

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



Evaluación de la actividad *in vitro* de la combinación de rifampicina y tigeciclina con imipenem, amikacina y colistín en cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* multi- o panresistentes.

MARÍA VICTORIA MORENO LÓPEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS MENCIÓN FARMACOLOGÍA.

Director de Tesis: Prof. MARÍA TERESA ULLOA FLORES

2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la (el) candidata(o)

María Victoria Moreno López

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias médicas y biológicas con mención en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 07 de noviembre de 2012.

**Prof. Dr.(a) María Teresa Ulloa Flores
Director(a) de Tesis
Programa de Microbiología y Micología, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Diego Bustamante Cádiz

Prof. Dr. Alberto Fica Cubillos

Prof. Dr. Juan Diego Maya Arango

**Prof. Dra María Eugenia Pinto Claude
Presidente Comisión**

Agradecimientos

Estoy en deuda con María Teresa Ulloa, por acogerme en su laboratorio, donde además de aprender y analizar rigurosamente técnicas de laboratorio y sus resultados, tuve la oportunidad de conocer amigos (Marce, Eta, Luisa, Lina, Harold, Jorge y muchos otros...), quienes fueron parte fundamental de mi aprendizaje y a quienes debo la compañía que me hizo lograr soportar largos días de trabajo.

Especial agradecimiento debo hacer a Luisa Nuñez por su constante preocupación y por su compañía, también a Harold Nuñez, Marcela Molina y Lina María Rivas, quién se incorporó más tarde al laboratorio pero que siempre tuvo la disposición a darme su ayuda.

Debo decir gracias al profesor German Hermosilla, quién también me ayudó muchas veces a aclarar mis dudas y, agradecer a la comisión por sus críticas constructivas y sugerencias que mejoraron la versión final de mi tesis.

Por último, agradecer a Sandro Bruni por su paciencia y por darme todo su apoyo cuando más lo necesité.

INDICE		Página
RESUMEN		5
ABSTRACT		6
INTRODUCCIÓN		7
REVISION BIBLIOGRÁFICA		8
HIPÓTESIS		16
OBJETIVOS		
Objetivo general		16
Objetivos específicos		16
DISEÑO DEL ESTUDIO		17
MATERIALES Y MÉTODOS		17
Muestras microbiológicas		17
Antibióticos		19
Definiciones		19
Evaluación del efecto sinérgico de rifampicina y tigeciclina en combinación con otros antimicrobianos y el efecto bactericida de esta sinergia		20
Método tablero de ajedrez		21
Preparación de las placas de microdilución para tablero de ajedrez		22
Curva de cinética de letalidad o muerte bacteriana		24
Procedimiento cinética de muerte		25
Estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a rifampicina y tigeciclina.		26
Rifampicina:	Detección del integrón clase 1 y el gen de resistencia a rifampicina <i>arr-2</i>	26
	Detección integrón clase 1	26
	Detección del <i>cassette arr-2</i>	27
Tigeciclina:	Detección de la bomba de eflujo AdeABC	28
	Técnica de difusión en agar	29
	Técnica de dilución en agar	29
Estudio de susceptibilidad antimicrobiana y de concentración inhibitoria mínima (CIM)		30
Microdilución en caldo		30
	Preparación de las placas de microdilución	31
E-test		32
Técnica de <i>Kirby- Bauer</i>		32

RESULTADOS	34
Evaluación del efecto sinérgico de rifampicina y tigeciclina en combinación con otros antimicrobianos y el efecto bactericida de esta sinergia	34
Método de damero	
Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín en cepas <i>P. aeruginosa</i>	35
Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín en cepas <i>A. baumannii</i>	36
Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la combinación de tigeciclina/rifampicina, tigeciclina/imipenem, tigeciclina/colistín y tigeciclina/amikacina en cepas <i>A. baumannii</i>	37
Curva de cinética de muerte bacteriana	
Rifampicina en combinación con imipenem y colistín	38
Gráficos cinética de muerte	40
Determinación de los mecanismos moleculares de la resistencia a rifampicina y tigeciclina en cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> multi- resistente.	45
Detección de integrón clase 1 mediante PCR	45
Detección del <i>cassette arr-2</i> mediante PCR	47
Evaluación de la presencia de la bomba de eflujo AdeABC mediante la utilización de un protón- ionóforo (CCCP)	48
Correlación de los resultados del estudio de susceptibilidad con los mecanismos de resistencia en estas cepas	49
Identificación de un método accesible para el estudio de la susceptibilidad en BGN no fermentadores multi- o panresistentes	50
Determinación de la CIM de rifampicina y tigeciclina por microdilución en caldo	50
Evaluación de la CIM de rifampicina y tigeciclina por E-test	51
Evaluación de la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina mediante técnica de Kirby- Bauer	52
Correlación de los valores obtenidos con E-test y técnica de Kirby- Bauer con la CIM determinada por microdilución en caldo	53
Comparación de resultados de susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina con las tres técnicas según categorización	55
DISCUSIÓN	58
RESUMEN DE RESULTADOS	72
CONCLUSIONES	73
PROYECCIONES	73

ANEXOS		74
Anexo N°1	Gráfico N°1: Perfiles de resistencia <i>P. aeruginosa</i>	74
	Gráfico N°2: Perfiles de resistencia <i>A. baumannii</i>	74
Anexo N°2	Preparación soluciones antibióticas madre	75
Anexo N°3	Preparación de diluciones intermedias de la solución madre. Método damero	75
Anexo N°4	Preparación de diluciones intermedias de la solución madre. Método microdilución en caldo	76

BIBLIOGRAFÍA		77
---------------------	--	-----------

INDICE (Tablas, Figuras y Gráficos)

TABLAS		Página
Tabla N°1	Características de los aislados de <i>P. aeruginosa</i>	18
Tabla N°2	Características de los aislados de <i>A. baumannii</i>	19
Tabla N°3	Combinaciones de antimicrobianos utilizados para estudio de sinergia	21
Tabla N°4	Partidores utilizados en PCR para detección de integrón clase 1 y <i>cassette arr-2</i>	27
Tabla N°5	Programas de PCR para detección de <i>intI1</i> y <i>arr-2</i>	28
Tabla N°6	Resultados de la evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín mediante método de damero en cepas <i>P. aeruginosa</i>	35
Tabla N°7	Correlación de los resultados de combinaciones antibióticas en cepas <i>P. aeruginosa</i> realizadas por método de damero	35
Tabla N°8	Resultados de la evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín mediante método de damero en cepas <i>A. baumannii</i>	36
Tabla N°9	Correlación de los resultados de combinaciones antibióticas en cepas <i>A. baumannii</i> realizadas por método de damero	36
Tabla N°10	Resultados de la evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la combinación de tigeciclina/rifampicina, tigeciclina/imipenem, tigeciclina/colistín y tigeciclina/amikacina mediante método de damero en cepas <i>A. baumannii</i>	37
Tabla N°11	Valores de CIM para cada antibiótico individual y en combinaciones sinérgicas para aislados de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	37
Tabla N°12	Resultados de la cinética de muerte bacteriana frente a las combinaciones sinérgicas obtenidas por método de damero	39
Tabla N°13	Resultados método de <i>screening</i> . Estudio presencia de bomba AdeABC en <i>A. baumannii</i>	48
Tabla N°14	Correlación resultados susceptibilidad a rifampicina, presencia de integrón clase 1 y <i>cassette arr-2</i> en cepas <i>P. aeruginosa</i>	49
Tabla N°15	Correlación resultados susceptibilidad a rifampicina, presencia de integrón clase 1 y <i>cassette arr-2</i> en cepas <i>A. baumannii</i>	49
Tabla N°16	Correlación resultados susceptibilidad a tigeciclina y presencia de bomba AdeABC en cepas <i>A. baumannii</i>	49
Tabla N°17	Resultados CIM rifampicina por microdilución en caldo en cepas <i>P. aeruginosa</i>	50
Tabla N°18	Resultados CIM rifampicina y tigeciclina por microdilución en caldo en cepas <i>A. baumannii</i>	50

Tabla N°19	Resultados CIM rifampicina por E-test® en cepas <i>P. aeruginosa</i>	51
Tabla N°20	Resultados CIM rifampicina y tigeciclina por E-test® en cepas <i>A. baumannii</i>	51
Tabla N°21	Resultados de susceptibilidad a rifampicina según técnica Kirby-Bauer en cepas <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabla N°22	Resultados de susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina según técnica Kirby-Bauer en cepas <i>A. baumannii</i>	52
Tabla N°23	Resultados del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo y E-test® expresados como CIM en <i>P. aeruginosa</i>	53
Tabla N°24	Resultados del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo y E-test® expresados como CIM en <i>A. baumannii</i>	54
Tabla N°25	Resultados del estudio de susceptibilidad a tigeciclina por microdilución en caldo y E-test® expresados como CIM en <i>A. baumannii</i>	54
Tabla N°26	Comparación de resultados de susceptibilidad mediante las tres técnicas según categorización en cepas <i>P. aeruginosa</i>	56
Tabla N°27	Comparación de resultados de susceptibilidad mediante las tres técnicas según categorización en cepas <i>A. baumannii</i>	56
Tabla N°28	Comparación del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar en cepas <i>P. aeruginosa</i>	56
Tabla N°29	Comparación del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar en cepas <i>A. baumannii</i>	56
Tabla N°30	Comparación del estudio de susceptibilidad a tigeciclina por microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar en cepas <i>A. baumannii</i>	57

FIGURAS

Figura N°1	Método tablero de ajedrez (damero)	
	A. Preparación placas de microdilución para método de damero	24
	B. Ejemplo de registro de CIM y FICI	24
Figura N°2	Preparación placas para microdilución en caldo	32
Figura N°3	Gráficos cinética de muerte rifampicina/imipenem en cepas <i>P. aeruginosa</i>	40
Figura N°4	Gráficos cinética de muerte rifampicina/colistín en cepas <i>P. aeruginosa</i>	41
Figura N°5	Gráficos cinética de muerte rifampicina/imipenem en cepas <i>A. baumannii</i>	42
Figura N°6	Gráficos cinética de muerte rifampicina/colistín en cepas <i>A. baumannii</i>	44
Figura N°7	Representación esquemática de integrón clase 1 que contiene el <i>cassette arr-2</i> en: A. <i>P. aeruginosa</i> y B. <i>A. baumannii</i>	45
Figura N°8 - 9	Gel de los productos de amplificación de PCR de cepas de <i>P. aeruginosa</i> después de la amplificación con el partidor <i>intI1</i> - <i>P. aeruginosa</i>	46
Figura N°10 - 11	Gel de los productos de amplificación de PCR de cepas de <i>A. baumannii</i> después de la amplificación con el partidor <i>intI1</i> - <i>A. baumannii</i>	46-47

GRAFICOS

Gráfico N°3	Coefficiente de correlación lineal MDC/ E-test® rifampicina en cepas <i>P. aeruginosa</i>	53
Gráfico N°4	Coefficiente de correlación lineal MDC/ E-test® rifampicina en cepas <i>A. baumannii</i>	54
Gráfico N°5	Coefficiente de correlación lineal MDC/ E-test® tigeciclina en cepas <i>A. baumannii</i>	54

RESUMEN

Acinetobacter baumannii y *Pseudomonas aeruginosa* son causas frecuentes de infecciones nosocomiales y presentan altas tasas de resistencia antimicrobiana. Actualmente no existe terapia óptima para las infecciones provocadas por organismos multi-resistentes; sin embargo, la combinación sinérgica de antibióticos es a menudo la alternativa en el tratamiento de infecciones severas. Estas combinaciones han sido exploradas en pacientes con infecciones nosocomiales, no obstante, solo algunas de ellas han sido evaluadas previamente *in vitro* para verificar la sinergia. En base a estos antecedentes el **objetivo** de este trabajo fue comprobar si las combinaciones *in vitro*, de rifampicina y tigeciclina con imipenem, amikacina y colistín, son sinérgicas en el tratamiento de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, incluso siendo éstas resistentes a estos fármacos. Se estudió un total de 50 cepas, 20 de *A. baumannii* y 30 de *P. aeruginosa*, en las cuales se evaluó el efecto sinérgico de las combinaciones antes mencionadas, utilizando el método de damero y curva de cinética de muerte bacteriana. Además, se determinó la presencia de enzimas modificantes asociada a integrones y bombas de eflujo, mediante RCP y el uso de protones-ionóforos respectivamente. Finalmente, se les realizó estudio de susceptibilidad por difusión en agar y determinación de CIM por microdilución en caldo y E-test®, esperando demostrar como resultado adicional que el método de evaluación de la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina ya sea por E-test® o por sensidiscos, es equivalente y reproducible respecto al método de referencia por microdilución en caldo. **Resultados:** el método de damero demostró sinergia para la combinación de rifampicina/colistín en un 53.3% de las cepas de *P. aeruginosa* y 53.3% de las cepas de *A. baumannii*. Se obtuvo sinergia en un menor porcentaje para rifampicina/imipenem. Se demostró sólo indiferencia para las combinaciones de tigeciclina con rifampicina, imipenem, colistín y amikacina. La cinética de muerte confirmó sinergia para rifampicina/colistín (96.4%) y rifampicina/imipenem (85.7%). Se demostró en la mayoría de las cepas la presencia de integrón clase 1, sin demostrarse la presencia del *cassette arr-2* y de la bomba de eflujo AdeABC. Los estudios de susceptibilidad por los distintos métodos mostraron baja correlación: entre MDC- E-test® para rifampicina en cepas de *P. aeruginosa* y entre MDC- difusión en agar para tigeciclina en cepas de *A. baumannii*. El método de difusión en agar parece una buena opción para el estudio de susceptibilidad a rifampicina en bacilos Gram negativos no fermentadores. **Conclusión:** se demostraron interacciones sinérgicas para las combinaciones de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín; no obstante, no se obtuvieron para las combinaciones de tigeciclina con otros antimicrobianos.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* are common causes of nosocomial infections and show high rates of resistance to broad-spectrum antibiotics commonly used. Currently, there is not any optimal therapy for infections caused by multi-drug resistant organisms; however, the synergistic combination of different antibiotics is often an alternative solution in the treatment of severe infections. Although these combinations have been explored in patients with nosocomial infections, only some of them have been previously evaluated in vitro to verify whether synergistic phenomena are presents. The **object** of this work is to check if in vitro combinations of rifampicin and tigecycline with imipenem, amikacin and colistin are synergistic in the treatment of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, even being they are resistant to these drugs. We studied a total of 50 strains of *A. baumannii* (20) and *P. aeruginosa* (30) to evaluate the synergistic effect of the previously described combinations using the checkerboard method and time kill assay. PCR and proton-ionophores allow us to identify the presence of modifying enzymes associated to integrons and efflux pumps, respectively. Finally, the susceptibility performed by agar diffusion and MIC determination, using both microdilution and E-test®, were determined to demonstrate if the method of evaluation of susceptibility to rifampicin by E-test® or sensitivity discs, is equivalent and reproducible compared to the reference method for broth microdilution. **Results:** Chequerboard analysis showed 53.3% synergy for the rifampicin/colistin combination in both *P. aeruginosa* and *A. baumannii* strains. Rifampicin/imipenem combination showed 26.7% synergy in the strains of *P. aeruginosa* and 20% synergy in the strains of *A. baumannii*. Indifference was observed for the tigecycline/rifampicin, tigecycline/imipenem, tigecycline/colistin and tigecycline/amikacin combinations. Time-kill assays confirmed the synergistic interaction between rifampicin and colistin (96.4%) and between rifampicin and imipenem (85.7%). Almost all strains showed the presence of class 1 integron with no-evidences of the cassette arr-2 and the efflux pump. Susceptibility studies performed by different methods showed low correlations between MDC- E-test® in susceptibility test with rifampicina in *P. aeruginosa* strains y between MDC- diffusion sensitivity test with tigecycline in *A. baumannii* strains. Agar diffusion method seems to be an ideal solution to perform a rifampicin susceptibility study in non fermentative Gram-negative bacilli. **Conclusions:** Synergistic interactions were demonstrated for combinations of rifampicin / imipenem and rifampicin / colistin; on the other hand, synergistic interactions were not obtained for combinations of tigecycline with other antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrahospitalarias por bacterias Gram negativas multi- resistentes están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad, afectando principalmente pacientes en escenarios críticos como unidades de cuidado intensivo (UCIs). Entre ellos, bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, se han convertido en causas frecuentes de infecciones nosocomiales, especialmente en las UCIs. Muchos estudios han documentado altas tasas de resistencia en estas dos especies bacterianas a antibióticos de amplio espectro, siendo a menudo susceptibles sólo a colistín. Estas bacterias expresan una variedad de mecanismos que les confieren resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos.

Actualmente, la necesidad de prevenir la expansión de infecciones bacterianas por bacilos Gram negativos se contrasta con la carencia de disponibilidad de nuevas drogas antimicrobianas que sean altamente efectivas contra cepas multi- resistentes. De esta manera, antimicrobianos en desuso, como las polimixinas, han vuelto a aparecer y se comienzan a utilizar en terapias de combinación que incluyen antimicrobianos que son sinérgicos *in vitro*. Por otra parte, rifampicina, que actualmente es usada para el tratamiento de infecciones por Gram positivos, ha sido recientemente adoptada como opción para el tratamiento de infecciones por Gram negativos multi-resistentes.

Varios antibióticos no tradicionales, tales como colistín y rifampicina, se han probado contra cepas multi- resistentes y se han determinado efectos sinérgicos para las combinaciones de estos antimicrobianos. Entre los antibióticos probados, particularmente las combinaciones con colistín parecen ser una alternativa eficaz contra bacilos Gram negativos multi-resistentes. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad *in vitro* de determinados antibióticos solos y en combinación en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi- o pan- resistentes aislados del Hospital Clínico de la Universidad de Chile en el periodo 2010-2012.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las infecciones nosocomiales son un problema frecuente y se asocian a morbilidad, aumento de los costos y letalidad atribuible. Están asociadas a microorganismos multi- o pan-resistentes que limitan seriamente las posibilidades de mejoría clínica y obligan a utilizar costosos compuestos antimicrobianos.

Las infecciones por bacilos Gram negativos ocupan un lugar central en este tipo de infecciones e involucran enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, estos últimos caracterizados por un mayor perfil de multi-resistencia y numerosas ocasiones como bacterias pan-resistentes, es decir sin ninguna alternativa registrada actualmente en Chile para su manejo. El ámbito de infecciones por estos microorganismos es relevante ya que participan en bacteriemias, neumonía asociada a ventilación mecánica, infección del sitio quirúrgico e infecciones del sistema nervioso central asociadas a drenajes ventriculares.

Resultados de un programa de vigilancia internacional SENTRY, que recopiló datos de cuatro regiones geográficas (Norteamérica, Latinoamérica, Europa y Asia) durante los años 2006-2009, muestra como los porcentajes de aislados de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos de primera línea supera el 50%, siendo susceptibles sobre un 98% sólo a polimixinas. Distinto, pero no menos relevante, es el escenario para los aislados de *A. baumannii*, que presentan un 20% de cepas resistentes para antibióticos usados de primera línea. (Gales *et al.*, 2011)

La emergencia de bacilos Gram negativos multi- o pan-resistentes es un fenómeno progresivo que se ha concentrado especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCIs) de la región Metropolitana. En Chile, los informes de vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias (IIH) del MINSAL de los años 2005 y 2007, presentan a *P. aeruginosa* y *A. baumannii* como importantes agentes de infecciones del tracto urinario asociadas a catéter urinario permanente (ITU-CUP), neumonías asociadas a ventilación mecánica (NAVM) e infecciones del torrente sanguíneo asociado a CVC (ITS-CVC). Dentro de estos datos, *P. aeruginosa* presenta un aumento en su prevalencia, como agente causal de ITU-CAP del año 2005 al 2007, de un 31% a un 49.9% respectivamente, también se observa un aumento para los casos de NAVM, de un 18.3% a un 22.4%. *A. baumannii* se presenta en ambos informes

como el principal agente de NAVM en el 30% de los casos y también como causa de ITS-CVC en un porcentaje relevante (10.9%) y con escasa tendencia a la disminución. (Informe de vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias, MINSAL 2005- 2007).

En el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, la frecuencia de aislados de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* pan- resistentes ha aumentado en forma constante desde el año 2004 (Fica *et al.*, 2007). Los resultados de la vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana en Chile del año 2009, en el cual participaron 14 centros de las regiones de Tarapacá, Valparaíso, Metropolitana y Bío-Bío, destaca que el porcentaje de cepas de *P. aeruginosa* susceptibles a antimicrobianos comúnmente usados no supera el 80%, excepto para colistín. En el caso de las cepas de *A. baumannii* se observa que para todos los antimicrobianos de primera línea el porcentaje de susceptibilidad *in vitro* en pacientes hospitalizados es inferior al 70%. (Silva *et al.*, 2011)

La multi- resistencia a antimicrobianos es muy frecuente en estas especies lo que complica su erradicación y su terapéutica en infecciones graves, identificándose aislados resistentes a prácticamente todos los antimicrobianos comercialmente disponibles, limitando extremadamente las alternativas terapéuticas. En la última década, se ha dado atención substancial al desarrollo de antimicrobianos para combatir cocáceas Gram positivas, mientras que la búsqueda de antimicrobianos para uso en infecciones causadas por bacilos Gram negativos ha sido postergada (El Solh *et al.*, 2009). Desde hace dos décadas, debido a la falta de opciones terapéuticas para organismos multi- o pan- resistentes, las combinaciones de antibióticos constituyen una práctica común en el tratamiento empírico inicial de las infecciones graves, basándose en su superioridad o mayor efectividad sobre el tratamiento con un solo agente antimicrobiano (monoterapia). Los fundamentos de su utilización tienen su base en la búsqueda de combinaciones sinérgicas, que resulten en un efecto significativamente mayor que a la actividad que resulta de la suma de cada antibiótico por si solo (Eliopoulos *et al.*, 1982; López-Fabal *et al.*, 2008). Mediante su uso se espera: 1) incrementar la actividad bactericida y la rapidez de la lisis bacteriana; 2) prevenir el desarrollo de resistencias bacterianas durante el tratamiento y simultáneamente suprimir la amplificación de subpoblaciones de organismos menos susceptibles; 3) aumentar la actividad antimicrobiana en pacientes de alto riesgo (inmunodeprimidos), hasta que los agentes etiológicos son aislados e identificados (Louie *et al.*, 2010). En los escenarios clínicos, la terapia de combinación es a

menudo administrada empíricamente sin el uso de datos de sinergia *in vitro*, ya que existe una carencia de datos clínicos para correlacionar los resultados de los estudios de sinergia *in vitro* con el resultado en los pacientes (Petersen *et al.*, 2006).

Existe evidencia que apoya el uso de la terapia combinada empírica ante la sospecha de infección por bacilos Gram negativos no fermentadores, como lo muestra un metaanálisis de Safdar *et al.* (2004), en el cual las bacteriemias por *P. aeruginosa* muestran un beneficio significativo en cuanto a reducir la mortalidad, recomendándose el uso de la terapia combinada en el contexto de infecciones severas. Otros estudios, evidencian que el uso de una adecuada terapia de combinación antimicrobiana como tratamiento empírico hasta la recepción del antibiograma, se ha asociado con mejores tasas de supervivencia que el uso de monoterapia. (Chamot *et al.*, 2003; Heyland *et al.*, 2008).

El manejo de las infecciones nosocomiales por bacilos Gram negativos no fermentadores pan- resistentes en Chile, generalmente depende de la importación de colistín endovenoso, una droga de alto costo, no exenta de toxicidad renal y sin una evaluación rigurosa de su eficacia clínica (Levin *et al.*, 1999; Fernandez-Viladrich *et al.*, 1999; Garnacho-Markou *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2004; Linden *et al.*, 2003; Falagas *et al.*, 2005- 2006; Michalopoulos *et al.*, 2005; Berlana *et al.*, 2005). El blanco de la actividad antimicrobiana de colistín es la alteración de la membrana celular, a través de una interacción electrostática entre el polipéptido catiónico (colistín) y la molécula de lipopolisacárido (LPS) aniónico en la membrana externa, desplazando el magnesio (Mg^{2+}) y el calcio (Ca^{2+}) que normalmente estabilizan las moléculas de LPS, resultando en un incremento en la permeabilidad celular (Falagas *et al.*, 2005).

El costo diario de tratamiento con esta droga supera los 60.000 pesos y habitualmente los pacientes son tratados por 10 o más días. Una evaluación reciente determinó que el porcentaje de respuesta favorable con colistín fue de sólo un 50% en 24 cursos de tratamiento y que la respuesta fue significativamente inferior en el grupo asociado a neumonía, la infección más frecuente en tratamiento (Fica *et al.*, 2007). Esta respuesta desfavorable podría ser atribuida a varios factores, entre ellos, al uso de dosis bajas para lograr un efecto terapéutico, asociado a la forma farmacéutica disponible en Chile, otro factor asociado estaría ligado a las bajas concentraciones tisulares en la pleura o en el parénquima pulmonar reportadas para este compuesto (al igual que en tejido óseo y SNC) y el uso de una terapia

dirigida por los resultados de los cultivos y no sobre bases empíricas, que podrían haber limitado el éxito terapéutico, ya que la demora perjudica al paciente al no cubrir en los momentos iniciales a los microorganismos involucrados (Fica *et al.*, 2007). Estos datos refuerzan el concepto de que la emergencia de estos microorganismos limita seriamente la posibilidad de mejoría en estos pacientes.

