

Original

Actividad *in vitro* de azitromicina frente a aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*

F. Fernández Cuenca¹, A. Pascual^{1,2}, L. Martínez Martínez^{1,2} y E.J. Perea^{1,2}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, España;

²Departamento de Microbiología y Epidemiología Infecciosa, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

RESUMEN

Se estudió la actividad de azitromicina frente a 225 cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas consecutivamente en 26 hospitales españoles durante el mes de noviembre de 2000. Se determinó la actividad *in vitro* de azitromicina mediante microdilución, siguiendo las recomendaciones del NCCLS. En 15 cepas no relacionadas clonalmente se determinó la actividad bactericida de azitromicina mediante el método de subcultivo en agar. En cinco cepas se empleó, además, el método de las curvas de letalidad. La CMI₅₀ y la CMI₉₀ de azitromicina fueron 32 mg/l y 64 mg/l, respectivamente. Azitromicina presentó una actividad bactericida moderada en 14 cepas evaluadas por el método de subcultivo (CMB 1 a 4 diluciones más elevadas que las CMI). En tres cepas, el número de UFC/ml se redujo entre 1 y 1,4 log en presencia de concentraciones de azitromicina equivalentes a 1 y 4 veces su CMI. Se concluye que azitromicina posee una moderada actividad bactericida frente a las cepas de *A. baumannii* estudiadas.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii* - Azitromicina - Sensibilidad antimicrobiana - Actividad bactericida

In vitro activity of azithromycin against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

SUMMARY

The activity of azithromycin against 225 clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated consecutively from 26 Spanish hospitals in November 2000 was studied. The MICs of azithromycin were determined by microdilution, according to the NCCLS guidelines. The bactericidal activity of azithromycin against 15 clonally unrelated *A. baumannii* strains with different antimicrobial susceptibility patterns was tested using the subculture method. The killing-curves method was also performed against five strains with different susceptibility to azithromycin. The MIC₅₀ and MIC₉₀ of azithromycin were 32 and 64 mg/l, respectively. Moderate bactericidal activity was observed in 14 out of the 15 strains evaluated by the subculture method (MBCs from 1 to 4 dilution steps higher than the MICs) and by the killing-curve method. For three strains the number of CFU/ml was reduced 1 to 1.4 log by concentrations of azithromycin equivalent to 1 and 4 times their MICs. It is concluded that azithromycin has moderate bactericidal activity against the strains of *A. baumannii* evaluated.

Key words: *Acinetobacter baumannii* - Azithromycin - Antimicrobial susceptibility - Bactericidal activity

INTRODUCCIÓN

El género *Acinetobacter* incluye al menos 21 genoespecies, de las que *Acinetobacter baumannii* es la que posee mayor relevancia clínica, principalmente en pacientes con enfermedades de base graves que ingresan en la UCI (1). En la última década se ha producido un notable aumento de las tasas de resistencia de *A. baumannii* a los antimicrobianos, incluidos los de amplio espectro (cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenemes, aminoglucósidos y fluoroquinolonas) (2, 3). Los carbapenemes y el sulbactam son eficaces para el tratamiento de las infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* multirresistentes (4, 5). Sin embargo, cada vez se aíslan con mayor frecuencia cepas de *A. baumannii* resistentes a los carbapenemes o el sulbactam, por lo que las opciones terapéuticas se reducen drásticamente a compuestos muy tóxicos (polimixinas) o a asociaciones de carbapenemes o sulbactam más un aminoglucósido (tobramicina o amikacina) (6, 7).

Diversos estudios realizados tanto *in vitro* como en modelos de experimentación animal han demostrado que las nuevas fluoroquinolonas (por ejemplo clinafloxacino y levofloxacino), rifampicina, doxiciclina y fosfomicina, solas o en asociación con otros antimicrobianos, son activas frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii*, pero su eficacia aún no ha sido evaluada en humanos (8-12).

Todo lo anterior hace necesaria la búsqueda de nuevos antimicrobianos o combinaciones con actividad frente a las cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

La azitromicina es un macrólido (azálido) con 15 átomos en su anillo lactónico macrocíclico que inhibe la síntesis de proteínas en las bacterias mediante su unión a la subunidad 50S de los ribosomas. Es activa frente a bacterias grampositivas, algunas bacterias gramnegativas (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter* spp., *Neisseria* spp.) y, sobre todo, frente a patógenos intracelulares (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Legionella* y *Rickettsia*). Posee, en cambio, una baja actividad frente a enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores (13). Algunos estudios realizados *in vitro* han demostrado que la azitromicina tiene actividad bactericida frente a *A. baumannii*, incluyendo cepas resistentes a los carbapenemes y con sensibilidad intermedia a ampicilina-sulbactam (14, 15).

