



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias con mención en
Microbiología

**Efecto antibacteriano de compuestos derivados de
líquenes antárticos sobre *Acinetobacter baumannii***

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en
Microbiología

XABIER ANDONI VILLANUEVA MARTÍNEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Gerardo González Rocha
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dra. Angélica Casanova Katny
Núcleo de Estudios Ambientales
Universidad Católica de Temuco

Comisión Evaluadora:



Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Homero Urrutia Briones
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Mauricio Cuéllar Fritis
Escuela de Química y Farmacia
Universidad de Valparaíso

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Juan y Marcela, y a mis hermanos Nicolás y Julián, quienes han sido un pilar fundamental a hora de poder desarrollar este trabajo y a la hora de orientar mi futuro académico y laboral.

Dedico este trabajo también a mi familia extendida, en especial a mi abuela Delfina.

Dedico también este trabajo a mis amigos más cercanos, por sus inestimables consejos y su apoyo constante.

A todos quienes han estado presentes de alguna forma durante mis años de Magíster, mis más sinceros agradecimientos.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al inestimable aporte del Instituto Nacional Antártico de Chile (INACH), a través de su proyecto de apoyo a tesis de Magíster INACH Gabinete MG_06-14 “Efecto antibacteriano de compuestos derivados de líquenes antárticos sobre *Acinetobacter baumannii*”.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), por su aporte a través del proyecto FONDEF IDeA CA12i10224 “Actividad antibacteriana de líquenes antárticos contra bacterias patógenas multiresistentes”, así como su apoyo financiero a través de la Beca CONICYT para financiamiento de estudios de Magíster.

A la totalidad del equipo del Laboratorio de Investigación en Agentes Antimicrobianos (LIAA), por entregarme las herramientas necesarias para poder desarrollar esta tesis de Magíster, en especial a quienes trabajaron conmigo en el proyecto FONDEF IDeA IDeA CA12i10224: Raúl Molina, Marcela Espinoza y Claudia Torres. También a todos aquellos miembros del laboratorio que indirectamente aportaron a mi aprendizaje durante el Magíster: Andrés Opazo, Tomás Kappes y Mario Quezada, quién me enseñó a usar herramientas estadísticas que fueron indispensables para mi tesis de magíster. A las técnicas de laboratorio Angélica Oliva y Evelyn Benavente, por su paciencia y buena disposición a la hora de ayudarme a preparar material y enseñarme técnicas básicas de laboratorio. A la Dra. Celia Lima, por su buena disposición para resolver dudas y aportar mejoras a mi trabajo de investigación.

Finalmente, quisiera agradecer a los profesores que estuvieron a cargo mío durante mi desempeño en el LIAA: Mariana Domínguez, Helia Bello y mi profesor guía Gerardo González, por su confianza en mi trabajo y la buena disposición que tuvieron para enseñarme a ser un investigador competente.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La resistencia a antibióticos: una emergencia sanitaria mundial	1
1.2. Características de <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
1.3. Virulencia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	9
1.4. Persistencia y capacidad de formación de biopelículas en <i>A. baumannii</i>	9
1.5. Realidad de <i>Acinetobacter baumannii</i> en Chile	12
1.6. Alternativas para el control de cepas resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
1.7. La Antártica como fuente de metabolitos antibacterianos.....	15
1.8. Objetivo general.....	17
1.9. Objetivos específicos	18
2. MATERIALES Y MÉTODO	19
2.1. Cepas sobre las que se ensayó la actividad antibacteriana y anti-biopelícula de los extractos totales y compuestos puros derivados de líquenes	19
2.2. Líquenes que se estudiaron en esta investigación	19

2.3. Determinación de actividad antibacteriana de extractos totales de líquenes antárticos sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> por ensayo de difusión en agar	20
2.4. Identificación de fracción con actividad antibacteriana del extracto total líquénico	22
2.5. Obtención de compuestos de las fracciones líquénicas.....	22
2.6. Determinación de CMI y CMB por microdilución en caldo	23
2.7. Realización de ensayos de descontaminación de superficie	25
2.8. Determinación de capacidad de inhibición de biopelícula.....	26
2.9. Determinación de actividad de erradicación de biopelícula	27
2.10. Análisis estadístico	28
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Objetivo 1: Determinar los extractos totales de líquenes antárticos con actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	28
3.2. Objetivo 2: Identificar las fracciones de extractos totales de líquenes antárticos responsables de la actividad antibacteriana sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes a los antibióticos	30
3.3. Objetivo 3: Cuantificar la actividad antibacteriana de compuestos puros obtenidos de las fracciones antes mencionada sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	31
3.4. Objetivo 4: Determinar la efectividad como desinfectante de compuestos puros sobre superficies abióticas, contaminadas con cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes a los antibióticos	36
3.5. Objetivo 5: Determinar la capacidad de los metabolitos para desagregar la biopelícula formada por cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes a los antibióticos.....	42
4. DISCUSIÓN	48

4.1. Objetivo 1: Determinar los extractos totales de líquenes antárticos con actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	48
4.2. Objetivo 2: Identificar las fracciones de extractos totales de líquenes antárticos responsables de la actividad antibacteriana sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes a los antibióticos	49
4.3. Objetivo 3: Cuantificar la actividad antibacteriana de compuestos puros obtenidos de las fracciones antes mencionada sobre cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	50
4.4. Objetivo 4: Determinar la efectividad como desinfectante de compuestos puros sobre superficies abióticas, contaminadas con cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes a los antibióticos	52
4.5. Objetivo 5: Determinar la capacidad de los metabolitos para desagregar la biopelícula formada por cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes a los antibióticos.....	55
5. CONCLUSIONES	59
6. PROYECCIONES	60
REFERENCIAS	61
ANEXOS	82
Anexo 1: Halos de inhibición promedio (mm) generados por discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 3 y 6 mg de extracto total de <i>Himantormia lugubris</i> sobre cepas de <i>A. baumannii</i>	82
Anexo 2: Comparación de actividad de HL sobre cepas de <i>A. baumannii</i> ...	83

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características de las cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> de origen hospitalario utilizadas en el estudio.....	21
TABLA 2. Halos de inhibición (mm) de discos impregnados con 3,0 y 6,0 mg de extracto total de <i>H. lugubris</i> sobre aislados seleccionados de <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341, <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 y clínicos de <i>A. baumannii</i>	29
TABLA 3. Halos de inhibición (mm) de discos impregnados con 4,5 mg de extracto total de 3 líquenes distintos sobre aislados seleccionados de <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341, <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 y clínicos de <i>A. baumannii</i>	29
TABLA 4. Halo de inhibición (mm) generado por discos de papel filtro impregnados con 4,5 mg de distintas fracciones del ET de <i>Himantormia lugubris</i> sobre aislados seleccionados de <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341, <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 y clínicos de <i>A. baumannii</i>	30
TABLA 5. Halo de inhibición (en mm) generado por discos de papel filtro impregnados con 4,5 mg de distintas fracciones del ET de <i>Ramalina terebrata</i> sobre aislados seleccionados de <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341, <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 y clínicos de <i>A. baumannii</i>	31
TABLA 6. CMI y CMB (en µg/ml) de la fracción metanólica de <i>H. lugubris</i> sobre aislados de <i>A. baumannii</i> sensibles a colistín	32
TABLA 7. CMI y CMB (en µg/ml) de la fracción metanólica de <i>H. lugubris</i> sobre aislados de <i>A. baumannii</i> resistentes a colistín	32

TABLA 8. Comparación entre CMI promedio, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de 12 aislados de <i>A. baumannii</i> susceptibles a colistín y 14 aislados de <i>A. baumannii</i> resistentes a colistín	33
TABLA 9. Actividad antibacteriana (CMI y CMB) de subfracciones de la fracción metanólica de <i>H. lugubris</i>	34
TABLA 10. Actividad antibacteriana (CMI y CMB) de atranol con inóculo estándar (5x10 ⁵ ufc/ml), sobre cepas de seleccionadas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	35
TABLA 11. Efecto del tamaño de inóculo en la CMI y CMB de atranol (µg/ml) e hipoclorito de sodio (% m/v) sobre <i>A. baumannii</i> A-496.....	36
TABLA 12. Efecto de atranol, hipoclorito de sodio y etanol a distintas concentraciones y a distintos tiempos de contacto sobre superficies de acero inoxidable contaminadas con <i>A. baumannii</i> A-496.....	37
TABLA 13. Agrupamiento, según ANOVA de una vía (con p < 0,05), de las dosis y tiempo de contacto a las cuales el efecto desinfectante del compuesto es similar	38
TABLA 14. Formación específica de biopelícula (SBF) de cepas de <i>A. baumannii</i> en condiciones control a 24 h de incubación, calculada en unidades arbitrarias ..	43
TABLA 15. Formación Específica de Biopelícula (promedio) de la cepa multisensible ATCC 19606 y diversos aislados extensivamente resistentes de <i>A. baumannii</i> , en presencia de distintas concentraciones subinhibitorias de atranol y con un tiempo de incubación de 24 h	45