La terapia de combinación de colistín más rifampicina, que ha resultado ser sinérgica en estudios *in vitro*, ha sido usada en algunos pacientes con neumonía debido a *P. aeruginosa* multi-resistente. Sin embargo, la evidencia limitada de estudios clínicos, sugiere que esta combinación no fue superior a colistín como monoterapia (El Solh *et al.*, 2009). Otros agentes antimicrobianos, han sido usados *in vivo* en combinación con colistín, incluyendo imipenem, meropenem, aztreonam, piperacilina, ceftazidima y ciprofloxacino, pero ninguno de estos regímenes muestra una mejoría en los resultados de los estudios clínicos (El Solh *et al.*, 2009). Por ahora, el uso empírico de colistín en todos los casos de infecciones nosocomiales es poco probable, debido al limitado éxito terapéutico y a las grandes dificultades que implica importar un medicamento no disponible comercialmente en Chile.

Una alternativa a la importación de colistín, es la utilización sinérgica de rifampicina asociada a imipenem u otros compuestos. Rifampicina actúa inhibiendo la RNA polimerasa en células bacterianas, la enzima responsable para la transcripción del DNA, formando un complejo enzima-droga estable, evitando la subsecuente traducción a proteínas. (Drapeau *et al.*, 2010). Trabajos *in vitro* e *in vivo* de Zuravleff y Valdés, que datan de los años 1983- 1990, muestran una actividad sinérgica de la rifampicina con aminoglucósidos y agentes β -lactámicos contra *P. aeruginosa* (Xiong *et al.*, 1996). Korvick *et al.*, 1992 demostró la eficacia del uso de rifampicina al agregarlo a una terapia estándar para *P. aeruginosa* consistente de un β -lactámico más un aminoglucósido. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que las combinaciones de compuestos carbapenémicos con aminoglucósidos, polimixinas y/o rifampicina permiten en ocasiones una acción sinérgica en curvas de cinética de muerte bacteriana sobre aislados de *A. baumannii*. Ello ocurre a pesar de que las cepas sean resistentes a los carbapenémicos o rifampicina (Yoon *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2004). Las implicancias de la terapia de combinación, han sido exploradas en un modelo animal de neumonía, demostrando una mayor reducción en la carga microbiana en el tejido pulmonar mediante combinaciones específicas de antimicrobianos (Montero *et al.*, 2004). Algunos de

ellos al utilizar la combinación de rifampicina más imipenem ó sulbactan obtuvieron buenos resultados en eficacia contra *A. baumannii* multi-resistente (Pachón-Ibañez *et al.*, 2010). Las combinaciones de imipenem con tobramicina fueron las más eficaces en casos de cepas con resistencia de baja magnitud a imipenem, pero con susceptibilidad intermedia a tobramicina. En caso de cepas con alto nivel de resistencia a imipenem, la combinación de este compuesto con rifampicina resultó más ventajosa (Montero *et al.*, 2004). Sin embargo, la combinación de rifampicina con colistín también permitió una reducción del recuento bacteriano pulmonar en estas cepas altamente resistentes, aunque de menor magnitud respecto al uso de las combinaciones de carbapenémicos con tobramicina o rifampicina. Estas combinaciones han sido exploradas en pacientes con infecciones nosocomiales. Por ejemplo, en una serie de 14 pacientes tratados con colistín y rifampicina, Petrosillo *et al.* (2005), describe una respuesta favorable en el 50% de casos de neumonía asociada a VM, algunos de ellos tratados además con sulbactam-ampicilina. Sin embargo, esta estrategia no ha sido evaluada en forma randomizada ni en estudios de tipo caso-control y dependen de una evaluación previa de si un fenómeno sinérgico está presente en algunas combinaciones de compuestos contra bacilos pan- resistentes. En particular, resulta de interés analizar este fenómeno frente a combinaciones de compuestos que inhiben la síntesis proteica (aminoglucósidos o rifampicina), con compuestos que inhiben la síntesis de la pared (carbapenémicos) o con efecto detergente sobre la membrana celular (colistín sulfato).

En la actualidad, son pocos los estudios acerca de la terapia de combinación de rifampicina con otros agentes. Aunque es una droga de bajo costo (120 pesos diarios) y que está disponible en Chile, tiene la desventaja que la metodología estándar para el estudio de la susceptibilidad de bacilos Gram negativos a rifampicina (microdilución en caldo), es engorroso y poco aplicable a nivel asistencial. Investigar si se puede contar con un sistema confiable, rápido y menos engorroso, es de gran relevancia en nuestro medio para facilitar la toma de decisiones terapéuticas. Tanto el método de susceptibilidad por sensidiscos (*Kirby Bauer*) como por cintas de E-test® ofrecen estas ventajas y deben ser evaluadas.

El reciente advenimiento y registro de tigeciclina en Chile no soluciona los problemas de tratamiento de las infecciones nosocomiales por cepas pan- resistentes, ya que no tiene actividad contra *P. aeruginosa* y también por la emergencia de cepas resistentes en otras especies, poco después de su introducción. (Livermore *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2007). La

tigeciclina, es un derivado 9-glicilamido de la minociclina, es el primer miembro de la clase glicilciclina de antibióticos para uso clínico. Actúa evitando la traducción (biosíntesis proteica) a través de una interacción reversible con la subunidad 30S ribosomal, bloqueando la incorporación del ARN de transferencia en el sitio aceptor del ribosoma. Su actividad no se ve afectada por los dos principales mecanismos de resistencia a la tetraciclina, incluyendo las bombas de eflujo y factores determinantes que proporcionan protección ribosomal (Entenza *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2006). En la determinación de la susceptibilidad, existe muy buena correlación entre la microdilución en caldo y el E-Test®; sin embargo, presenta dificultades al utilizar la técnica de difusión por disco, existiendo una sobreestimación de resistencia *in vitro* (García *et al.*, 2009).

Cepas *A. baumannii* resistentes a todos los antimicrobianos, excepto a las polimixinas han incrementado su prevalencia como patógeno intrahospitalario (Diomedi *et al.*, 2005), especialmente en neumonía y bacteriemia en pacientes hospitalizados. La mortalidad asociada a tales infecciones es alta, con una tasa de mortalidad en casos de bacteriemia de un 52% y en neumonía entre un 23% y 73% (Diomedi *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2007; Opazo *et al.*, 2009). Investigaciones previas revelan que tigeciclina es bacteriostático contra *A. baumannii* multi-resistente, pero terapias de combinación con tigeciclina no han sido suficientemente evaluadas *in vitro*. En algunos de los escasos estudios realizados de combinaciones de tigeciclina con otros antibióticos no se ha demostrado sinergia, sólo respuestas indiferentes en su gran mayoría (Scheetz *et al.*, 2007; Vouillamoz *et al.*, 2007). En contraste, otros han obtenido interacciones sinérgicas en las combinaciones de tigeciclina con amikacina ó imipenem (Petersen *et al.*, 2006; Moland *et al.*, 2008; Sopirala *et al.*, 2010). Más estudios son necesarios para aclarar estas diferencias en los resultados.

Para realizar los estudios de sinergia *in vitro*, a pesar de que no existe un consenso en cuanto a cual es el mejor método, el ensayo más utilizado es el método de titulación en damero/tablero de ajedrez; sin embargo, este método a menudo es usado sólo como prueba de *screening*. El método de damero tiene como desventaja medir sólo efectos bacteriostáticos y en algunas situaciones es poco reproducible. De esta manera, las pruebas de sinergia determinadas en base a la cinética de muerte bacteriana son usadas para confirmar los resultados del método de damero, como un protocolo estándar en varios laboratorios (Petersen *et al.*, 2006).

Las ventajas potenciales de las combinaciones antimicrobianas podrían estar limitadas por la aparición de resistencia debida fundamentalmente al uso masivo de los antimicrobianos y selección de clones que presentan esta característica. Actualmente, se sabe que esta multi-resistencia puede estar relacionada en gran medida a la presencia de integrones, que se definen como elementos genéticos que pueden albergar *cassettes* génicos que confieren resistencia contra diferentes antimicrobianos. Los integrones codifican una recombinasa de sitio específico que captura y expresa *cassettes* génicos. De acuerdo con la naturaleza de esta recombinasa ó integrasa, se han descrito cuatro clases de integrones en bacterias Gram negativas. La existencia de estos elementos genéticos favorece una rápida diseminación de la resistencia en cepas que son sometidas a una fuerte presión selectiva, como sucede en el ambiente intrahospitalario. Mecanismos de resistencia recientemente descritos, tales como los genes modificantes de rifampicina que incrementan la CIM para este antibiótico, pueden obstaculizar su participación en combinaciones sinérgicas. (Tribuddharat *et al.*, 1999; Houang *et al.*, 2003). De acuerdo a González *et al.* (2004), las cepas de *A. baumannii* aisladas desde hospitales chilenos que poseen integrones presentaron los perfiles de resistencia más amplios (Gootz *et al.*, 2008; Opazo *et al.*, 2009).

Otro de los mecanismos involucrados en resistencia antibiótica es la presencia y expresión de bombas de expulsión en bacilos Gram negativos. A finales de la década de 1980 se descubrieron los primeros sistemas de expulsión activa en bacterias Gram negativas y Gram positivas, denominados bombas multidrogas, una serie de transportadores cuya importancia radica en que poseen un amplio rango de sustratos, por lo que son capaces de contribuir en la resistencia a una gran cantidad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente, y por ello se clasifican como sistemas multidrogas inespecíficos (Opazo *et al.*, 2009). De acuerdo a Vila *et al.* (2007), el principal grupo de bombas de eflujo multidrogas involucrados en la multi-resistencia a antimicrobianos en *A. baumannii* pertenecen a la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*). En el 2001, se identificó en una cepa *A. baumannii* multi-resistente, una bomba de expulsión perteneciente a esta familia, denominada AdeABC, que está constituida por una proteína de fusión de membrana (AdeA), una proteína transportadora multidroga (AdeB) y una proteína de membrana externa (AdeC) (Magnet *et al.*, 2001), la cual en el año 2006 y en estudios posteriores, se asoció a la resistencia a tige ciclina en cepas *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2007; Gootz *et al.*, 2008). En los últimos años se ha asociado esta

bomba en la contribución a la resistencia frente a varias clases de antimicrobianos, entre los que se encuentran tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, cefotaxima, gentamicina, kanamicina, carbapenémicos como el meropenem y la tigeciclina como se indicó anteriormente (Houang *et al.*, 2008; Gootz *et al.*, 2008; Opazo *et al.*, 2009).

Una de las dificultades adicionales para el estudio de terapias de combinación de antibióticos que son plausibles de evaluar, como rifampicina y tigeciclina es que para estos antimicrobianos aún no ha sido validada una técnica confiable para el estudio de susceptibilidad *in vitro*. Para rifampicina, no se han establecido puntos de corte para bacilos Gram negativos no fermentadores, debido a que es un antibiótico utilizado en el tratamiento de infecciones por Gram positivos y sólo recientemente se está evaluando su eficacia en terapias de combinación para infecciones por Gram negativos multi- o panresistentes.

En el caso de la tigeciclina, se han descrito puntos de corte aprobados por la FDA para casi todas las especies bacterianas por el método de microdilución en caldo. Para *Enterobacteriaceae* en general, se entiende como sensible una CIM < 2 µg/ml, intermedia una CIM de 4 µg/ml y resistente la CIM ≥ 8 µg/ml, siendo estos valores utilizados para categorizar la susceptibilidad en aislados de *A. baumannii*. Sin embargo, la aplicación de estos puntos de corte en *A. baumannii* ha mostrado una tasa inaceptable de errores menores en comparación con el método de microdilución en caldo.

Considerando los antecedentes expuestos: 1) altas tasas de resistencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* a antibióticos de amplio espectro, 2) ausencia de una terapia óptima para infecciones provocadas por organismos multi-resistentes y 3) uso de combinaciones sinérgicas de diferentes antibióticos como alternativa en el tratamiento de infecciones severas, pero sólo algunas de ellas evaluadas previamente *in vitro*, el propósito de este estudio fue evaluar *in vitro* combinaciones de rifampicina y tigeciclina con otros antibióticos, para ser utilizados como potenciales tratamientos para el manejo de infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas multi- o pan-resistentes. En consecuencia se planteó la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS. La combinación *in vitro*, de rifampicina y tigeciclina con carbapenémicos, aminoglucósidos y polimixinas como imipenem, amikacina y colistín respectivamente, es sinérgica en el tratamiento de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, incluso siendo éstas resistentes a estos fármacos por separado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL. Determinar la actividad *in vitro* de la combinación de rifampicina y tigeciclina con carbapenémicos, aminoglucósidos y polimixinas como imipenem, amikacina y colistín respectivamente, en cepas multi- o pan- resistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, en el periodo 2010-2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Evaluar el efecto sinérgico de rifampicina y tigeciclina en combinación con otros antimicrobianos y el efecto bactericida de esta sinergia.**
 - 1.1. Evaluar in vitro en tableros de ajedrez (damero) la interacción de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín en cepas de P. aeruginosa y A. baumannii y evaluar la interacción de la combinación de tigeciclina/rifampicina, tigeciclina/imipenem, tigeciclina/colistín y tigeciclina/amikacina en cepas de A. baumannii. El cálculo de este efecto se realiza mediante concentración inhibitoria fraccional (FICI) (Isenberg et al., 2007).*
 - 1.2. Determinar la curva de cinética de muerte bacteriana a rifampicina y tigeciclina en forma aislada y en combinación con amikacina, imipenem o colistín.*
- 2. Determinar los mecanismos moleculares de la resistencia a rifampicina y tigeciclina en cepas de P. aeruginosa y A. baumannii multi- resistente.**
 - 2.1. Detectar en cepas de A. baumannii y P. aeruginosa resistentes a rifampicina la presencia y tipo de integrón y el gen ADP-ribosiltransferasa (arr-2) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, según sus siglas en inglés)*

- 2.2. *Evaluar la presencia de la bomba de eflujo AdeABC en cepas de A. baumannii multi-resistentes, mediante la utilización de un protón-ionóforo CCCP como inhibidor del sistema de expulsión.*
3. **Identificar un método accesible para el estudio de la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina en Bacilos Gram negativo no fermentadores multi- o pan- resistentes asociados a infecciones nosocomiales.**
- 3.1. *Determinar la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina mediante la prueba de microdilución en caldo en 20 cepas de A. baumannii y 30 cepas de P. aeruginosa multi- resistentes identificados en infecciones nosocomiales en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.*
- 3.2. *Evaluar la CIM de rifampicina en cepas de P. aeruginosa y de rifampicina y tigeciclina en cepas de A. baumannii mediante cintas de E-test®.*
- 3.3. *Evaluar la susceptibilidad a rifampicina en cepas de P. aeruginosa y de rifampicina y tigeciclina en cepas de A. baumannii mediante la técnica de Kirby-Bauer (difusión en agar).*
- 3.4. *Correlacionar los valores obtenidos con la técnica de E-test® y Kirby-Bauer con los valores de la CIM determinados por microdilución en caldo (método de referencia), para seleccionar el método más confiable, determinando al mismo tiempo sus limitaciones.*

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un proyecto de investigación básica *in vitro*. No hay seres humanos involucrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras microbiológicas.

Se recolectó un total de 99 cepas de *P. aeruginosa* y 34 cepas de *A. baumannii*, de las cuales ingresaron a este estudio: 30 cepas de *P. aeruginosa* y 20 cepas de *A. baumannii* aislados en muestras de pacientes atendidos en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, recolectadas durante el 2010, 2011 y 2012, que cumplen con el criterio de aislado multi- o pan- resistente. Se incluyó sólo una cepa por paciente y para cada una de ellas se registró sitio

de origen, fecha de aislamiento y perfil de resistencia (**Tabla N° 1 y 2**). Las cepas fueron identificadas mediante tinción Gram, pruebas bioquímicas como catalasa y oxidasa y también mediante el API 20NE (bioMérieux®). Las cepas se clasificaron en distintas categorías antibióticas, según si fueron resistentes a 3, 4 o 5 familias de antimicrobianos. En los aislados de *P. aeruginosa*, se observó resistencia a 3 categorías antibióticas (53.4%) y a 4 categorías antibióticas (46.7%). Para los aislados de *A. baumannii*, se reportó resistencia a 3 categorías antibióticas (15%), 4 categorías antibióticas (20%) y a 5 categorías antibióticas (65%) (**Anexo N° 1: Gráfico 1 y 2**).

Tabla N° 1. Características de los aislados de *P. aeruginosa*.

Cepa	Origen (fecha aislamiento)	Perfil de resistencia*
P4	Secreción-Aspirado endotraqueal (05/2010)	MEM FEP CIP AMK
P8	Sangre (05/2010)	IPM CAZ FEP CIP AMK
P19	Sangre (05/2010)	IPM MEM FEP CIP
P26	Secreción-Aspirado endotraqueal (05/2011)	IPM MEM CAZ CIP
P28	Orina (05/2011)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P34	Secreción herida operatoria (05/2011)	IPM MEM FEP CIP
P40	Secreción-Aspirado endotraqueal (05/2011)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P41	Secreción-Aspirado endotraqueal (05/2011)	IPM MEM FEP CIP AMK
P51	Orina (06/2011)	MEM CAZ FEP CIP
P53	Orina (07/2011)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P54	Orina (07/2011)	FEP CIP AMK
P55	Secreción-Aspirado endotraqueal (07/2011)	IPM MEM FEP CIP AMK
P56	Orina (07/2011)	IPM MEM CAZ FEP CIP
P57	Secreción-Aspirado endotraqueal (08/2011)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P62	Secreción-Aspirado endotraqueal (08/2011)	IPM MEM CAZ CIP
P65	Orina (08/2011)	MEM CAZ CIP
P74	Secreción-Aspirado endotraqueal (10/2011)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P75	Orina (12/2011)	IPM MEM CIP AMK
P77	Orina (12/2011)	MEM CAZ FEP CIP
P79	Orina (01/2012)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P80	Secreción-Aspirado endotraqueal (01/2012)	IPM MEM CAZ CIP
P82	Orina (02/2012)	IPM MEM CIP AMK
P83	Orina (02/2012)	IPM MEM CAZ CIP AMK
P84	Orina (03/2012)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P89	Orina (03/2012)	IPM MEM CAZ FEP CIP
P93	Secreción- Drenaje (05/2012)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
P95	Secreción (05/2012)	IPM MEM CAZ FEP CIP
P97	Secreción-Aspirado endotraqueal (06/2012)	IPM MEM FEP CIP
P98	Orina ambulatoria (06/2012)	CAZ CIP AMK
P99	Secreción- Lavado broncoalveolar (06/2012)	IPM MEM FEP CIP AMK

Abreviaturas. **IPM:** Imipenem; **MEM:** Meropenem; **CAZ:**Ceftazidima
FEP: Cefepime; **CIP:** Ciprofloxacino; **AMK:** Amikacina.

Tabla N° 2. Características de los aislados de *A. baumannii*.

Cepa	Origen (fecha aislamiento)	Perfil de resistencia*
A2	Secreción-Aspirado endotraqueal (04/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A3	Secreción-Aspirado endotraqueal (03/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A4	Secreción herida (04/2010)	MEM CAZ FEP SAM CIP
A8	Secreción-Aspirado endotraqueal (03/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A9	Tejido muslo derecho (03/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A12	Líquido cefalorraquídeo (05/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A13	Orina (03/2010)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
A14	Secreción herida (06/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A15	Secreción-Aspirado endotraqueal (06/2010)	IPM MEM CAZ FEP CIP AMK
A17	Secreción-Lavado broncoalveolar (06/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A18	Secreción-Aspirado endotraqueal (04/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A19	Secreción bronqueal (06/2010)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A20	Secreción-Aspirado endotraqueal (04/2011)	CAZ FEP CIP AMK
A22	Secreción-Lavado broncoalveolar (05/2011)	IPM MEM FEP SAM CIP AMK
A23	Secreción-Aspirado endotraqueal (05/2011)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A24	Secreción herida inguinal der. (05/2011)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK
A26	Secreción-Aspirado endotraqueal (05/2011)	CAZ FEP CIP AMK
A27	Orina (05/2011)	CAZ FEP CIP AMK
A32	Sangre (12/2011)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP
A33	Secreción herida operatoria (01/2012)	IPM MEM CAZ FEP SAM CIP AMK

Abreviaturas. **IPM:** Imipenem; **MEM:** Meropenem; **CAZ:**Ceftazidima; **SAM:** Ampicilina/Sulbactam
FEP: Cefepime; **CIP:** Ciprofloxacino; **AMK:** Amikacina.

Antibióticos. Este estudio se realizó empleando las siguientes drogas puras estándar: Rifampicina (Laboratorio Chile® Santiago, Chile), Tigeciclina (Pfizer® Santiago, Chile), Imipenem (Merck Sharp & Dohme®, casa matriz New Jersey, U.S.A), Amikacina (Sigma-Aldrich®) y Colistín (Sigma-Aldrich®). La preparación de las soluciones madre fueron realizadas según indicaciones del CLSI 2012.

Siembra. Las cepas fueron sembradas en una placa Petri que contenía agar sangre (Becton Dickinson®) y se incubaron a 37°C por 18 horas. Las cepas se cosecharon y se preparó una suspensión bacteriana en 1 ml de caldo *Brain Heart infusion* (Oxoid®) más 15% de glicerol v/v, la cual se congeló a -20°C hasta su estudio.

Definiciones.

Cepas. Se consideró:

***A. baumannii* multi- resistente:** cepa resistente al menos a dos de las siguientes cinco clases de antimicrobianos: cefalosporinas antipseudomonales (ceftazidima, cefepime), carbapenémicos, ampicilina/sulbactam, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Guía APIC-

Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Washington, DC, 2010)

A. baumannii pan- resistentes: cepas que son resistentes a todos los β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas y que regularmente son sólo susceptibles a polimixinas como colistín (Diomedi *et al.*, 2005; Gootz *et al.*, 2008).

P. aeruginosa multi- resistente: cepa resistente al menos a tres drogas de las siguientes categorías antibióticas: cefalosporinas de tercera generación (con o sin inhibidores de β -lactamasa), quinolonas, aminoglucósido o carbapenémicos.

P. aeruginosa pan- resistente: cepas con resistencia a todas las alternativas registradas en Chile pudiendo retener susceptibilidad a colistín, sulfas, u otro compuesto experimental. En especial las cepas pan- resistentes deberán incluir simultáneamente resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas de 3^a generación con o sin inhibidores de β -lactamasas, quinolonas y aminoglucósidos. (Falagas *et al.*, 2006; Fica *et al.*, 2007).

Sinergia. Efecto de dos antimicrobianos combinados es mayor que la suma de las acciones de cada uno: $(A + B) > (A) + (B)$.

1.- Evaluación del efecto sinérgico de rifampicina y tigeciclina en combinación con otros antimicrobianos y el efecto bactericida de esta sinergia.

Para el estudio de sinergia se seleccionaron 15 cepas de *A. baumannii* y 15 cepas de *P. aeruginosa*. Las combinaciones de antibióticos (**Tabla N° 3**) fueron evaluadas mediante el método de tablero de ajedrez y cinética de muerte bacteriana según técnica descrita por Isenberg *et al.*, 2007, realizándose el análisis por duplicado. La selección de antibióticos se basó en combinaciones de antibióticos que difieren en el mecanismo y/o sitios blanco de acción. Uno de los fármacos causa cambios en la superficie bacteriana (colistín/imipenem), permitiendo una mayor penetración de la segunda droga, la cual actuaría inhibiendo la síntesis proteica (rifampicina/tigeciclina). La combinación de tigeciclina con rifampicina, se fundamenta en que aunque ambos inhiben la síntesis de proteínas actúan en sitios blanco diferentes. La combinación de tigeciclina más amikacina fue una excepción, ya que ambos poseen el mismo mecanismo de acción y ambos se unen a la subunidad 30S ribosomal, pero la

tigeciclina se une con una mayor afinidad a este sitio blanco, debido a la presencia de un glicilamido- en el carbono 1 del anillo D.

Tabla N° 3. Combinaciones de antimicrobianos utilizados para estudio de sinergia.

<i>Acinetobacter baumannii</i> (15 cepas)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (15 cepas)
Rifampicina/Imipenem	Rifampicina/Imipenem
Rifampicina/Colistín	Rifampicina/Colistín
<i>Acinetobacter baumannii</i> (10 cepas)	
Tigeciclina/Rifampicina	
Tigeciclina/Imipenem	
Tigeciclina/Colistín	
Tigeciclina/Amikacina	

Se utilizaron cepas con diferentes valores de CIM para rifampicina y tigeciclina incluyendo cepas resistentes. Los ensayos de cinética de muerte se prepararon con las combinaciones antibióticas que resultaron ser sinérgicas o aditivas por el método de damero.

1.1.- Método tablero de ajedrez (Método de damero).

El efecto sinérgico de rifampicina y tigeciclina en combinaciones con otros compuestos se evaluó *in vitro* mediante técnica del tablero de ajedrez (damero) con concentraciones crecientes de rifampicina y tigeciclina en un eje y de la droga acompañante en el otro eje en microplacas apropiadas. Se calculó la FICI (índice de concentración inhibitoria fraccional) de acuerdo a fórmulas estandarizadas para determinar si la combinación es sinérgica, indiferente ó antagónica (Eliopoulos *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2004). Se utilizó un panel personalizado de placas de microdilución de 96 pozos en la que se efectuaron múltiples diluciones de los antimicrobianos solos y en combinación. Las CIMs de las drogas son determinados usando la técnica de microdilución en caldo de acuerdo con las recomendaciones del CLSI, 2012.

1.1.a.- Medios y reactivos.

- Caldo *Mueller-Hinton* catión ajustado (*Mueller Hinton II Broth Cation-Adjusted; CAMHB*, según sus siglas en inglés) distribuido en matraces de 250 ml, que fueron almacenados a 2 - 8 °C.

- Agua destilada estéril con *Tween* 80 al 0.02% distribuido en alícuotas de 25 ml dentro de tubos con tapa rosca. Almacenaje a 25°C.
- Placas con agar sangre. Almacenaje a 2 -8°C.
- NaCl 0.9% estéril.

1.1.b.- Control.

