento para infecciones complicadas por *A. baumannii*.

Por otra parte, el fenómeno de resistencia bacteriana va en aumento en infecciones de origen comunitario por la utilización de antibióticos de forma desmedida, sobre todo en países donde no existe una regulación bien establecida para su comercialización y distribución. Sin embargo, el problema es mucho más grave en las IAAS debido al uso de antibacterianos, muchas veces sin una indicación bien definida, y con protocolos que favorecen la selección de cepas resistentes, complicando aún más el hecho que en pacientes críticos su compromiso fisiológico los vuelve vulnerable al apareamiento de infecciones por agentes oportunistas multiresistentes.

En bacilos Gram negativos multiresistentes se tiene pocas opciones terapéuticas. Así, en *A. baumannii* se consideraba a los carbapenémicos como de elección cuando se presentaban cepas multiresistentes; sin embargo, reportes cada vez más frecuentes de falla terapéutica de estos medicamentos han motivado la investigación *in vitro* de perfiles de resistencia a estos medicamentos (Pérez *et al.*, 2007). También se han evaluado otras opciones como rifampicina y tigeciclina para el tratamiento de estos agentes multiresistentes, pero los resultados experimentales han sido contradictorios, por lo que el enfoque actual es buscar sinergia a través de combinaciones de medicamentos (Hernández, 2010). Evidencia experimental *in vitro* ha mostrado que cuando se combina colistín con otros fármacos como carbapenémicos o rifampicina se presenta un efecto sinérgico en la acción bactericida sobre cepas de *A. baumannii*, y esto ocurre a pesar de ser el agente resistente tanto a carbapenémicos como colistín y rifampicina (Fica *et al.*, 2007).

Antecedentes del uso clínico de colistín

Con el objetivo de reducir la mortalidad asociada a IAAS por organismos multiresistentes, se han ensayado drogas antimicrobianas que habían sido utilizadas anteriormente, pero que fueron discontinuadas debido al grado de toxicidad que presentaban y al surgimiento de nuevas drogas con igual espectro de acción y menor grado de toxicidad. Una de estas drogas es el colistín, fármaco que surgió a mediados del siglo pasado, siendo muy utilizado para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas (Luque *et al.*, 2011).

El colistín o polimixina E, como también se conoce, se obtiene de *Bacillus polymixa*, subespecie *colistinus*, y posee un anillo polipeptídico policatiónico con características detergentes que actúa uniéndose a los fosfatos de la membrana celular de la bacteria, desplazando los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} , alterando su permeabilidad, produciendo la formación de poros que permiten una mayor entrada de medicamento, siendo este fenómeno el que gatilla una respuesta enzimática hidrolítica sobre el peptidoglican, lo que conlleva a la muerte celular (Giacometti *et al.*, 2000). Existen dos presentaciones: colistín metanosulfato para uso parenteral, y colistín sulfato para uso tópico. En los últimos años, la utilización de este fármaco ha estado limitada casi exclusivamente para uso tópico. Sin embargo, la efectividad de las polimixinas contra cepas de *A. baumannii* ha sido bien documentada, presentando un rango de efectividad de alrededor de 88 % (Balaji, 2011; Neonakis *et al.*, 2011).

El conocimiento sobre colistín aún es insuficiente, lo que deriva en dosificación inapropiada y producción de efectos secundarios indeseables, potencial toxicidad y resistencia al medicamento. No obstante, existen estudios que demuestran un menor efecto tóxico del colistín en comparación con los fármacos que surgieron como una mejor opción terapéutica y que desplazaron a colistín debido a su similar espectro de acción. Estos medicamentos, los aminoglucósidos, son nefrotóxicos conocidos y su toxicidad se ve aumentada cuando se combinan con colistín en pacientes con función renal disminuida (Al Aloul *et al.*, 2005; Falagas *et al.*, 2006). Sin embargo, la toxicidad renal de colistín, en muchos casos dosis dependiente, puede ser evitada al utilizar regímenes de combinación con fármacos que resulten en actividad sinérgica a fin de reducir las dosis efectivas, evitando de esta manera los efectos tóxicos del medicamento y la resistencia antimicrobiana. Así, la combinación de colistín con otros fármacos tiene como objetivo proporcionar terapias eficaces contra la resistencia mostrada por agentes bacterianos Gram negativos de difícil control, así como evitar la emergencia de resistencia a estos fármacos (Jackson y Machado, 1998; Shields *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2012).

Resistencia a colistín

Lamentablemente colistín, y en general las polimixinas, no están exentas de que los microorganismos para los cuales están indicados presenten resistencia. La resistencia a dichos medicamentos está mediada por varios mecanismos en las bacterias Gram negativas. La mayoría de estos implican cambios en la membrana externa, principalmente modificaciones en el lipopolisacárido, específicamente en el lípido A (Nikaido, 2003; Li *et al.*, 2006). Ejemplo de estos cambios son aquellos producidos por la activación del sistema regulatorio de dos componentes (*pmrA* – *pmrB*), que al ser activado se generan modificaciones de los grupos fosfatos del LPS y del lípido A con etanolamina y modificación del 4' fosfato del lípido A con aminoarabinosa. Estas modificaciones reducen las interacciones electrostáticas

entre la molécula de colistín y su sitio de unión con la superficie celular. Estas alteraciones electrostáticas han sido demostradas en bacterias como *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Proteus vulgaris* (Numilia, et al, 1996; Gunn et al., 1998)

En *A. baumannii* también se ha reportado resistencia asociada a pérdida total de LPS, pero en este caso por mutaciones en uno de los tres genes implicados en la biosíntesis de lípido A, que son *lpxA*, *lpxC* y *lpxD* (Vaara et al., 1999; Lin et al., 2012). Estas mutaciones producen niveles altos de resistencia a colistín, lo que refuerza la recomendación de utilización de combinaciones de medicamentos que permitan prolongar la vida útil de colistín, disminuyendo la selección de cepas resistentes (Moffatt et al., 2010).

Aún más importante es señalar que regímenes de dosificación inadecuados pueden aumentar la aparición de cepas resistentes de *A. baumannii* y que, aún en dosificaciones adecuadas, existe un porcentaje importante de cepas que pueden presentar heteroresistencia con recrecimiento bacteriano en 24 horas en ensayos *in vitro*, lo que aumenta el riesgo de selección de subpoblaciones resistentes a colistín en regímenes de monoterapia por periodos prolongados (Li et al., 2006).

En Chile es muy escasa la información que sustente el uso de colistín sobre microorganismos que exhiben patrones de multiresistencia, como *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, debido a la baja permeabilidad de membranas a los diferentes antibióticos, así como a su capacidad de recibir múltiples genes que codifican diferentes mecanismos de resistencia, como bombas de eflujo y enzimas inactivantes (Magiorakos et al., 2011).

Combinación de antibióticos contra microorganismos multiresistentes

Está ampliamente demostrado que las bacterias exhiben resistencia a aquellos elementos que ejercen presión selectiva como las condiciones ambientales y uso de medicamentos.

Para el tratamiento de microorganismos multiresistentes se utilizan combinaciones de antibióticos por las siguientes razones: garantizar cobertura de amplio espectro, tratamiento para infecciones polimicrobianas, prevención de la resistencia antimicrobiana, tratar de reducir la toxicidad de determinado fármaco y para obtener sinergismo antibacteriano (Jackson y Machado Reyes, 1998).

La falta de opciones terapéuticas para tratar agentes microbianos multiresistentes, ha llevado a la búsqueda de protocolos alternativos. La utilización de combinaciones, sobre todo para agentes Gram negativos multiresistentes, permite mejores resultados antimicrobianos y reduce la descripción de efectos tóxicos asociados al paciente (Petrosillo et al., 2008).

Sin embargo, la combinación de antibióticos debe de hacerse en base a conocimiento del perfil de resistencia bacteriana, mecanismo de actividad de los medicamentos a combinar, efectos tóxicos y costos (Jackson y Machado Reyes, 1998).

In vitro es posible evaluar si el efecto al combinar dos antimicrobianos será sinergia, adición, indiferencia o antagonismo. Esto puede realizarse por diversas técnicas, siendo el método de microdilución en tablero de ajedrez uno de los métodos más utilizados (Rand *et al.*, 1993).