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad bacteriostática y bactericida de la azitromicina frente a aislamientos clínicos de *A. baumannii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se evaluaron 225 cepas de *A. baumannii* cedidas por el Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). Las

cepas se aislaron durante el mes de noviembre de 2000 en 26 hospitales españoles (16).

En las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se utilizaron como controles *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Los aislamientos se conservaron en caldo de soja y triplicada (Difco, Detroit, EE.UU.), con un 10% de glicerol, a -80°C hasta su utilización.

Identificación y tipificación de *A. baumannii*

La identificación de las cepas de *A. baumannii* se realizó mediante pruebas fenotípicas (tinción de Gram, prueba de la oxidasa y pruebas bioquímicas convencionales) y mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (17).

Las cepas se tipificaron genotípicamente mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) siguiendo el método desarrollado por Allardet Servent y cols. (18). Se consideraron pulstipos distintos los patrones de restricción que se diferenciaron en tres o más bandas de DNA.

Actividad bacteriostática de azitromicina

Las CMI de azitromicina (Pfizer, Madrid, España) se determinaron mediante microdilución en caldo Mueller-Hinton (Difco) ajustado con cationes, siguiendo las recomendaciones del NCCLS (19). El rango de concentraciones de azitromicina evaluado fue de 256 mg/l a 0,125 mg/l.

Actividad bactericida de azitromicina

La actividad bactericida de azitromicina se determinó usando la técnica de subcultivo en agar sin antimicrobiano y mediante el método de las curvas de letalidad (20). En el método de subcultivo se evaluaron 15 cepas de *A. baumannii* no relacionadas clonalmente, que representan los fenotipos de sensibilidad antimicrobiana más frecuentes. Los subcultivos se realizaron en agar Mueller-Hinton.

La actividad de azitromicina se consideró bactericida cuando la CMB fue al menos una dilución superior a la CMI. Con el método de las curvas de letalidad se estudiaron cinco cepas no relacionadas clonalmente y con distinta sensibilidad a la azitromicina. Se evaluaron tres concentraciones de azitromicina equivalentes a 0,25, 1 y 4 veces la respectiva CMI de azitromicina. Los recuentos de bacterias viables se realizaron a las 0, 8 y 24 horas de incubación,

mediante subcultivo en agar Mueller-Hinton. La actividad de azitromicina se consideró bactericida cuando el número de UFC/ml se redujo más de 2 log respecto del control sin azitromicina.

RESULTADOS

Las CMI de azitromicina variaron entre $\leq 0,125$ mg/l y ≥ 512 mg/l. La CMI₅₀ y la CMI₉₀ de azitromicina fueron 32 mg/l y 64 mg/l, respectivamente.

Los valores de CMB de azitromicina obtenidos mediante subcultivo en agar Mueller-Hinton sin antimicrobiano se recogen en la Tabla 1. En 14 de las 15 cepas evaluadas la CMB de azitromicina fue dos (n=8), cuatro (n=2) o más de cuatro veces superior (n=4) a la CMI. En seis de las siete cepas en que la CMB de azitromicina fue dos veces superior a la CMI, este último valor era ≥ 32 mg/l.

En la Fig. 1 se presentan los resultados obtenidos mediante curvas de letalidad para azitromicina frente a cinco cepas de *A. baumannii*. Como puede observarse, el número de UFC/ml obtenido con las tres concentraciones de azitromicina evaluadas se redujo menos de 2 log respecto al recuento realizado en ausencia de azitromicina (control).

Tabla 1. Actividad bacteriostática (CMI) y bactericida (CMB) de azitromicina frente a 15 cepas de *A. baumannii*.

<i>A. baumannii</i>	Azitromicina	
	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)
243	2	4
245	2	32
225	32	64
232	32	32
204	64	128
229	64	128
200	64	128
240	64	>256
211	32	>256
186	64	128
189	64	128
205	64	128
193	32	128
202	32	128
218	32	>256

En las cepas Ab 1, Ab 39 y Ab 2 (CMI de azitromicina 32, 64 y 256 mg/l, respectivamente) el número de UFC/ml se redujo entre 1 y 1,4 log para concentraciones de azitromicina equivalentes a uno y cuatro veces la CMI de azitromicina. En cambio, en las cepas Ab 3 y Ab 30 (CMI de azi-