Cepas control. Para los antimicrobianos testeados las cepas control utilizadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Control de crecimiento (100 µl CAMHB + inóculo). Debe mostrar turbidez.

Control del inóculo. Recuento de colonias en placas. Se diluyeron 10 µl del pozo de control de crecimiento en 10 ml de NaCl 0.9%, sembrando posteriormente 100 µl de esta dilución en una placa de agar sangre. Un inóculo de 5×10^5 UFC/ml debe presentar entre 30- 70 colonias.

Control de pureza. Usando un asa calibrada, se transfirió 1 µl del inóculo del control de crecimiento a una placa de agar sangre. La placa de pureza debe mostrar sólo crecimiento de la cepa en estudio.

Control esterilidad (100 µl CAMHB). Debe estar libre de cualquier crecimiento.

1.1.c.- Preparación de las placas de microdilución para tablero de ajedrez. Se determinó la CIM para cada aislado testado y se prepararon las soluciones antibióticas madre (**Anexo N° 2**) y las diluciones intermedias de los antibióticos (**Anexo N°3**). Se distribuyeron los volúmenes adecuados en el eje -x e -y de la microplaca de combinación: (i) en el eje X se colocaron 50 µl de las diluciones del antimicrobiano A en un rango de 4 a 8 veces y de 1/8 a 1/16 veces la CIM, para observar la ocurrencia y magnitud del sinergismo o antagonismo. Estas diluciones pueden incrementarse si se considera necesario o existe la posibilidad de que exista antagonismo. (ii) en el eje Y se colocaron 50 µl de las mismas diluciones para el antimicrobiano B, de forma que la primera casilla correspondió a 0 x CIM de los dos antimicrobianos. De esta manera quedaron representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones de los dos antimicrobianos, además de un control de crecimiento (CC) y de esterilidad (CE) como lo muestra la **Figura N° 1.A**.

Para la preparación del inóculo, se transfirieron 4 a 5 colonias de morfología similar a 5 ml de CAMHB. Se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta lograr una turbidez de 0.5 McFarland (1.5×10^8

UFC/ml). Para preparar la dilución del inóculo intermedio, se adicionó 0.8 ml de la suspensión a 25 ml de agua con *Tween* 80 (dilución 1:31) obteniéndose un inóculo de 4×10^6 a 5×10^6 UFC/ml. A partir de esta dilución, se inoculó 10 μ l en cada pozo mediante una pipeta multicanal, obteniéndose un inóculo final de 4×10^4 a 5×10^4 UFC/pozo (4×10^5 a 5×10^5 UFC/ml).

Las placas se incubaron 16 a 20 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera normal. La lectura se realizó visualmente y la turbidez en los pozos indicó crecimiento de los microorganismos. Primero, se examinó el control de pureza, las placas de recuento, el pozo de control de crecimiento, que debe mostrar turbidez y el pozo de esterilidad, que no debe presentar turbidez. Se registró la CIM y los pozos donde no hubo turbidez y se calculó el índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI) a partir de la suma de las fracciones de las concentraciones inhibitorias de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{FICI} = \frac{\text{CIM antibiótico A combinado}}{\text{CIM antibiótico A solo}} + \frac{\text{CIM antibiótico B combinado}}{\text{CIM antibiótico B solo}}$$

Los resultados obtenidos fueron categorizados de la siguiente forma: **Sinérgico**, $\text{FICI} \leq 0.5$; **Indiferente**, $0.5 < \text{FICI} \leq 4$; **Antagónico**, $\text{FICI} > 4$ (**Figura 1.B.**).

Sinergia se ha definido como una reducción de cuatro veces la CIM de ambos antibióticos en combinación, en comparación con cada uno por separado, midiendo el índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI) (Isenberg *et al.*, 2007)

A

		Antibiótico A (µg/ml)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Antibiótico B (µg/ml)	A	CC									CIM		
	B	2									IND		
	C	4									IND		
	D	8						SIN	SIN				
	E	16					SIN	SIN					
	F	32		IND	IND	IND							
	G	64	CIM										
	H	128											CE

CIM: Concentración inhibitoria mínima.

CC: Control de crecimiento; CE: Control de esterilidad.

SIN: Sinergia; IND: Indiferencia.

B.- Registro de concentración inhibitoria mínima (CIM) e índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI)

Pozo sin desarrollo bacteriano	Antibiótico A		Antibiótico B		FICI =	Interpretación
	Conc. (ug/ml)	*FIC antibiótico A	Conc. (ug/ml)	*FIC antibiótico B	FIC de A + FIC de B	
A10	128	CIM de A	0	CIM de A	CIM de A	CIM de A
B10	128	1	1	0.03	1.03	IND
C9	64	0.5	2	0.06	0.56	IND
D8	32	0.25	4	0.125	0.375	SIN
D7	16	0.125	4	0.125	0.25	SIN
E6	8	0.06	8	0.25	0.31	SIN
E5	4	0.03	8	0.25	0.28	SIN
F4	2	0.016	16	0.5	0.516	IND
F3	1	0.008	16	0.5	0.508	IND
F2	0.5	0.004	16	0.5	0.504	IND
G1	0	CIM de B	32	CIM de B	CIM de B	CIM de B

Figura N° 1. Método tablero de ajedrez (damero) **A.-** Preparación placas de microdilución para método de damero y **B.-** Ejemplo de registro de concentración inhibitoria mínima (CIM) e índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI).

1.2.- Curva de cinética de letalidad o muerte bacteriana.

Todas las interacciones sinérgicas obtenidas del análisis del método de tablero de ajedrez, se evaluaron mediante la técnica de cinética de muerte (Príncipe *et al.*, 2009). Debido a que con la técnica de damero se puede evaluar el efecto inhibitorio sinérgico, pero no el efecto bactericida de rifampicina y tigeciclina en combinación con otras drogas, se complementó el estudio con una evaluación directa del efecto bactericida de rifampicina y tigeciclina, determinándose la curva de cinética de muerte bacteriana de rifampicina y tigeciclina en forma aislada y en combinación con las mismas drogas testeadas previamente.

1.2.a.- Control.

Cepas control. Para los antimicrobianos testeados las cepas control utilizadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Control de crecimiento. Tubos con 9.9 ml de μ l CAMHB + 100 μ l del inóculo.

Control del inóculo. Recuento de colonias en placas.

Control de pureza. Usando un asa calibrada, se inoculó una placa de agar sangre, subcultivando 1 μ l de la suspensión estándar 1.0 McFarland. La placa de pureza debe sólo desarrollo del microorganismo en estudio.

1.2.b.- Procedimiento cinética de muerte. Para la preparación de las diluciones intermedias del antibiótico, se diluyó la solución madre en agua destilada estéril, de manera que la concentración obtenida fuera 100 veces la concentración más alta que sería testada. Por ejemplo, si la concentración deseada era de 1 μ g/ml y la solución madre tenía una concentración de 1280 μ g/ml, se realizó una dilución 1:12 (0.25 ml en 2.75 ml de agua) para obtener una concentración de 100 μ g/ml. Luego, se distribuyó 100 μ l de la dilución intermedia en 9.9 ml de CAMHB, lográndose una concentración final de 1 μ g/ml. Para las combinaciones, se distribuyeron 9.8 ml de CAMHB + 100 μ l del antimicrobiano A 100 veces concentrado + 100 μ l del antimicrobiano B 100 veces concentrado en tubos estériles.

Para obtener un inóculo con crecimiento en fase logarítmica, se transfirieron 4 a 5 colonias de morfología similar a 5 ml de CAMHB obteniéndose una suspensión equivalente a una turbidez 0.5 McFarland. Se transfirieron 100 μ l de la suspensión a 5 ml de CAMHB y se incubó en un agitador a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta lograr una turbidez visible. Luego, con NaCl 0.9% se ajustó la suspensión a una turbidez de 1.0 McFarland (3.0×10^8 UFC/ml) y se realizó una dilución 1:5 de la suspensión estandarizada, adicionando 1 ml de la suspensión a 4 ml de CAMHB para obtener un inóculo de 6×10^7 UFC/ml, del cual se colocaron 100 μ l en los tubos con el antibiótico sólo y en combinación, obteniéndose una densidad final de 6×10^5 UFC/ml.

Los tubos y la placa de pureza fueron incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera normal. Alícuotas de 100 μ l de cada tubo fueron removidas al tiempo 0, 4, 8 y 24 horas post-inoculación y diluidas en serie en 900 μ l de NaCl 0.9% para la determinación de recuentos viables. Muestras diluidas (100 μ l) fueron sembradas en duplicado sobre placas de agar sangre

y los recuentos bacterianos fueron determinados luego de 18 horas de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Se incubaron los tubos inmediatamente después de obtener las alícuotas.

El análisis de los datos y gráficos se realizó utilizando el *software* Graphpad Prisma 5. El \log_{10} UFC/ml bacteriano total fue determinado después de 24 h de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. **Sinergia** fue definida como una disminución $\geq 2 \log_{10}$ en UFC/ml en el recuento de colonias a las 4- 8- 24 h con la combinación antimicrobiana comparado con el fármaco más activo por separado. **Antagonismo** fue definido como un aumento $\geq 2 \log_{10}$ en UFC/ml en el recuento de colonias a las 4- 8- 24 h con la combinación antimicrobiana comparado con el fármaco más activo por separado. **Indiferencia** fue definida como un aumento ó disminución $< 2 \log_{10}$ en UFC/ml en el recuento de colonias a las 4- 8- 24 h con la combinación antimicrobiana comparado con el fármaco más activo por separado. El **efecto bactericida** fue definido como el tiempo transcurrido para una caída de $3 \log_{10}$ de la carga bacteriana inicial. ($10 \text{ UFC/ml} = 1 \log_{10} \text{ UFC/ml}$)

2.-Estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a rifampicina y tigeciclina.

2.1.- Rifampicina: Detección del integrón clase 1 y el gen de resistencia a rifampicina *arr-2*.
En la totalidad de las cepas (50 cepas), se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, según sus siglas en inglés) la presencia del integrón clase 1 que se ha asociado al gen que codifica para la enzima modificante de rifampicina ADP-ribosiltransferasa (*arr-2*) (Houang *et al.*, 2003; Tribuddharat *et al.*, 1999)

2.1.a.- Partidores.

Detección de integrón clase 1. Para las cepas de *A. baumannii* se utilizó un par de partidores que detectan un fragmento de 160 pb de la integrasa clase 1 descritos por Koeleman *et al.*, 2001 y para *P. aeruginosa* se utilizó un par de partidores que detectan un fragmento de 457 pb descritos por Yousefi *et al.*, 2010 (**Tabla 4.A.**). Se utilizó como control positivo de amplificación DNA de integrón clase 1 de *Shigella sonnei*.

Detección del gen cassette arr-2. Para su estudio se utilizó dos pares de partidores, de los cuales uno detectó un fragmento de 1.182 pb del integrón clase 1 en las cepas de *A. baumannii*, que corresponde a una región conservada llamada 5'CS, en conjunto con el gen *cassette arr-2* descritos por Houang *et al.*, 2003 y para cepas de *P. aeruginosa* se realizó el diseño de los partidores con el programa Primer 3 a partir de la secuencia nucleotídica disponible en la base de datos de GenBank, cuyo acceso corresponde al N° AF078527 descrita en un trabajo de Tribuddharat *et al.*, 1999. Este partidore detecta un fragmento de 543 pb, que corresponde al gen *cassette arr-2* en conjunto con una región conservada de éste llamado región 59 bases (**Tabla N°4.B.**) .

Tabla N°4. Partidores utilizados en PCR para detección de integrón clase I y *cassette arr-2*.

A.- Detección Integrón clase I

Gen	Partidor 5'-3'	Tamaño	Referencia
<i>IntI- 1 A. baumannii</i>	CAG TTG ACA TAA GCC TGT TC CCC GAG GCA TAG ACT GTA	160 pb	Koeleman <i>et al.</i> , 2001
<i>IntI-1 P. aeruginosa</i>	GGT GTG GCG GGC TTC GTG GCA TCC TCG GTT TTC TGG	457 pb	Yousefi <i>et al.</i> , 2010

B.- Detección cassette arr -2

Gen	Partidor 5'-3'	Tamaño	Referencia
5'CS- <i>arr-2 A. baumannii</i> (25 pmoles)	CAT CCA AGC AGC AAG CGC GTT A ACC CCG CTT TCT CGT AGC AT	1.182 pb	Houang <i>et al.</i> , 2003
59bp- <i>arr-2 P. aeruginosa</i>	GCC TAA CAA TTC GTC CAA G ACG GCG CTT TAA GTC CTC	543 pb	Tribuddharat <i>et al.</i> , 1999

La mezcla de reacción para la PCR fue la siguiente:

Reactivo	Cantidad
Buffer 5 X	10 µl
MgCl ₂ 25 mM	6 µl
dNTP 1 mM	1 µl
Partidor <i>Forward</i> 20/25 pmoles	1 µl
Partidor <i>Reverse</i> 20/25 pmoles	1 µl
Taq DNA Polimerasa 5U/µl	0,2 µl
DNA blanco	1 µl
H ₂ O destilada	29,8 µl
Volumen final	50 µl

La extracción del ADN se obtuvo al calentar a 100°C por 15 minutos, 200µl de suspensión bacteriana de un cultivo *overnight* (ON). Tras la ebullición, se centrifugó por tres minutos a 13.000 rpm y se utilizó el sobrenadante.

La amplificación se realizó en el termociclador (*Thermo Electron Corporation*), utilizando uno de los siguientes programas según el fragmento a amplificar (**Tabla N°5**).

Tabla N°5. Programas de PCR para detección de *intl 1* y *arr-2*.

Gen <i>intl 1 A. baumannii</i>	Gen <i>intl 1 P. aeruginosa</i>	Gen 5'CS- <i>arr-2 A. baumannii</i>	Gen 59 bp- <i>arr-2 P. aeruginosa</i>
1 ciclo 95° x 4 min.	1 ciclo 95° x 4 min	1 ciclo 94° x 2 min.	1 ciclo 94° x 2 min.
94° x 30 seg.	94° x 60 seg.	94° x 1 min.	94° x 1 min.
35 ciclos 55° x 30 seg.	35 ciclos 62° x 60 seg.	35 ciclos 55° x 1 min.	35 ciclos 56° x 1 min.
72° x 30 seg.	72° x 45 seg	72° x 1 min.	72° x 1 min.
1 ciclo 72° x 7 min.	1 ciclo 72° x 7 min.	1 ciclo 72° x 3 min.	1 ciclo 72° x 3 min.

Los productos de la amplificación se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizándose como indicador de tamaño del amplicón un marcador de 100 bp (BioLab®) y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Espectroline, Mod TUC-312R), después de haber sido teñido con bromuro de etidio. Los resultados obtenidos se registraron en fotografías (Kodak, Sistema EDAS 290, Software Kodak 1 D3-6) para su análisis. (Ramírez *et al.*, 2000; Houang *et al.*, 2003; Moraga *et al.*, 2007).

Los productos amplificados fueron purificados usando el *kit* comercial QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN®, según instrucciones de manufactura y secuenciados en *Macrogen* (Korea). El análisis de las secuencias se realizó mediante el *software* Clustal W (*online*)

2.2.- Tigeciclina. Detección de la bomba de eflujo AdeABC. Para determinar la importancia de la bomba AdeABC en la resistencia a tigeciclina se estudió la presencia de los sistemas de bomba de expulsión en las 20 cepas de *A. baumannii* con sensibilidad intermedia y sensible a tigeciclina (Microdilución en caldo), mediante el uso de un inhibidor de bomba llamado carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Estas moléculas corresponden a un protón ionóforo que depolariza la membrana citoplasmática produciendo la interrupción del gradiente de protones en la membrana, por lo cual los antimicrobianos no pueden ser expulsados por la bomba AdeABC. Si la presencia del protón-ionóforo produce la disminución de a lo menos 4 veces la CIM del antimicrobiano se considera que existe una contribución del mecanismo de expulsión en la resistencia al agente antibacteriano. (Opazo *et al.*, 2009). Para realizar este estudio se efectuaron dos métodos fenotípicos.

2.2.a.- Técnica de difusión en agar. Se utilizó como un método de *screening* para determinar la presencia del sistema de bomba de expulsión AdeABC a las 20 cepas de *A. baumannii*.

La solución madre de CCCP se preparó disolviendo 10.23 mg del polvo en 3 ml de metanol y 2 ml de agua, que resultó en una solución final a una concentración de 10 mM (Webber et al., 2010; Peleg *et al.*, 2007). Discos blancos fueron embebidos con 10 μ l de esta solución.

La preparación del inóculo se realizó mediante método de suspensión directa de colonias, transfiriendo 4 a 5 colonias con un asa y ajustando el inóculo a una turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Se inocularon las placas de agar *Mueller-Hinton*, deslizando la tórula por la superficie del agar tres veces y se colocó un disco de tigeciclina (15 μ g/ml) y un disco con CCCP a una distancia de 2 cm y en una segunda placa se colocó un disco de tigeciclina sólo como control. Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera normal por 16 a 18 horas. Si el sistema de bomba se encuentra implicado en la resistencia a tigeciclina se potencia el halo de inhibición del disco antibiótico por la presencia del CCCP, favoreciendo la actividad del antibiótico.

2.2.b.- Técnica de dilución en agar. La solución madre de CCCP se preparó disolviendo 13 mg del polvo en 3 ml de metanol y 2 ml de agua, que resultó en una solución final a una concentración de 12.5 mM.

La CIM de tigeciclina de las cepas de *A. baumannii* se ubicaron en un rango entre 0.5 y 4 μ g/ml. A partir de una solución madre de tigeciclina a 1280 μ g/ml, se prepararon diluciones seriadas de manera de obtener concentraciones del antibiótico a 16; 8; 4; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 μ g/ml.

Se prepararon dos sets de placas de agar *Mueller-Hinton* (MH) en duplicado:

- Set 1: 9 placas en duplicado que contenían 25 ml de agar MH con 0.5 ml de antibiótico en concentraciones crecientes de 0.065 μ g/ml a 16 μ g/ml.
- Set 2: 9 placas en duplicado que contenían 25 ml de agar MH + 0.5 ml de antibiótico en concentraciones crecientes + 25 μ l de CCCP a una concentración de 12.5 mM.

La preparación del inóculo se realizó mediante método de suspensión directa de colonias y las placas se inocularon mediante el uso de un replicador, que tomó 1 μ l de cada suspensión bacteriana. Tras una incubación en atmósfera normal a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 h, se leyó la CIM de

cada cepa en estudio, comparando la CIM en las cepas sembradas en agar con antibiótico con las cepas sembradas en presencia de inhibidor. Una disminución de al menos 4 veces la CIM del antimicrobiano indica la presencia de bomba.

3.- Estudio de susceptibilidad antimicrobiana y de concentración inhibitoria mínima (CIM).

Se evaluó la totalidad de las cepas de *A. baumannii* (20) y *P. aeruginosa* (30), considerándose como técnica de referencia la prueba de microdilución en caldo y como técnicas de comparación la evaluación de la susceptibilidad mediante la técnica de *Kirby-Bauer* (antibiograma convencional) y la evaluación mediante cintas de E-test®.

3.1.- Microdilución en caldo (MDC). Se determinó la CIM de rifampicina y tigeciclina, como también la CIM de imipenem, amikacina y colistín. Debido a la carencia de puntos de corte establecidos por el CLSI para bacilos Gram negativos no fermentadores para la evaluación de rifampicina, se consideró una CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ como resistente, según un informe de trabajo de la BSAC (*The British Society for Antimicrobial Chemotherapy*)

El nivel de corte para resistencia a colistín para cepas de *P. aeruginosa* es una CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, y para cepas de *A. baumannii* es una CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$, de acuerdo con los criterios del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute, 2012*). La categoría de interpretación de susceptible, intermedio o resistente para tigeciclina se aplicó usando los puntos de corte de interpretación de la FDA (*Food and Drug Administration*) para *Enterobacteriaceae*. (FDA website <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/021821s0101bl.pdf>), según el cual, resistente corresponde a una CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, susceptibilidad intermedia una CIM = 4 $\mu\text{g/ml}$ y sensible una CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$. Los puntos de corte de la FDA fueron aplicados debido a la carencia de puntos de corte establecidos por el CLSI para tigeciclina (García *et al.*, 2009, Pillar *et al.*, 2008, Sopirala *et al.*, 2010).

3.1.a.- Control.

Cepas control. Para los antimicrobianos testeados las cepas control utilizadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Control de crecimiento (100 μl CAHMB + inóculo). Debe mostrar turbidez.

Control de pureza. Para realizar el control de pureza del inóculo, se toma una asada de la suspensión del pozo con el cultivo del control de crecimiento o del reservorio del inóculo, y se procede a realizar un subcultivo en una placa de agar sangre. La placa de pureza debe mostrar sólo el microorganismo en estudio.

Control esterilidad (100 µl CAHMB + antibiótico). Ausencia de turbidez.

Control del inóculo. Placa de conteo de verificación. Se diluyó 10 µl del tubo o del pozo de control positivo en 10 ml de NaCl 0.9%, sembrando posteriormente 100 µl de esta dilución en un medio sólido. Un inóculo de 5×10^5 UFC/ml debe mostrar 50 colonias en la placa de agar sangre, aproximadamente.

3.1.b.- Preparación de las placas de microdilución. Se utilizó placas de microdilución (Santa Cruz ®) de 96 pozos (12 x 8), que se disponen para estudiar con cada una de ellas 6 cepas más la cepa control y 11 diluciones del antibiótico (**Anexo N°4**). La última columna (12) se utilizó como control de crecimiento y la última fila (H) como control de esterilidad (**Figura N°2**). El volumen final de cada pozo fue de 100 µl de CAMHB con antimicrobiano, utilizándose un volumen de inóculo 5 µl.

Se preparó el inóculo mediante método de suspensión directa de colonias, ajustándose la turbidez a 0.5 McFarland (1×10^8 a 2×10^8 UFC/ml). A partir de esta suspensión, se realizó una dilución 1:10 y se empleó un inóculo de 5 µl, que al incorporarlo a los 100 µl del pozo, permitió obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/ml ó 5×10^4 UFC/pozo.

Las placas de microdilución y placas de recuento se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16 a 20 horas en atmósfera normal, mientras que el control de pureza se incubó en 3-5% de CO₂. Para evitar diferencias de temperatura de incubación se apiló hasta cuatro placas y se evitó la deshidratación colocando un sello plástico sobre la placa.

Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados. Antes de la lectura, se examinó el control de crecimiento, control de esterilidad y control de pureza. En el caso de los pozos de control de crecimiento, deben presentar una marcada turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro (crecimiento de 3+ a 4+), lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de CIM. La **CIM** se definió como la menor concentración de antibiótico que por observación directa, inhibió completamente el crecimiento del microorganismo estudiado.

		Antibiótico A (µg/ml)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cepas y control ATCC	A												
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H	Controles de esterilidad											
		Controles de crecimiento											

Figura N°2. Preparación placas para microdilución en caldo.

3.2.- E-test®. Se evaluó la CIM de rifampicina y tigeciclina mediante cintas de E-test® en placas de agar *Mueller-Hinton*. Para obtener la CIM, se realizó una suspensión bacteriana con NaCl 0.9% y se ajustó la turbidez a 0.5 McFarland. Posteriormente se sembró en una placa con agar *Mueller-Hinton* con tórula y en 3 sentidos. Una vez inoculada la placa de agar con el microorganismo, se colocó la tira de E-test® sobre su superficie, la cual consiste en una tira de material sintético que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. En el caso del E-test® de rifampicina (bioMérieux ®) va desde 0.002 µg/ml hasta 32 µg/ml y el E-test® de tigeciclina (bioMérieux®) va desde 0.016 µg/ml hasta 256 µg/ml. Se depositó una tira por placa y se incubó inmediatamente a temperatura de 35 ± 2°C en atmósfera normal por 18 a 20 horas. Después de una adecuada incubación, el punto de la CIM fue leído donde la elipse de inhibición interceptó el gradiente de CIM de la tira de E-test®. La categoría de interpretación de susceptible, intermedio o resistente para tigeciclina se aplicó usando los puntos de corte de interpretación utilizados en el método de microdilución en caldo.

En este estudio, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, fueron usados como cepas control de acuerdo al CLSI, 2012.

3.3- Técnica de Kirby- Bauer. Se evaluó en la totalidad de las cepas la susceptibilidad de los aislados a rifampicina y tigeciclina, corroborando también la resistencia a carbapenémicos, aminoglucósidos y a colistín. Dado que no hay puntos de corte para rifampicina se registró el halo de inhibición en mm y la interpretación de susceptibilidad recomendada para Gram positivos ($S \geq 21$ mm y $R \leq 16$ mm) según CLSI 2012 y para tigeciclina, se siguió los puntos de corte recomendados por la FDA ($S \geq 19$ mm y $R \leq 14$ mm), dado que actualmente no hay

valores de corte para este antibiótico (García et al., 2009). La técnica e interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con lo establecido por el CLSI 2012.

La preparación del inóculo, se realizó mediante método de suspensión directa de colonias en NaCl 0.9% para lograr una turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Posteriormente se sembró en una placa con agar *Mueller-Hinton* con tórula y en 3 sentidos. Los discos fueron colocados, empleando no más de 6 discos por placa. Finalmente las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmósfera normal por 16 a 18 horas.

RESULTADOS

Evaluación del efecto sinérgico de rifampicina y tigeciclina en combinación con otros antimicrobianos y el efecto bactericida de esta sinergia.

Evaluación in vitro en tableros de ajedrez (damero) de la interacción de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín en 15 cepas de P. aeruginosa y en 15 cepas de A. baumannii y evaluación de la interacción de la combinación de tigeciclina/rifampicina, tigeciclina/imipenem, tigeciclina/colistín y tigeciclina/amikacina en 10 cepas de A. baumannii.