Mediante este método se determina un parámetro conocido como Índice Inhibitorio Fraccionado (Σ FIC), para lo que se necesita conocer la concentración inhibitoria fraccional (FIC) de los antibióticos de la combinación (Pillai *et al.*, 2005). La FIC se obtiene de la siguiente manera:

$$FIC_A = \frac{\text{concentración antibiótico A en la combinación}}{CMI_A}$$

$$FIC_B = \frac{\text{concentración antibiótico B en la combinación}}{CMI_B}$$

El índice FIC corresponde a $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B$

Dependiendo del valor de este parámetro, se puede establecer el efecto de la combinación antibiótica. Así, se obtiene sinergia si el índice FIC es $\leq 0,5$; adición si oscila entre $>0,5$ y $\leq 1,0$; indiferencia si varía entre $>1,0$ - $\leq 2,0$ y antagonismo cuando es $>2,0$ (Hernández *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2005; Kobayashi, 2005; Shields *et al.*, 2011).

Por otra parte, resulta de interés conocer si combinaciones sinérgicas *in vitro* producen muerte bacteriana. Los estudios de sinergia se pueden complementar con estudios de curva de muerte en el tiempo, evaluando lo que sucede con la población bacteriana al exponerla a combinaciones con diferente concentración de antibióticos, tomando muestras en una serie de tiempo durante un periodo generalmente de 24 horas (Vogelman y Craig, 1986).

Combinaciones antibióticas con colistín

La descripción de multiresistencia, tanto en *K. pneumoniae* como en *A. baumannii*, representa un serio problema a nivel mundial: las opciones de tratamiento son limitadas, y estas incluyen a colistín. Por lo tanto, cepas que muestran resistencia a este antibiótico requieren estrategias diferentes, y ante la falta de nuevas opciones de antibióticos, la combinación de medicamentos es una opción a seguir (Ko *et al.*, 2007; Shields *et al.*, 2011; Neonakis, *et al.*, 2011).

Existen pocos datos de resultados experimentales que sustenten la combinación de colistín con otros fármacos, lo que plantea la necesidad de implementar protocolos de estudio *in vitro* que sustenten la utilización de este fármaco como opción terapéutica y, sobre todo, que permitan orientar posibles combinaciones con otros medicamentos que disminuyan el riesgo de seleccionar más cepas multiresistentes (Balaji *et al.*, 2011; Luque *et al.*, 2011).

En este contexto, la implementación de protocolos que combinan colistín con otros medicamentos ha sido una tendencia que ha ido en aumento en los últimos años, a pesar que los datos que existen sobre farmacodinamia y farmacocinética no son concluyentes, y que la utilización de estas combinaciones se basa, fundamentalmente, en experiencias clínicas (Luque *et al.*, 2011).

De esta manera, protocolos apropiados de estudio sistemático de susceptibilidad a colistín de los microorganismos más frecuentemente aislados en los diferentes servicios médicos pueden llevar a conservar por mayor tiempo la susceptibilidad para este medicamento. La elección de antibióticos para su utilización en combinación o terapia individual con fundamento en resultados *in vitro* es de vital importancia en nuestro medio, sobre todo por la cada vez más marcada ausencia de opciones terapéuticas.

Se plantea entonces la siguiente pregunta:

Con base a resultados *in vitro*, ¿cuál es la combinación de colistín con otros antibióticos que permita el mejor resultado sinérgico para un potencial uso como tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos o *K. pneumoniae* productoras de BLEE multiresistentes?

II. METOLOGÍA

1. Hipótesis, objetivos y materiales

1.a Hipótesis

En la búsqueda de protocolos de tratamiento que permitan un adecuado abordaje terapéutico de pacientes afectados por infecciones producidas por bacilos Gram negativos multiresistentes, se plantea investigar el efecto de diferentes combinaciones de antibióticos que se utilizan rutinariamente para el tratamiento de estas infecciones, basando dichas combinaciones en el mecanismo de acción que poseen las polimixinas (colistín), alterando la permeabilidad de los microorganismos,

permitiéndole a otras drogas penetrar al espacio intracelular y producir el efecto deseado en el sitio blanco, recuperando así la susceptibilidad a dichos fármacos.

En este contexto se plantea la siguiente hipótesis:

La combinación de colistín con otros antibióticos *in vitro* resulta en efecto sinérgico y bactericida sobre *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos y *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido de origen hospitalario

1.b Objetivo general

Investigar el efecto *in vitro* de la combinación de colistín con diversos agentes antibacterianos sobre cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos y *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido de origen hospitalario.

1.c Objetivos específicos

- Conocer la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos en estudio sobre cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*.
- Investigar el efecto de la asociación de colistín con diferentes agentes antibacterianos sobre cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* resistentes a ambos compuestos de la asociación.
- Comparar, en cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* seleccionadas en base a la combinación de antibióticos que presente el mejor efecto sinérgico, el efecto bactericida en el tiempo de la combinación.

2- Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se trabajó con 44 cepas de *A. baumannii* resistentes, al menos, a un antibiótico carbapenémico (imipenem y/o meropenem) y 48 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diferentes hospitales chilenos entre los años 2008 al 2012. Además, se incluyó las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 como cepas controles en estudios de susceptibilidad, según propone el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012)

Previo a cada experimento, los diferentes aislados, mantenidos en el cepario del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos a -80°C en una mezcla cultivo/glicerol 50 % en proporción 2:1, se cultivaron en caldo tripticasa por un periodo de 18 a 24 horas a 37°C y se traspasaron a agar tripticasa para comprobar su pureza.

Estudio de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de los siguientes antibióticos: ampicilina/sulbactam (SAM), vancomicina (VAN), imipenem (IMP), rifampicina (RIF), tigeciclina (TIG) y colistín (COL) para las cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*. En las cepas susceptibles a imipenem, se determinó la CMI de meropenem y ertapenem para *K. pneumoniae* y de meropenem para *A. baumannii*. Se utilizó el método de microdilución y puntos de corte de acuerdo a recomendaciones de CLSI (2012). Para colistín en cepas de *K. pneumoniae* y tigeciclina, en ambas especies se utilizó los puntos de corte de EUCAST (2012). Al no existir puntos de cortes para rifampicina sobre estas especies bacterianas, se estableció un valor de CMI $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ como resistencia.

Las series de concentraciones se prepararon de la siguiente manera: se colocó 100 μl de caldo Mueller-Hinton en cada pocillo, luego se agregó 100 μl de solución del antibacteriano (en concentración al doble de la correspondiente) en el primer pocillo de la serie y se realizó diluciones seriadas a la mitad, traspasando 100 μl de un pocillo al siguiente, dejando el último pocillo sin antibiótico como control de crecimiento de la cepa.

A partir de un cultivo de 18-20 h a 37°C en caldo tripticasa, se preparó una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente al estándar McFarland 0,5 (10^8 UFC/ml). Se diluyó esta suspensión 1:10, para lograr 10^7 UFC/ml, y se inoculó cada pocillo de la serie con 5 μl para obtener 5×10^5 UFC/ml, según lo establecido por CLSI (2012).

Las placas se incubaron a 37°C por 18 a 24 horas, hasta su lectura, la cual se determinó por turbidez observada a simple vista como indicador de crecimiento bacteriano. El pocillo con la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano se consideró como CMI del antibiótico. Todas las determinaciones fueron realizadas en triplicado.

Estudio de combinaciones de antibióticos

Se estudió el efecto de la combinación de colistín con otros antibióticos en cepas que presentaron resistencia a ambos compuestos de la combinación. Este estudio se realizó mediante el método de tablero de ajedrez, en microplacas de 96 pocillos, utilizando las siguientes combinaciones: colistín más ampicilina/sulbactam (COL/SAM), colistín más carbapenémico (imipenem (COL/IMP), meropenem (COL/

MER) o ertapenem (COL/ERP); colistín más vancomicina (COL/VAN); colistín más rifampicina (COL/RIF) y colistín más tigeciclina (COL/TIG).

Cada serie de concentraciones a ensayar se preparó a partir de una concentración equivalente a 2 diluciones por encima del valor de CMI encontrado para cada antibiótico, según el estudio previo de CMI.