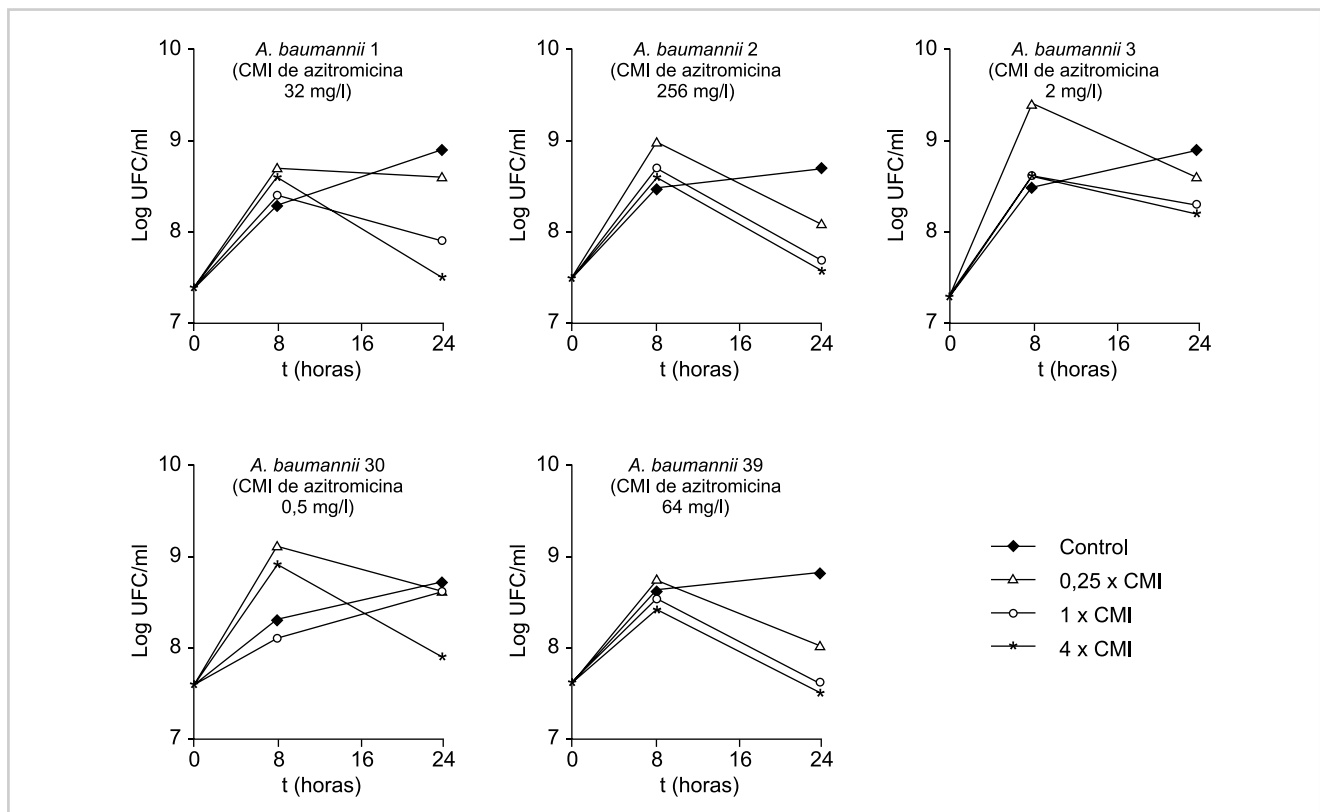


Figura 1. Curvas de letalidad para azitromicina en cinco cepas de *A. baumannii* con distinta sensibilidad.

tromicina 2 y 0,5 mg/l, respectivamente) el número de UFC/ml se redujo entre 0,1 y 0,8 log.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha producido un aumento creciente en la resistencia de *A. baumannii*, causado probablemente por el uso indiscriminado de antimicrobianos de amplio espectro. Los carbapenemes y el sulbactam constituyen el tratamiento de elección en las infecciones por *A. baumannii* multiresistente, pero la aparición de cepas de *A. baumannii* resistentes a estos fármacos ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos antimicrobianos o asociaciones de ellos con actividad frente a este tipo de cepas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en concordancia con lo observado por otros autores, indican que la azitromicina posee escasa actividad bacteriostática frente a *A. baumannii* (3, 15).

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ de azitromicina fueron superiores (32 y 64 mg/l, respectivamente) a los puntos de corte que el NCCLS establece para este antimicrobiano en otros microorganismos como *Haemophilus* spp. (≤ 8 mg/l para la categoría sensible), lo que sugiere una limitada utilidad clínica de azitromicina frente a *A. baumannii*. Además, las concentraciones hícticas de azitromicina suelen ser inferiores a 5 mg/l (a pesar de que se acumula entre diez y cien veces en el interior de las células hícticas, leucocitos y espacios intersticiales), una concentración que está muy por debajo de los valores de CMI observados, sobre todo en los casos en que éstos son de 64 mg/l o 256 mg/l (21, 22).