Los resultados del estudio de sinergia por método de damero, demostró interacción sinérgica para la combinación de rifampicina/imipenem en 4/15 (26.7%) e indiferencia en 11/15 (73.3%) de las cepas de *P. aeruginosa* (**Tabla N°6 y 7**). En 3/15 (20%) cepas de *A. baumannii*, esta combinación fue sinérgica y en 12/15 (80%) fue indiferente (**Tabla N°8 y 9**).

Se obtuvo combinaciones sinérgicas para rifampicina/colistín en 8/15 (53.3%) e indiferencia en 7/15 (46.7%) de las cepas de *P. aeruginosa* (**Tabla N°6 y 7**). En 8/15 (53.3%) aislados de *A. baumannii*, esta combinación fue sinérgica y en 7/15 (46.7%) fue indiferente (**Tabla N°8 y 9**). No se observó interacciones antagónicas para estas combinaciones.

Para las combinaciones de tigeciclina con rifampicina, imipenem, colistín y amikacina en cepas *A. baumannii*, se demostró en 10/10 (100%) indiferencia (**Tabla N°10**).

Tabla N°6. Resultados de la evaluación de la actividad *in vitro* de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina /colistín mediante el método de damero en cepas *P. aeruginosa*.

CEPA	Rifampicina/Imipenem		Rifampicina/Colistín	
	Categorización	FICI	Categorización	FICI
P4	Indiferente	(0.75-1.1)	Sinérgico	0.4
P8	Sinérgico	0.5	Sinérgico	0.5
P28	Indiferente	(0.8-1.1)	Indiferente	(0.8-1.25)
P40	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(0.56-1.1)
P41	Indiferente	(0.75-1.1)	Sinérgico	0.5
P51	Indiferente	(0.6-1.1)	Sinérgico	0.4/0.5
P53	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(0.56-1.1)
P54	Indiferente	(0.51-1.25)	Indiferente	(0.51-1.25)
P55	Sinérgico	0.5	Sinérgico	0.5
P56	Indiferente	(0.75-1.1)	Sinérgico	0.4/0.5
P57	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(1-1.25)
P62	Indiferente	(0.75-1.1)	Indiferente	(0.56-1.25)
P74	Indiferente	(0.51-1.25)	Indiferente	(0.56-0.75)
P77	Sinérgico	0.5	Sinérgico	0.3/0.4/0.5
P79	Sinérgico	0.5	Sinérgico	0.3/0.5

Categorización según índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI).

*Sinérgico FICI ≤ 0.5

*Indiferente FICI > 0.5 y FICI ≤ 4

*Antagónico FICI > 4

Tabla N°7. Correlación de los resultados de combinaciones antibióticas en cepas *P. aeruginosa* realizadas por método de damero.

	Método de damero		
	Rifampicina/imipenem	Rifampicina/colistín	Total
Sinergia	4	8	12
Indiferencia	11	7	18
Antagonismo	0	0	0
Total	15	15	30

Tabla N° 8. Resultados de la evaluación de la actividad *in vitro* de la combinación de rifampicina/imipenem y rifampicina /colistín mediante el método de damero en cepas *A. baumannii*.

CEPA	Rifampicina/Imipenem		Rifampicina/Colistín	
	Categorización	FICI	Categorización	FICI
A3	Indiferente	(0.56-2.1)	Sinérgico	0.5
A12	Indiferente	(1.1-1.5)	Sinérgico	0.5
A13	Indiferente	(1.1-2.25)	Sinérgico	0.5
A14	Indiferente	(0.56-2.25)	Sinérgico	0.3/0.4/0.5
A15	Sinérgico	0.5	Indiferente	(0.75-1.1)
A17	Indiferente	(0.6-2.1)	Sinérgico	0.4/0.5
A18	Indiferente	(0.52-1.1)	Sinérgico	0.4/0.5
A19	Sinérgico	0.5	Indiferente	(0.51-1.25)
A20	Indiferente	(1.06-1.5)	Sinérgico	0.4/0.5
A22	Sinérgico	0.5	Indiferente	(0.56-0.75)
A24	Indiferente	(0.8-1.13)	Indiferente	(1-1.25)
A26	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(0.6-1.25)
A27	Indiferente	(0.56-1.13)	Indiferente	(0.6-1.12)
A32	Indiferente	(0.56-1.13)	Indiferente	(0.6-1.25)
A33	Indiferente	(0.6-1.07)	Sinérgico	0.3/0.38/0.5

Categorización según índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI).

*Sinérgico FICI ≤ 0.5

*Indiferente FICI > 0.5 y FICI ≤ 4

*Antagónico FICI > 4

Tabla N° 9. Correlación de los resultados de combinaciones antibióticas en cepas *A. baumannii* realizadas por método de damero.

	Método de damero		
	Rifampicina/imipenem	Rifampicina/colistín	Total
Sinergia	3	8	12
Indiferencia	12	7	18
Antagonismo	0	0	0
Total	15	15	30

Tabla N° 10. Resultados de la evaluación de la actividad *in vitro* de la combinación de tigeciclina/rifampicina, tigeciclina/imipenem, tigeciclina/colistín y tigeciclina/amikacina mediante el método del damero en cepas *A. baumannii*.

CEPA	Tigeciclina/rifampicina		Tigeciclina/imipenem		Tigeciclina/colistín		Tigeciclina/amikacina	
	Categorización	FICI	Categorización	FICI	Categorización	FICI	Categorización	FICI
A3	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(0.8-1.1)	Indiferente	(0.6-1.1)	Indiferente	(0.53-2.3)
A12	Indiferente	(0.8-1.25)	Indiferente	(0.6-1.5)	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(0.8-1.3)
A13	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(0.53-1.25)	Indiferente	(1-2.1)	Indiferente	(1-1.3)
A14	Indiferente	(0.6-1.1)	Indiferente	(0.6-1.1)	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(0.53-1.5)
A15	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(0.53-1.5)	Indiferente	(1-2.25)	Indiferente	(1-1.5)
A17	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(1-1.25)
A18	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(1-2.5)	Indiferente	(0.6-1.25)	Indiferente	(0.56-2.3)
A19	Indiferente	(0.75-1.1)	Indiferente	(0.53-1.25)	Indiferente	(0.6-1.25)	Indiferente	(0.53-1.5)
A20	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(0.8-1.25)	Indiferente	(0.75-2.1)
A26	Indiferente	(1-1.25)	Indiferente	(1-1.3)	Indiferente	(1-1.5)	Indiferente	(1-4)

Categorización según índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI).

*Sinérgico FICI ≤ 0.5

*Indiferente FICI > 0.5 y FICI ≤ 4

*Antagónico FICI > 4

A continuación se muestran los valores de CIM para cada antibiótico individual y en las combinaciones sinérgicas de los aislados estudiados. La CIM obtenida en las combinaciones sinérgicas fue una disminución de al menos 4 veces la CIM de los antibióticos por separado (**Tabla N° 11**).

Tabla N° 11. Valores de CIM para cada antibiótico individual y en combinaciones sinérgicas para aislados de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Cepas	RIF	IPM	RIF/IPM	Disminución CIM		Cepas	RIF	CL	RIF/CL	Disminución CIM	
	CIM (ug/ml)	CIM (ug/ml)	CIM (ug/ml)	RIF	IMP		CIM (ug/ml)	CIM (ug/ml)	CIM (ug/ml)	RIF	CL
<i>P. aeruginosa</i>						<i>P. aeruginosa</i>					
P8	32	64	8/16	4x	4x	P4	64	2	16/0.5	4x	4x
P55	64	64	16/16	4x	4x	P8	64	2	16/0.5	4x	4x
P77	64	2	16/0.5	4x	4x	P41	16	2	4/0.5	4x	4x
P79	64	32	16/8	4x	4x	P51	64	2	(16/0.5)(8/0.5)	4x/8x	4x
						P55	64	1	16/0.25	4x	4x
						P56	32	2	8/0.25	4x	8x
						P77	64	2	(8/0.5)(4/0.5)(2/0.5)	8x/16x/32x	4x
						P79	64	2	(16/0.5)(16/0.25)	4x	4x/8x
<i>A. baumannii</i>						<i>A. baumannii</i>					
A15	8	32	2/8	4x	4x	A3	8	0.5	2/0.125	4x	4x
A19	128	64	32/16	4x	4x	A12	8	0.125	2/0.031	4x	4x
A22	16	64	4/16	4x	4x	A13	8	0.125	2/0.031	4x	4x
						A14	8	0.5	(2/0.125)(1/0.125)(0.5/0.125)	4x/8x/16x	4x
						A17	8	0.25	(1/0.0625)(0.5/0.0625)	8x/16x	4x
						A18	4	0.125	1/0.031	4x	4x
						A20	32	2	(8/0.5)(4/0.5)	4x/8x	4x
						A33	64	1	(16/0.25)(8/0.25)(4/0.25)	4x/8x/16x	4x

Abreviaturas. RIF: rifampicina; IPM: imipenem; CL: colistín.

Determinación de la curva de cinética de muerte bacteriana de rifampicina en forma aislada y en combinación con imipenem y colistín.

Todas las interacciones sinérgicas que resultaron del método de damero, fueron reevaluados por cinética de muerte con rifampicina en combinación con imipenem y colistín. Se estudió un total de 19 cepas y 35 combinaciones antibióticas, de las cuales 7 correspondieron a rifampicina/imipenem (20%) y 28 a rifampicina/colistín (80%).

Para la combinación de rifampicina/imipenem, en cepas de *P. aeruginosa* 4/4 (100%) resultó sinérgico y en cepas de *A. baumannii* 2/3 (66.7%) resultó sinérgico y 1/3 (33.3%) resultó indiferente (4-8 h) y antagónico (24 h).

Los resultados para la combinación de rifampicina/colistín en cepas de *P. aeruginosa*, muestran 12/12 (100%) combinaciones sinérgicas. En *A. baumannii*, 15/16 (93.8%) fueron sinérgicas y 1/16 (6.3%) indiferente.

Para la combinación de rifampicina/imipenem, en 5/7 (71.4%) combinaciones, hubo efecto bactericida, dos logradas a las 4 h y dos a las 8h, sin embargo en 2/5 (40%) hubo recrecimiento a las 24 horas. Al analizar la combinación de rifampicina/colistín, en 21/28 (75%) combinaciones hubo efecto bactericida a las 4 h; sin embargo en 6/21 (28.6%) se observó recrecimiento de colonias, en su mayoría a las 24 h.

Las cepas y sus correspondientes combinaciones antibióticas se muestran en la **Tabla N° 12**, y los gráficos (Graphpad Prism 5) en las **Figuras N° 3, 4, 5 y 6**.

Mediante el método de *T-student*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar combinaciones sinérgicas para rifampicina/imipenem entre *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, como tampoco para las combinaciones sinérgicas con rifampicina/colistín, con un $p > 0.05$. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar el total de combinaciones sinérgicas de rifampicina/imipenem con rifampicina/colistín con un $p > 0.05$.

Tabla N° 12. Resultados de la cinética de muerte bacteriana frente a las combinaciones sinérgicas obtenidas por método de damero.

Cepa	Rifampicina	Imipenem	Tiempo (h) y efecto antibacteriano.
P8	8	16	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
P55	16	16	4-8-24, sinergia; 8, bactericida
P77	16	0.5	4-8-24, sinergia; 8, bactericida; 24, recrecimiento
P79	16	8	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
A15	2	8	24, sinergia
A19	32	16	4-8-24, sinergia; 8, bactericida; 24, recrecimiento
A22	4	16	4-8, indiferente; 24, antagónico
Cepa	Rifampicina	Colistín	Tiempo (h) y efecto antibacteriano.
P4	16	0.5	4-8-24, sinergia; 4-8, bactericida; 24, recrecimiento
P8	16	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
P41	4	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
P51	16	0.5	4-8-24, sinergia; 4-8, bactericida; 24, recrecimiento
	8	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
P55	16	0.25	4-8-24, sinergia; 4-8, bactericida; 24, recrecimiento
P56	8	0.25	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
P77	8	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida; 8, recrecimiento
	4	0.5	8-24, sinergia; 4, indiferente
	2	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
P79	16	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
	16	0.25	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
A3	2	0.125	4-8-24, sinergia; 4-8, bactericida; 24, recrecimiento
A12	2	0.031	4-8, sinergia; 24, indiferente
	2	0.125	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
A13	2	0.031	4-8, sinergia; 24, indiferente
A14	2	0.125	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
	1	0.125	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
	0.5	0.125	4-8-24, sinergia; 4-8, bactericida; 24, recrecimiento
A17	1	0.0625	4-8-24, indiferente
	0.5	0.0625	4, sinergia; 8-24, indiferente
A18	1	0.031	8, sinergia; 4-24, indiferente
	1	0.125	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
A20	8	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
	4	0.5	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
A33	16	0.25	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
	8	0.25	4-8-24, sinergia; 4, bactericida
	4	0.25	8-24, sinergia; 4, indiferente

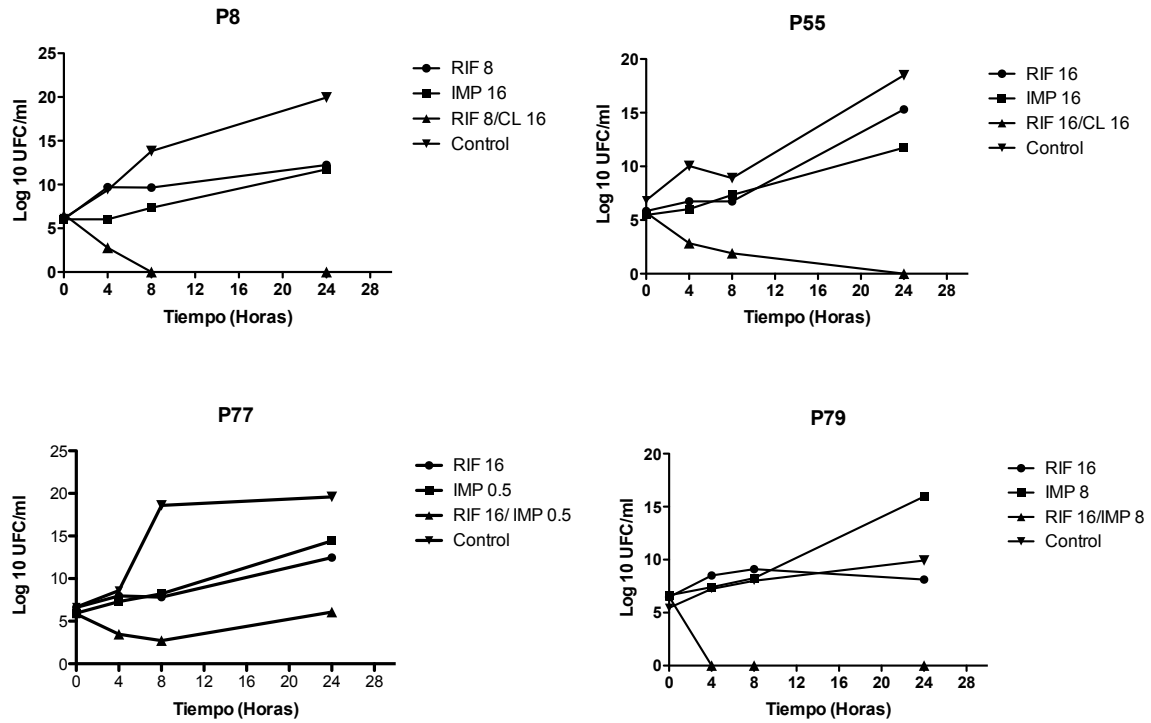
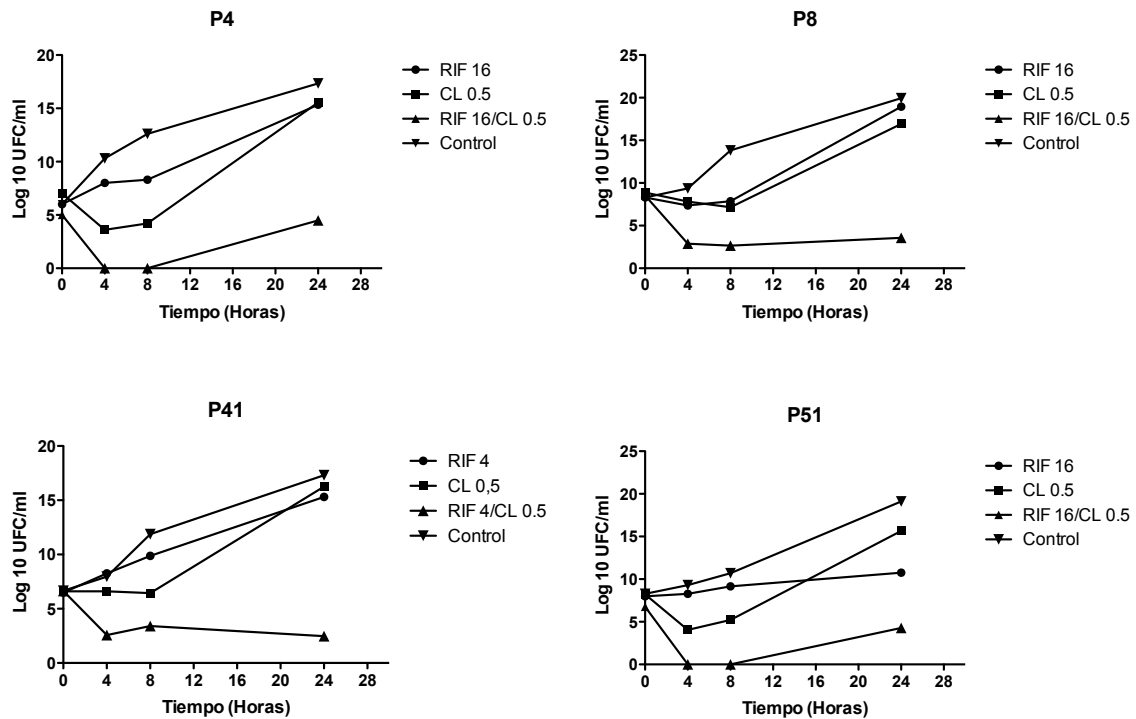


Figura N° 3. Gráficos cinética de muerte rifampicina/imipenem en cepas *P. aeruginosa* (P8, P55, P77 y P79).



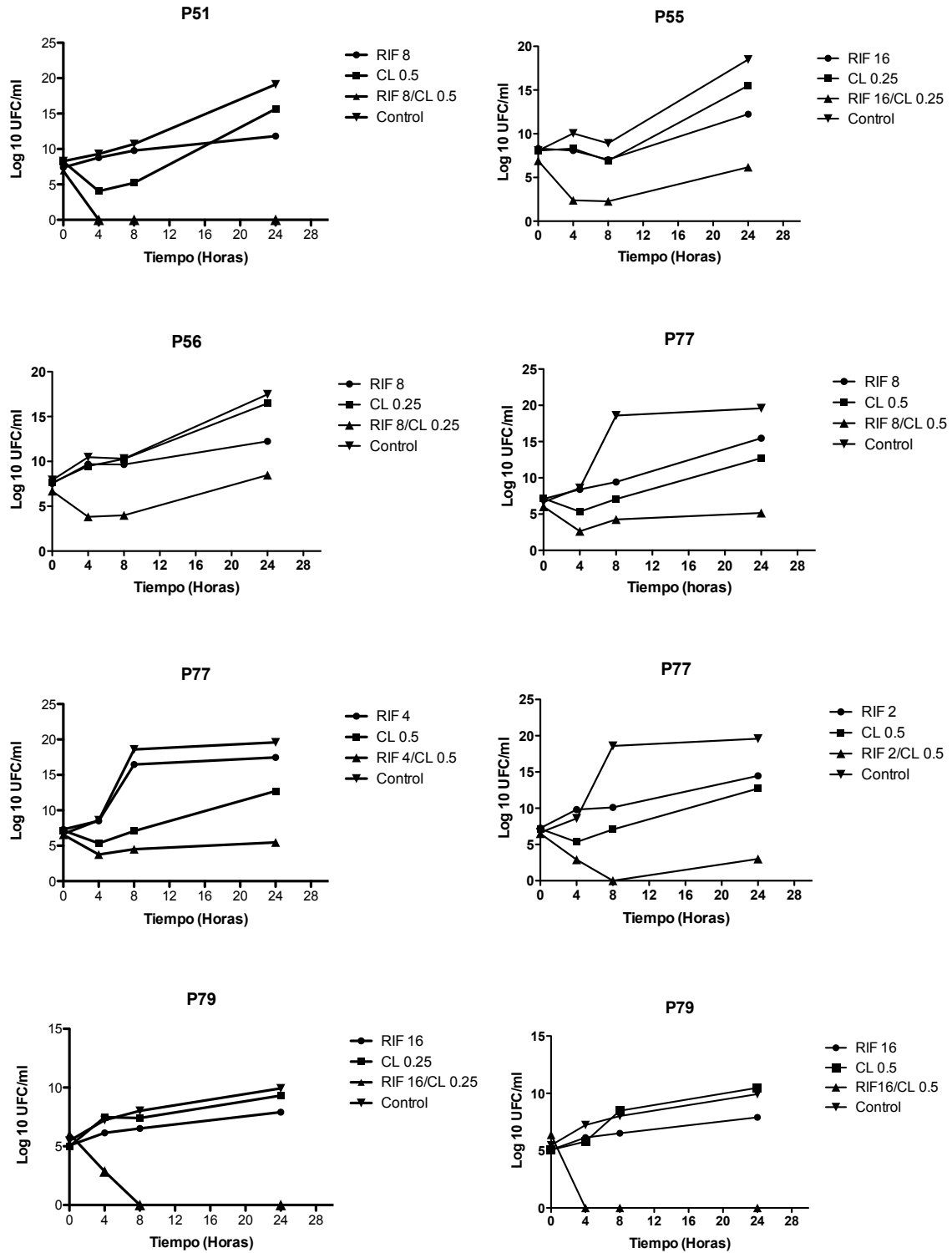


Figura N° 4. Gráficos cinética de muerte rifampicina/colistín en cepas *P. aeruginosa* (P4, P8, P41, P51, P55, P56, P77 y P79).