Los tableros de ajedrez se prepararon de la siguiente manera: en la fila A y en la columna 11 de las microplacas de 96 pocillos, se agregó 100 µl de caldo Mueller Hinton en cada pocillo, y luego 100 µl de solución de antibiótico A y B, respectivamente, en concentración al doble de la que se deseaba obtener. A partir de aquí, se realizó diluciones seriadas a la mitad de cada uno de los antibióticos, logrando de esta manera tener en cada pocillo concentraciones decrecientes de la combinación de antibióticos. En la columna 1 y en la fila H se conservó los antibióticos en individual, de tal manera de obtener la CMI de cada antibiótico por separado. Luego se inoculó cada pocillo con 5 µl de una suspensión de la cepa bacteriana que contenía 10^7 UFC/ml a fin de lograr un inóculo final de 5×10^5 UFC/ml en cada pocillo, como se mencionó anteriormente.

Posteriormente se incubaron las placas a 37 °C por un periodo de 18 a 24 horas, luego del cual se registró la combinación con la menor concentración de cada antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano.

Con estos resultados se determinó la concentración inhibitoria fraccional (FIC) de cada compuesto, se calculó el índice FIC para establecer el efecto producido por la combinación de antibióticos (Hernández *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2005; Kobayashi, 2005; Pillai *et al.*, 2005; Shields *et al.*, 2011), de acuerdo a los siguientes valores:

Sinergia	índice FIC = $\leq 0,5$
Adición	índice FIC = $> 0,5 - \leq 1,0$
Indiferencia	índice FIC = $> 1,0 - \leq 2,0$
Antagonismo	índice FIC = $> 2,0$

Los ensayos se realizaron en triplicado para cada combinación de antibióticos por cada cepa estudiada.

Curva de muerte

Para este ensayo se seleccionó una cepa de *K. pneumoniae* y una cepa de *A. baumannii*, tomando como criterio aquellas que habían presentado el mejor efecto

sinérgico en las combinaciones de antibióticos (Pillay *et al.*, 2005).

El ensayo de curva de muerte se desarrolló en caldo Mueller-Hinton, utilizando las concentraciones correspondientes a la de la menor combinación que produjo inhibición del crecimiento (Shields *et al.*, 2011; Peck *et al.*, 2012). A partir de un cultivo de 18-24 h a 37°C, en caldo tripticasa, de cada cepa bacteriana se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada estéril con turbidez equivalente al estándar Mc Farland 0,5 (10^8 UFC/ml) y se diluyó en caldo Mueller Hinton hasta una concentración que permitiera obtener, aproximadamente, 10^5 UFC/ml como población inicial en cada matraz. Se inoculó matraces conteniendo 10 ml de caldo Mueller-Hinton con las diferentes combinaciones de antibióticos establecidas y un matraz sin antibiótico como control de crecimiento. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para recuento bacteriano. Para esto se tomaron alícuotas de 10 μ l de cultivo que se colocaron en un filtro de 0,45 μ m y se efectuó lavado con 1 ml agua estéril, filtrando el excedente de líquido a través de un sistema de vacío con matraz de Kitasato para eliminar el efecto *carry over*, luego se procedió a colocar el filtro en una placa con agar tripticasa la que se incubó a 37°C durante 18 a 24 horas. Se utilizó el criterio de Pearson *et al.* (1980) para establecer muerte bacteriana.

El ensayo de curva de muerte se realizó en duplicado para cada combinación de antibiótico en cada cepa estudiada.

III- RESULTADOS

CMI para cepas de *Acinetobacter baumannii*

Al determinar la CMI en las 44 cepas de *A. baumannii* se encontró que 97,7 % de las cepas presentó resistencia a ampicilina/sulbactam, 100 % a vancomicina, 52,3 % a imipenem, 27 % a colistín y 4 % a meropenem (Figura 1). Además, 8 de las cepas estudiadas presentaron resistencia intermedia a meropenem y 11 a imipenem (CMI de 8 μ g/ml).

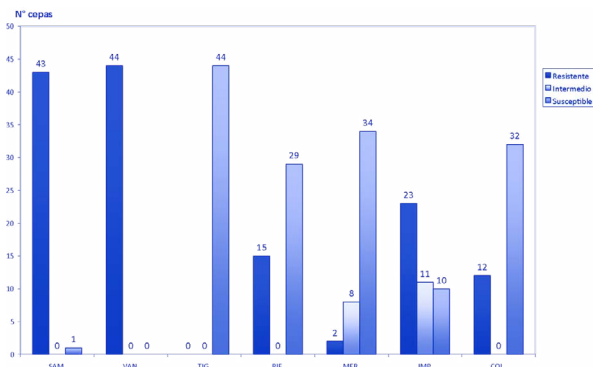


Figura 1. Número de cepas de *A. baumannii* resistentes, con resistencia intermedia y susceptibles a los diferentes antibióticos.

SAM: ampicilina/sulbactam; VAN: vancomicina; TIG: tigeciclina; RIF: rifampicina; MER: meropenem; IMP: imipenem; COL: colistín.

En la Tabla 1 se muestra los resultados de CMI de los antibióticos estudiados sobre las cepas de *A. baumannii*. Tanto para SAM como para IMP se presentaron valores de CMI₅₀ correspondientes al punto de corte de resistencia para *A. baumannii*, en cambio para tigeciclina y colistín este parámetro correspondió a valores de susceptibilidad.

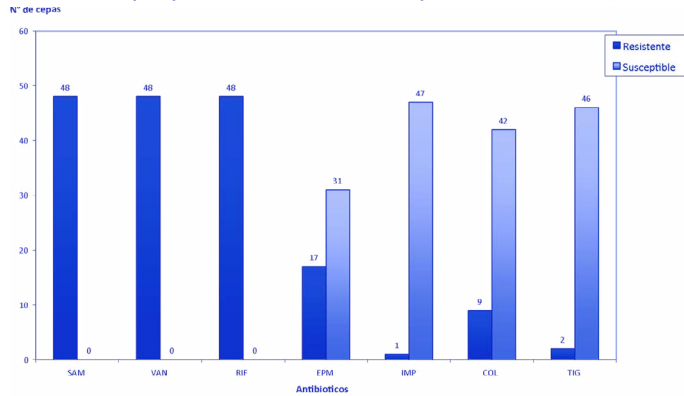
La CMI de vancomicina fue de 128 µg/ml y >128 µg/ml para las cepas de *A. baumannii* estudiadas.

Tabla 1. Actividad antibacteriana de ampicilina/sulbactam (SAM), vancomicina (VAN), rifampicina (RIF), imipenem (IMP), tigeciclina (TIG) y colistín (COL) sobre 44 cepas de *Acinetobacter baumannii* multiresistentes

Antibiótico	CMI (µg/ml)		
	rango	50 %	90 %
SAM	4/2 - 256/128	32/16	64/32
VAN	32 - >128	>128	128
RIF	0,5 - 32	2	32
IMP	2 - 128	16	32
TIG	0,06 - 0,5	0,25	0,25
COL	0,5 - 32	2	32

CMI para cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Para las 48 cepas de *K. pneumoniae* se encontró 100% de resistencia a ampicilina/sulbactam, vancomicina y rifampicina; 2 % (una cepa) fue resistente a imipenem; 35,4 %, a ertapenem; 18,8 %, a colistín; y 4 % resistentes a tigeciclina (Figura 2). Es importante hacer mención que la cepa identificada como resistente a imipenem correspondió a una cepa productora de carbapenemasa (KPC). Además, 6 de las



cepas estudiadas presentaron resistencia intermedia a ertapenem.

Figura 2. Número de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE resistentes y susceptibles a los diferentes antibióticos

SAM: ampicilina/sulbactam; VAN: vancomicina; RIF: rifampicina; ERP: ertapenem; IMP: imipenem; COL: colistín; TIG: tigeciclina.

De los antibióticos estudiados, tanto para SAM como para VAN y RIF, se presentaron CMI elevadas con valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ por encima de los que determinan resistencia para *K. pneumoniae* (Tabla 2).