TABLA 16. Formación Específica de Biopelícula (promedio) a las 24 h de incubación de los aislados de *A. baumannii* ensayados, agrupados en un solo grupo, en presencia de distintas concentraciones subinhibitorias de atranol 46

TABLA 17. Tabla basada en análisis ANOVA de una vía, en el que se agrupan los SBF promedio obtenidos según concentración de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) y semejanza estadística 46

TABLA 18. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB), Concentración Mínima de Inhibición de Biopelícula (CMIB) y Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB) de atranol sobre distintos aislados clínicos XDR de *Acinetobacter baumannii* 47

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Correlación entre concentración de atranol ($\mu\text{g/ml}$) y la carga bacteriana (\log_{10} de ufc/ml) sobre discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro, con un tiempo de contacto de 5 min 39

FIGURA 2. Correlación entre concentración de atranol ($\mu\text{g/ml}$) y la carga bacteriana (\log_{10} de ufc/ml) sobre discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro, con un tiempo de contacto de de 30 min 40

FIGURA 3. Correlación entre tiempo de contacto (minutos) y la carga bacteriana (\log_{10} de ufc/ml) en discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro, a concentraciones de atranol de 250 (A), 500 (B), 1000 (C), 2000 (D) y 4000 (E) $\mu\text{g/ml}$ 42

FIGURA 4. Formación de biopelícula en condiciones control a 24 h de incubación, calculada en unidades arbitrarias, al separar los aislados según nivel de susceptibilidad a colistín 44

ABREVIATURAS

ARDRA	Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado
ATCC	American Type Culture Collection (<i>“Colección estadounidense de cultivos tipo”</i> , cepario de bacterias)
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute (<i>“Instituto de estándares de laboratorio clínico”</i> de Estados Unidos)
CMB	Concentración mínima bactericida
CMEB	Concentración mínima de erradicación de biopelícula
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
FDA	Food and Drug Administration (<i>“Administración de alimentos y medicamentos”</i> de Estados Unidos)
GC-MS	Cromatografía de gases – espectrometría de masa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IAAS	Infecciones asociadas a atención en salud
IDSA	Infectious Disease Society of America (<i>“Sociedad estadounidense de enfermedades infecciosas”</i>)
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo
MDR	Bacteria multirresistente a antibióticos
MLSA	Análisis de Secuencias Multilocus
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDR	Bacteria panresistente a antibióticos
SBF	Formación específica de biopelícula
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina
XDR	Bacteria extensamente resistente a antibióticos
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UTI	Unidad de Tratamientos Intermedios

RESUMEN

Las bacterias del grupo *ESCAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad intrahospitalaria, por presentar elevada resistencia a antibióticos. De estos microorganismos, *A. baumannii* destaca no sólo por presentarse habitualmente con resistencia extensa (sensible sólo a colistín y/o tigeciclina), sino que también por persistir en el ambiente inanimado, principalmente por ser productor de biopelículas. Por esta razón, se hace imprescindible la búsqueda de nuevos compuestos con acción antibiótica, desinfectante de superficie y/o antibiopelícula sobre *A. baumannii*. En consecuencia, el objetivo de este trabajo de tesis fue buscar en líquenes colectados de Bahía Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica, la existencia de un metabolito con estas características.

Como resultado, se obtuvo que el líquen *Himantormia lugubris* producía un compuesto de la familia de los benzaldehídos llamado atranol, que presentó actividad bactericida sobre aislados extensivamente resistentes (XDR) a antibióticos de *A. baumannii*, con CMI entre 125 y 250 µg/ml y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 250 a 500 µg/ml. Por otro lado, este compuesto mostró actividad inhibitoria de la formación de biopelícula, presentando un 30% de inhibición de la formación de biopelícula (respecto a la condición control) a concentraciones menores a la CMI. Además, presentó una Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB) de entre 1000 y 2000 µg/ml, lo que corresponde a entre 4 y 8 veces la CMI, siendo por tanto muy superior a los comparadores meropenem (>1000 veces) y colistín (8 veces). Destaca además la existencia de una amplia variabilidad en la producción de biopelícula por parte de los aislados de *A. baumannii*, desde aislados con muy baja producción de biopelícula hasta aquellos con amplia producción de la misma.

No obstante, los resultados anteriores, no se logró demostrar actividad desinfectante de superficie para este compuesto, obteniéndose una disminución de la carga bacteriana

de un 90% (1 logaritmo) con un tiempo de contacto de 30 minutos y una concentración de 4000 µg/ml, no cumpliendo con el mínimo de 5 logaritmos de descenso de la carga bacteriana para ser considerado un desinfectante eficaz.

Se concluye que el atranol, obtenido del líquen *H. lugubris*, es capaz de eliminar la presencia de *Acinetobacter baumannii* tanto en fase planctónica (libre) como formando biopelículas y es por tanto un potencial candidato para prevenir o eliminar colonizaciones en dispositivos médicos, así como un eventual coadyuvante de los compuestos antimicrobianos actualmente en uso.



ABSTRACT

The bacteria of the group *ESCAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) are an important cause of intrahospital morbidity and mortality, because of being highly resistant to antibiotics. Of these microorganism, *A. baumannii* is remarkable not only for being usually extremely drug resistant (only susceptible to tigecycline or colistin), but also for its ability to persist in unanimated environments, mainly due to its capacity to form biofilms. For this reason, it is extremely important the quest for new compounds with antibiotic, disinfectant and antibiofilm action against *A. baumannii*. As a consequence, the main objective of this investigation was to search in lichens collected from Fildes Bay, King George Island, Antarctica, a secondary metabolite with these characteristics.

As a result, it was found that the lichen *Himantormia lugubris* produces a compound of the family of the benzaldehydes called atranol, which presented bactericidal activity against extremely-drug resistant isolates (XDR) of *A. baumannii*, with Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) from 125 to 250 µg/ml and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) from 250 to 500 µg/ml. On the other hand, this compound exhibited inhibitory activity against biofilm formation in several strains of *A. baumannii*, with an average inhibition of biofilm formation of 30% when compared to the positive control at concentrations below the MIC. Also, it exhibited a Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) between 1000 to 2000 µg/ml, which ranges from 4 to 8 times the MIC, thus being superior than meropenem (>1000 fold) and colistin (8 fold). It is also remarkable that there a great variability in the production of biofilm of the isolates of *A. baumannii*, form isolates with very low biofilm production to isolates with a very high production of that structure.

Besides the above results, it couldn't be demonstrated a surface disinfection ability for this compound, obtaining only a 90% (1-log) decrease with a contact time of 30 minutes

and a concentration of 4000 µg/ml, not accomplishing the minimal 5-log decrease (99.999%) in the bacterial load to be considered a successful disinfectant.

As conclusion atranol, obtained from the lichen *H. lugubris*, is capable of eliminate the presence of *A. baumannii* both in planktonic and biofilm forms. For this reason, atranol is a potential candidate for a compound to avoid or eliminate bacterial colonization of medical devices, and also a potential adjuvant of currently available antimicrobial compounds.



INTRODUCCIÓN

1.1. La resistencia a antibióticos: una emergencia sanitaria mundial

Actualmente la resistencia a antibióticos es un problema de gran magnitud a nivel mundial, sobre todo a nivel de centros de atención en salud (Labarca y Araos, 2009). En estos últimos, la aparición de Infecciones Asociadas a Atención en Salud (IAAS) produce prolongación de las hospitalizaciones, aumento de la morbi-mortalidad y aumento de los costos en atención a los pacientes (Klevens *et al.*, 2002; Ehrenkranz *et al.*, 2011; Zimlichman *et al.*, 2013). Estas infecciones se han asociado a la emergencia cada vez mayor de cepas multiresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) y panresistentes (PDR) a antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012).