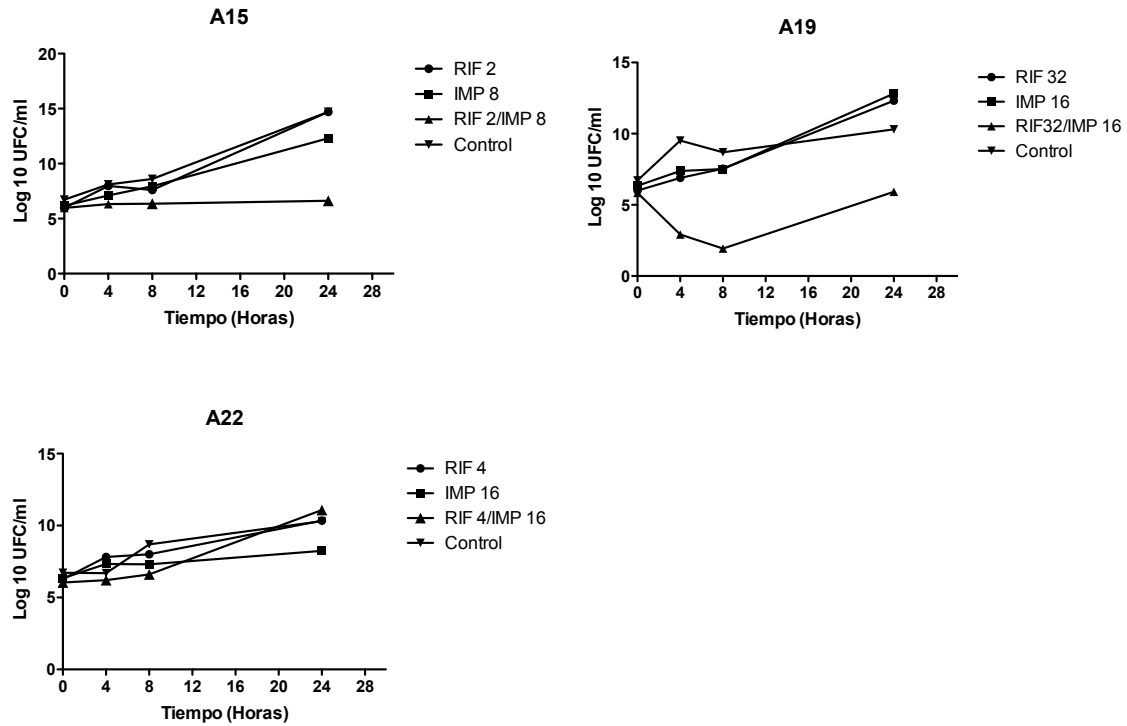
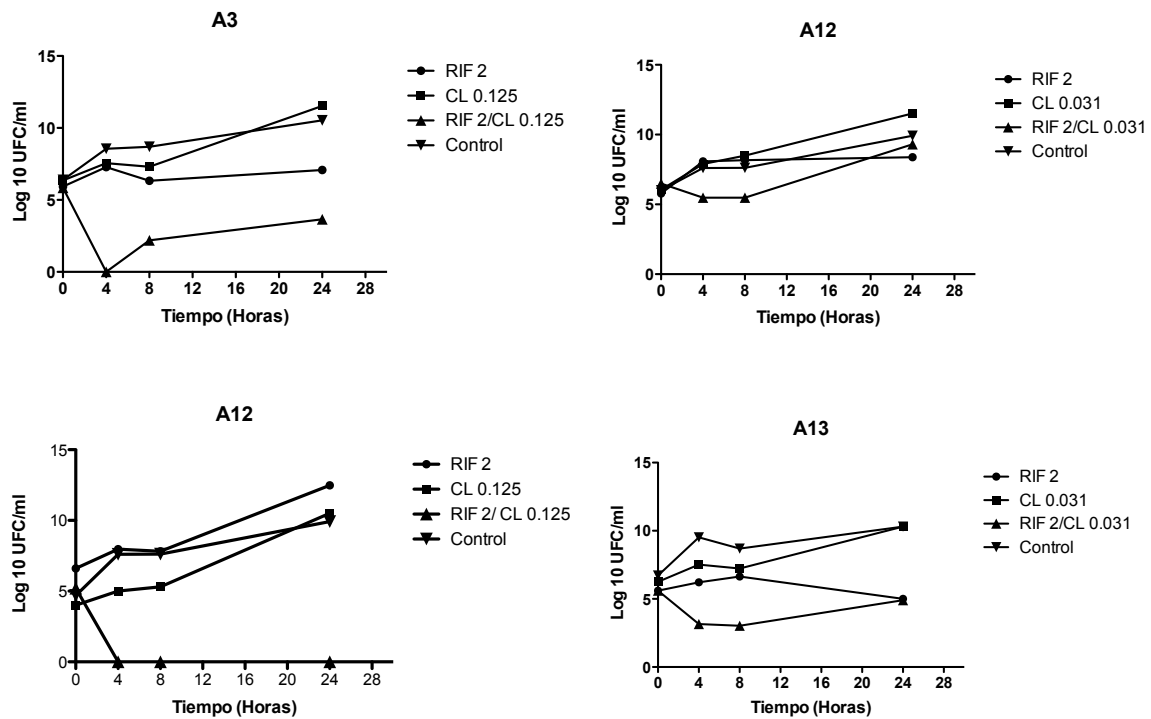
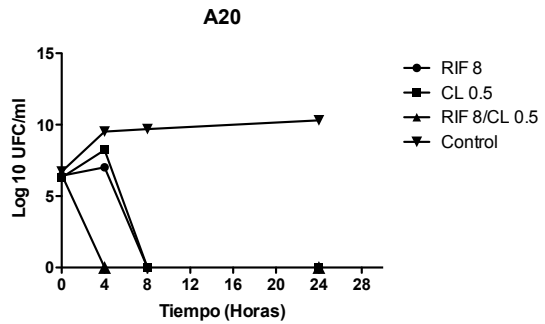
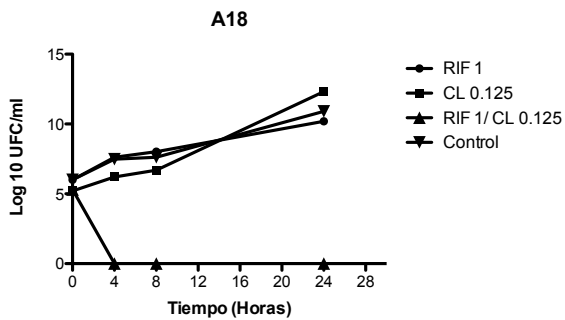
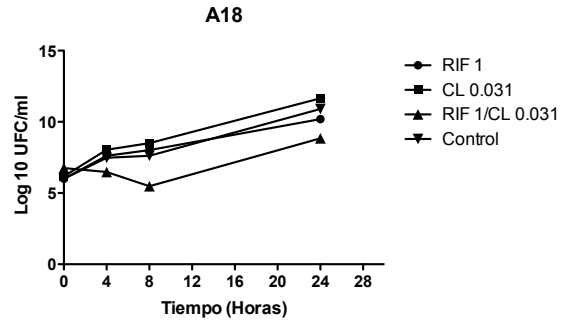
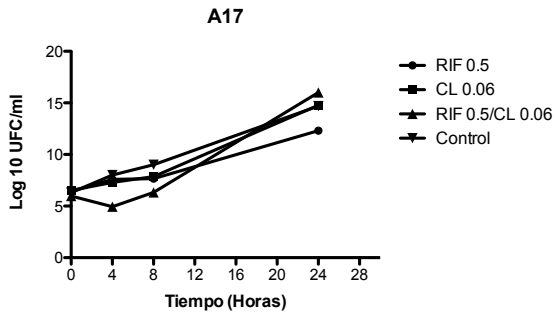
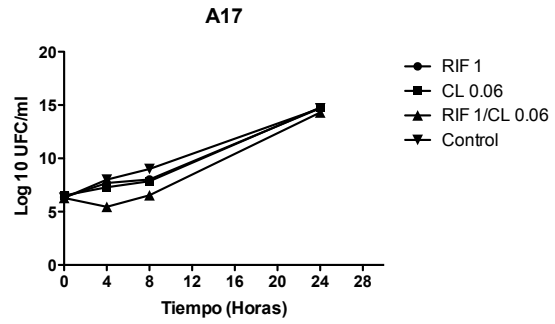
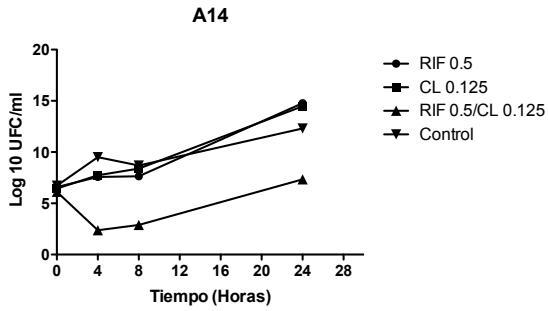
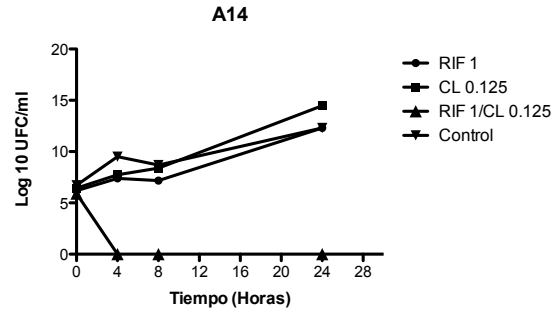
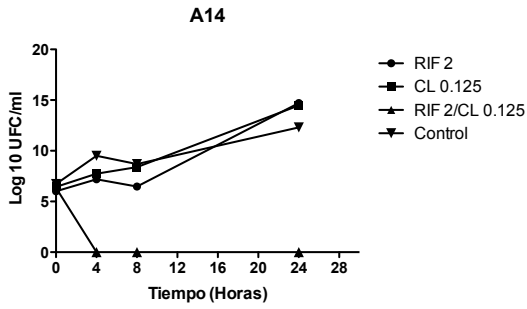


Figura N° 5. Gráficos cinética de muerte rifampicina/imipenem en cepas *A. baumannii* (A15, A19 y A22).





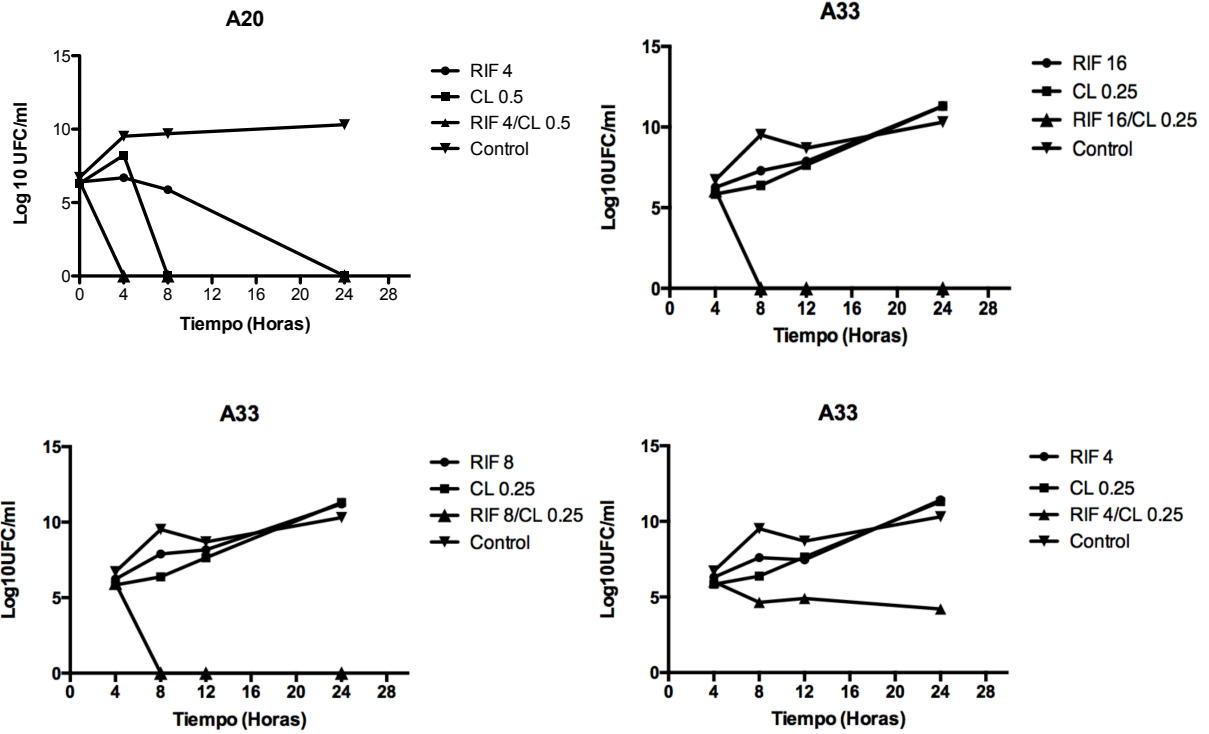


Figura N° 6. Gráficos cinética de muerte rifampicina/colistín en cepas *A. baumannii* (A3, A12, A13, A14, A17, A18, A20 y A33).

Determinación de los mecanismos moleculares de la resistencia a rifampicina y tigeciclina en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi-resistente.

Detección en cepas de A. baumannii y P. aeruginosa resistentes a rifampicina la presencia y tipo de integrón y el gen ADP-ribosiltransferasa (arr-2) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Detección de integrón clase 1. Se demostró que 26/30 (86.7%) aislados de *P. aeruginosa* amplificaron una banda del tamaño esperado de 457 pb, 2/30 (6.7%) no amplificaron banda y en 2/30 cepas (P41- P79) se detectó un amplicón de 800 pb (Figura N° 7.A., 8 y 9). En el caso de *A. baumannii*, 20/20 (100%) cepas portan el gen *intI1*, que corresponde a la banda de 160 pb (Figura 7.B., 10 y 11).

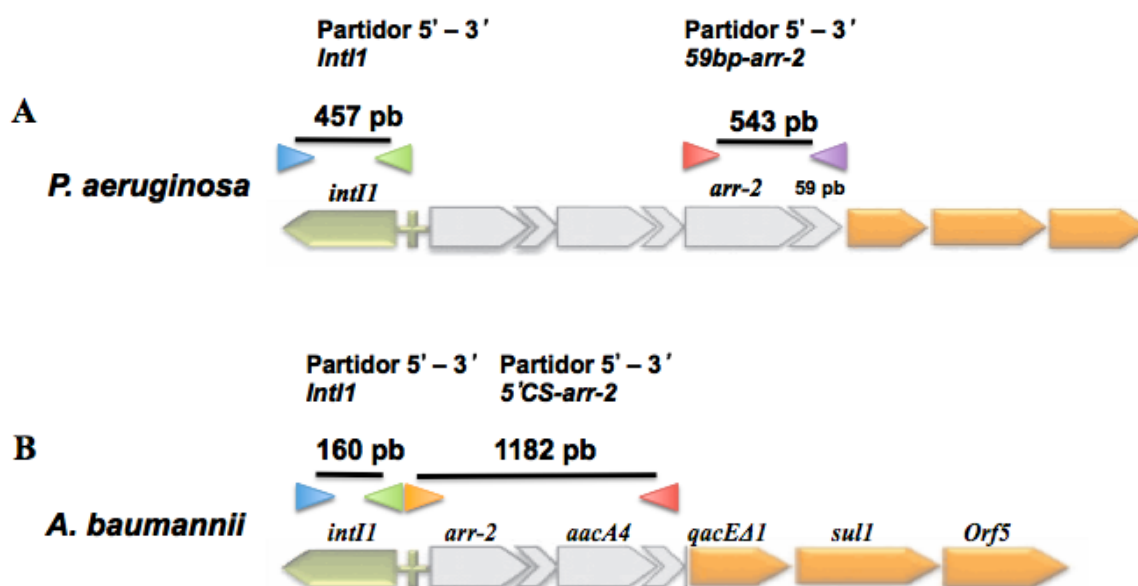


Figura N° 7. Representación esquemática del integrón clase 1 que contiene el *cassette* *arr-2* en: **A.** Cepas de *P. aeruginosa* y **B.** *A. baumannii*, con los tamaños de los fragmentos que amplifican para una integrasa clase 1 y el *cassette* *arr-2*.

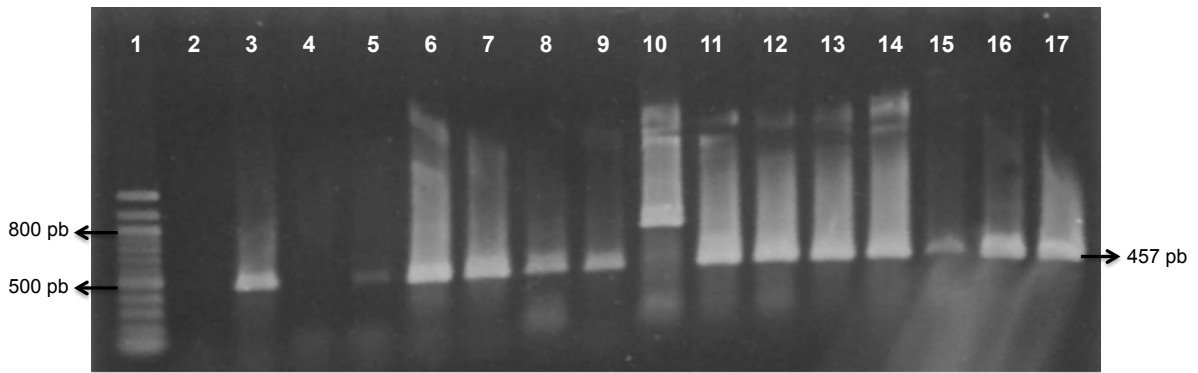


Figura N° 8. Gel de los productos de PCR de cepas de *P. aeruginosa* después de la amplificación con el partidor *intI1*- *P. aeruginosa*.

Línea 1; marcador de tamaño molecular **100 bp**, 2; C(-), 3; P4, 4; P8, 5; P19, 6; P26, 7; P28, 8; P34, 9; P40, 10; P41, 11; P51, 12; P53, 13; P54, 14; P55, 15; P56, 16; P57, 17; P62.

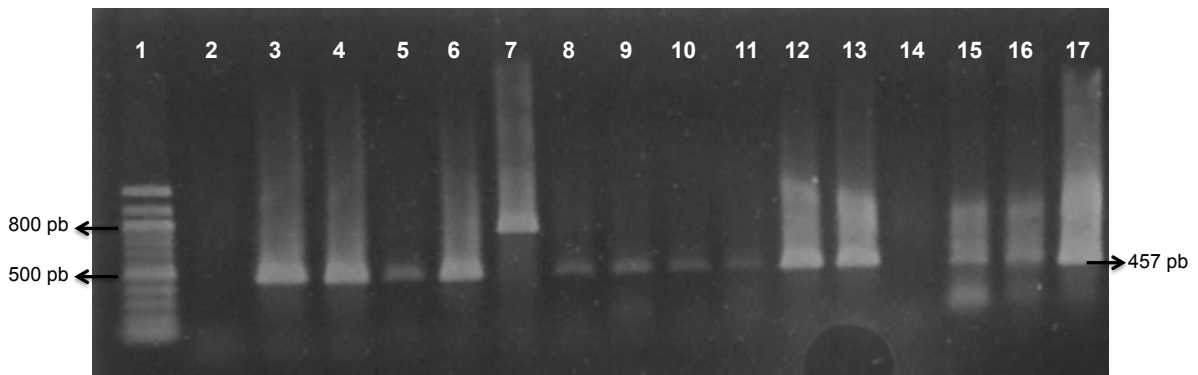


Figura N° 9. Gel de los productos de PCR de cepas de *P. aeruginosa* después de la amplificación con el partidor *intI1*-*P. aeruginosa*.

Línea 1; marcador de tamaño molecular **100 bp**, 2; C(-), 3; P65, 4; P74, 5; P75, 6; P77, 7; P79, 8; P80, 9; P82, 10; P83, 11; P84, 12; P89, 13; P93, 14; P95, 15; P97, 16; P98, 17; P99.

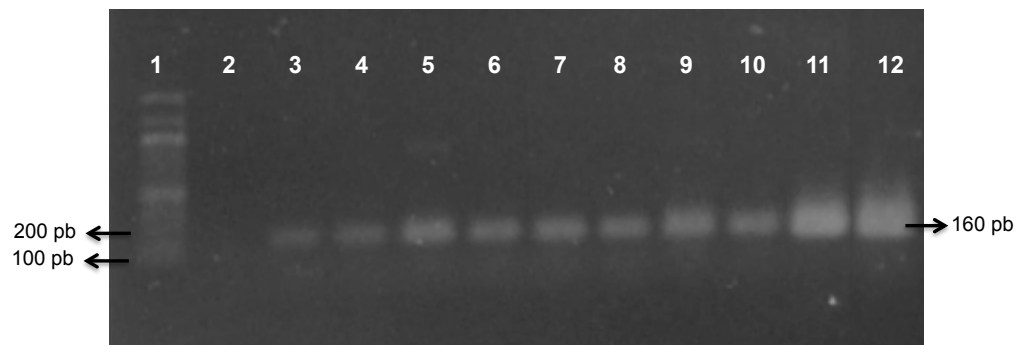


Figura N° 10. Gel de los productos de PCR de cepas de *A. baumannii* después de la amplificación con el partidor *intI1*- *A. baumannii*.

Línea 1; marcador de tamaño molecular **100 bp**, 2; C(-), 3; A2, 4; A3, 5; A4, 6; A8, 7; A9, 8; A12, 9; A13, 10; A14, 11; A15, 12; A17.

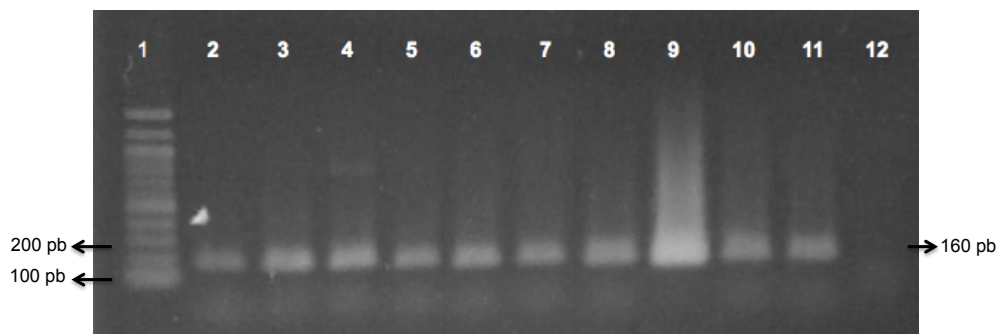


Figura N° 11. Gel de los productos de PCR de cepas de *A. baumannii* después de la amplificación con el partidor *intI1*- *A. baumannii*.

Línea 1; marcador de tamaño molecular **100 bp**, 2; A18, 3; A19, 4; A20, 5; A22, 6; A23, 7; A24, 8; A26, 9; A27, 10; A32, 11; A33, 12; C(-).

Detección del *cassette arr-2*. En ninguno de los aislados de *P. aeruginosa*, se amplificó una banda correspondiente al tamaño esperado. Las bandas obtenidas en las cepas de *A. baumannii* de un tamaño de 700 pb aproximadamente, se purificaron y secuenciaron.

Una vez realizada la PCR, de todos los fragmentos amplificados para detección de integrón clase 1 que coincidieron con el tamaño esperado se secuenciaron un total de 2 cepas de *P. aeruginosa* y 2 cepas de *A. baumannii* para verificar la presencia de la integrasa clase 1 (*intI1*). Además se purificaron y enviaron a secuenciar los fragmentos que amplificaron para una banda de 800 pb en cepas de *P. aeruginosa*. Las cepas seleccionadas para secuenciación fueron aquellas que presentaron una mejor de calidad de banda de amplificación en el PCR. Los resultados obtenidos se alinearon con el programa Clustal W frente a las secuencias FJ207466 y JF262175.1 depositadas en GenBank. Al realizar el alineamiento de las cepas se confirmó que las 4 cepas secuenciadas para el gen *intI1* y también las que amplificaron un fragmento de 800 pb presentaban la integrasa clase 1.

Los fragmentos amplificados para detección del *cassette arr-2* en cepas de *A. baumannii*, que no correspondieron al tamaño esperado, se enviaron a secuenciar. Los resultados obtenidos en 2 cepas, se alinearon con el programa Clustal W frente a la secuencia AY038837.3 en GenBank, confirmándose la ausencia del *cassette arr-2*.

Se intentó conseguir cepas para control positivo de integrón clase 1 y *cassette arr-2*, para lo cual no se obtuvo una respuesta positiva. El problema se abordó de la siguiente

manera: Se controlaron los partidores con cepas de *Shigella sonnei* positivos para integrón clase 1 y posteriormente se amplificó un par de cepas del estudio, tanto de *P. aeruginosa* como de *A. baumannii*, cuyos productos enviados a secuenciar se utilizaron como controles positivos para el resto del estudio.

Evaluación de la presencia de la bomba de eflujo AdeABC en cepas de A. baumannii multi-resistentes, mediante la utilización de un protón-ionóforo CCCP como inhibidor del sistema de expulsión.

20/20 (100%) cepas estudiadas no muestran cambios en el tamaño del halo de inhibición (**Tabla N° 13**). El estudio con el método confirmatorio a través de la técnica de dilución en agar, confirma los resultados antes obtenidos.

No se contó en este estudio con controles positivos de bomba de eflujo de AdeABC, debido a que no logramos conseguir una cepa con existencia de bomba demostrada por algún método molecular que además presentara sobreexpresión de ésta evidenciada por un método fenotípico.

Tabla N° 13. Resultados método de *screening*. Estudio presencia de bomba AdeABC en *A. baumannii*.

CEPA	Tigeciclina		Tigeciclina + CCCP	
	Halo de inhibición (mm)	Categorización R/I/S	Halo de inhibición (mm)	Categorización R/I/S
A2	19	S	19	S
A3	19	S	20	S
A4	17	I	17	I
A8	19	S	19	S
A9	20	S	20	S
A12	20	S	20	S
A13	20	S	20	S
A14	20	S	20	S
A15	17	I	19	S
A17	20	S	20	S
A18	20	S	20	S
A19	20	S	20	S
A20	19	S	19	S
A22	20	S	20	S
A23	18	I	18	I
A24	21	S	22	S
A26	17	I	17	I
A27	19	S	19	S
A32	20	S	20	S
A33	18	I	18	I

CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine

Correlación de los resultados del estudio de susceptibilidad con los mecanismos de resistencia en estas cepas.

Al correlacionar susceptibilidad a rifampicina con mecanismos de resistencia, se observó que en cepas de *P. aeruginosa*, 28/30 (93.3%) fueron resistentes a rifampicina y presentaron integrón clase 1, 2/30 (6.7%) fueron resistentes a rifampicina sin presencia del integrón clase 1 y 30/30 (100%) no se detectó el *cassette arr-2* asociado a la presencia de este integrón (**Tabla N° 14**). En las cepas de *A. baumannii*, 20/20 (100%) presentó integrón clase 1 sin detectarse el *cassette arr-2* (**Tabla N° 15**).

Al correlacionar susceptibilidad a tigeciclina con mecanismos de resistencia en cepas de *A. baumannii*, se observó en 3/20 (15%) susceptibilidad intermedia a tigeciclina en ausencia de la bomba de eflujo AdeABC y en 17/20 (85%) sensibles a tigeciclina, no se detectó bomba AdeABC (**Tabla N° 16**).

Tabla N° 14. Correlación resultados susceptibilidad a rifampicina, presencia de integrón clase 1 y *cassette arr-2* en cepas *P. aeruginosa*.

MDC RIF	<i>IntI1</i> +	<i>IntI1</i> -	Total	<i>Arr-2</i> +	<i>Arr-2</i> -	Total
R	26	4	30	0	30	30
S	0	0	0	0	0	0
Total	26	4	30	0	30	30

*MDC: microdilución en caldo; RIF: rifampicina

Tabla N° 15. Correlación resultados susceptibilidad a rifampicina, presencia de integrón clase 1 y *cassette arr-2* en cepas *A. baumannii*.

MDC RIF	<i>IntI1</i> +	<i>IntI1</i> -	Total	<i>Arr-2</i> +	<i>Arr-2</i> -	Total
R	20	0	20	0	20	20
S	0	0	0	0	0	0
Total	20	0	20	0	20	20

*MDC: microdilución en caldo; RIF: rifampicina

Tabla N° 16. Correlación resultados susceptibilidad a tigeciclina y presencia de bomba AdeABC en cepas *A. baumannii*.

MDC TIG	AdeABC +	AdeABC -	Total
I	0	3	20
S	0	17	0
Total	0	20	20

*MDC: microdilución en caldo; TIG: tigeciclina

Identificación de un método accesible para el estudio de la susceptibilidad en Bacilos Gram negativos no fermentadores multi- o panresistentes asociados a infecciones nosocomiales.

Determinación de la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina mediante la prueba de microdilución en caldo en 20 cepas de A. baumannii y 30 cepas de P. aeruginosa multi-resistentes identificados en infecciones nosocomiales en el Hospital Clínico U. de Chile.