Las cepas mostraron susceptibilidad a imipenem con una CMI₉₀ de $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, excepto la cepa productora de KPC que resultó susceptible sólo a TIG y COL con valores de CMI de 1 y 0,06 $\mu\text{g/}$, respectivamente. Frente a ertapenem, se encontraron 37 cepas susceptibles, de las cuales 31 fueron inhibidas con concentraciones que oscilaron entre 1 y $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de ampicilina/sulbactam (SAM), vancomicina (VAN), rifampicina (RIF), imipenem (IMP), ertapenem (EPM), tigeciclina (TIG) y colistín (COL) sobre 48 cepas de *Klebsiella pneumoniae*

SAM	CMI (µg/ml)		
	64/32 - 256/128	256/128	256/128
VAN	128 - >128	>128	>128
RIF	0.5 - 64	32	64
IMP	≤2 - 64	≤2	≤2
EPM	0,125 - >16	1	16
TIG	0,12 - 4	0,5	2
COL	0,5 - 64	0,5	16

Ensayos de combinación de antibióticos (tablero de ajedrez)

Se seleccionó 12 cepas *A. baumannii* y 6 cepas *K. pneumoniae* resistentes a colistín para realizar los ensayos de combinación de antibióticos (tablas 3 y 4). En las cepas de *A. baumannii* se realizó combinación colistín con imipenem solamente en 10 de las doce cepas, ya que dos de las cepas eran susceptibles a imipenem. En estas cepas se realizó combinación colistín con meropenem, ya que las cepas resultaron resistentes a ambos antibióticos.

Tabla 3. Efecto de la combinación de colistín con ampicilina/sulbactam, imipenem, vancomicina, rifampicina y tigeciclina sobre cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)										
	COL	SAM	COL/SAM	IMP	COL/IMP	VAN	COL/VAN	RIF	COL/RIF	TIG	COL/TIG
A267	64	128/64	4 / 64/32	64	4 / 16	64	64/64	8	64/8	0.25	64/1
A363	64	128/64	0,25 / 4/2	32	0,25/2	128	0.12/2	8	0.12/2	ND	ND
A364	64	32/16	64/16/8	16	0.5/8	128	64/128	8	64/8	ND	ND
A375	64	64/32	4/8/4	16	0,5/8	128	1/32	16	0,12/0,5	0,25	0,12/0,5
A393	64	32/16	0,5/16/8	32	4/8	128	2/32	32	0,5/0,5	0,5	32/0,25
A394	64	64/32	2/16/8	16	0,5/4	128	0.12/2	16	0,06/2	0,5	0,5/0,12
A399	16	128/64	0,5/16/8	32	0,5/4	128	0,06/8	16	0,12/0,5	ND	ND
A-26	4	64/32	0,12/4/2	ND	ND	128	0,12/2	1	0,12/0,5	ND	ND

A-40	64	64/32	32/32/16	ND	ND	128	0,12/2	1	0,12/0,5	ND	ND
A400	32	64/32	8/16/8	128	1/64	32	0,12/2	16	0,25/0,5	0,25	4/0,06
A401	64	256/128	0,5/32/16	16	0,5/2	128	4/32	16	0,25/0,5	0,12	0,12/0,25
A403	64	128/64	2/16/8	32	0,5/4	128	4/4	16	0,12/0,5	0,25	64/0,25

COL: colistín; SAM: ampicilina/sulbactam; IMP: imipenem; VAN: vancomicina; RIF: rifampicina; TIG: tigeciclina; ND: no determinado

Tabla 4. Efecto de la combinación de colistín con ampicilina/sulbactam, ertapenem, vancomicina, rifampicina y tigeciclina sobre cepas de *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido

concentración mínima inhibitoria (µg/ml)											
cepa	COL	SAM	COL/SAM	EPM	COL/EPM	VAN	COL/VAN	RIF	COL/RIF	TIG	COL/TIG
ND	ND	32	1/16	32	0,5/0,12	4	0,12/0,5				
K-802	32	256/128	0,5/16/8	16	4/8	32	1/16	32	0,12/0,5	1	0,25/8
K-828	8	256/128	2/32/16	64	1/8	128	0,5/32	16	0,12/0,5	0,25	05/0,25
K-848	4	256/128	4/4/2	ND	ND	128	2/2	32	1/4	0,5	2/0,03
K-849	16	256/128	2/16/8	ND	ND	128	0,5/8	32	0,25/0,5	4	2/0,12

K-869 64 256/128 0,12/8/4 ND ND 32 64/32 32 8/1 2 64/2 K-870 64 64/32 4/32/16 ND ND 128 64/128 8 0,12/0,5 0,5 16/0,25.

COL: colistín; SAM: ampicilina/sulbactam, EPM: ertapenem; VAN: vancomicina; RIF: rifampicina; TIG: tigeciclina; ND: no determinado

Como se muestra en la tabla 5, sobre las cepas de *A. baumannii*, se presentó predominantemente un efecto sinérgico al combinar colistín con carbapenémicos, vancomicina y rifampicina (9/12 cepas). Este efecto también se observó, pero con menor frecuencia, con la combinación colistín-ampicilina/sulbactam. Con ninguna de estas asociaciones se obtuvo antagonismo y se observó inhibición del crecimiento bacteriano con concentraciones de ambos antibióticos por debajo de los valores establecidos como puntos de corte para resistencia a dichos antibióticos (tabla 3).

Solamente frente a una cepa se encontró un efecto antagónico y correspondió a la combinación de colistín con tigeciclina. Es importante señalar que esta combinación se ensayó únicamente en 7 cepas de *A. baumannii*, ya que ninguna de las cepas estudiadas resultó resistente a tigeciclina.

Tabla 5. Efectos de la combinación de colistín con otros antibióticos sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* multiresistentes

Combinación	N° de cepas			
	Sinergia	Adición	Indiferencia	Antagonismo
COL + SAM	9	2	1	0
COL + VAN	10	0	2	0
COL + RIF	9	1	2	0
COL + IMP	8	2	0	0
COL + MER	1	1	0	0
COL + TIG*	1	0	4	2

COL: colistín; SAM: ampicilina/sulbactam; VAN: vancomicina; RIF: rifampicina; IMP: imipenem; MER: meropenem; TIG: tigeciclina.

*Ensayo de 7 cepas

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con las cepas de *K. pneumoniae*. También se observó que las combinaciones ensayadas presentaron efecto sinérgico, siendo la combinación de colistín con rifampicina la que presentó el mejor resultado, ya que en las 6 cepas ensayadas se encontró este efecto. La sinergia fue menos frecuente al combinar colistín con ampicilina/sulbactam y vancomicina, encontrándose en cantidad similar al efecto de indiferencia (Tabla 6).

La combinación colistín-tigeciclina fue evaluada en 7 cepas de *K. pneumoniae*, de las cuales sólo 2 cepas eran resistentes a ambos antibióticos, encontrando en una de ellas (cepa K-801) un efecto sinérgico y en la otra (cepa K- 869) indiferencia.

A diferencia de lo encontrado con *A. baumannii*, ninguna de las combinaciones ensayadas presentó efecto antagónico frente a las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas.

Tabla 6. Efecto de la combinación de colistín con otros antibióticos sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE resistentes a colistín

Combinación	N° de cepas			
	Sinergia	Adición	Indiferencia	Antagonismo
COL + SAM	3	1	2	0
COL + VAN	2	2	2	0
COL + RIF	6	0	0	0
COL + EMP#	1	1	0	0
COL+TIG*	3	3	1	0

SAM: ampicilina/sulbactam; VAN: vancomicina; TIG: tigeciclina; RIF: rifampicina; EMP: ertapenem; COL: colistin.

* Ensayo de 7 cepas; # ensayo de 2 cepas

Ensayo de curva de muerte para *A. baumannii*

Se realizó curva de muerte para la cepa *A. baumannii* A-400 sobre la cual se presentó la mejor sinergia con todas las combinaciones de antibióticos ensayadas.

Partiendo de un inóculo de 10^5 ufc/ml, las combinaciones COL/SAM, COL/VAN, COL/TIG y COL/IMP lograron efecto bactericida antes de las 4 horas. La combinación de COL/IMP fue la que en menor tiempo alcanzó muerte bacteriana (Figura 3).

Con la combinación COL/RIF no se alcanzó muerte bacteriana en las 24 horas del ensayo, sin embargo a las 4 horas presentó un descenso de 2 log con respecto al inóculo inicial (Figura 3).

Todas las combinaciones, excepto COL/TIG, presentaron recrecimiento a las 24 horas. Sin embargo, es importante señalar que la cepa A-400 era susceptible a TIG, pero se incluyó en este ensayo ya que ninguna de las cepas seleccionadas para este estudio presentaba resistencia a dicho antibiótico.