Entre las causas de la emergencia de las infecciones intrahospitalarias causadas por bacterias resistentes a antibióticos se cuentan el aumento de la presión selectiva por el uso indiscriminado de antibióticos, la instrumentalización de pacientes, la hospitalización de pacientes inmunosuprimidos y el rompimiento de las precauciones estándar a la hora de atender pacientes, permitiendo esta última situación la propagación de brotes de bacterias hospitalarias (Hedrick y Sawyer, 2005). A pesar de que es técnicamente imposible reducir el riesgo a cero, se ha intentado una serie de estrategias para la disminución de la emergencia de IAAS y de cepas con resistencia aumentada a antimicrobianos. Entre estas estrategias se cuentan:

Racionalización del uso de antibióticos

Generación de protocolos y guías clínicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, asociado a la implementación de sistemas de vigilancia de uso de antibióticos (uso de receta visada por médico infectólogo) y sustitución de antimicrobianos con mayor impacto sobre la microbiota del paciente, lo que se resume en el concepto de “Antimicrobial Stewardship”, el cual presenta una amplia bibliografía que sustenta su utilidad (Bauer *et al.*, 2010; Nicolau, 2011).

Dentro de esta estrategia se incluye también la implementación de métodos rápidos de detección de cepas resistentes, con objeto de ajustar de forma más rápida y adecuada el tratamiento antibiótico. Respecto de esto último, destaca la emergencia de los métodos de biología molecular basados en PCR convencional y en tiempo real (Altun *et al.*, 2013), el uso de MALDI-TOF (Espinal *et al.*, 2012) y la aparición de los “Carba test” (Nordmann *et al.*, 2012), que disminuyen en al menos 1 día la detección de carabapenemasas y otros mecanismos de resistencia de importancia clínica.

Reforzamiento de las precauciones estándar.

Desde que Semmelweis descubriera, en la segunda mitad del siglo XIX, la importancia del lavado clínico de manos para reducir la morbi-mortalidad de la atención médica (Semmelweiss, 1861; Kirkland *et al.*, 2012), esta medida se ha transformado en pilar fundamental para evitar la emergencia y propagación de brotes infecciosos intrahospitalarios (Allegranzi y Pittet, 2009); sin embargo, el bajo cumplimiento de la misma conspira contra su efectividad (Kampf *et al.*, 2009). La implementación del correcto lavado de manos va aparejada de otras medidas como el uso de una distancia adecuada entre camas hospitalarias, medidas de aislamiento físico (uso de mascarilla y guantes, entre otros) dependiendo de la situación clínica y optimización de los procedimientos invasivos a pacientes hospitalizados (Siegel *et al.*, 2007; Yokoe *et al.*, 2008; Kampf *et al.*, 2009).

Implementación de protocolos de desinfección:

Algunas bacterias como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. sobreviven por tiempo prolongado en el ambiente (Kerr y Snelling, 2009; Peleg, 2008), por lo que en algunos centros hospitalarios se ha tenido éxito moderado en disminuir los brotes de estas bacterias aplicando esquemas agresivos de desinfección de superficies e implementos hospitalarios (Barbolla *et al.*, 2008, Apisarnthanarak *et al.*, 2008).

No obstante, lo anteriormente señalado, el problema no ha hecho más que aumentar, situación que se agrava por el hecho de que desde el fin de la “Edad de Oro” de los antibióticos ha disminuido progresivamente la invención o descubrimiento de moléculas antimicrobianas, a tal punto que en la última década (2000-2010) sólo se lanzaron al mercado 3 grupos nuevos de antimicrobianos (Boucher *et al.*, 2013), siendo los demás compuestos aprobados sólo variaciones de antimicrobianos ya existentes. Es por este motivo que la IDSA (*Infectious Disease Society of America*) lanzó la iniciativa “10 x ’20, *Bad Bugs Need Drugs*” con el objetivo de sintetizar un antibiótico nuevo por año y obtener 10 antibióticos nuevos durante la década 2010-2020 (IDSA, 2010). Por desgracia, no se podrá lograr este objetivo ya que desde el 2010 sólo se han aprobado las cefalosporinas de 5ª generación ceftobiprol (Chahine *et al.*, 2011) y ceftarolina (Poon *et al.*, 2012), estando aún en estudio otros compuestos como los inhibidores reversibles de betalactamasas del grupo de los diazabiciclooctanos, dentro de los que destaca avibactam (Sader *et al.*, 2014; Boucher *et al.*, 2013). Peor aún, ya existen reportes de emergencia de aislados resistentes a algunos de estos antibióticos (Humphries *et al.*, 2015).

Otro problema asociado a la falta de desarrollo de nuevas moléculas antibacterianas es que la mayoría de los antibióticos desarrollados en las últimas 2 décadas, así como los nuevos en desarrollo, tienen efecto fundamentalmente contra bacterias Gram positivas, lo que deja una cantidad importante de bacterias Gram negativas MDR con pocas o ninguna alternativa terapéutica (Boucher *et al.*, 2013).

La gran mayoría de las infecciones por bacterias multiresistentes son debidas a un grupo determinado de bacterias hospitalarias, en su mayoría Gram negativas, las que han sido agrupadas bajo el acrónimo *ESCAPE* (Peterson, 2009). Este grupo de bacterias se considera de especial relevancia no sólo por su elevada resistencia, sino también por la mortalidad que generan; entre las que destacan:

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Clostridium difficile*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacteriaceae* (donde se incluye *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *Proteus* spp.)

Dentro del grupo de bacterias anteriormente mencionado, nos centraremos en la especie *A. baumannii*, por ser una bacteria que no sólo ha generado brotes importantes en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), asociados a gran mortalidad, sino que es bastante difícil de eliminar tanto de pacientes como de superficies clínicas; más aún, se describen algunas cepas panresistentes (PRD), es decir, resistentes a todos los antibióticos conocidos, de uso clínico (Göttig *et al.*, 2014). Este problema podría agravarse en los próximos años, puesto que si bien hasta ahora las cepas PDR reportadas habían presentado mecanismos no transmisibles de resistencia a colistín (la última alternativa de tratamiento disponible para la gran mayoría de aislados clínicos de *A. baumannii*), el año 2015 se descubrió la existencia de un plásmido conjugativo portador del gen *mcr-1*, el que confiere resistencia a colistín por adición de fosfoetanolamina al lípido A. Este plásmido, originalmente descrito en aislados de *Escherichia coli* hallados en criaderos de cerdos en China (Liu *et al.*, 2016), ha sido encontrado posteriormente en bacterias procedentes de lugares tan distantes como Dinamarca (Hasman *et al.*, 2015) y Estados Unidos (McGann *et al.*, 2016), situación que nos pone directamente a las puertas de la era post-antibiótica, la que se describe como el periodo en el que no existirán antibióticos efectivos para combatir infecciones producidas por bacterias (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2014). El hallazgo de McGann *et al.*, (2016) es especialmente grave, ya que no fue hallado en animales de granja, si no que causando infección en un paciente.