Los resultados obtenidos mediante el método de referencia (microdilución en caldo) destacan: 30/30 (100%) cepas de *P. aeruginosa* resistentes a rifampicina mediante la técnica de microdilución en caldo (**Tabla N° 17**). Las 20/20 (100%) cepas de *A. baumannii*, son resistentes a rifampicina, 17/20 (85%) cepas son sensibles a tigeciclina y 3/20 (15%) cepas poseen susceptibilidad intermedia a este antibiótico. (**Tabla N° 18**).

Tabla N° 17. Resultados CIM rifampicina por microdilución en caldo en *P. aeruginosa*.

CEPA	Rifampicina	
	CIM(ug/ml)	Categorización
P4	32	R
P8	16	R
P19	32	R
P26	32	R
P28	32	R
P34	16	R
P40	32	R
P41	32	R
P51	64	R
P53	32	R
P54	>512	R
P55	32	R
P56	32	R
P57	32	R
P62	32	R
P65	64	R
P74	64	R
P75	64	R
P77	64	R
P79	128	R
P80	32	R
P82	64	R
P83	64	R
P84	128	R
P89	64	R
P93	128	R
P95	64	R
P97	32	R
P98	64	R
P99	32	R

Tabla N° 18. Resultados CIM rifampicina y tigeciclina por microdilución en caldo en *A. baumannii*.

CEPA	Rifampicina		Tigeciclina	
	CIM (ug/ml)	Categorización	CIM (ug/ml)	Categorización
A2	8	R	1	S
A3	8	R	1	S
A4	16	R	2	S
A8	8	R	2	S
A9	8	R	1	S
A12	8	R	1	S
A13	8	R	4	I
A14	8	R	1	S
A15	16	R	1	S
A17	8	R	1	S
A18	8	R	1	S
A19	16	R	1	S
A20	8	R	4	I
A22	16	R	1	S
A23	8	R	2	S
A24	8	R	1	S
A26	8	R	4	I
A27	8	R	1	S
A32	16	R	2	S
A33	128	R	2	S

RIF ≥ 4 ug/ml, según criterios de la BSAC.

TIG $S \leq 2$ ug/ml; I = 4 ug/ml; R ≥ 8 ug/ml, según criterios de la FDA.

Categorización. R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible

RIF R ≥ 4 ug/ml según criterios de la BSAC.

Categorización. R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible

Evaluación de la CIM de rifampicina en 30 cepas de *P. aeruginosa* y de rifampicina y tigeciclina en 20 cepas de *A. baumannii* mediante cintas de E-test®.

Se observó en cepas de *P. aeruginosa*, 28/30 (93.3%) cepas resistentes y 2/30 (6.7%) sensibles a rifampicina (Tabla N° 19). Mientras que en cepas de *A. baumannii*, 20/20 (100%) cepas fueron resistentes a rifampicina, 18/20 (90%) sensibles a tigeciclina y 2/20 (10%) aislados presentaron susceptibilidad intermedia (Tabla N° 20).

Tabla N° 19. Resultados CIM rifampicina por E- test ® en *P. aeruginosa*.

CEPA	Rifampicina	
	CIM (ug/ml)	Categorización
P4	>32	R
P8	12	R
P19	24	R
P26	>32	R
P28	>32	R
P34	8	R
P40	16	R
P41	2	S
P51	3	S
P53	>32	R
P54	>32	R
P55	>32	R
P56	8	R
P57	>32	R
P62	24	R
P65	>32	R
P74	>32	R
P75	>32	R
P77	>32	R
P79	12	R
P80	>32	R
P82	>32	R
P83	>32	R
P84	>32	R
P89	>32	R
P93	>32	R
P95	>32	R
P97	>32	R
P98	>32	R
P99	>32	R

RIF R \geq 4 ug/ml según criterios de la BSAC.
Categorización. R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible

Tabla N° 20. Resultados CIM rifampicina y tigeciclina por E-test ® en *A. baumannii*.

CEPA	Rifampicina		Tigeciclina	
	CIM(ug/ml)	Categorización	CIM(ug/ml)	Categorización
A2	3	R	0,5	S
A3	4	R	0,5	S
A4	4	R	2	S
A8	12	R	1,5	S
A9	8	R	0,38	S
A12	3	R	0,38	S
A13	3	R	1	S
A14	4	R	0,38	S
A15	8	R	1,5	S
A17	3	R	0,5	S
A18	6	R	1	S
A19	6	R	2	S
A20	4	R	3	I
A22	16	R	1,5	S
A23	3	R	2	S
A24	6	R	1	S
A26	4	R	3	I
A27	3	R	1	S
A32	4	R	1,5	S
A33	>32	R	2	S

RIF R \geq 4 ug/ml, según criterios de la BSAC.
TIG S \leq 2 ug/ml; I = 4 ug/ml; R \geq 8 ug/ml, según criterios de la FDA.
Categorización. R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible

Evaluación de la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina mediante la técnica de Kirby-Bauer (difusión en agar).

Mediante esta técnica, 29/30 (96.7%) cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a rifampicina y 1/30 (3.3%) cepa posee susceptibilidad intermedia (**Tabla N° 21**). Los resultados en cepas de *A. baumannii*, muestra que la totalidad de las cepas son resistentes a rifampicina, mientras que sólo 5/20 (25%) cepas son sensibles a tigeciclina y 15/20 (75%) tienen susceptibilidad intermedia a este antibiótico (**Tabla N° 22**).

Tabla N° 21. Resultados de susceptibilidad a rifampicina según técnica Kirby-Bauer en cepas *P. aeruginosa*.

CEPA	Rifampicina	
	Halo de inhibición (mm)	Categorización R/I/S
P4	6	R
P8	6	R
P19	6	R
P26	6	R
P28	6	R
P34	8	R
P40	6	R
P41	18	I
P51	6	R
P53	6	R
P54	6	R
P55	6	R
P56	6	R
P57	6	R
P62	8	R
P65	6	R
P74	6	R
P75	6	R
P77	6	R
P79	6	R
P80	6	R
P82	6	R
P83	6	R
P84	6	R
P89	6	R
P93	6	R
P95	6	R
P97	8	R
P98	6	R
P99	6	R

RIF $S \geq 20$ mm; $R \leq 16$ mm según criterios de susceptibilidad para *Staphylococcus* spp. CLSI 2012.
Categorización. R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible

Tabla N° 22. Resultados de susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina según técnica Kirby-Bauer en cepas *A. baumannii*.

CEPA	Rifampicina		Tigeciclina	
	Halo de inhibición (mm)	Categorización R/I/S	Halo de inhibición (mm)	Categorización R/I/S
A2	12	R	17	I
A3	10	R	18	I
A4	10	R	15	I
A8	12	R	16	I
A9	11	R	18	I
A12	13	R	19	S
A13	13	R	20	S
A14	10	R	18	I
A15	9	R	16	I
A17	12	R	18	I
A18	12	R	18	I
A19	6	R	19	S
A20	12	R	16	I
A22	6	R	18	I
A23	11	R	17	I
A24	13	R	20	S
A26	11	R	15	I
A27	13	R	18	I
A32	10	R	18	I
A33	6	R	18	I

RIF $S \geq 20$ mm; $R \leq 16$ mm según criterios de susceptibilidad para *Staphylococcus* spp. CLSI 2012.
TIG $S \geq 19$ mm y $R \leq 14$ mm según puntos de corte de la FDA para *Enterobacteriaceae*.
Categorización. R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible.

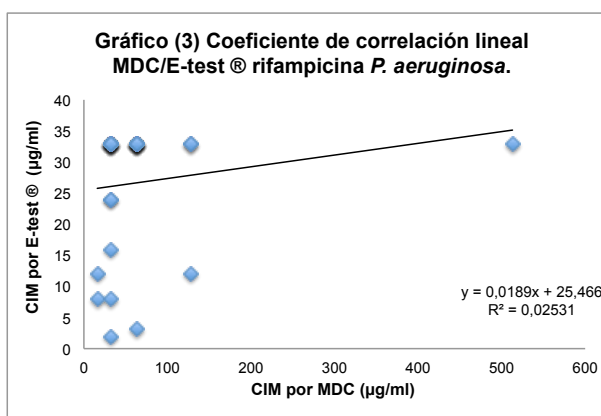
Correlación de los valores obtenidos con la técnica de E-test® y Kirby-Bauer con los valores de la CIM determinados por microdilución en caldo (método de referencia), para seleccionar el método más confiable, determinando al mismo tiempo sus limitaciones.

Se analizó los resultados obtenidos mediante microdilución en caldo y E-test® y se calculó el coeficiente de correlación (r), para determinar la relación lineal entre estas dos variables aleatorias cuantitativas. Si el coeficiente de correlación toma valores cercanos a 1 la correlación es fuerte y directa. El coeficiente de correlación para rifampicina en cepas de *P. aeruginosa* fue 0.159, mostrando una correlación débil (Tabla N° 23 y Gráfico N° 3). Al contrario, la correlación obtenida en el caso de la rifampicina en cepas de *A. baumannii* fue de 0.892 (Tabla N° 24 y Gráfico N° 4). La comparación de los resultados de la microdilución en caldo y E-test® para tigeciclina en cepas *A. baumannii* muestra una correlación con un coeficiente de correlación de 0.676 (Tabla N° 25 y Gráfico N° 5).

Tabla N° 23. Resultados del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo y E-test® expresados como CIM en *P. aeruginosa*.

CEPA	Rifampicina	
	MDC CIM(µg/ml)	E-test® CIM (µg/ml)
P4	32	33
P8	16	12
P19	32	24
P26	32	33
P28	32	33
P34	16	8
P40	32	16
P41	32	2
P51	64	3
P53	32	33
P54	513	33
P55	32	33
P56	32	8
P57	32	33
P62	32	24
P65	64	33
P74	64	33
P75	64	33
P77	64	33
P79	128	12
P80	32	33
P82	64	33
P83	64	33
P84	128	33
P89	64	33
P93	128	33
P95	64	33
P97	32	33
P98	64	33
P99	32	33

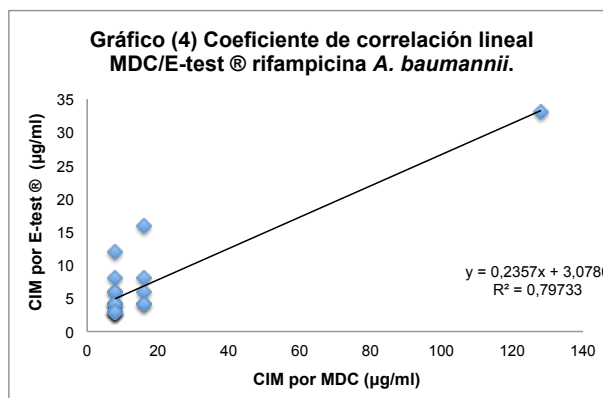
Coefficiente de correlación 0,159084749



MDC: Microdilución en caldo.

Tabla N° 24. Resultados del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo y E-test® expresados como CIM en *A. baumannii*.

CEPA	Rifampicina	
	MDC CIM (µg/ml)	E-test® CIM (µg/ml)
A2	8	3
A3	8	4
A4	16	4
A8	8	12
A9	8	8
A12	8	3
A13	8	3
A14	8	4
A15	16	8
A17	8	3
A18	8	6
A19	16	6
A20	8	4
A22	16	16
A23	8	3
A24	8	6
A26	8	4
A27	8	3
A32	16	4
A33	128	33

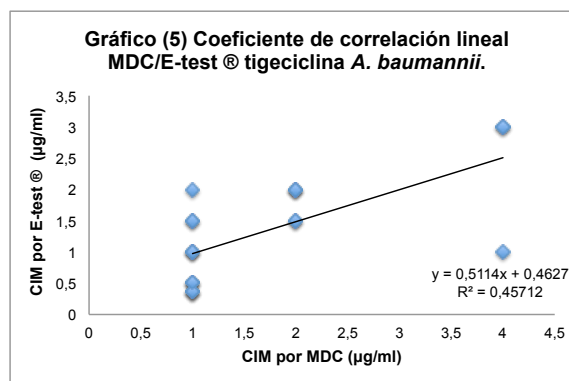


MDC: Microdilución en caldo.

Coefficiente de correlación 0,892935428

Tabla N° 25. Resultados del estudio de susceptibilidad a tigeciclina por microdilución en caldo y E-test® expresados como CIM en *A. baumannii*.

CEPA	Tigeciclina	
	MDC CIM (µg/ml)	E-test® CIM (µg/ml)
A2	1	0,5
A3	1	0,5
A4	2	2
A8	2	1,5
A9	1	0,38
A12	1	0,38
A13	4	1
A14	1	0,38
A15	1	1,5
A17	1	0,5
A18	1	1
A19	1	2
A20	4	3
A22	1	1,5
A23	2	2
A24	1	1
A26	4	3
A27	1	1
A32	2	1,5
A33	2	2



MDC: Microdilución en caldo.

Coefficiente de correlación 0,676107762

Comparación de resultados de susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina en P. aeruginosa y A. baumannii con las tres técnicas según categorización.

Al comparar E-test® con microdilución en caldo (MDC) para rifampicina, se observa que 28/30 (93.3%) cepas de *P. aeruginosa* son resistentes por ambos métodos y 2/30 (6.7%) son sensibles por E- test® pero resistentes por MDC, que corresponden a errores muy graves, por ser un valor falsamente susceptible. Si comparamos difusión en agar con MDC, 29/30 (96.7%) cepas son resistentes por ambos métodos y 1/30 (3.3%) tiene susceptibilidad intermedia por difusión en agar pero es resistente por MDC, lo que corresponde a un error menor (**Tabla N° 26 y 28**).

Al evaluar la susceptibilidad entre E-test® y difusión en agar con MDC para rifampicina en cepas de *A. baumannii*, observamos que 20/20 (100%) es resistente al utilizar cualquiera de los dos métodos enfrentados al método de referencia (**Tabla N° 27 y 29**).

Si comparamos E-test® y MDC para tigeciclina, 19/20 (95%) de las cepas de *A. baumannii* presentó la misma categorización por ambos métodos, 1/20 (5%) fue sensible por E-test® pero con susceptibilidad intermedia por MDC, lo que corresponde a un error menor. Finalmente, al comparar difusión en agar con MDC para tigeciclina, 5/20 (25%) de las cepas de *A. baumannii* presentó la misma categorización por ambos métodos, 14/20 (70%) presentó susceptibilidad intermedia por difusión en agar pero fue sensible por MDC, que corresponden a errores menores y 1/20 (5%) fue sensible por difusión en agar pero con susceptibilidad intermedia por MDC que también corresponde a un error menor (**Tabla N° 27 y 30**).

En estos resultados no se encontraron errores graves, que corresponde a obtener susceptibilidad en microdilución pero resistencia por E-test®, valor falsamente resistente.

Tabla N° 26. Comparación de resultados de susceptibilidad mediante las tres técnicas según categorización en cepas *P. aeruginosa*.

CEPA	Susceptibilidad Rifampicina		
	MDC	E-test®	Difusión agar
P4	R	R	R
P8	R	R	R
P19	R	R	R
P26	R	R	R
P28	R	R	R
P34	R	R	R
P40	R	R	R
P41	R	S	I
P51	R	S	R
P53	R	R	R
P54	R	R	R
P55	R	R	R
P56	R	R	R
P57	R	R	R
P62	R	R	R
P65	R	R	R
P74	R	R	R
P75	R	R	R
P77	R	R	R
P79	R	R	R
P80	R	R	R
P82	R	R	R
P83	R	R	R
P84	R	R	R
P89	R	R	R
P93	R	R	R
P95	R	R	R
P97	R	R	R
P98	R	R	R
P99	R	R	R

MDC: microdilución en caldo
Categorización. R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible

Tabla N° 27. Comparación de resultados de susceptibilidad mediante las tres técnicas según categorización en cepas *A. baumannii*.

CEPA	Susceptibilidad Rifampicina			Susceptibilidad Tigeciclina		
	MDC	E-test®	Difusión agar	MDC	E-test®	Difusión agar
A2	R	R	R	S	S	I
A3	R	R	R	S	S	I
A4	R	R	R	S	S	I
A8	R	R	R	S	S	I
A9	R	R	R	S	S	I
A12	R	R	R	S	S	S
A13	R	R	R	I	S	S
A14	R	R	R	S	S	I
A15	R	R	R	S	S	I
A17	R	R	R	S	S	I
A18	R	R	R	S	S	I
A19	R	R	R	S	S	S
A20	R	R	R	I	I	I
A22	R	R	R	S	S	I
A23	R	R	R	S	S	I
A24	R	R	R	S	S	S
A26	R	R	R	I	I	I
A27	R	R	R	S	S	I
A32	R	R	R	S	S	I
A33	R	R	R	S	S	I

MDC: microdilución en caldo
Categorización. R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible

Tabla N° 28. Comparación del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar en cepas *P. aeruginosa*.

		Microdilución en caldo				Difusión en agar
		R	I	S	Total	
E- test	R	28	0	0	28	
	I	0	0	0	0	
	S	2	0	0	2	
	Total	30	0	0	30	

		Microdilución en caldo				Difusión en agar
		R	I	S	Total	
E- test	R	29	0	0	29	
	I	1	0	0	1	
	S	0	0	0	0	
	Total	30	0	0	30	

Tabla N° 29. Comparación del estudio de susceptibilidad a rifampicina por microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar en cepas *A. baumannii*.

		Microdilución en caldo			Difusión en agar
		R	S	Total	
E- test	R	20	0	20	
	S	0	0	0	
	Total	20	0	20	

		Microdilución en caldo			Difusión en agar
		R	S	Total	
E- test	R	20	0	20	
	S	0	0	0	
	Total	20	0	20	

Tabla N° 30. Comparación del estudio de susceptibilidad a tigeciclina por microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar en cepas *A. baumannii*.

		Microdilución en caldo						Microdilución en caldo			
		R	I	S	Total			R	I	S	Total
E- test	R	0	0	0	0	Difusión en agar	R	0	0	0	0
	I	0	2	0	2		I	0	2	14	16
	S	0	1	17	18		S	0	1	3	4
	Total	0	3	17	20		Total	0	3	17	20

DISCUSIÓN.

Las infecciones causadas por bacilos Gram negativos multi- resistentes plantean un reto terapéutico, sobre todo por la alta mortalidad asociada a estos microorganismos. Cada vez, surgen más aislados con una sensibilidad reducida en muchos países, limitando aún más las opciones terapéuticas (Príncipe *et al.*, 2009). El conocimiento actual se basa, fundamentalmente, en experiencias clínicas, con resultados poco concluyentes. Las terapias con combinaciones empíricas se han vuelto una práctica común para el tratamiento de pacientes infectados con organismos multi- resistentes, a pesar de la limitada evidencia clínica y microbiológica que apoya su eficacia (Safdar *et al.*, 2004; Bliziotis *et al.*, 2005; Heyland *et al.*, 2008; El Solh *et al.*, 2009).

Bacilos Gram negativos no fermentadores como *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, son causas importantes de infecciones nosocomiales, particularmente en UCIs y en la última década han representado una carga significativa en términos de incremento en la incidencia de resistencia antibiótica y tasas de mortalidad (Drapeau *et al.*, 2010).

El objetivo principal de este estudio fue identificar combinaciones antibióticas potenciales contra bacilos Gram negativos aislados del Hospital Clínico de la Universidad de Chile mediante estudios de sinergia *in vitro*. Se investigó en un total de 30 cepas: 15 cepas de *P. aeruginosa* y 15 cepas de *A. baumannii*, la interacción de rifampicina en combinación con imipenem y colistín, mediante dos métodos de detección de sinergia, de manera de lograr una mejor evaluación de la actividad de las combinaciones. El primero: el método de tablero de ajedrez (damero), que provee evidencia de inhibición de crecimiento bacteriano en un determinado momento en el tiempo y el segundo: la cinética de muerte, que proporciona una imagen dinámica de la acción del antibiótico en el tiempo (Príncipe *et al.*, 2009).

En nuestros resultados, destaca un alto porcentaje de sinergia para la combinación de rifampicina/colistín en aislados de *P. aeruginosa* (53.3%) y en aislados de *A. baumannii* (53.3%) por método de damero. Un estudio de sinergia relativamente comparable mediante tablero de ajedrez para la combinación de rifampicina/polimixina B, realizado por Tan *et al.* (2011) en 16 aislados de *A. baumannii* muestra sinergia en un 19% de los casos (n=3); sin embargo, en ese estudio se utilizó como punto de corte una FICI menor de 0.5, a diferencia de lo establecido internacionalmente que define sinergia con una $FICI \leq 0.5$. Si consideramos

este punto de corte, este porcentaje alcanza un 37.5%. En un trabajo de Timurkaynak *et al.* (2006), se evaluaron 5 cepas de *P. aeruginosa* y 5 cepas de *A. baumannii*, demostrándose sinergia con la combinación de rifampicina/colistín en el 60% de las cepas estudiadas y Hogg *et al.* (1998), en un total de 13 cepas de *A. baumannii* obtiene un 84.6% de sinergia para la combinación de rifampicina/ colistín. En la mayoría de los trabajos publicados la combinación de rifampicina/colistín es la más efectiva; sin embargo, de manera contradictoria en un trabajo de López-Fabal *et al.* (2008), en 12 aislados de *P. aeruginosa* la combinación de rifampicina/colistín fue indiferente en el 75% de los casos. Es posible, que los resultados entre los distintos estudios no sean absolutamente comparables, dado que en ellos se estudia un bajo número de aislados, debido a que las técnicas de damero y cinética de muerte son laboriosas y costosas y por lo tanto los trabajos disponibles, aún no son suficientes para una buena comparación.

Las combinaciones que resultaron ser sinérgicas por el método de damero, fueron evaluadas por cinética de muerte. Se estudió un total de 28 combinaciones de rifampicina/colistín, confirmándose sinergia en el 96.4%. Cabe destacar que el 75% de las combinaciones presentó actividad bactericida. Si analizamos los datos de la literatura, en un estudio de Lim *et al.* (2011), en 31 aislados de *A. baumannii* multi- resistentes la combinación de rifampicina/polimixina B mediante cinética de muerte demostró un 41.9% de combinaciones sinérgicas, incluyendo cepas sensibles a polimixinas, al igual que en nuestro estudio. En los trabajos de Aoki *et al.* (2009) y Pachón-Ibañez *et al.* (2010), la combinación más efectiva de las estudiadas fue rifampicina/colistín.

En varios ensayos clínicos que han evaluado la eficacia de colistín, este agente individual ha demostrado ser efectivo, siendo cada vez más utilizado como monoterapia para el tratamiento de microorganismos que son reportados como sensibles sólo a colistín/polimixina B. Sin embargo, la terapia con colistín como monoterapia ha sido criticada porque en algunos casos dirige a una respuesta clínica subóptima con la posible ocurrencia de resistencia, dado que el principal problema de colistín radica en que la información disponible sobre su eficacia clínica, seguridad, dosificación, farmacocinética y farmacodinamia es muy limitada, lo que ha impedido diseñar regímenes de dosificación eficaces y seguros (Luque *et al.*, 2011).

En un estudio de cinética de muerte para colistín contra aislados clínicos de *A. baumannii* multi-resistente, se demostró que colistín fue activo hasta con concentraciones de 0.5 veces la CIM, pero con un substancial recrecimiento a las 24 horas incluso con concentraciones de 64 veces la CIM. En este caso, este fenómeno correspondió al crecimiento de subpoblaciones resistentes a colistín y las concentraciones requeridas para inhibir el recrecimiento (64 x CIM, 16- 128 µg/ml) no son logrables *in vivo*. (Owen *et al.*, 2007). Los resultados de nuestro estudio, muestran actividad bactericida de la combinación de rifampicina/colistín, con disminuciones de 4 veces la CIM para colistín (CIM de 0.031 a 0.5 µg/ml, logrado con la combinación). Si consideramos los puntos de corte establecidos por el CLSI 2012 para la susceptibilidad a colistín, el punto de corte de sensibilidad para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se ha definido en una CIM ≤ 2 µg/ml. Las C_{máx} de colistín observadas en la mayoría de los estudios se encuentran por debajo de estos puntos de corte, especialmente en bacilos Gram negativos implicados en infecciones en pacientes críticos (Luque *et al.*, 2011). Una CIM de 2 µg/ml se obtuvo en varios de nuestros aislados, por lo tanto lograr sinergia *in vitro* con disminuciones de la CIM de 4 veces, apuntan a pensar que combinaciones antibióticas con colistín podrían ser eficaces *in vivo*, al obtener valores que se acercan a las concentraciones de antibiótico que se pueden obtener en plasma.

En nuestro estudio, con algunas combinaciones sinérgicas, en las cuales se evidenció actividad bactericida por cinética de muerte, se observó un recrecimiento a las 24 horas. Resultados similares en otros estudios, indican que este fenómeno podría ser debido a inactivación del antibiótico (Isenberg *et al.*, 2007) o a selección de cepas resistentes (Príncipe *et al.*, 2009). Un trabajo de Tan *et al.* (2007), que utilizó un modelo PK/PD (modelo farmacocinético/farmacodinámico) para simular cuatro regímenes de dosis clínicamente relevantes de colistimetato sódico, demostró que a pesar de la existencia de concentraciones sobre la CIM, se amplificaron subpoblaciones resistentes para los actuales regímenes de dosis recomendados, siendo inadecuados para prevenir la emergencia de resistencia *in vitro*. Aún cuando el fenómeno de recrecimiento fuera por inactivación del fármaco o selección de cepas resistentes, es de esperar que el uso de un adecuado régimen de dosificación para la combinación de rifampicina/colistín, no reproduzca el recrecimiento *in vivo*. En nuestro estudio, este fenómeno se logró revertir, al aumentar tan sólo en una dilución la concentración de uno de los antibióticos de la combinación. Por ejemplo: para la cepa A14, una combinación

de rifampicina (0.5 µg/ml)/ colistín (0.125 µg/ml) produce recrecimiento; sin embargo, si se aumenta la concentración de rifampicina a 1 µg/ml, se produce efecto bactericida que se prolonga hasta las 24 horas. Un trabajo de Garonzik *et al.* (2011), indica que el uso de colistín con el objetivo de lograr regímenes de dosis con alta seguridad y eficacia debería ser usado como parte de una terapia de combinación. En especial, para el caso de pacientes con buena a moderada función renal, para lo cuales, no es posible lograr valores de colistín que sean efectivas sin la administración de dosis de mantención de colistimetato sódico que pueden incrementar el riesgo de nefrotoxicidad. Sus resultados sobre las bases de análisis farmacocinéticos de colistimetato sódico y colistín en pacientes críticos, sugieren que debido a la incapacidad de lograr adecuadas concentraciones en plasma de colistín con monoterapia de colistimetato sódico, éste último debería ser usado como parte de una terapia de combinación, especialmente cuando se trata una infección causada por un organismo con una CIM > 0.5 µg/ml en un paciente con un *clearance* de creatinina >70 ml/min.