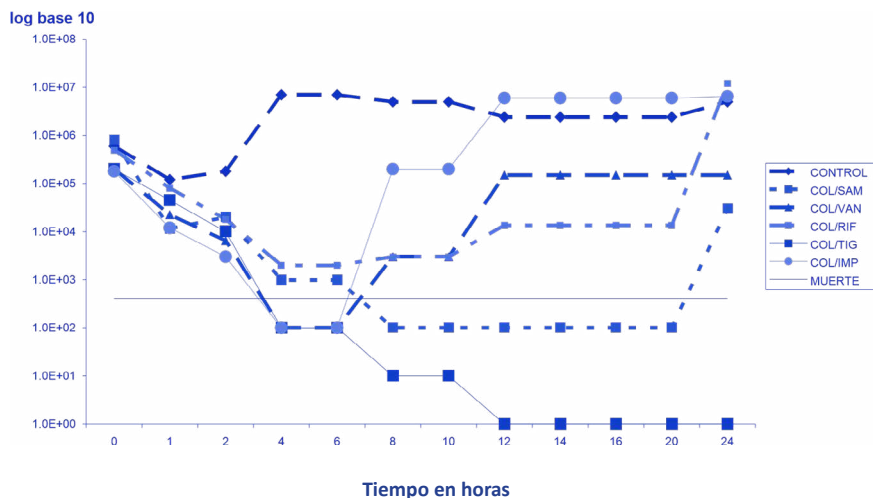


Figura 3. Curva de muerte de *Acinetobacter baumannii* A-400 con colistín combinado con diferentes antibióticos

COL: colistín; SAM: ampicilina/sulbactam; VAN: vancomicina; RIF: rifampicin; TIG: tigeciclina; IMP: imipenem. Las concentraciones de cada combinación corresponden a las del menor índice FIC.

Ensayo de curva de muerte para *K. pneumoniae*

Se realizó curva de muerte con la cepa K-849, sobre la cual se presentó sinergia con todas las combinaciones de antibióticos ensayadas. No se realizó este estudio con la combinación colistín/carbapenémicos, ya que esta cepa resultó susceptible a los carbapenémicos ensayados.

Todas las combinaciones antibióticas ensayadas produjeron muerte bacteriana rápidamente en las primeras 2 horas del ensayo. Sin embargo, al igual que con *A. baumannii*, todas presentaron recrecimiento antes de las 24 horas (Figura 4).

Las combinaciones COL/TIG y COL/RIF fueron las que primero mostraron efecto bactericida (antes de la primera hora). Sin embargo, con ambas se evidenció un recrecimiento bacteriano tan pronto como a las 4 horas del ensayo.

Con las combinaciones COL/VAN y COL/SAM se observó un descenso de 3 log de la población bacteriana a las 2 h del ensayo. No obstante, se produjo recrecimiento bacteriano a las 8 y 12 h, respectivamente.



Figura 4. Curva de muerte de *K. pneumoniae* K-849 con colistín combinado con diferentes antibióticos

COL: colistín; SAM: ampicilina/sulbactam; VAN: vancomicina; RIF: rifampicina; TIG: tigeciclina. Las concentraciones de cada combinación corresponden a las del menor índice FIC

IV- DISCUSIÓN

Las IAAS ocasionadas por agentes Gram negativos multirresistentes son un problema creciente de gran importancia para los servicios de salud, no sólo por el riesgo implícito de mortalidad, sino también por los altos costos que representa la internación hospitalaria y el uso de antimicrobianos por periodos prolongados (Shields *et al.*, 2011; Falagas *et al.*, 2012).

Cuando los protocolos de tratamiento fallan y las opciones terapéuticas son escasas, se necesitan opciones que ofrezcan alternativas viables para los pacientes que padecen estas infecciones. Esto es particularmente importante en el caso de infecciones por Gram negativos donde el surgimiento de nuevos medicamentos cada vez es más escaso (Luque *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2011).

En este contexto, las combinaciones de antibióticos ofrecen una alternativa importante para el tratamiento de las infecciones por agentes multirresistentes (Ko *et al.*, 2007; Balaji *et al.*, 2011; Shields *et al.*, 2011).

En esta tesis se encontró que el efecto combinado de colistín con otros fármacos permite recuperar la susceptibilidad de estos medicamentos cuando el microorganismo se presenta como resistente, incluyendo cuando es resistente también a colistín.

Las cepas de *A. baumannii* analizadas fueron seleccionadas por su resistencia a carbapenémicos, las cuales, además, presentaban diferentes grados de resistencia a los otros antibióticos ensayados. De éstas, 12 cepas resultaron resistentes a colistín. Si consideramos que colistín junto con tigeciclina es el tratamiento de elección para infecciones por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, el porcentaje encontrado de resistencia a polimixinas de 27,2 % es muy alto.

En estas cepas también se ensayó tigeciclina, resultando ser todas susceptibles a este medicamento; sin embargo, debido a las características farmacocinéticas de este medicamento, y a la dificultad para alcanzar concentraciones terapéuticas en tejidos diferentes al pulmonar, es necesario contar con opciones terapéuticas alternativas (Albur *et al.*, 2012).

En aquellos antibacterianos ensayados que resultaron resistentes para cada cepa, las concentraciones utilizadas fueron considerablemente altas, de hasta 3 o 4 diluciones por encima de los puntos de corte establecidos como resistentes para estos medicamentos. En cepas de *A. baumannii*, la CMI₉₀ para SAM, VAN, RIF, IMP y COL fueron de 64/32, 128, 32, 32 y 32 µg/ml, respectivamente; y en cepas de *K. pneumoniae*, las CMI₉₀ para SAM, VAN, RIF, EPM y COL fueron de 256/128, >128, 64, 16 y 16 µg/ml, respectivamente. Estas concentraciones vuelven inviable la utilización del medicamento, ya que las dosis necesarias para alcanzar concentraciones plasmáticas terapéuticas son muy altas, lo que aumenta el riesgo de efectos tóxicos, sobre todo aquellos dependientes de concentración, como el caso del colistín (Al-Aloul *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2011; Falagas *et al.*, 2006).

También se determinó la CMI para vancomicina en las cepas de ambas bacterias Gram negativas, las cuales poseen resistencia intrínseca a dicho medicamento. La vancomicina surgió para el tratamiento de sepsis por bacterias del género *Staphylococcus*, y este antibiótico bactericida se usa exclusivamente para infecciones clínicas por bacterias Gram positivas (González Piñera *et al.*; 1998). En bacilos Gram negativos, el principal mecanismo de resistencia mostrado contra vancomicina es impermeabilidad a dicho compuesto, el cual está formado por una molécula de gran tamaño que no puede atravesar la pared celular para alcanzar su sitio blanco (MacDougall y Chambers, 2012). Todas las cepas analizadas presentan resistencia a vancomicina con CMI por encima de 128 µg/ml, lo cual es el resultado esperado para estas bacterias.

Al ensayar la combinación de colistín con vancomicina, se presentó efecto sinérgico en 61 % de las cepas estudiadas (9 de 12 cepas de *A. baumannii* y 2 de 6 cepas de *K. pneumoniae*), disminuyendo la concentración necesaria de ambos medicamentos para inhibir el crecimiento bacteriano en más de dos diluciones con respecto a la CMI observada para cada antibiótico en forma individual. En el caso de colistín, esta disminución estuvo por debajo de los niveles establecidos como punto de corte, aún en cepas resistentes a este medicamento.

Este efecto es producido por el aumento de la permeabilidad de la membrana celular ocasionado por el colistín, el cual forma poros con el tamaño suficiente para que la molécula de vancomicina pueda penetrar y alcanzar su sitio blanco (Gordon, Png y Whareham, 2010). Esto permite evaluar nuevas opciones de tratamiento combinando colistín con un medicamento específico para bacterias Gram positivas, como terapia para Gram negativos multirresistentes (Giacometti *et al*, 2000).

La posibilidad de incorporar vancomicina en el protocolo de atención de infecciones por Gram negativos multirresistentes es una opción innovadora que requiere de mayor estudio, aumentando el número de ensayos *in vitro* e incorporando ensayos *in vivo* a los resultados obtenidos; sin embargo, los hallazgos de esta investigación son de relevancia, ya que proporcionan evidencia experimental sobre la eficacia de posibles combinaciones de colistín con vancomicina.