1.2. Características de *Acinetobacter baumannii*

Para comprender mejor este problema es necesario describir esta bacteria, haciendo hincapié en los factores de virulencia y de sobrevivencia que posee. *A. baumannii*. Esta bacteria corresponde a un cocobacilo Gram negativo, inmóvil (de donde deriva su nombre, ya que *akinetos* significa “sin movimiento”), no fermentador de glucosa y no productor de oxidasa. El género *Acinetobacter* fue definido por primera vez en 1954 y agrupa una gran cantidad de genoespecies bacterianas (43 a fecha del 13/08/2016, según “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”), las que se definen como aquellos grupos de bacterias dentro de un género (en este caso, *Acinetobacter*) compuestos por individuos que presentan entre sí una hibridación ADN-ADN mayor al 70% (Wayne *et al.*, 1987). Estas genoespecies son en su mayoría de origen ambiental, las que además son difíciles de distinguir entre sí por sus características fenotípicas (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Por lo anterior, las genoespecies de *Acinetobacter* se dividen en grupos de compatibilidad basados en su similitud fenotípica, siendo el más importante del punto de vista clínico el “complejo *A. baumannii*”, que incluye las especies *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis* (Higgins *et al.*, 2007; McConnell *et al.*, 2012), debido a la frecuente presencia del mismo en infecciones que afectan a pacientes de UCI, su fuerte presencia y sobrevida en medios abióticos intrahospitalarios, y a la elevada mortalidad asociada (Dijkshoorn *et al.*, 2007; McConnell *et al.*, 2012). Respecto al “complejo *A. baumannii*” es importante recalcar algunas observaciones:

- Los métodos fenotípicos de identificación actualmente en uso a nivel de Laboratorio Clínico no permiten identificar la especie con precisión, por lo que en estricto rigor las bacterias identificadas como “*A. baumannii*” por métodos fenotípicos comerciales (API 20NE y VITEK 2, entre otros) sólo debieran informarse como “Complejo *A. baumannii* - *A. calcoaceticus*” (Higgins *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, se ha propuesto una serie de métodos basados en biología molecular para identificar las bacterias del género *Acinetobacter* a nivel de

especie, dentro de los que destacan la identificación por PCR usando los genes *gyrB* (Higgins *et al.*, 2007), *rpoB* (Nemec *et al.*, 2011) o las regiones variables del ARN 16s, así como el uso de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) (Nemec *et al.*, 2011). De estos, *rpoB* es el que ha demostrado mejor discriminación entre las especies del complejo (Nemec *et al.*, 2011). Últimamente, ha surgido como alternativa a la secuenciación un PCR múltiple propuesto por Lee *et al.* (2013), el cual amplifica la región intergénica 16S-23S y que presenta una alta sensibilidad y especificidad.

- A pesar de lo anterior, habitualmente se informa en los cultivos de origen hospitalario como “*A. baumannii*” el hallazgo de bacterias del complejo antes señalado (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Esto se debe a que la inmensa mayoría de las infecciones por este género corresponden a la especie antes señalada (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Sin embargo, un reporte de Schleicher *et al.* (2013) sugiere que esto no necesariamente es así, y que *A. pittii* pudiera ser en ocasiones la especie más prevalente. Esto es relevante, ya que la mayoría de los trabajos publicados sugieren que *A. pittii* y *A. nosocomialis* tienden a ser más sensibles a los antibióticos que *A. baumannii* (Chuang *et al.*, 2011).

- Aunque el resto de las bacterias de este complejo han sido descritas en el medioambiente, *A. baumannii* ha sido descrita casi exclusivamente en el ambiente hospitalario, existiendo aún poca claridad de cómo surgió dicha bacteria en los centros clínicos (McConnell *et al.*, 2012). Una excepción a lo anteriormente dicho fueron los reportes de *A. baumannii* en infecciones asociadas a trauma bélico en la Segunda Guerra del Golfo Pérsico (2003), razón por lo cual dicho fenómeno se conoció coloquialmente como “Irakibacter”; sin embargo, al menos un estudio afirma que la infección por “Irakibacter” fue adquirida en los Hospitales Militares y no en el campo de batalla (Scott *et al.*, 2007).

Por otra parte, Wilharm y colaboradores (2015) han descrito la existencia de aislados de *A. baumannii* en nidos de aves en la región occidental de Polonia, los que presentan características muy distintas a las bacterias de la misma especie en ambientes hospitalarios, lo que incluye la ausencia en estos aislados ambientales de beta-lactamasas clase D del grupo OXA 51-like, las que son intrínsecas de los aislados obtenidos de ambientes clínicos. Por otro lado, Eveillard *et al.* (2013) recopilan una serie de reservorios extrahospitalarios descritos para *A. baumannii*, entre los cuales se describe el suelo de distintas áreas de la ciudad de Hong Kong (Houang *et al.*, 2001) y heces de cerdos en Reino Unido (Byrne-Bailey *et al.*, 2009). La identificación de las especies de *Acinetobacter* se realizó en el primero de los estudios usando análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*, ARDRA) y en el segundo de éstos secuenciando un fragmento de 800 pb del ARNr 16S.

- Hoy en día, aún existe controversia en cuanto a si *A. baumannii* es sólo un marcador de la gravedad del paciente de UCI o bien causa mortalidad *per se* (Blot *et al.*, 2003; Falagas *et al.*, 2006, 2007). Lo que sí está claro es que las personas que presentan infección por esta bacteria tienen una alta mortalidad (mayor a la que tendrían de no tener dicha infección) que de acuerdo a algunas publicaciones puede llegar al 70% (McConnell *et al.*, 2012).

- La infección más frecuente causada por *A. baumannii* es la neumonía asociada a ventilador mecánico, seguida de la bacteriemia y la infección de partes blandas (incluyendo quemadura infectada) (McConnell *et al.*, 2012).

Dentro las características que permiten el éxito de esta bacteria se incluyen su gran capacidad para colonizar ambientes clínicos. Reyes (2013) estudió la presencia de *A. baumannii* en distintas superficies de la UCI del Hospital Herminda Martín de Chillán, encontrando una alta colonización de lugares como las llaves de 3 pasos, los catéteres

de aspiración de secreciones respiratorias y las camas de los pacientes. Interesantemente, en dicho estudio estableció que 2 pacientes que hubiesen ocupado la misma cama de forma sucesiva podían presentar el mismo aislado de *A. baumannii*, lo que habla del potencial de resistencia de la bacteria.

La situación anterior, descrita también en otros trabajos (Garnacho-Montero *et al.*, 2015, Doi *et al.*, 2015), estaría dada entre otros factores por la capacidad de formar biopelículas y la gran resistencia a desinfectantes (debido principalmente a la presencia de bombas de expulsión, destacando las del grupo RND, del inglés *resistance-nodulation-cell division*) (Coyne *et al.*, 2011). De hecho, un estudio realizado por Espinal *et al.* (2012) demuestra diferencias significativas en la resistencia a la desecación de cepas de *A. baumannii* productoras y no productoras de biopelícula, con mayor sobrevivencia de las primeras.

Otro problema aparejado a lo anterior es la elevada resistencia a antimicrobianos, que en nuestro medio incluye resistencia a carbapenémicos (Cifuentes *et al.*, 2014). Esto último ha obligado al uso de medicamentos de última línea (tigeciclina, colistín) para tratar a estas infecciones (Garnacho-Montero *et al.*, 2015, Doi *et al.*, 2015), registrándose ya casos en que se presenta resistencia a estos antibióticos (Navon-Venezia *et al.*, 2007, Hornsey *et al.*, 2010, Qureshi *et al.*, 2015). Otro problema añadido es que en el caso de tigeciclina no hay puntos de corte aceptados por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), ya que su uso sobre *A. baumannii* no está aprobado por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos (FDA, 2016). Esta resistencia a antibióticos está ocasionada por 4 factores: bajo número de porinas, presencia de bombas de expulsión, presencia de β -lactamasas principalmente del grupo D de Ambler (tipo oxacilinasas) y modificación del sitio blanco por mutaciones puntuales en *gyrA* y *parC*, confiriendo esta última situación resistencia a quinolonas (Singh *et al.*, 2013).

Es por lo anteriormente señalado que la desinfección de superficies clínicas, así como el correcto lavado de manos, se constituyen en elementos clave a la hora de reducir el impacto clínico de *Acinetobacter baumannii* en el ambiente hospitalario, ya que sería más efectivo evitar las infecciones por esta bacteria que combatir las infecciones una vez que ya se producen (Kollef y Niederman, 2015). En este sentido, Apisarnthanarak *et al.* (2008) logran reducir la incidencia de *A. baumannii* pan-resistente en pacientes de UCI usando desinfección con hipoclorito al 1% y reforzamiento del lavado clínico de manos.

1.3. Virulencia de *Acinetobacter baumannii*

Una controversia importante que se presentó por mucho tiempo en torno a *A. baumannii* es si éste presenta o no factores de virulencia. Sin embargo, se ha visto la existencia de una isla de resistencia de 86 kb denominada AbaR1 en aquellas cepas (cepas AYE) asociadas a mayor morbi-mortalidad, y que además se asociaban a presencia abundante de genes de resistencia a antibióticos, en su gran mayoría provenientes de otras bacterias no relacionadas y obtenidos por transferencia horizontal de genes; más aún, se ha visto que las primeras cepas descritas de *A. baumannii* (incluyendo la cepa de referencia ATCC 19606) son susceptibles a la gran mayoría o a todos los antibióticos, lo que necesariamente implica plasticidad génica, ya sea por rearrreglos del cromosoma y/o captación de genes de resistencia foráneos (Fournier *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha visto que la proteína OmpA no sólo es importante para la adhesión de *A. baumannii* a superficies biológicas como el epitelio traqueal, si no que actúa induciendo la apoptosis de células del huésped vía destrucción mitocondrial.