Existen estudios clínicos como el de Bassetti *et al.* (2008), en el cual el uso de la combinación de rifampicina/colistín en pacientes con NAVM y bacteriemia por *A. baumannii* multi- resistentes, presentó una buena respuesta clínica y microbiológica en el 76% de los casos, con dosis de colistimetato sódico de 2.000.000 UI tres veces al día en adición a rifampicina en dosis de 10 mg/kg cada 12 horas. Sin embargo, se han establecido nuevos regímenes de dosificación, que han sido probados en estudios clínicos, demostrando eficacia de colistín, en pacientes críticos, con infecciones por *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, que recibieron colistimetato sódico con una dosis de carga de 9.000.000 UI, seguido por dosis de mantención de 4.500.000 UI cada 12 horas, obteniéndose cura clínica en el 82.1% de los casos sin deterioro de la función renal (Dalfino *et al.*, 2012). Faltan estudios donde se pruebe el uso de colistimetato sódico en estas dosis en adición a rifampicina.

La utilidad de esta combinación antibiótica, también se sustenta en estudios *in vitro* que muestran que rifampicina, tiene actividad bactericida contra *A. baumannii* multi-resistentes; no obstante, desarrolla rápidamente altas tasas de resistencia al utilizarlo como monoterapia (Pachón- Ibañez *et al.*, 2006). Es posible que los buenos resultados obtenidos con la combinación de rifampicina/colistín dependa de la actividad bactericida de rifampicina y que colistín prevenga la aparición de *A. baumannii* resistentes a rifampicina, como lo sugieren los trabajos de Pachon- Ibañez *et al.* (2006). En algunos de los estudios realizados para evaluar

terapias de combinación con rifampicina, se encuentra que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas fueron multi-resistentes. En algunos estudios clínicos (4) que evaluaron sinergia para rifampicina en combinación con colistín *in vitro*, aunque la susceptibilidad antimicrobiana a rifampicina no fue especificada para *P. aeruginosa*, demostraron sinergismo entre rifampicina y colistín en todos los casos (Drapeau *et al.*, 2010). La actividad sinérgica *in vitro* e *in vivo* (modelos animales) también fue demostrada para infecciones por *A. baumannii* multi-resistentes productoras de carbapenemasas entre rifampicina/imipenem, sulbactam-ampicilina y colistín (Pachón- Ibañez *et al.*, 2010). En estudios experimentales en animales, conducidos por Pantopoulou *et al.* (2007), en ratas neutropénicas infectadas con cepas de *A. baumannii* multi-resistente, la eficacia de colistín aumentó después de la co-administración de rifampicina y los resultados fueron estadísticamente significativos en términos de reducción de la tasa de mortalidad.

Rifampicina y colistín es considerada una asociación efectiva por las siguientes razones: actividad bactericida, baja toxicidad de la combinación asociado a los diferentes mecanismos de *clearance* (hepática, renal) y actividad sinérgica *in vitro*. Además, la eficacia de rifampicina en asociación con diferentes antibióticos (colistín, carbapenémicos) ha sido demostrada incluso en los casos de resistencia documentada a rifampicina. Colistín como antibiótico individual ha demostrado efecto bactericida en concentraciones altas, por encima de 4 veces la CIM, que clínicamente es importante considerando la nefrotoxicidad dosis-dependiente del colistín. Además, es un agente antimicrobiano que muestra sólo un modesto efecto post-antibiótico contra *A. baumannii* a altas concentraciones; sin embargo, si se combina con rifampicina en niveles de la CIM, el efecto sinérgico y bactericida se mantiene durante 24 horas (Song *et al.*, 2007). En conjunto, estos datos sugieren que la terapia de combinación puede ser la única opción terapéutica para preservar la utilidad clínica de las polimixinas contra dichos patógenos resistentes (Lim *et al.*, 2011).

Además de la combinación de rifampicina/colistín, nuestros resultados también mostraron sinergia con la combinación de rifampicina/imipenem por método de damero aunque en un bajo porcentaje de las cepas, con un resultado indiferente en el 73% de las cepas de *P. aeruginosa* y en el 80% de las cepas de *A. baumannii*. Las combinaciones que resultaron ser sinérgicas en 4 cepas de *P. aeruginosa* (26.7%) y en 3 cepas de *A. baumannii* (20%) fueron evaluadas por cinética de muerte. Se confirmó sinergia en 6/7 de las combinaciones por este

método. Existen escasos datos en la literatura, para comparar estos resultados *in vitro*. En un estudio de Montero *et al.* (2004), se evaluaron 2 cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, con 8 asociaciones de rifampicina/imipenem a diferentes concentraciones, obteniendo un 25% de sinergia. Un estudio de cinética de muerte de Tripodi *et al.* (2007), en 9 aislados de *A. baumannii* multi- resistentes se observó sinergismo de rifampicina/imipenem en el 22% de los aislados estudiados. Podemos apreciar resultados similares entre los estudios, en cuanto a eficacia de la combinación de rifampicina/imipenem para obtener sinergia. Datos que avalan su uso, indican que esta combinación sería eficaz en evitar el surgimiento de resistencia en cepas multi- resistentes (Pachon- Ibañez *et al.*, 2006). Con las combinaciones sinérgicas, la CIM de rifampicina e imipenem para la mayoría de los aislados estudiados disminuyó a CIMs $\leq 16 \mu\text{g/ml}$, valores que son relevantes si consideramos que las concentraciones plasmáticas promedio que se logran con rifampicina son del orden de 8 a 24 $\mu\text{g/ml}$ y para imipenem de 20 $\mu\text{g/ml}$. Cabe destacar, que regímenes de dosis de rifampicina para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos multi- resistentes no han sido establecidos, debido al reciente uso en este tipo de infecciones. Algunos datos provenientes de la literatura, muestran que con dosis de rifampicina de 750- 900 mg una vez al día, se logran concentraciones en plasma de 20.87- 27.7 $\mu\text{g/ml}$ (Van Ingen *et al.*, 2011), que nos acercan a la CIM de rifampicina que se lograron con las combinaciones sinérgicas de rifampicina/colistín y rifampicina/imipenem en nuestro estudio.

En los resultados de cinética de muerte, también podemos destacar que las cepas de *P. aeruginosa* que no mostraron sinergia con ninguna de las combinaciones presentaban las CIMs más altas a imipenem (CIM 128 $\mu\text{g/ml}$ y $>512 \mu\text{g/ml}$) y a rifampicina (CIM $>512 \mu\text{g/ml}$). No obstante, en los aislados de *A. baumannii*, no hubo una asociación con CIMs altas a algún antibiótico, para los casos en que ambas combinaciones no fueron sinérgicas. Estas discrepancias, refuerzan la importancia de conocer más en profundidad, qué mecanismos de resistencia presentan nuestras cepas a nivel hospitalario y además que en cepas de *A. baumannii* con un comportamiento tan impredecible, es relevante disponer de estudios de sinergia *in vitro* para determinar combinaciones antibióticas adecuadas de tratamiento.

Siendo la tigeciclina, un antibiótico actualmente en uso para el tratamiento de *A. baumannii* multi- resistente y dado que se han reportado casos de resistencia a este antibiótico, en este estudio, también se investigó la interacción de tigeciclina/colistín;

tigeciclina/rifampicina; tigeciclina/imipenem; tigeciclina/amikacina, que resultó ser indiferente para todas las combinaciones estudiadas por el método de damero. Datos de la literatura, concuerdan parcialmente con estos resultados, debido a que en su mayoría obtienen sinergia, pero un bajo porcentaje. Varios autores examinaron la actividad de tigeciclina en combinación con diferentes antibióticos en cepas de *A. baumannii*. Petersen *et al.* (2006) y Vouillamoz *et al.* (2007), investigaron la interacción de tigeciclina con una colección de antibióticos por método de damero y cinética de muerte, contra un panel de aislados clínicos Gram negativos. En general, la combinación de tigeciclina con otros fármacos resultó en indiferencia en un 76% por método de damero y 88% por cinética de muerte. Sopirala *et al.* (2010), reportó resultados indiferentes con la combinación de tigeciclina con amikacina, colistimetato sódico o imipenem por método de damero y E-test®. Scheetz *et al.* (2007), también reportó una interacción indiferente por cinética de muerte con tigeciclina en combinación con una colección de diferentes antibióticos. Moland *et al.* (2008), observó sinergia y actividad bactericida de tigeciclina en combinación con amikacina en aislados altamente resistentes a tigeciclina y en un trabajo de Príncipe *et al.* (2009), en 24 cepas estudiadas, las combinaciones de tigeciclina con amikacina, imipenem y colistín, resultaron ser sinérgicos en un 10% de las cepas. A pesar que la interacción de tigeciclina con otros antibióticos produjo principalmente una interacción indiferente, debemos considerar que los puntos de corte de tigeciclina para bacilos Gram negativos no fermentadores aún no han sido establecidos, lo que nos da la posibilidad que estemos utilizando dosis subóptimas para este antibiótico. Un trabajo de Hagihara *et al.* (2012), mediante el uso de un modelo farmacodinámico *in vitro*, mostró que la combinación de tigeciclina/colistín (tigeciclina en dosis de 100 mg cada 12 horas) aumentó el efecto bactericida contra aislados de *A. baumannii* multi-resistentes y se describe un reporte de éxito terapéutico con la adición de tigeciclina a una terapia combinada, en un paciente con shock séptico producto de una pancreatitis aguda complicada (Taccone *et al.*, 2006).

Aunque la razón convencional cuando se combinan dos agentes es aumentar la actividad de cada agente a través del logro de un efecto sinérgico, un objetivo adicional es ayudar a alcanzar un aumento del efecto farmacodinámico que pueda potencialmente frenar la emergencia de más resistencia. Como se ha observado, el fenotipo de bacterias multi-resistentes puede ser mediado por varios mecanismos moleculares de resistencia, lo que

genera que una combinación antibiótica que ha sido previamente utilizada contra un organismo particular puede no siempre ser efectiva para otros pacientes que tienen la misma infección, lo cual explicaría en gran parte, las discrepancias que se observan entre diferentes trabajos al utilizar las mismas combinaciones antibióticas. Dentro de un grupo clonal, puede no haber un consenso de los tipos de combinaciones antibióticas que puedan constantemente actuar con eficacia. Como *A. baumannii* integra determinantes de resistencia con gran facilidad, una especulación podría ser que diferentes mecanismos de resistencia encontrados en aislados relacionados, pudieron ser up- regulados o adquiridos en diferente medida durante diferentes exposiciones a antibióticos. Por lo tanto, es posible que datos de pruebas de combinación no puedan ser fiables para ser aplicados a todos los miembros de un grupo clonal.

En un estudio de Sopirala *et al.* (2010; Ohio, Estados Unidos) ellos reportaron que imipenem/colistín o imipenem/tigeciclina fueron combinaciones sinérgicas efectivas para *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, mientras que la combinación de tigeciclina/colistín fue inefectiva. En contraste, en el trabajo de Lim *et al.* (2011; Singapur), tigeciclina/polimixina B fue una de las combinaciones bactericidas prometedoras para 9 aislados de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, mientras que la combinación de polimixinas/carbapenémicos no fue considerada. Esto es probablemente debido a las diferencias en los mecanismos de resistencia subyacentes, que se dilucidaron en los distintos estudios. Los aislados estudiados en el trabajo de Lim *et al.* (2011) albergaban los genes de carbapenemasas: *blaOXA-23*-y *blaOXA-51*, mientras que los determinantes genéticos de resistencia en los aislados estudiados por Sopirala *et al.* (2010), contenían integrones clase 1 en la totalidad de sus clones, además de β -lactamasas tipo OXA (tipo de OXA no se informó) y genes para acetiltransferasa y fosfotransferasa (*aacA4*, *aac (6')* - *Iad*, *aacC6* y *aphA1*), que imparten resistencia a los aminoglucósidos. Las discrepancias también pueden deberse a que Sopirala *et al.* (2010) asumió que la combinación antibiótica, que era sinérgica y eficaz para un clon representativo, también debía ser eficaz para el resto de la misma familia clonal, seleccionando un clon representativo de cada uno de los ocho tipos clonales para las pruebas de sinergia. Sin embargo, los resultados de Lim *et al.* (2011) ilustran que dentro de un grupo clonal, una combinación antibiótica no necesariamente logra ser efectiva para todos los

miembros de la familia. Por lo tanto, es claro que combinaciones antibióticas eficaces contra aislados multi- resistentes pueden ser altamente cepa-específica.

Las discrepancias de los resultados obtenidos en esta investigación en comparación a los obtenidos en estudios de otros autores, como los evidenciados principalmente con las combinaciones de tigeciclina y otros antibióticos, apoyan la necesidad de realizar estudios a nivel local y ayudar a guiar el uso de la combinación de antibióticos apropiados en diferentes partes del mundo en los que las cepas pueden diferir en sus mecanismos de resistencia.

Un fenómeno que complica aún más el problema de la resistencia antimicrobiana, es la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en el manejo de enfermedades infecciosas, especialmente mediante transferencia genética horizontal. En la última década, se ha demostrado una alta prevalencia (50-80%) de integrones entre cepas nosocomiales de *A. baumannii* y su alta asociación con diseminación de resistencia ha concitado mucha atención. En un trabajo de Tribuddharat *et al.* (1999), se localizó el gen *arr-2* en un *cassette* dentro de un integrón clase 1 en una cepa de *P. aeruginosa* multi- resistente. La CIM de rifampicina para esta cepa fue >256 µg/ml. En un estudio de Houang *et al.* (2003), se demostró la presencia de integrón clase 1 en un 33% de los aislados de *A. baumannii* (17/52), en los cuales (10/17) se demostró la presencia del gen *arr-2*, que se asocia a una CIM de rifampicina ≥ 32 µg/ml. En nuestro trabajo, de acuerdo a los estudios de susceptibilidad, todas las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* fueron resistentes a rifampicina. Dados los altos valores de CIM, principalmente encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* (entre 16 y 64 µg/ml y dos cepas con CIMs de 128 y 512 µg/ml), se esperaba encontrar el *cassette arr-2* asociado a resistencia a rifampicina, al menos en las cepas con las CIMs más elevadas. Nuestros resultados de la PCR, indican que la mayoría de las cepas contienen el integrón clase 1, sin embargo, no se obtuvieron productos que se asocien con la presencia del *cassette arr-2*. Esto indica probablemente que otros mecanismos están implicados en la resistencia a rifampicina o quizás los partidores utilizados en nuestro estudio no fueron capaces de evidenciarlos. Rifampicina es un antibiótico hidrofóbico que no penetra efectivamente a través de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Sin embargo, si se asocia con antibióticos que permeabilizan la membrana externa, como el colistín, rifampicina puede también ser efectiva para estas bacterias. En efecto, se ha observado que un aumento de la CIM de bacterias Gram negativas para rifampicina podría no atribuirse a una menor sensibilidad del blanco (RNA polimerasa)

sino a una penetración reducida de rifampicina a través de la membrana externa de estos organismos (Drapeau *et al.*, 2010). Por lo tanto, podríamos explicar la mayor efectividad de rifampicina/colistín en nuestras cepas, si el mecanismo de resistencia a rifampicina fuera por una disminución de la permeabilidad, la cual habría sido revertida por la acción del colistín. La ausencia del *cassette arr-2* apoyaría esta idea, ya que podríamos suponer que de haber sido ésta la causa de la resistencia, quizás la tasa de efectividad habría sido menor. Son pocos los estudios, que revelan mecanismos de resistencia a rifampicina en bacilos Gram negativos. Un estudio de Chandrasekaran *et al.* (1998), reporta resistencia a rifampicina mediada por un plasmidio en *Pseudomonas fluorescens*, el cual codificaría para una bomba de eflujo. En aislados de *A. baumannii*, se han descrito tres bombas de eflujo implicadas en resistencia a rifampicina, denominadas AdeXYZ (Coyne *et al.*, 2011), AdeDE (Chu *et al.*, 2006; Coyne *et al.*, 2011) y AdeIJK, que también ha sido involucrada en resistencia a tigeciclina (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Existen además otros mecanismos de resistencia a rifampicina, como por ejemplo mutaciones o duplicación del sitio blanco, proteínas de unión a la RNA polimerasa, que tienen un efecto protector y resistencia por modificación del antibiótico, como la glucosilación, fosforilación además de la ribosilación, pero que no han sido reportadas en bacilos Gram negativos no fermentadores (Tupin *et al.*, 2010).

Otro de los mecanismos de resistencia estudiado, asociado a resistencia en aislados de *A. baumannii*, es la presencia y expresión de bombas de expulsión multidrogas. Estudios recientes, indican que la bomba de eflujo AdeABC en aislados de *A. baumannii*, está implicado en la disminución de la susceptibilidad a nuevos antimicrobianos como la tigeciclina. Desafortunadamente, existen varios estudios donde la resistencia a tigeciclina se ha desarrollado rápidamente en pacientes que están recibiendo tigeciclina, con aislados que presentan CIM de 4-16 µg/ml post- tratamiento. La expresión constitutiva de la bomba AdeABC, aumenta la CIM de tigeciclina a 4 µg/ml en aislados clínicos de *A. baumannii*. (Gootz *et al.*, 2008). Mediante el *screening* realizado en este trabajo, no se logró demostrar la presencia de esta bomba de expulsión, resultados esperados, dado que mediante la microdilución en caldo, la mayoría de las cepas demostró ser sensible a tigeciclina y sólo se obtuvo tres cepas con susceptibilidad intermedia. Al analizar las cepas por dilución en agar, la máxima CIM obtenida, correspondió a 2 µg/ml y al realizar el estudio de presencia de bomba de eflujo AdeABC, asociado a resistencia a tigeciclina, los resultados obtenidos indican que

ninguna de las cepas de *A. baumannii* presenta este mecanismo de resistencia. No obstante, podemos encontrar otras bombas de eflujo implicadas en la resistencia a tigeciclina, que también forman parte de la familia RND, como por ejemplo la bomba AdeIJK, cuya inactivación confiere una disminución de 3 veces la CIM de la tigeciclina y además existiría una tercera bomba denominada AdeFGH que podría estar implicada en resistencia, ambas bombas han sido encontradas en aislados de *A. baumannii* (Coyne *et al.*, 2011).

Considerando todos los antecedentes antes mencionados y que datos en la literatura sobre regímenes combinados con rifampicina son limitados y hacen referencia principalmente a estudios no controlados, el beneficio real del uso de terapias asociadas a rifampicina para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos multi- resistentes en términos de resultados clínicos y tasas de sobrevida aún necesitan ser evaluados. Estudios clínicos randomizados controlados son necesarios para confirmar la eficacia clínica de rifampicina luego de haber demostrado sinergismo *in vitro* con otros antibióticos como el colistín.

Las investigaciones futuras deben incluir más estudios farmacocinéticos para establecer perfiles clínicamente más relevantes de la tigeciclina y colistín/polimixina B. Esto mejorará la aplicabilidad de los datos obtenidos en modelos *in vitro* e *in vivo* para dilucidar las combinaciones de antimicrobianos que potencialmente pueden ser utilizados en infecciones por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multi- resistente. Debe considerarse el estudio de pruebas de combinaciones antibióticas *in vitro* utilizando concentraciones de fármaco clínicamente relevantes en lugar de concentraciones basadas en la CIM para guiar a los médicos a determinar qué combinación antimicrobiana y en qué dosis pueden ser utilizados como terapia empírica.

Aunque mediante el método de cinética de muerte, los resultados no pueden estar a disposición de los médicos en el momento oportuno para tomar decisiones, puede ayudar a reducir las posibles combinaciones alternativas a utilizar para el tratamiento empírico, mientras se está a la espera de los resultados de las pruebas de combinación. Es deseable encontrar un método *in vitro* de detección de sinergia que sea simple de realizar, preciso y reproducible y que tenga el potencial para la extrapolación clínica. Los métodos de cinética de muerte y de tablero de ajedrez son las técnicas más ampliamente utilizadas para evaluar sinergia pero son laboriosos y costosos. La prueba Epsilon (E-test), una prueba menos exigente técnicamente, no ha sido bien estudiado para las pruebas de sinergia. White *et al.*

(1996), comparó los tres métodos para evaluar sinergia, obteniendo un alto porcentaje de concordancia en los resultados por cinética de muerte y E-test®. Considerando, lo importante que es el tiempo en el tratamiento oportuno de pacientes con infecciones graves, son necesarios estudios que permitan evaluar si se obtiene concordancia entre los resultados de combinaciones sinérgicas de cinética de muerte y E-test®.

Una de las dificultades para el estudio de terapias de combinación es el hecho que actualmente no ha sido validada una técnica confiable para evaluar la susceptibilidad a rifampicina y tigeciclina. Por lo tanto, un objetivo adicional de nuestro estudio fue realizar una comparación de los resultados de susceptibilidad obtenidos mediante microdilución en caldo, E-test® y difusión en agar. Con respecto al estudio de susceptibilidad a rifampicina, en cepas de *P. aeruginosa*, si comparamos los resultados de susceptibilidad por categorización, obtenidos por microdilución en caldo y E-test®, obtenemos un alto porcentaje de error muy grave (6.7%), que en conjunto con un coeficiente de correlación de 0.15, indican que el E-test® no podría ser considerado una opción segura para determinar susceptibilidad a rifampicina en cepas de *P. aeruginosa*. Si comparamos los resultados de susceptibilidad por categorización mediante microdilución en caldo y difusión en agar encontramos un error menor, lo que indica que a pesar de esa diferencia, las 29 cepas restantes fueron categorizadas por ambos métodos como resistentes.

Con respecto al estudio de susceptibilidad a rifampicina, en cepas de *A. baumannii*, si comparamos los resultados de susceptibilidad por categorización obtenidos mediante microdilución en caldo y E-test®, obtenemos un 100% de concordancia, que se refleja también en un coeficiente de correlación cercano a 1 (0.8). Si comparamos los resultados de susceptibilidad por categorización mediante microdilución en caldo y difusión en agar, obtenemos concordancia en el 100% de los casos.

Las discrepancias obtenidas al comparar microdilución en caldo y E-test® para susceptibilidad a rifampicina entre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se explican por los rangos de CIM que evalúa la tira de E-test®, el cual llega hasta 32 µg/ml. Si consideramos que nuestras cepas de *P. aeruginosa* estudiadas muestran una CIM por microdilución en caldo en un rango entre 32 y >512 µg/ml, la tira de E-test® no se vuelve útil para el estudio de CIM en estas cepas. Contrario es lo que ocurre para las cepas de *A. baumannii*, cuyo rango de CIM se ubica

entre 8 y 32 µg/ml, lo que permite evaluarlos a través de las cinta de E-test®, haciendo comparable el E-test® con la CIM por microdilución en caldo.

Estos resultados permitirían utilizar cualquiera de las tres técnicas para estudio de susceptibilidad a rifampicina en cepas de *A. baumannii*, utilizando los puntos de corte para cocáceas Gram positivas en el caso de la difusión en agar y los puntos de corte de resistencia a rifampicina ≥ 4 µg/ml según la BSCA. Para el caso de las cepas de *P. aeruginosa*, sería posible utilizar el método de difusión en agar para determinar susceptibilidad ya que hubo concordancia en la categorización en el 97% de las cepas, excepto en una que fue categorizada como intermedia.

Según los datos obtenidos en el estudio de susceptibilidad a tigeciclina en cepas de *A. baumannii*, si comparamos los resultados de susceptibilidad por categorización mediante microdilución en caldo y E- test®, obtenemos un error menor, que asociado a un coeficiente de correlación de 0.68, difícilmente puede considerarse como suficiente para concluir que las cintas de E-test® puedan ser utilizados como un método alternativo a la microdilución en caldo, debido a que es un valor bajo si se trata de la fiabilidad de un cierto test; sin embargo, por categorización se obtiene concordancia en el 95% de lo casos. Estos resultados concuerdan parcialmente con el análisis de los datos provenientes de un estudio multicéntrico realizado por García *et al.* (2009), que indican que existe muy buena correlación entre la microdilución en caldo y el E-test®, tanto para la categoría de susceptibilidad (concordancia 100%) como para las CIMs. La discordancia con respecto a la CIM, podría ser en parte debido a que la microdilución en caldo fue realizada mediante Sensititre® Trek Diagnostic.

Al comparar los resultados de susceptibilidad por categorización obtenidos por microdilución en caldo y difusión en agar, utilizando discos de tigeciclina de 15µg y aplicando los puntos de corte recomendados por la FDA para la mayoría de los microorganismos (susceptible ≥ 19 mm y resistente ≤ 14 mm) en *A. baumannii*, los resultados presentan un porcentaje inaceptable de errores menores (75%), que coincide con resultados de estudios americanos que indican altas tasas de error (23%) (García *et al.*, 2009).