Cuando se realizó el ensayo de curva de muerte en la cepa de *A. baumannii* sobre la que se presentaba efecto sinérgico con las combinaciones de colistín con los diferentes antibióticos, todas las combinaciones presentaron efecto bactericida antes de las 4 horas de ensayo, excepto la combinación COL/RIF, la cual no alcanzó efecto bactericida en 24 horas de ensayo: Todas las combinaciones presentaron recrecimiento a las 24 horas. Esto puede deberse a que únicamente se ensayaron concentraciones de 1xFIC en cada antibiótico de la combinación, lo que resultaba en concentraciones sumamente bajas de ambos medicamentos.

También en estas cepas bacterianas pueden estar actuando más de un mecanismo de resistencia: la combinación de colistín con los diferentes antibióticos tiene como objetivo contrarrestar el efecto de la impermeabilidad de la bacteria a los diferentes medicamentos estudiados. Sin embargo, ya que *A. baumannii* tiene la capacidad de contener genes que codifican diferentes mecanismos de resistencia, en este ensayo esta cepa podría estar exhibiendo un mecanismo de resistencia diferente a la impermeabilidad, lo que posiblemente le permita presentar recrecimiento a las 24 horas.

El principal mecanismo de resistencia de *A. baumannii* al colistín consiste en presentar modificaciones del LPS, lo que reduce la capacidad del colistín de unirse a su sitio blanco por la interacción electrostática entre el componente lipofílico de la

molécula de medicamento y el lípido A del LPS (Gunn et al, 1998). En *A. baumannii* mutaciones en los genes esenciales que codifican la biosíntesis de lípido A, los genes: *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* producen pérdida del lípido A, y por consiguiente resistencia a colistín por modificación del sitio blanco (Moffatt et al., 2010). Estas mutaciones pueden estar determinadas por la presencia de secuencias de inserción del tipo *ISAbA11*, las cuales interrumpen el promotor de los genes de la región central del LPS, presentando así la modificación del sitio blanco (Moffat et al., 2011). A las 12 cepas de *A. baumannii* estudiadas que resultaron resistentes a COL, se buscó secuencias de inserción *ISAbA11* a través de técnica de PCR convencional, utilizando partidores diseñados con la herramienta de Pubmed en el sitio www.ncbi.nlm.nih.gov. (resultados no mostrados), de las cuales 3 cepas amplificaron para *ISAbA11*. Este hallazgo hace pensar que en estas cepas, el mecanismo de resistencia está mediado por una mutación en los genes que codifican para la formación del LPS; sin embargo, la combinación con otros medicamentos permite recuperar la susceptibilidad a ambos fármacos, aun cuando la cepa presenta resistencia a ambos medicamentos de la combinación, lo cual se evidencia por el efecto sinérgico obtenido al utilizar solo pequeñas concentraciones de medicamentos para lograr inhibir el crecimiento bacteriano. Este dato debe de complementarse con mayores ensayos a fin de determinar si la presencia de *ISAbA11* efectivamente está interrumpiendo los genes *lpxA*, *lpxC* o *lpxD* en estas cepas y correlacionarlo con los resultados obtenidos de los ensayos de sinergia y curva de muerte.

El resultado de la combinación de colistín con imipenem en *A. baumannii* resulta la mejor combinación, ya que alcanzó valores de muerte bacteriana (descenso de 3 log base 10 de UFC con respecto al inóculo inicial) en el menor tiempo (antes de 3 horas). Es importante hacer notar que la combinación de COL/TIG tuvo resultados igualmente positivos, ya que la muerte bacteriana se alcanzó a las 3 horas. Esto posiblemente se debería a que el mecanismo de resistencia a carbapenémicos, principalmente implicado en la cepa *A. baumannii* A400, puede ser impermeabilidad a los diferentes antibióticos, y al anular esa impermeabilidad con la apertura de poros en la membrana celular por efecto del colistín, esto permite recuperar la susceptibilidad de la bacteria a imipenem y los otros antibióticos de las diferentes combinaciones.

De igual forma en la combinación COL/RIF, pueden estar implicados otros mecanismos de resistencia a RIF, los cuales al expresarse permiten a la bacteria sobrevivir a dicha combinación. Sin embargo, este resultado no es desalentador, ya que si se utilizan concentraciones más altas de ambos medicamentos en la combinación, sería posible alcanzar resultado de muerte.

Las infecciones de las vías urinarias representan las infecciones nosocomiales más frecuentes en los servicios de hospitalización (Andrade, 2011), siendo *K. pneumoniae*

uno de los principales agentes asociados a esta patología. Las cepas productoras de BLEE estudiadas, todas provenientes de hospitales chilenos, presentan 100% de resistencia a SAM, VAN y RIF, además de 35,4 % de resistencia a ertapenem y 18,7% a colistín. Estos resultados vuelven particularmente importante buscar posibles combinaciones que permitan obtener efecto sinérgico sobre estos microorganismos. Así, las combinaciones de COL con ERP y COL con TIG presentan efecto sinérgico, posiblemente debido a que el principal mecanismo de resistencia mostrado por estas cepas, ya sea alteraciones de la permeabilidad de las membranas celulares a dichos medicamentos. Estas dos combinaciones son utilizadas en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones ocasionadas por este microorganismo, sin embargo es importante resaltar que, en este estudio, todas las combinaciones ensayadas de colistín presentaron recrecimiento antes de las 24 horas del ensayo de curva de muerte.

La combinación de COL con TIG fue la que logró más rápido muerte bacteriana, con concentraciones de 1xMIC. Tanto para *A. baumannii* como para *K. pneumoniae*, estas concentraciones fueron muy bajas incluso para algunos medicamentos, hasta más de 10 veces menores que las CMI de cada antibiótico por separado para estas cepas; sin embargo, estos valores tan pequeños permitieron, en el caso de TIG, descender el inóculo inicial en 3 log antes de las 2 horas de ensayo. El recrecimiento mostrado puede deberse a que la cepa ensayada posea, además, un mecanismo de resistencia diferente a la impermeabilidad, como puede ser la sobreexpresión de bombas de expulsión. En el caso de *K. pneumoniae*, se ha identificado la sobreexpresión de *ramA*, un gen regulador del sistema de expulsión AcrAB en cepas que presentan resistencia a TIG (Ruzin *et al.*, 2008; Spanu *et al.*, 2012). Concentraciones mayores podrían ser efectivas para evitar el recrecimiento a las 24 horas, por lo que debe complementarse estos resultados con nuevos ensayos a fin de encontrar las concentraciones adecuadas de medicamento.

La combinación de medicamentos contribuye a disminuir la mortalidad en pacientes afectados por microorganismos multiresistentes. Se ha informado que la combinación de colistín con tigeciclina o con carbapenémicos presenta mejores resultados disminuyendo la mortalidad cuando se trata de infecciones por cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC (Zubair *et al.*, 2012). En nuestro estudio, se obtuvo resultados similares, donde las combinaciones de colistín con imipenem, para el caso de *A. baumannii*, y colistín con tigeciclina, para *K. pneumoniae*, presentaron mejores efectos bactericidas.

Si bien estos resultados se ven limitados por el número de cepas ensayadas, y por la falta de concentraciones diferentes a las cuales se realizó los ensayos de curva de

muerte, los hallazgos observados representan evidencia *in vitro* de microorganismos aislados en hospitales chilenos, y de la efectividad de estas combinaciones para un probable tratamiento de infecciones por *A. baumannii* y *K. pneumoniae* multirresistentes. También abre la pauta para continuar investigando en esta línea de experimentación con posibles combinaciones que permitan al médico contar con evidencia experimental que sustente la utilización de dichas combinaciones.

V- CONCLUSIONES

- Las combinaciones de colistín con carbapenémicos, rifampicina, vancomicina y ampicilina sulbactam presentan, predominantemente, efecto sinérgico en cepas de *A. baumannii* y de *K. pneumoniae* resistentes a ambos antibióticos de la combinación.
- Las combinaciones sinérgicas presentan efecto bactericida en las cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* ensayadas en concentraciones correspondientes a la presente en la menor combinación que produce inhibición; excepto la combinación de COL/RIF sobre la cepa de *A. baumannii*.
- A pesar de ocurrir muerte bacteriana, con todas las combinaciones se produce recrecimiento bacteriano a las 24 horas.