Nuestros datos indican, además, que la azitromicina (a las concentraciones evaluadas) posee moderada o baja actividad bactericida (el número de UFC/ml se redujo entre 0,1 y 1,4 log en presencia de azitromicina), hecho que también se ha observado en otros estudios (15).

Aunque en *P. aeruginosa* y *Proteus mirabilis* se ha observado que concentraciones de azitromicina inferiores a su CMI inhiben la expresión de factores de virulencia (23), en *A. baumannii* aún no se han realizado estudios que valoren esta posibilidad.

El estudio de la actividad de azitromicina en cepas de *A. baumannii* con mecanismos de resistencia caracterizados puede ayudar a comprender frente a qué tipo de cepas puede ser útil este macrólido.

En conclusión, azitromicina posee escasa actividad antimicrobiana frente a los aislamientos de *A. baumannii* evaluados.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado parcialmente por Pfizer Pharmaceuticals Inc. Agradecemos a los coordinadores del

proyecto GEIH Ab-2001, del Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) de la SEIMC, la cesión de las cepas de *A. baumannii*.

Correspondencia: Felipe Fernández Cuenca, Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Apdo. 914, 41009 Sevilla, España. Tel: 34-95-5008287. Fax: 34-95-4377413. E-mail: felipefc@supercable.es

BIBLIOGRAFÍA

- Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-165.
- Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A., Pulverer, G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 750-753.
- López Hernández, S., Alarcón, T., López Brea, M. Evolución de la sensibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* (1995-1997). Rev Esp Quimioterap 2000; 13: 394-400.
- Go, E.S., Urban, C., Burns, J., Kreiswirth, B., Eisner, W., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. Lancet 1994; 344: 1329-1332.
- Corbella, X., Ariza, J., Ardanuy, C. y cols. Efficacy of sulbactam alone or in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *A. baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 2: 793-802.
- Levin, A.S., Barone, A.A., Penco, J. y cols. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 1999; 28: 1008-1011.
- Cisneros, J.M., Reyes, M.J., Pachón, J. y cols. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical findings and prognostic features. Clin Infect Dis 1996; 22: 1026-1032.
- Martínez-Martínez, L., Rodríguez, G., Pascual, A., Suárez, A.I., Perea, E.J. In vitro activity of antimicrobial agent combinations against multiresistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1995; 38: 1107-1108.
- Pascual, A., López Hernández, I., Martínez-Martínez, L., Perea, E.J. In vitro susceptibilities of multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii* to eight quinolones. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 140-142.
- Joly-Guillou, M.L., Wolff, M., Farinotti, R., Bryskier, A., Carbon, C. In vitro activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 827-830.
- Rodríguez-Hernández, M.J., Pachón, J., Pichardo, C. y cols. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 493-501.
- Wolff, M., Joly-Guoflou, M.L., Farinotti, R., Carbon, C. In vivo efficacies of beta-lactams, beta-lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1406-1411.
- Retsema, J., Fu, W. Macrolides: Structures and microbial targets. Int J Antimicrob Agents 2001; 18 (Suppl.): 3-10.

14. Citron, D.M., Kwok, Y.Y., Fiorentino, N., Appleman, M.D. *In vitro* activity of azithromycin against *Acinetobacter* strains resistant to routinely tested betalactams, aminoglycosides, quinolones and imipenem. 4th International Conference on the Macrolides, Azalides, Streptogramins and Ketolides, Barcelona 1998; 4.48.
15. Appleman, M.D., Belzberg, H., Citron, D.M. y cols. *In vitro* activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1035-1040.
16. Fernández Cuenca, F., Pascual, A., Vila, J. y cols., Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Proyecto GEIH-Ab 2001: Sensibilidad de Acinetobacter spp. aislados en hospitales españoles a los antimicrobianos*. X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Sevilla, España 2002; abstr. 391
17. Vanechouttee, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I. y cols. *Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 11-15.
18. Allardet Servent, A., Bouzigues, N., Carles Nurit, M.J., Bourg, G., Gouby, A., Ramuz, M. *Use of low-frequency-cleavage-restriction endonuclease for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2057-2061.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard M7-A5, NCCLS, Wayne, PA, 1997; vol. 20, nº 2.
20. Amsterdam, D. *Antimicrobial combinations*. En: Lorian, V. (Ed). *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 1996; 330-396.
21. Neu, H.C. *Clinical microbiology of azithromycin*. *Am J Med* 1991; 91(3A): 12S-18S.
22. Peters, D.H., Friedel, H.A., McTavish, D. *Azithromycin, a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy*. *Drugs* 1992; 44: 750-799.
23. Kawamura, K., Inuma, Y., Hasegawa, T., Horii, T., Yamashino, T., Ohta, M. *Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2869-2872.