1.4. Persistencia y capacidad de formación de biopelículas en *A. baumannii*

Como se mencionaba anteriormente, la formación de biopelículas por parte de *A. baumannii* forma parte importante de su capacidad de persistir en el ambiente

hospitalario. En este sentido, *A. baumannii* ha demostrado tener capacidad para formar biopelículas tanto en superficies inanimadas (Vidal *et al.*, 1997) como en epitelio vesical y traqueal (Sepúlveda *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 1998), otorgándole por tanto la capacidad de colonizar e infectar el tracto urinario y la vía respiratoria de pacientes en cuidados intensivos, además de resistencia aumentada a antibióticos (Vidal *et al.*, 1997).

El principal componente de la biopelícula de *A. baumannii* es un exopolisacárido denominado poli-beta-(1–6)-N-acetilglucosamina, el cual forma una matriz extracelular que permite la adhesión de las bacterias entre sí (De Gregorio *et al.*, 2015).

Sin embargo, las proteínas de superficie de la bacteria también juegan un rol en la formación de la biopelícula, fundamentalmente en la adhesión a superficies bióticas y abióticas. Además de la ya mencionada OmpA, otra proteína que cumple un rol clave es la proteína Bap-like, llamada así por su similitud a la “Biofilm Associated Protein” de *S. aureus* y que es importante tanto en la adhesión intercelular de *A. baumannii* como en la adherencia a superficies abióticas como vidrio o plástico. Esta proteína posee estructura similar a las inmunoglobulinas y, si bien no es imprescindible para la formación inicial de la biopelícula, es fundamental para su incremento en biomasa y maduración (De Gregorio *et al.*, 2015). Respecto de este último punto, también tiene un rol en la adherencia a superficies inanimadas el pili tipo “chaperon-usher” CsuA/BABCDE (McConnell *et al.*, 2012), el cual es importante para la adherencia inicial a este tipo de superficies.

Además de lo anteriormente señalado, un rol clave en la virulencia y formación de biopelículas de *A. baumannii* lo cumplen los sideróforos, compuestos que permiten la captación de iones de hierro en el torrente sanguíneo humano, para los que se ha demostrado que su inhibición permitiría dispersar biopelículas de *A. baumannii* (Gentile *et al.*, 2014; Runci *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016).

En la formación de biopelículas, forma un rol clave el sistema de *quorum sensing* Abal/AbaR, un sistema dependiente de acil-homoseril-lactonas (AHL) que usa varios mediadores, los que presentan un rango de largos de cadena de entre 10 y 16 carbonos (Bhargava *et al.*, 2010).

Respecto a la correlación entre multirresistencia, virulencia y capacidad de formación de biopelícula, existe evidencia conflictiva al respecto. Por un lado, algunos autores proponen que estos 3 elementos van de la mano, sugiriéndose incluso la relación entre la presencia de la betalactamasa de espectro extendido PER-1 (Sechi *et al.*, 2004) y una mayor formación de biopelícula, lo que también es planteado por Lee *et al.*, (2008), quien encontró una correlación positiva entre el nivel de expresión de *bla*_{PER-1} y la formación biopelícula. Sin embargo, Rao *et al.* (2008) reporta que de 11 aislados con PER-1, sólo 2 forman una biopelícula fuerte al ser comparados con aislados carentes de PER-1.

Por otro lado, algunos autores han encontrado una correlación inversa entre resistencia extrema o panresistencia y la capacidad de formación de biopelícula y/o la virulencia, como reportan Dafopoulou *et al.* (2016) respecto a la correlación inversa existente entre la resistencia a colistín y la capacidad de formación de biopelícula. Una situación similar es reportada por Yoon *et al.* (2015), quienes observaron que la sobreexpresión de bombas de expulsión del tipo RND incrementaba la resistencia a múltiples antibióticos, pero disminuiría la formación de biopelícula. Esto último implicaría que la adquisición de multirresistencia tendría un costo biológico para la bacteria.

Si lo último mencionado es verdadero, ¿cómo persisten las bacterias extensivamente resistentes en los ambientes clínicos? La explicación estaría dada en la condición polimicrobiana de las biopelículas (Hu *et al.*, 2015): las cepas más productoras de biopelícula, pero al mismo tiempo más sensibles a antibióticos, formarían un reservorio para las cepas menos productoras, pero más resistentes a antibióticos. Luego, la

presión selectiva generada por el uso indiscriminado de antibióticos favorecería a las cepas más resistentes para colonizar e infectar a los pacientes hospitalizados. Esta situación se ha visto por ejemplo en los catéteres urinarios, donde la asociación de *Pseudomonas aeruginosa* y *A. baumannii* genera biopelículas que permiten la persistencia de otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae* (Djeribi *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha visto que la biopelícula *per se* contribuye a la resistencia a antibióticos y desinfectantes, al disminuir la penetración de los mismo hacia las bacterias de la biopelícula (Wang *et al.*, 2015).

1.5. Realidad de *Acinetobacter baumannii* en Chile

Una de las características más llamativas de las cepas de *A. baumannii* presentes en hospitales chilenos ha sido su transición de aislados multisensibles (Bello *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2012) a presentar un patrón MDR o XDR (Diomedi, 2005; Cifuentes *et al.*, 2014). Según los últimos datos recopilados por el Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana de Chile (Cifuentes *et al.*, 2014), la susceptibilidad a carbapenémicos de *A. baumannii* causante de infecciones en pacientes adultos (tanto en UCI como fuera de ellas) es menor a 30%, presentando además porcentajes de resistencia mayores a un 50% a casi todos los antibióticos excepto colistín (al que presenta un 98% de susceptibilidad). Es por esto último que colistín, tanto solo como asociado, se posiciona como el tratamiento de elección para pacientes que adquieren una infección por esta bacteria.

En este contexto, el reporte en algunos hospitales chilenos de la emergencia de aislados resistentes a colistín (Opazo, 2015) es una situación preocupante, ya que no existen tratamientos alternativos a colistín que sean eficaces contra las infecciones causadas por *A. baumannii*, puesto que el uso de tigeciclina muestra evidencia contradictoria que, si bien sugiere su eventual utilidad, no es del todo concluyente (Chuang *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2013, Garnacho-Montero *et al.*, 2015).

Interesantemente, la distribución de *A. baumannii* no es homogénea entre hospitales chilenos, puesto que algunos de estos no presentan infecciones por esta bacteria mientras que en otros se da una situación de endemia (Rivera *et al.*, 2016). Esta situación tendría que ver con el hecho de que, tal como se mencionó anteriormente, la calidad de la desinfección juega un rol clave en la prevalencia de esta bacteria en los entornos clínicos (Manian *et al.*, 2011). Respecto a esto último, las normas de desinfección de superficies clínicas en hospitales chilenos, si bien son bastante similares entre un centro y otro, presentan sutiles diferencias que pudieran influir en el éxito a la hora de erradicar *A. baumannii*. Por ejemplo, todos los hospitales emplean hipoclorito de sodio cada 8 h para la desinfección de superficies (con el fin de eliminar esporas de *Clostridium difficile*), pero la concentración usada varía de un hospital a otro. Así, la norma interna del Hospital Regional de Concepción “Dr. Guillermo Grant B.”, indica el uso de NaClO al 0,1%, mientras que en otros hospitales se sugiere soluciones al 0,5%. Por otro lado, existen diferencias dentro de los mismos hospitales en cuanto a la metodología de desinfección. Nuevamente citando el ejemplo de Concepción, el aseo del baño de los pacientes (externalizado a una empresa privada) no emplea NaClO para su desinfección, si no que compuestos de amonio cuaternario.