VI- PROYECCIONES

- Es necesario ampliar el número de ensayos con mayor número de cepas de ambas especies bacterianas para confirmar el efecto sinérgico mostrado por las diferentes combinaciones.
- Estudiar el efecto bactericida de combinaciones con diferentes concentraciones de ambos antibióticos para determinar las concentraciones necesarias que eviten el recrecimiento en 24 horas.
- Se debe ampliar la investigación hacia los mecanismos de resistencia exhibidos por las cepas estudiadas a fin de correlacionar el efecto sinérgico con el mecanismo de resistencia que poseen las cepas estudiadas.
- Las combinaciones con efecto sinérgico *in vitro* deben ser estudiadas en ensayos *in vivo* a fin de establecer la correlación entre ellas.

VII- FUENTES CONSULTADAS

- Al-Aloul M., Miller H., Alapati S., Stockton P.A., Ledson M.J., Walshaw M.J. 2005. Renal Impairment in Cystic Fibrosis Patients Due to Repeated Intravenous Aminoglycoside Use. *Pediatr Pulmonol* **39**(1):15–20.
- Albur M., Noel A., Bowker K., MacGowan A., 2012. Bactericidal Activity of Multiple Combinations of Tigecycline and Colistin against NDM-1-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **56**(6): 3441-3443.
- Alpuche Aranda C., Daza Timaná C. 2002. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enf Infec y Micro* **22**(4): 192-199.
- Andrade A.B. 2011. Antibioticoterapia en las infecciones graves. *Acta Med Per* **28**(1): 27-38.
- Arnold R. S., Thom K. A., Sharma S., Phillips M., Johnson J., Morgan D.J. 2011. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. *South Med J* **104**(1): 40–45.
- Balaji V., Jeremiah S.S., Baliga P.R. 2011. Polymixins. Antimicrobial susceptibility and therapeutic options. *Indian J Med Microbiol* **29**(3): 230-242.
- Boucher H.W, Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., David Gilbert D., Rice L.B. Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *CID* **48**: 1-12
- Bratu S., Landman D., Haag R., Recco R., Eramo A., Alam M., Quale J. 2005. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med* **165**:1430-1435.
- Cai Y., Chai D., Wang R., Liang B., Bai N. 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* **67**(7): 1607-1615.
- Cifuentes M., García P., San Martín P., Silva F., Zúñiga J., Reyes S., Rojas R., Ponce R., Quintanilla R., Delpiano L., Wolff M. 2012. Primer caso de detección de *bla*_{KPC} en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Rev Chil Infect.* **29** (2): 224-228.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Ninth Edition. CLSI document M07-A9. (ISBN 1-56238-783-9). Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22- (ISBN 1-56238-785-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Curcio D., Istúriz R. 2006. Tigecycline, the first glycylycylcline. *Rev Panam Infectol* **8**(3):35-42
- Díaz Jiménez V. 2010. *Acinetobacter baumannii*: actualidades. *Rev Enferm Infec Ped* **23**(92): 104-105.
- Diomedi A. 2005. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil Infect* **22**(4): 298-320.

- Echeverri-Toro L.M., Rueda Z.V., Maya W., Agudelo Y., Ospina S. 2012. *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Rev Chil Infect* **29** (2): 175-182.
- Elemam A., Rahimian J., Doymaz M. 2010. *In Vitro* Evaluation of Antibiotic Synergy for Polymyxin B-Resistant Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **48**(10): 3558–3562.
- Endiamani A., Hujer K.M., Hujer A.M, Pulse M. E., Weiss W.J., Bonomo R. A. 2011. Evaluation of Ceftazidime and NXL104 in Two Murine Models of Infection Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(1): 82–85.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2012. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, valid from 2012-01-01. <http://www.eucast.org>
- Fernández Riverón F., López Hernández J., Ponce Martínez L.M., Machado Betarte C. 2003. Resistencia Bacteriana. *Rev Cubana Med Milit* **32**(1):44-48.
- Falagas M., Kasiakou S. 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care* **10**(1): R27.
- Falagas M., Petros R. 2012. Colistin in Ventilador-Associated Pneumonia. *Clin Infect Dis* **54**(5): 681-683.
- Garnacho-Montero J. and Amaya-Villar R. 2010. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr Opin Infect Dis* **23** (4):332–339.
- Giacometti A., Cirioni O., Del Prete M. S., Barchiesi F., Fortuna M., Drenaggi D, Scalise G. 2000. *In Vitro* Activities of Membrane-Active Peptides Alone and in Combination with Clinically Used Antimicrobial. Agents against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(6):1716-1719.
- Gobernado M. 2005. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterap* **18**(2): 115-117.
- González Piñera J., Penié J.B., Rodríguez M. A., Reyes A., Mora E., Lescay M. 1998. Glicopéptidos. *Act Med* **8**(1): 54-57.
- Gordon N.C., Png K., Whareham D.W. 2010. Potent Synergy and Sustained Bactericidal Activity of a Vancomycin-Colistin Combination versus MultidrugResistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agent Chemother*. **54**(12): 5316–5322.
- Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., S.I. Miller. 1998. PmrA–PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* **27**(6): 1171–1182.
- Hernández Torres A., García Vásquez E., Yagüe G., Gómez Gómez J. 2010. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter* **23**(1):12-19.

- Hernández M. E., Couto Ramos M. J., Ferrer N. F., Rojas N. 2003. Resistencia a antimicrobianos y evaluación del tratamiento combinado en la septicemia neonatal. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health* **13**(4): 214-221.
- Jackson L. C. y Machado Reyes L. 1998. Combinaciones de antimicrobianos. *Acta Médica* **8**(1):101-104.
- Jones R. N., Ferraro M. J., Barth Reller L., Schreckenberger P. C., Swenson J. M., Sader H. S. 2006. Multicenter Studies of Tigecycline Disk Diffusion Susceptibility Results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* **45**:227–230.
- Kobayashi Y. 2005. Study of the synergism between carbapenems and vancomycin or teicoplanin against MRSA, focusing on S-4661, a carbapenem newly developed in Japan. *J Infect Chemother* **11**:259–261
- Liao Ch., Kung H., Hsu G., Lu P., Liu Y., Chen Ch., Lee Ch., Sun W., Jang T., Chiang P., Cheng Y., Lin H., Shim Z., Wang L., Chuang Y., Tsao S., Lu Ch., Liu J., Huang Ch., Hsueh P. 2008. In-vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan determined by the broth microdilution and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Ag* **32**(S3): S192-S196.
- Li J., Rainer C.R., Nation R.L, Owen R.J., Spelman D., Tan K.E., Liolios L. 2006. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* **50**(9): 2946–2950.
- Li J., Nation R.L, Turnidge J.D., Milne R.W, Coulthard K., Rayner C.R, Paterson D.L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* **6**: 589–601
- Lin L., Tan B., Pantapalangkoor P., Ho T., Baquir B., Tomaras A., Montgomery J., Reilly U., Barbacci U., Hujer K., Bonomo R., Fernandez L., Hancock R., Adams M., French S., Buslon V., Spellberg B. 2012. Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. *mBio.* **3**(5): e00312-12.
- Lisboa T. y Nagel F. 2011. Infection with multi-resistant agents in the ICU: how to escape? *Rev Bras Ter Intensiva.* **23**(2):120-124.
- Livermore D.W. 2004. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect* **10**(Suppl. 4): 1–9.
- Lizaso D., Aguilera K., Correa M., Yantorno M. L., Cuitiño M., Pérez L., Lares M., Parra G., Esposto A. 2008. Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad de las bacteremias intrahospitalarias por bacilos gramnegativos. *Rev Chil Infec* **25**(5): 368373.
- López Vargas J.A., Echeverri Toro L.M. 2009. *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *IATREIA* **23**(2): 157-164.
- Luque S., Grau S., Berenguer N., Horcajada J. P., Sorlí L., Montero M., Salas E. 2011. Luces y sombras en el uso del colistín: falta mucho por conocer. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **29**(4):287-296.
- MacDougall C. y Chambers H. 2012. Inhibidores de la síntesis de proteínas y diversos antibacterianos. En: Goodman y Gilman's Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 12ª ed. L.L. Brunton, B.A. Chabner, B.C Knollmann (eds.). Mc Graw Hill Interamericana. Mexico. pp. 1539-1542.

Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T. and Monnet D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**(3): 268–281.

Ministerio de Salud Gobierno de Chile (MINSAL). 2010. Normas Generales de infecciones asociadas a la atención en salud. Disponible en: http://hospitaldetalca.cl/adicional/documentos/Normas_generales_de_IAAS.pdf

Moffat J.H., Harper M., Adler B., Nation R.L., Li J., Boyce J.D. 2011. Insertion Sequence ISAbA11 Is Involved in Colistin Resistance and Loss of Lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(6): 3022–3024.

Moffatt J.H, Harper M., Harrison P.,Hale J.D.F, Vinogradov E., Seemann T., Henry R., Crane B., St. Michael F., Cox A.D., Adler B., Nation R.L, Li J., Boyce J.D. 2010. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(12):4971–4977.

Muñoz-Price L.S., Weinstein R.A. 2008. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. **358**: 1271–1281.

Neonakis I., Spandidos D.A., Petinaki E. 2011. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int J Antimicrob Agents* **37**: 102-109.

Nikaido H. 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4):593-656.

Nordmann P., Naas T., Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* **17**(10): 1791-1798.

Nummila, K., Kilpelainen, I., Zahringer, U., Vaara, M., Helander, I.M. 1995. Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol Microbiol* **16**: 271–278.

Orhan G., Bayram A., Zer Y., Balci I. 2005. Synergy tests by E-Test and checkerboard method of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* **43**(1): 140-143.

Opazo A., Domínguez M., Bello H., Amyes S.G.B., González-Rocha G. 2012. OXAtype carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries* **6**(4): 311-316.

Pearson R., Steigbigel R.T., Davis H.T., Chapman S.W. 1980. Method for reliable determination of minimal lethal concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* **38**(5):2065-2072.

Peck K., Kim M., Choi J. Y., Kim H., Kang Ch-I., Cho Y., Park D., Lee H., Lee M., Ko K. S. 2012. In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecyclineresistant isolates. *J Med Microbiol* **61**: 353–360.

Pérez F., Hujer A., Hujer K., Decker B., Rather P., Bonomo R. 2007. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(10): 3471–3484.

- Pillai S. K., Moellering Jr R. C., Eliopoulos G.. 2005. Antimicrobial Combinations. En: Antibiotics in Laboratory Medicine 5th Edition. V. Lorian (ed). Williams & Wilkins. Philadelphia, PA USA. pp. 365-440.
- Pino C., Domínguez M., González G., Bello H., Sepulveda M., Mella S., Zemelman C., Zemelman R. 2007. Producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales de la VIIIª Región, Chile. Rev Chil Infect **24**(2); 137-141.
- Qureshi Z.A., Paterson D.L., Potoski B.A., Kilayko M.C., Sandovsky G., Sordillo E., Polsky B., Adams-Haduch J.M., Doi Y. 2012. Treatment Outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. Antimicrob Agents Chemother. **59**(4): 2108–2113.
- Rodríguez C. H., Nastro M., Weyland B., Losada M., Vay C., Famiglietti A. 2010. Bacteremias by *Acinetobacter* spp. and carbapenems resistance. Acta Bioquím Clín Latinoam **44** (2): 243-248.
- Ruzin A., Visalli M.A., Keeney D., Bradford P.A. 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:1017– 1022.
- Shields R. K., Kwak E. J., Potoski B. A., Doi Y., Adams-Haduch J. M., Silveira F. P., Toyoda Y., Pilewski J. M., Crespo M., Pasculle A. W., Clancy C. J., Nguyen M. H. 2011. High mortality rates among solid organ transplant recipients infected with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: using in vitro antibiotic combination testing to identify the combination of a carbapenem and colistin as an effective treatment regimen. Diagn Microbiol Infect Dis **70**(2): 246–252.
- Spanu T., De Angelis G., Cipriani M., Pedruzzi B., D’Inzeo T., Cataldo M.A, Sganga G., Tacconellib E. 2012. In Vivo Emergence of Tigecycline Resistance in MultidrugResistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **56**(8): 4516–4518
- Subsecretaria de Redes Asistenciales. Departamento de Calidad y Seguridad del Paciente. 2011. Indicadores de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Indic IAAS. 1-3.
- Sunenshine R.H., Wright M.O., Maragakis L., Harris A.D., Song X., Hebden J. 2007. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. Emerg Infect Dis **13**: 97-103.
- Vaara M., Nurminen M. 1999. Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutants that are defective in the late acyltransferases of Lipid A biosynthesis. Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1459-1462.
- Villa J. y Pachon J. 2011. *Acinetobacter baumannii* resistant to everything: what should we do? Clin Microbiol Infect **17**(7): 955-956.

ANEXOS

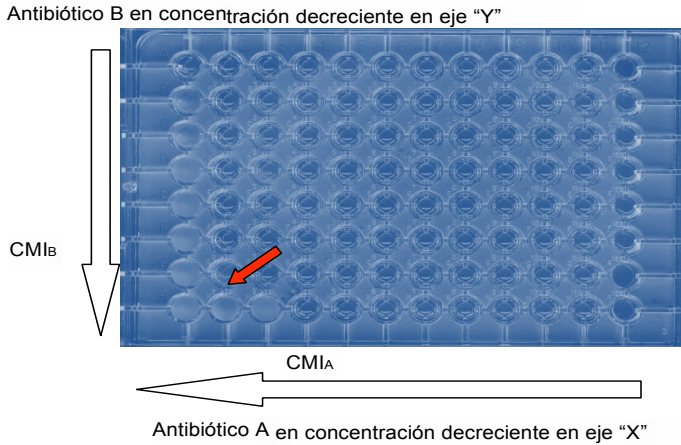


Figura 5. Fotografía de tablero de ajedrez para cálculo de índice FIC. La flecha roja corresponde a la combinación con menor concentración de ambos antibióticos que logra inhibir el crecimiento bacteriano.

RIF (µg/ml)	32	16	8	4	2	1	0.5	C	COL (µg/ml)										
32	-	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
16	-	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
8	-	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
4	+	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
2	+	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
0.5	+	-	-	-	-	-	-	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-
C	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 6: Representación de resultados de tablero de ajedrez con la combinación colistín más rifampicina sobre la cepa de *K. pneumoniae* K-870. Marcada de color amarillo los valores correspondientes a la FIC de cada antibiótico.

SAM (µg/ml)											
256/128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128/64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64/32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32/16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16/8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
		COL (µg/ml)									

Figura 7: Representación de resultados de tablero de ajedrez con la combinación colistín más ampicilina/sulbactam sobre la cepa de *A. baumannii* A-394. Marcada de color amarillo los valores correspondientes a la FIC de cada antibiótico

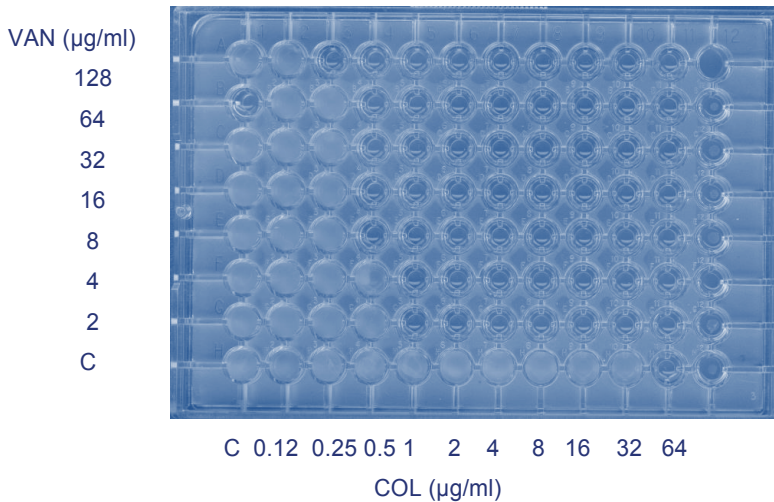


Figura 8: Fotografía de tablero de ajedrez de la combinación COL-VAN sobre la cepa de *A. baumannii* A-346. Inhibición con la combinación de VAN/COL en concentraciones de 8/0,5 µg/ml, respectivamente. C: control de crecimiento