El estudio de susceptibilidad a rifampicina por discos de difusión parece una buena opción para el estudio de susceptibilidad de bacilos Gram negativos, utilizando los puntos de corte para cocáceas Gram positivas; sin embargo, es necesario ampliar el estudio con un mayor número de cepas que sean representativas de varios hospitales. En el caso de la

tigeciclina, el estudio de susceptibilidad por discos de difusión no es posible por la baja correlación que hay en la interpretación de los resultados en comparación a los otros dos métodos. Es importante contar con puntos de corte adecuados para establecer la CIM de los antibióticos a utilizar en combinaciones antimicrobianas, debido a que de ello depende que nuestros resultados no se traduzcan en el uso de dosis subóptimas. Por otro lado, el obtener puntos de corte de rifampicina y tigeciclina para *A. baumannii* y *P. aeruginosa* permitirá investigar estos antimicrobianos en nuevas y diversas combinaciones, para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos multi- o pan- resistentes.

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio, apoyan la necesidad de aumentar el número de casos, incluir cepas de otros hospitales y seguir estimulando el estudio *in vitro* sistemático de nuevas combinaciones para tratamiento de estas cepas. La habilidad de las pruebas de sinergia *in vitro* no siempre se corroboran con los resultados *in vivo*, por lo tanto estudios clínicos para determinar la relevancia de estos resultados constituyen un desafío próximo.

RESUMEN DE RESULTADOS.

- La combinación de rifampicina/colistín mostró un alto porcentaje de sinergia tanto en aislados de *P. aeruginosa* (53.3%) como en aislados de *A. baumannii* (53.3%). La combinación de rifampicina/imipenem muestra actividad sinérgica en menor porcentaje (26.7% en *P. aeruginosa* y 20% en *A. baumannii*).
- El estudio de sinergia debe ser realizado mediante tablero de ajedrez y cinética de muerte puesto que los resultados de ambos métodos son complementarios.
- Las combinaciones de tigeciclina con rifampicina, imipenem, amikacina y colistín mostraron indiferencia para los aislados de *A. baumannii*, sin embargo, dado que los puntos de corte están siendo evaluados, una vez establecidos sería conveniente reevaluar estas combinaciones.
- La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* 93.3% y *A. baumannii* 100% presentan integrón clase 1, sin embargo, no se identificó el *cassette arr-2* responsable de la resistencia a rifampicina por ribosilación.
- Mediante el método de *screening* no se logró demostrar que la bomba de eflujo AdeABC está implicado en la disminución de la susceptibilidad a tigeciclina, lo que fue confirmado por el método de dilución en agar.
- El método de E-test® no es confiable para el estudio de susceptibilidad a rifampicina en cepas de *P. aeruginosa*, sin embargo, podría ser utilizado en el estudio de cepas de *A. baumannii*.
- El E-test® en cepas de *A. baumannii* podría ser considerado para el estudio de susceptibilidad a tigeciclina pero requiere más investigación.
- El método de difusión en agar (método cualitativo) parece una buena opción para el estudio de susceptibilidad a rifampicina en bacilos Gram- negativos (BGN) no fermentadores. En cuanto a la tigeciclina, el uso de difusión en agar para el estudio de susceptibilidad en cepas de *A. baumannii* no es una buena alternativa por el alto porcentaje de errores menores.

CONCLUSIONES.

- La hipótesis planteada en este estudio se cumplió parcialmente, debido a que se demostró interacciones sinérgicas para las combinaciones de rifampicina/imipenem y rifampicina/colistín para la mayoría de las cepas estudiadas, incluso siendo éstas resistentes a rifampicina. Sin embargo, no se obtuvo sinergia para las combinaciones de tigeciclina con rifampicina, imipenem, amikacina y colistín.
- El estudio *in vitro* de combinación antibiótica podría ser una herramienta útil para tomar decisiones en cuanto a continuar o modificar conductas terapéuticas en pacientes críticos que están recibiendo una terapia empírica.

PROYECCIONES.

- ✓ **Se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos moleculares responsables de las interacciones sinérgicas y explorar su potencial terapéutico.**
- ✓ **Es necesario combinar los resultados *in vitro* con otros datos, farmacocinéticos y farmacodinámicos con el fin de proporcionar una predicción más significativa de la eficacia *in vivo* de las combinaciones sinérgicas en la práctica clínica.**

ANEXOS.

Anexo N°1

Gráfico 1. Perfiles de resistencia *P. aeruginosa*

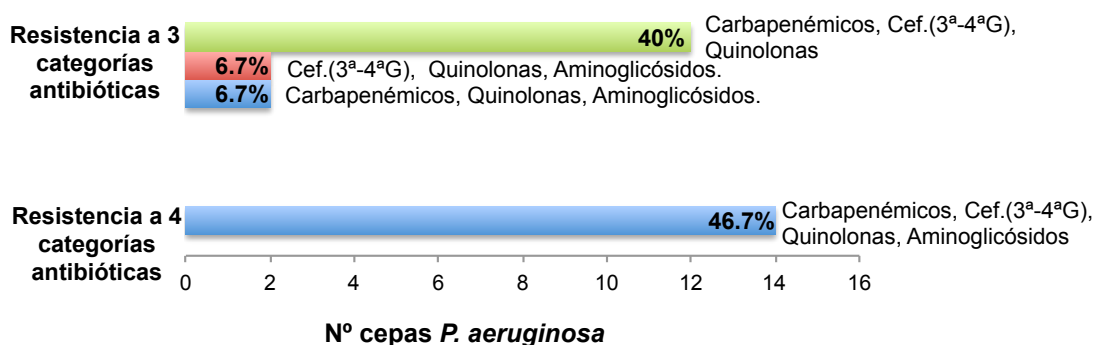
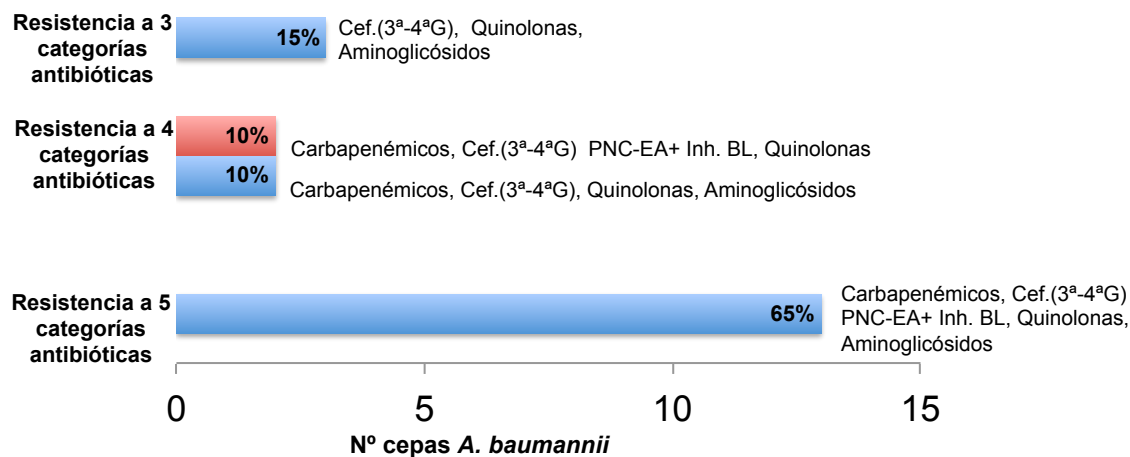


Gráfico 2. Perfiles de resistencia *A. baumannii*



Categorías antibióticas: Carbapenémicos (imipenem/meropenem); Cef.(3^a-4^aG): Cefalosporinas 3^a-4^a generación (ceftazidima/cefepime); Quinolonas (ciprofloxacino); Aminoglicósidos (amikacina); PNC EA+Inh.BL: Penicilina espectro ampliado + inhibidor betalactamasas (ampicilina/sulbactam)

Anexo N° 2. Preparación soluciones antibióticas madre. Almacenaje a -70°C.

	Rifampicina	Tigeciclina	Imipenem	Amikacina	Colistín
Concentración (µg/ml)	10.240	1.280	5.120	10.240	2.560
Potencia (µg/mg)	980	983	997	767	789,6
Peso (mg)	104,5	6,51	51,35	133,5	32,42
Volumen (ml)	10	10	10	10	10

Anexo N° 3. Preparación de diluciones intermedias de la solución madre para método de damero.

Esquema de diluciones para dos agentes a utilizar en método damero

Droga y N° paso	Concentración (µg/ml)	Origen	Diluyente CAMHB (ml)	Concentración intermedia (µg/ml)
Droga A				
1	10.240	Stock	9	1.024
2	1.024	Paso 1	1	512
3	1.024	Paso 1	3	256
4	1.024	Paso 1	7	128
5	128	Paso 4	1	64
6	128	Paso 4	3	32
7	128	Paso 4	7	16
8	16	Paso 7	1	8
9	16	Paso 7	3	4
10	16	Paso 7	7	2
11	2	Paso 10	1	1
Droga B				
1	1.280	Stock	9	128
2	128	Paso 1	1	64
3	128	Paso 1	3	32
4	128	Paso 1	7	16
5	16	Paso 4	1	8
6	16	Paso 4	3	4
7	16	Paso 4	7	2
El diluyente es CAMHB. Este es combinado con 1 ml del origen. Estos valores pueden ser modificados para obtener volúmenes de trabajo final suficientes.				

Anexo N°4. Preparación de diluciones intermedias de la solución madre para método de microdilución en caldo.

Esquema de diluciones para un agente a utilizar en microdilución en caldo

Droga y N° paso	Concentración (µg/ml)	Origen	Diluyente CAMHB (ml)	Concentración intermedia (µg/ml)
Droga				
1	10.240	stock	9	1.024
2	1.024	Paso 1	1	512
3	1.024	Paso 1	3	256
4	1.024	Paso 1	7	128
5	128	Paso 4	1	64
6	128	Paso 4	3	32
7	128	Paso 4	7	16
8	16	Paso 7	1	8
9	16	Paso 7	3	4
10	16	Paso 7	7	2
11	2	Paso 10	1	1
12	2	Paso 10	3	0.5

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Aoki, N.; Tateda, K.; Kikuchi, Y.; Kimura, S.; Miyazaki, Ch.; Ishii, Y.; Tanabe, Y.; Gejyo, F y Yamaguchi, K.** Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 63, 534–542, 2009.
2. **Bassetti, M.; Repetto, E.; Righi, E.; Boni, S.; Diverio, M.; Molinari, M.; Mussap, M.; Artioli, S.; Ansaldi, F.; Durando, P.; Orengo, G.; Bobbio Pallavicini, F. y Viscoli, C.** Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61, 417–420. 2008.
3. **Berlana, D.; Llop, J.; Fort, E.; Badia, M. y Jódar, R.** Use of colistin in the treatment of multiple-drug-resistant gram-negative infections. American Journal of Health-System Pharmacy. 62: 39-47, 2005.
4. **Bliziotis, A.; Samonis, G.; Vardakas, K.; Chrysanthopoulou, S. y Falagas, M.** Effect of aminoglycoside and beta-lactam combination therapy versus beta-lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Clinical Infectious Diseases. 41(2): 149-58, 2005.
5. **Bustamante, R. y Espinóla, V.** Informe de vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Unidad de Infecciones Intrahospitalarias. Departamento de Calidad en Salud Subsecretaría de Redes Asistenciales MINSAL, Chile, 2007.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100- S22, 2012.
7. **Chamot, E.; Boffi El Amari, E.; Rohner, P. y Van Delden, C.** Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(9): 2756-64, 2003.
8. **Chandrasekaran, S. y Lalithakumari, D.** Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Medical Microbiology. 47, 197-200. 1998.
9. **Chu, Y.; Chau, S. y Houang, E.** Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE y AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. Journal of Medical Microbiology. 55(Pt 4):477-8. 2006.
10. **Coyne, S.; Courvalin, P. y Périchon, B.** Efflux- Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter spp.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 55 (3), p. 947-953.
11. **Dalfino, L.; Puntillo, F.; Mosca, A.; Monno, R.; Spada, M.; Coppolecchia, S.; Miragliotta, G.; Bruno, F. y Brienza, N.** High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this right dosing strategy? A preliminary study. Clinical Infectious Diseases 54(12): 1720-6. 2012.

12. **Damier-Piolle, L.; Magnet, S.; Brémont, S.; Lambert, T. y Courvalin, P.** AdeIJK, a Resistance-Nodulation-Cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(2):557-62. 2008.
13. **Diomedi, A.** *Acinetobacter baumannii* pandrug-resistant: update in epidemiological and antimicrobial managing issues. *Revista Chilena Infectología*. 22(4): 298-320, 2005.
14. **Drapeau, M.; Grilli, E. y Petrosillo, N.** Rifampicin combined regimens for gram-negative infections: data from the literature. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35(1): 39-44, 2010.
15. **Entenza, J. y Moreillon, P.** Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34(1): 8.e 1-9, 2009.
16. **Eliopoulos, G. y Moellering, R.** Antimicrobial combinations. En: Lorian V. (Ed.) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins. Baltimore. 4th Edition. p: 330-96, 1996.
17. **El Solh, A. y Alhajhusain, A.** Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64(2): 229-38, 2009.
18. **Falagas, M. y Kasiakou, S.** Colistín: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases* 40:1333-41, 2005.
19. **Falagas, M. y Kasiakou, S.** Toxicity of polymyxins: A systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*. 10:R27 (doi:10.1186/cc3995), 2006.
20. **Fernández-Viladrich, P.; Corbella, X.; Corral, F.; Tubau, F. y Mateu, A.** Successful treatment of ventriculitis due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with intraventricular colistin sulfomethate sodium. *Clinical Infectious Diseases*. 28:916-7, 1999.
21. **Fica, C.; Céspedes, J.; Gompertz, G.; Jalón, V.; Sakurada, Z. y Sáez, L.** Intravenous colistin in the treatment of infections due to pan-resistant Gram negative bacilli . *Revista Chilena Infectología*. 24(5):360-7, 2007.
22. **Gales, A.; Jones, R.; y Sader, H.** Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 66: 2070–2074. 2011.
23. **García, P.; Porte, L. y Curcio, D.** Estudio de susceptibilidad a tigeiciclina: Influencia del agar Mueller-Hinton en el método de difusión en agar y validación del método E-test® para *Acinetobacter baumannii*. *Revista Chilena de Infectología*. 26 (Supl 1): 13-16, 2009.
24. **Garnacho, J.; Leyba, C.; Jiménez, F.; Barrero, A.; García, J. y Bernabeu, M.** Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases*. 36:1111-8, 2003.

25. **Garonzik, S.; Li, J.; Thamlikitkul, V.; Paterson, D.; Shoham, S.; Jacob, J.; Silveira, F.; Forrest, A. y Nation, R.** Population pharmacokinetics of colistín methanesulfonate and formed colistín in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(7): 3284-3294. 2011.
26. **González, G.; Mella, S.; Zemelman, R.; Bello, H. y Domínguez, M.** Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile*. 132: 619-26, 2004.
27. **Gootz, T. y Marra, A.** *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Multidrug-resistant Threat. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 6(3): 309-325. 2008.
28. **Hagihara, M.; Housman, S.; Nicolau, D. y Kuti, J.** In Vitro pharmacodynamics of polymyxin B (PMB) and tigecycline (TGC) alone and in combination against multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* (ACB). Abstract A-023. IAAC 2012, San Francisco.
29. **Heyland, D.; Dodek, P.; Muscedere, J.; Day, A. y Cook, D.** Canadian Critical Care Trials Group. Randomized trial of combination versus monotherapy for the empiric treatment of suspected ventilator-associated pneumonia. *Critical Care Medicine*. 36(3):737-44, 2008.
30. **Hogg, G.; Barr, J. y Webb, C.** In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 41: 494-495. 1998.
31. **Houang, E.; Chu, Y.; Lo, W.; Chu, K. y Cheng, A.** Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo- β -lactamase (*bla_{IMP4}*) gene cassettes in class I integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:1382-1390, 2003.
32. **Isenberg, H.** *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. ASM press Washington, D.C. Volumen 2. Sección 5. Antimicrobial Susceptibility Testing. Capítulos 5.1; 5.2; 5.8; 5.10; 5.12; 5.14, 2007.
33. **Koeleman, J.; Stoof, J.; Van Der Bijl, M.; Vandenbroucke- Grauls, C. y Savelkoul, P.** Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(1): 8-13, 2001.
34. **Korvick, K.; Peacock, J; Robert, J.; Muder, R.; Wheeler, R. y Yu, V.** Addition of Rifampin to Combination Antibiotic Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Prospective Trial Using the Zelen Protocol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p- 620-625. 1992.
35. **Levin, A.; Barone, A.; Penço, J.; Santos, M.; Marinho, I.; Arruda, E.; Manrique, E. y Costa, S.** Intravenous colistin as therapy of nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*. 28:1008-11, 1999.

36. **Lim, TP.; Tan, T.; Lee, W.; Sasikala, S.; Tan, T.; Hsu, LY. y Kwa, AL.** In-vitro activity of polymyxin B, rifampicin, tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. Plos One. 21;6(4):e18485. 2011
37. **Linden, P.; Kusne, S.; Coley, K.; Fontes, P.; Kramer, D. y Paterson, D.** Use of parenteral colistin for the treatment of serious infections due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Infectious Diseases. 37:e 154-60, 2003.
38. **Livermore, D.** Tigecycline: What is it, and where should it be used?. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56:611-14, 2005.
39. **López-Fabal, F.; Culebras, E.; Bonilla, I.; Gómez, M. y Picazo, J.** Actividad in vitro de terapia combinada con colistina frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en Unidad de Cuidados Intensivos. Revista Española de Quimioterapia. 21(3): 189-193, 2008.
40. **Louie, A.; Grasso, C.; Bahniuk, N.; Van Scoy, B.; Brown, D.; Kulawy, R. y Drusano, G.** The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(6):2646-54, 2010.
41. **Luque, S.; Grau, S.; Berenguer, N.; Horcajada, J.; Sorlí, L.; Montero, M. y Salas, E.** Luces y sombras en el uso de colistina: falta mucho por conocer. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. doi:10.1016/j.eimc. 2011.
42. **Magnet, S.; Courvalin, P. y Lambert, T.** Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (12): 3375-80, 2001.
43. **Markou, N.; Apostolakis, H.; Koumoudiou, C.; Athanasiou, M.; Koutsouku, A.; Alamanos, I. y Gregorakos, L.** Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multi-resistant gram-negative bacilli in critically ill patients. Critical Care. 7:R78-83, 2003.
44. **Michalopoulos, A.; Tsiodras, S.; Rellos, K.; Mentzelopoulos, S. y Falagas, M.** Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. Clinical Microbiology and Infection. 11:115-21, 2005.
45. **Moland, E.; Craft, D.; Hong, S.; Kim, S.; Hachmeister, L.; Sayed, S. y Thomson, K.** In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and selection of tigecycline-amikacin synergy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52(8): 2940-2, 2008.
46. **Montero, A.; Ariza, J.; Corbella, X.; Doménech, A.; Cabellos, C.; Ayats, J.; Tubau, F.; Borraz, C. y Gudiol, F.** Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54:1085-91, 2004.
47. **Moraga, R.; Santander, E.; Arias, T. y Méndez, F.** Integrons and their relationship with resistance phenotype in Gram negative bacilli isolated in the Hospital Torres Galdames, Iquique, Chile. Revista Chilena de Infectología. 24(5): 384-90, 2007.

48. **Opazo, A.; Mella, S.; Domínguez, M.; Bello, H. y González, G.** Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Revista Chilena de Infectología*. 26(6): 499-503, 2009.
49. **Otaíza, F.; Pohlenz, M.; Brenner, P. y Bustamante, R.** Informe de vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Unidad de Infecciones Intrahospitalarias. Departamento de Calidad en Salud Subsecretaría de Redes Asistenciales MINSAL, Chile, 2005.
50. **Owen, R.; Li, J.; Nation, R. y Spelman, D.** In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59, 473-477. 2007.
51. **Pachón-Ibáñez, M.; Fernandez-Cuenca, F.; Docobo-Perez, F.; Pachón, J. y Pascual, A.** Prevention of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:689– 692. 2006.
52. **Pachón-Ibáñez, M.; Docobo-Pérez, F.; López-Rojas, R.; Domínguez-Herrera, J.; Jiménez-Mejías, M.; García-Curiel, A.; Pichardo, C.; Jiménez, L. y Pachón, J.** Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(3): 1165-72, 2010.
53. **Pantopoulou, A.; Giamarellos- Bourboulis, E.; Raftogannis, M.; Tsaganos, T.; Dontas, I. y Koutoukas, P.** Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29:51-5. 2007.
54. **Peleg, A.; Potoski, B.; Rea, R.; Adams, J.; Sethi, J.; Capitano, B.; Shahid, H.; Eun, J.; Sunil, V.; y David, L.** *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline. A cautionary report. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59:128-31, 2007.
55. **Petersen, P.; Labthavikul, P.; Jones, C. y Bradford, P.** In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(3): 573-6, 2006.
56. **Petrosillo, N.; Chinello, P.; Proietti, M.; Cecchini, L.; Masala, M.; Franchi, C.; Venditti, M.; Esposito, S. y Nicastrì, E.** Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events. *Clinical Microbiology and Infection*. 11:682-3, 2005.
57. **Picazo, J.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 1ª Edición (11), 2000.

58. **Pillar, C.; Draghi, D.; Dowzicky, M. y Sahm, D.** In Vitro activity of tigecycline against Gram-Positive and Gram-Negative pathogens as evaluated by broth microdilution and Etest. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(9):2862, 2008.
59. **Principe, L.; D'Arezzo, S.; Capone, A.; Petrosillo, N. y Visca, P.** In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 8:18, 2009.
60. **Ramírez, C.; Pino, C.; González, G.; Bello, H.; Domínguez, M.; Mella, S.; Zemelman, R.; Young, H. y Amyes, S.** Presencia de integrones y su relación con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. *Revista Médica de Chile*. 128:863-7, 2000.
61. **Safdar, N.; Handelsman, J. y Maki, D.** Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in gram-negative bacteremia? A metaanalysis. *Lancet Infectious Diseases*. 4:519–27, 2004.
62. **Scheetz, M.; Qi, C.; Warren, J.; Postelnick, M.; Zembower, T.; Obias, A. y Noskin, G.** In vitro activities of various antimicrobials alone and in combination with tigecycline against carbapenem-intermediate or –resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(5):1621-6, 2007.
63. **Silva, F.; Cifuentes, M.; Pinto, ME.** Results of antimicrobial susceptibility surveillance in Chile: consolidating a network. *Revista Chilena de Infectología*. 28(1):19-27. 2011.
64. **Song, J., Cheong, H.; Lee, J.; Sung, A. y Kim, W.** Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. *International Journal Antimicrobial Agents*. 33:33–39. 2009.
65. **Sopirala, M.; Mangino, J.; Gebreyes, W.; Biller, B.; Bannerman, T.; Balada-Llasat, J. y Pancholi, P.** Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(11): 4678-83, 2010.
66. **Taccone, F.; Rodriguez-Villalobos, H.; De Backer, D.; De Moor, V.; Deviere, J.; Vincent, J. y Jacobs, F.** Successful treatment of septic shock due to pan- resistant *Acinetobacter baumannii* using combined antimicrobial therapy including tigecycline. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 25: 257-260. 2006.
67. **Tan, CH.; Li, J. y Nation, R.** Activity of colistín against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in a in vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(9): 3413-3415. 2007.
68. **Tan, TY.; Lim, TP.; Lee, WH.; Sasikala, S.; Hsu, LY. y Kwa, AL.** *In Vitro* Antibiotic Synergy in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: the Effect of Testing by Time-Kill, Checkerboard, and Etest Methods. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. p. 436–438. 2011.

69. **Tribuddharat, C. y Fennewald, M.** Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43:960-62, 1999.
70. **Timurkaynak, F.; Can, F.; Azap, O.; Demirbilek, M.; Arslan, H. y Karaman, S.** In vitro activities of nontraditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International Journal Antimicrobial Agents*. 27:224–228. 2006.
71. **Tripodi, M.; Durante- Magnoni, E.; Fortunato, R.; Utili, R. y Zarrilli, R.** Comparative activities of colistín, rifampicin, imipenem y sulbactam/ampicilina alone or in combination against epidemic multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *International Journal Antimicrobial Agents*. 30:537-40. 2007.
72. **Tupin, A.; Gualtieri, M.; Roquet-Banères, F.; Morichaud, Z.; Brodolin, K. y Leonetti, JP.** Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35(6):519-23. 2010.
73. **Van Ingen, J.; Aarnoutse R.; Donald, P.; Diacon, A.; Dawson, R.; Plemper Van Balen, G.; Gillespie, S. y Boeree, M.** Why do we use 600 mg of rifampicin in tuberculosis treatment?. *Clinical Infectious Diseases*. 52(9): e194-e199. 2011.
74. **Vouillamoz, J.; Moreillon, P.; Giddey, M. y Entenza, J.** In vitro activities of tigecycline combined with other antimicrobials against multiresistant gram-positive and gram-negative pathogens. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61(2):371-4, 2008.
75. **Webber, M. y Coldham, N.** 2010. Measuring the activity of active efflux in Gram-negative bacteria. Stephen H. Gillespie and Timothy D. McHugh (eds.), *Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition*, Methods in Molecular Biology, Vol. 642. 2010.
76. **White, R.; Burgess, D.; Manduru, M. y Bosso, J.** Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. P. 1914–1918. 1996.
77. **Xiong, Y.; Caillon, J.; Drugeon, H.; Potel, G. y Baron, D.** The effect of rifampicin on adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 37, 993-998, 1996.
78. **Yoon, J.; Urban, C.; Terzian, C.; Mariano, N. y Rahal, J.** In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:753-57, 2004.
79. **Yousefi, S.; Nahaei, M.; Farajnia, M.; Ghojzadeh, M.; Akhi, M.; Sharifi, Y.; Milani, M. y Ghotaslou, R.** Class 1 integron and Imipenem Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence and Antibiotic Susceptibility. *Iranian Journal of Microbiology*. Volume 2 Number 3, 2010.