1.6. Alternativas para el control de cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii*

En relación al preocupante panorama respecto a la discrepancia entre incremento de la resistencia bacteriana y la disminución de aparición de nuevas moléculas antimicrobianas, ha habido esfuerzos por analizar organismos vivos de ambientes extremos en busca de nuevos metabolitos que puedan tener efecto contra microorganismos de interés humano. En este sentido, los líquenes constituyen un muy buen candidato para buscar nuevos compuestos de utilidad.

Los líquenes corresponden a una simbiosis mutualista entre una microalga o una cianobacteria (fotobionte) y un hongo (micobionte) que están ampliamente

diseminados en distintos ambientes a nivel mundial, incluso ambientes extremos como la Antártica (Shrestha *et al.*, 2013). Existe una gran variedad de los mismos, habiendo una gran selectividad en la predilección de un hongo en particular por un determinado fotobionte (Stenroos *et al.*, 2006). Una de las propiedades interesantes de los mismos es la gran cantidad de metabolitos secundarios que producen, los que son siempre sintetizados por el micobionte. A este respecto, es importante señalar que muchos de los metabolitos se producen solamente si el micobionte está “liquenizado” (Huneck, 1999). Los líquenes son organismos sésiles de crecimiento lento, por lo que estos metabolitos secundarios serían importantes para cumplir diversas funciones como captación de iones metálicos, protección contra radiación UV y defensa contra bacterias y depredadores (Huneck, 1999).

Los metabolitos secundarios de líquenes vienen siendo estudiados desde inicios del siglo XX y se ha visto en múltiples ocasiones que poseen un aceptable efecto antimicrobiano (Shrestha *et al.*, 2013), destacando algunos compuestos como el ácido úsnico (Ingólfssdóttir, 2002). Este último, así como muchos de los metabolitos secundarios de líquenes, es un compuesto fenólico, por lo que es mayormente soluble en solventes orgánicos, pero presenta baja solubilidad en agua. Esto, asociado al hecho de que estos metabolitos están en baja concentración, genera algunas dificultades en la obtención de los mismos. Estas características de los metabolitos secundarios de líquenes vienen dadas por el hecho de que son sintetizados por vías metabólicas de gran complejidad, las que son divididas en tres (Huneck, 1999):

- 1) La vía del acetil-polimalonil, que produce la gran mayoría de los metabolitos secundarios de líquenes, dentro de los que se incluyen dépsidos, depsidonas y derivados del ácido úsnico, entre otros.
- 2) La vía del ácido mevalónico, responsable de la producción de esteroides, terpenos y carotenoides, y

- 3) La vía del ácido shikímico, responsable de la producción de derivados del ácido pulvínico.

A pesar de la gran cantidad de publicaciones de efectos antibacterianos de metabolitos líquénicos, pocos hallazgos se han hecho en cuanto al mecanismo de acción de los mismos, destacando en el último tiempo una publicación que muestra el efecto de ácido úsnico en la inhibición de la síntesis de ADN (Maciazg-Dorszynska *et al.*, 2014) y el descubrimiento usando una biblioteca de compuestos antimicrobianos del efecto de ácido anziaico de *Hypotrachyna* sp. en la inhibición de la topoisomerasa IV bacteriana (Cheng *et al.*, 2013).

1.7. La Antártica como fuente de metabolitos antibacterianos

Los ambientes extremos, por su carencia de recursos, obligan a los líquenes a competir de forma exitosa en el ambiente, teniendo los metabolitos secundarios un rol a este respecto. Esto se ve avalado por la literatura, que registra el hallazgo de líquenes que poseen metabolitos con actividad antimicrobiana (Paudel *et al.*, 2008).

Es importante mencionar que existen pocos estudios que ensayen el efecto de extractos líquénicos sobre *A. baumannii*, existiendo un estudio de Sökmen *et al.* (2012) que muestra resultados prometedores. En este último trabajo, se informa la acción del extracto total de los líquenes *Pseudevernia furfuracea* y *Evernia prunastri* sobre cepas de *Staphylococcus calmii*, *Bacillus pumilis*, *B. megaterium*, *A. baumannii* y *Enterococcus faecium*, la que se midió por el método de difusión en agar y de microdilución en caldo (este último para obtener la CMI). Algo a considerar en este trabajo, es que sólo se ensayó el extracto total, sin identificar ni evaluar algún metabolito particular de los líquenes en cuestión.

Otro hallazgo interesante, respecto al efecto de compuestos líquénicos sobre *A. baumannii*, fue lo investigado por Porcile (2014), quien mostró el efecto de diversos extractos totales sobre la inhibición del *Quorum sensing*, mecanismo que, como se

mencionó anteriormente, tiene un rol relevante en la formación de biopelículas por *A. baumannii* (Bhargava *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados, se plantea la necesidad de explorar los metabolitos de líquenes u otros compuestos de origen natural para encontrar sustancias con efecto sobre *A. baumannii*. La obtención de un metabolito activo podría llevar al desarrollo de nuevos antibióticos de uso clínico, o bien a un desinfectante más efectivo que permita una disminución de la colonización de *A. baumannii* sobre las superficies de elementos de las unidades de paciente crítico. Respecto de este último punto, se ha demostrado que la aplicación de procesos de desinfección profunda destinados a eliminar esta especie bacteriana de superficies de salas de hospitalización reduce la recurrencia de brotes de esta bacteria, habiendo mostrado efectividad los compuestos de amonio cuaternario (Manian *et al.*, 2011) y peróxido de hidrógeno vaporizado (Ray *et al.*, 2010); sin embargo, el disponer de un nuevo desinfectante que disminuya la carga de *A. baumannii* sobre las superficies clínicas ayudaría a ampliar el set de herramientas disponibles para combatir este microorganismo, más aún si se logra demostrar su acción sobre biopelículas. Por otro lado, el disponer de un nuevo desinfectante disminuiría la presión selectiva ejercida por los compuestos actualmente en uso, ya que se ha observado una selección creciente de cepas resistentes a estos compuestos, así como una correlación positiva entre el nivel de resistencia antibiótica y la susceptibilidad disminuida a desinfectantes (Koljalg *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009). Esto último sería atribuible a mecanismos comunes de resistencia, por ejemplo, bombas de expulsión multidroga (Opazo *et al.*, 2009; Rajamohan *et al.*, 2010).

Uno de los problemas a la hora de evaluar la efectividad de los desinfectantes y antisépticos es que existe una gran cantidad de protocolos diferentes, la mayoría sólo de alcance nacional y de pobre reproducibilidad. Es por esto que en 1993 el Comité Europeo de Estandarización (CEN/TC 216) propuso la realización de una evaluación en 2 etapas. La primera consiste en un ensayo de suspensión en fase líquida (también

llamado ensayo de dilución-neutralización) (Bloomfield *et al.*, 1991) y la segunda consiste en un ensayo de descontaminación de superficie en discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro (ver en Metodología) con objeto de simular las condiciones con las que se enfrentaría el desinfectante en la vida real (Bloomfield *et al.*, 1993, 1994). Este protocolo europeo, con actualizaciones, es hoy por hoy uno de los más aceptados y hay estudios que demuestran su utilidad, por lo que será la base de esta tesis de magíster.

Por lo anterior, en esta tesis se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Existen líquenes antárticos cuyo extracto total posea actividad inhibitoria contra *A. baumannii*?
- En los líquenes antárticos con actividad inhibitoria contra *A. baumannii*, ¿existe al menos un metabolito secundario que posea actividad antimicrobiana y/o capacidad biocida sobre *A. baumannii*?
- De existir, ¿tiene(n) este(os) metabolito(s) secundario(s) capacidad de desagregar la biopelícula de *A. baumannii*?

La Hipótesis que se ha planteado en esta tesis es la siguiente:

“Existe al menos un extracto total de líquen antártico que posee actividad inhibitoria sobre *Acinetobacter baumannii* y que contiene al menos un compuesto puro con actividad biocida y/o desagregante de la biopelícula formada por esta bacteria”

1.8. Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana y antibiopelícula de extractos totales y derivados de líquenes antárticos sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistentes a los antibióticos.

1.9. Objetivos Específicos

- Determinar los extractos totales de líquenes antárticos con actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de *A. baumannii*.
- Identificar las fracciones de extractos totales de líquenes antárticos responsables de la actividad antibacteriana sobre cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.
- Cuantificar la actividad antibacteriana de compuestos puros obtenidos de las fracciones antes mencionada sobre cepas clínicas de *A. baumannii*.
- Determinar la efectividad como desinfectante de compuestos puros sobre superficies abióticas, contaminadas con cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.
- Determinar la capacidad de los metabolitos para desagregar la biopelícula formada por cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.

2. MATERIALES Y MÉTODO

2.1. Cepas sobre las que se ensayó la actividad antibacteriana y anti-biopelícula de los extractos totales y compuestos puros derivados de líquenes

Se trabajó con 26 cepas multiresistentes de *A. baumannii* aisladas en hospitales chilenos entre 2008 y 2012, clasificadas según su susceptibilidad o resistencia a colistín (Tabla 1).

Adicionalmente, se ensayó la actividad sobre 2 cepas controles: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (cepa hipersensible) y *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (cepa de colección que es susceptible).

2.2. Líquenes que se estudiaron en esta investigación

En este trabajo se estudió la actividad antimicrobiana de los extractos y metabolitos puros obtenidos de los siguientes líquenes obtenidos de Territorio Antártico Chileno:

1. *Himantormia lugubris* (Hue) I.M. Lamb 1964,
2. *Stereocaulon alpinum* Laurer 1827,
3. *Usnea aurantiacoatra* (Jacq.) Bory 1826,
4. *Usnea antarctica* Du Rietz 1926,
5. *Ramalina terebrata* Hook. f. & Taylor 1844,
6. *Sphaerophorus globosus* (Huds.) Vain. 1903
7. *Umbilicaria antarctica* Frey & I.M. Lamb 1939.

Para obtener el extracto total de los líquenes antes mencionados, se realizó una extracción metanólica seguida de destilación en vacío con rotavapor, con objeto de

separar los compuestos orgánicos (solubles en solventes apolares) del agua (Karakus, 2009). El extracto crudo obtenido de esta manera se usó en posteriores estudios.

2.3. Determinación de actividad antibacteriana de extractos totales de líquenes antárticos sobre cepas clínicas de *A. baumannii* por ensayo de difusión en agar

La actividad antibacteriana de los extractos totales de líquenes antárticos se evaluó mediante el método de difusión en agar (Bauer *et al.*, 1966; Srivastava *et al.*, 2013). En primer lugar, estos extractos se adicionaron disueltos en tetrahidrofurano (THF) en discos estériles de papel filtro a volumen de 90 μ L y concentración de 50 mg/mL por disco (4,5 mg de extracto por disco), los que se secaron toda la noche en estufa a 37°C para eliminar el exceso de THF. Al día siguiente, estos discos se depositaron en placas de agar Müller-Hinton inoculadas con una suspensión bacteriana 0,5 McFarland (equivalente a 1×10^8 ufc/mL) de *A. baumannii* por un periodo de 20-24 h a 37°C, siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para ensayo de difusión en agar (2012). Cumplido el periodo anterior, se procedió a medir el halo de inhibición alrededor de los discos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Características de las cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen hospitalario utilizadas en el estudio

CEPA	PROCEDENCIA	AÑO DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLÍNICA	COMPORTAMIENTO A COL*
A527	HP-Temuco	2012	Herida (UCI Adultos)	CEPAS SUSCEPTIBLES
A368	CP-Santiago	2007	Aspirado Bronquial	
A378	HP-Santiago	2007	Orina (Cirugía)	
A396	CP-Santiago	2008	Neumonía	
A442	HP-Santiago	2012	Expectoración (Medicina Hombres)	
A370	CP-Santiago	2007	Punta Catéter	
A380	HP-Santiago	2007	Abdomen (Urgencia)	
A397	CP-Santiago	2008	UCI	
A444	HP-Santiago	2012	Orina (Quemados)	
A446	HP-Santiago	2012	Sangre (Quemados)	
A387	HP-Santiago	2007	Sangre (UTI)	
A450	HP-Santiago	2012	Tejido Brazo Derecho (Quemados)	
A496	HP-Temuco	2012	Tejido Tobillo (Cirugía)	
A523	CP-Santiago	2012	Aspirado Endotraqueal (Intermedio)	
A417	HP-Santiago	2012	Aspirado Endotraqueal (UCI)	
A500	HP-Temuco	2012	Herida Operatoria (Cirugía)	
A439	HP-Santiago	2012	Herida Muslo Izqdo. (Cirugía Hombres)	
A507	HP-Temuco	2011	LCR (UTI Adulto)	
A490	HP-Temuco	2012	LCR (UCI Adulto)	
A440	HP-Santiago	2012	Aspirado Endotraqueal (Quemados)	
A530	CP-Santiago	2012	Orina (Medicina)	
A419	HP-Santiago	2012	Aspirado Endotraqueal (Quemados)	
A430	HP-Temuco	2012	Aspirado Endotraqueal (UCI)	
A503	HP-Temuco	2012	Sangre (UCI Adulto)	
A512	CP-Santiago	2011	Secreción Herida (UCI Adulto)	
A511	CP-Santiago	2012	Secreción Bronquial (Unidad Coronaria)	

*Susceptibilidad determinada anteriormente en tesis de Magíster de Alexis Opazo (2014); HP = Hospital Público, CP = Clínica Privada; *COL: colistín. Fuente: elaboración propia.

2.4. Identificación de fracción con actividad antibacteriana del extracto total liquénico

Para identificar la porción del extracto total responsable de la actividad antimicrobiana, se procedió a separar el mismo en fracciones mediante cromatografía líquida por adsorción en fase normal, usando como separador una columna de sílice y usando como eluyentes acetona y metanol (Sergio Triviño, Químico proyecto FONDEF IDeA CA12i10224). Una vez separadas las fracciones, se ensayaron contra las cepas bacterianas mediante el método de difusión en agar usando como vehículo discos de papel filtro, según la metodología descrita anteriormente (Bauer *et al.*, 1966; Srivastava *et al.*, 2013).

2.5. Obtención de compuestos de las fracciones liquénicas

Una vez determinadas las fracciones que presentan actividad sobre *A. baumannii*, se procedió a identificar los compuestos presentes en la misma mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa (GC-MS) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés; Lumbsch, 2002), para lo cual se compararon las señales obtenidas de las fracciones liquénicas con una base de datos de perfiles de HPLC proporcionada por el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Luego de determinados los compuestos presentes en las fracciones liquénicas, se procedió a separarlos mediante cromatografía en columna de sílica gel por gradiente de polaridad, usando como solvente inicial hexano adicionando concentraciones progresivamente mayores de acetato de etilo en hexano, finalizando con acetato de etilo al 100%. Para establecer a que compuesto correspondía cada fracción de la columna, se analizaron las fracciones usando placas de cromatografía de capa fina (TLC, Merck Milipore) y comparándose su patrón de desplazamiento contra muestras

de compuestos conocidos, los que habían sido identificados previamente por Cabrera (2015) usando Resonancia Nuclear Magnética (RNM).

Uno de estos compuestos, rotulado como **CI-05** por Cabrera (2015), resultó ser el más abundante de la fracción metanólica de *Himantormia lugubris* y se purificó mediante precipitación por solvente, para lo cual se ocupó una mezcla 1:1 dietiléter/metanol.

Cabe mencionar que buena parte de esta actividad pudo desarrollarse gracias a la inestimable ayuda del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, liderado por el Dr. Mauricio Cuéllar Fritis.

Una vez obtenido un compuesto puro, se procedió a determinar su actividad biológica.

2.6. Determinación de CMI y CMB por microdilución en caldo

La CMI del extracto puro fue determinada por el método de dilución seriada en caldo usando microplacas de 96 pocillos.

Para determinar la CMI usando inóculo estándar (esto es, 5×10^5 ufc/ml), se siguió el método propuesto por Michels *et al.* (2015) para compuestos obtenidos de productos naturales, modificado de la siguiente manera: se prepararon diluciones seriadas de cada compuesto puro (disuelto en metanol puro 99,7%) desde 1000 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$ en caldo Müller-Hinton (MHB, por sus siglas en inglés). Las placas de microtitulación fueron inoculadas con 260 μL de MHB, 30 μL del compuesto puro y 10 μL de suspensión bacteriana con una concentración de 10^6 ufc/mL. En cada placa se utilizó tres controles diferentes: control de referencia del medio de cultivo (290 μL medio de cultivo + 10 μL inóculo bacteriano), control de referencia del solvente utilizado (260 μL medio de cultivo + 30 μL metanol + 10 μL inóculo bacteriano) y un control de referencia del extracto preparado (270 μL medio de cultivo + 30 μL extracto puro).

Para determinar la CMI usando inóculo aumentado (esto es, 10^8 y 10^9 ufc/ml), se empleó el método descrito por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, pero con algunas modificaciones. Brevemente, se obtuvo un inóculo de 4 McFarland (equivalente a $1,2 \times 10^9$ ufc/ml), parte del cual fue concentrado por centrifugación para obtener un inóculo de $1,2 \times 10^{10}$ ufc/ml. Luego, se tomó 10 μ L de ambos inóculos, los que se sembraron en los correspondientes pocillos de la microplaca de 96 pocillos, que contenían 100 μ L de MHB con la concentración deseada del compuesto.

Para ambas situaciones antes descritas, las placas de microtitulación fueron incubadas a 37°C por 20 - 24 h. La CMI se determinó mediante el establecimiento del crecimiento visible de los microorganismos. Se definió como CMI la menor concentración del compuesto a la que no se observó turbidez. En caso de que la coloración del compuesto en MHB no permita discriminar turbidez, se empleó MTT (sal de tetrazolio) al 1% en PBS (buffer fosfato salino), según protocolo modificado de Tan *et al.* (2008). Brevemente, a los pocillos en los que se incubó la bacteria con compuesto se añadió 15 μ L de MTT disuelto en PSB para luego incubarse a 37°C por 1 hora. Los pocillos con desarrollo bacteriano fueron aquellos que presentaron cambio de coloración a azul.

Se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB) siguiendo un protocolo similar al propuesto por Guerra *et al.* (2013) tomando una muestra de 100 μ L de todos los pocillos sin crecimiento visible, los que se diluyeron en 5 mL de MHB, para evitar el *carry over* del compuesto, y se incubaron por 20 - 24 h a 37°C. La CMB fue la menor concentración del metabolito liquénico a la que se registró ausencia de desarrollo bacteriano.

Es necesario comentar que los experimentos mencionados en este acápite fueron realizados por triplicado.

2.7. Realización de ensayos de descontaminación de superficie

El método de evaluación de efectividad de los compuestos liquénicos como desinfectantes en superficie de acero inoxidable usado en esta tesis fue el Test Europeo de Superficie, tomando como referencia lo publicado por Bloomfield *et al.* (1993) y Møretro *et al.* (2009), con algunas modificaciones.

De un cultivo bacteriano de 24 h en TSB se tomó una alícuota de 100 µl que se depositó en la superficie de 2 discos estériles de acero inoxidable de 2 cm de diámetro y se dejaron secar en campana de bioseguridad a temperatura ambiente por 1 h, esto para un inóculo bacteriano en ausencia de restos orgánicos.

Para establecer un inóculo bacteriano en presencia de restos orgánicos, se centrifugó el inóculo antes mencionado por 10 min a 10.000 rpm, eliminándose el sobrenadante líquido y resuspendiéndose el sedimento en 100 µl de solución diluyente (albúmina 3% + NaCl 0,85% + peptona de caseína 1% en 100 ml de agua destilada estéril).

Una vez cumplido el plazo antes mencionado, se añadió en uno de los discos 100 µl de agua destilada estéril y en el otro 100 µl de la solución desinfectante a estudiar, dejando secar en campana de bioseguridad a temperatura ambiente por 5 o 30 minutos (dependiendo del tiempo de contacto deseado). Una vez cumplido este tiempo, se tomaron cuidadosamente los discos y se pusieron dentro de matraces con 10 ml de PBS pH 7,0-7,4 y 3,6 g de perlas de vidrio, los que agitaron a 150 rpm por 10 min. Cumplida la agitación, se tomaron alícuotas de los matraces para realizar recuento en placas de TSA.

Es importante mencionar que, para usar este protocolo, se estandarizó previamente usando etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 0,5% como control (+).

Para determinar el logaritmo del descenso de población atribuible al compuesto en estudio, se procedió a restar al valor del logaritmo de la población de los controles con agua destilada el valor del logaritmo de la población de los discos con desinfectante.

2.8. Determinación de capacidad de inhibición de biopelícula

Para determinar el efecto de los compuestos puros respecto de la capacidad de formación de biopelícula de las distintas cepas de *A. baumannii*, se procedió previamente a calcular la formación de biopelícula en condiciones de sin presencia de inhibidores (control), de la totalidad de las cepas clínicas consideradas en este trabajo, además de la cepa control de *A. baumannii* ATCC 19606.

Para esto se usó el método del cristal violeta (CV) según lo descrito por Danese *et al.* (2000), basado a su vez en lo descrito por O'Toole y Kolter (1998). En primer lugar, se procedió a sembrar en microplacas de 96 pocillos y usando como medio de cultivo caldo tripticasa y un inóculo inicial de 10^5 ufc/ml por pocillo (control positivo), dejando por cada microplaca 6 pocillos con caldo sin inóculo (control negativo). Luego las microplacas se procedieron a incubar en agitación (100 rpm) y a 37°C por 24 h. Cumplido este periodo se tomó la fase planctónica en suspensión líquida (sobrenadante de cada pocillo) y se cambió a otra placa con objeto de medir su densidad óptica (DO) a 600 nm. Luego, se procedió a lavar la placa 2 veces con PBS y teñir las biopelículas de los pocillos con CV al 1%, lo que se logró incubando los pocillos con dicha tinción por 10 min en agitación. Luego, se procedió a retirar el exceso de CV de cada pocillo, lavando 2 veces con PBS y añadiendo etanol al 95% (para disolver el CV adherido a las biopelículas de los pocillos), incubándose la placa con dicho solvente por 15 min en agitación. Luego, el CV suspendido en etanol al 95% se trasladó a otra microplaca de 96 pocillos para proceder a leer la DO a 570 nm de la fase de biopelícula. Con estos resultados, se procedió a calcular la Formación Específica de Biopelícula (SBF, por sus siglas en inglés) usando la fórmula $SBF = ([B - NC]/G)$, en la que B es la DO a 570 nm de la biopelícula teñida con CV, NC es la DO

a 570 nm del control negativo (sin bacteria) teñido con CV y G es la DO a 600 nm de la fase planctónica.

2.9. Determinación de actividad de erradicación de biopelícula

Se procedió a determinar la capacidad del compuesto para eliminar una biopelícula ya formada de *A. baumannii* mediante una versión modificada del método de Calgary, basado en el *Calgary Biofilm Device* (CBD) (Ceri *et al.*, 1999; Innovotech, 2014; Takei *et al.*, 2013). Brevemente, se procedió a precultivar la bacteria a ensayar por 18-24 h en caldo TS, luego se ajustó el inóculo a 1.0 McFarland en MHB y, posteriormente se diluyó esta suspensión 1/30 (1×10^7 ufc/mL) en caldo antes mencionado. Luego, se adicionaron 200 μ L a cada uno de los pocillos de la placa MBEC de 96 pocillos para formación de biopelícula, incubándose a 37°C en cámara húmeda por 24 h y 150 rpm en incubador-agitador.

Luego de 24 horas de incubación, se abrió la microplaca especial y se procedió a retirar la cubierta donde se incubaron las biopelículas, la que se traslada a una microplaca convencional estéril de 96 pocillos con diluciones seriadas del biocida a estudiar en 200 μ L MHB por pocillo, incubándose a 37°C y 150 rpm en incubador-agitador por 20-24 horas. Luego se procedió a retirar la parte superior de la placa (donde está la biopelícula), lavándose en buffer fosfato salino para posteriormente incubarse en una segunda microplaca convencional con 200 μ L de caldo TS por pocillo, la que se sometió a incubación durante 24 horas a 37°C y 150 rpm en incubador-agitador (Takei *et al.*, 2013). Se estableció como Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula a la mínima requerida para lograr ausencia de turbidez en los pocillos de la segunda microplaca.

Como método de calibración, se ensayó este protocolo usando los antibióticos meropenem y colistín sobre el aislado A-417.

2.10. Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente los datos obtenidos se empleó el programa IBM SPSS Statistics 23, con el cual se determinaron las pruebas estadísticas a realizar según la naturaleza de los datos.

3. RESULTADOS

3.1. Objetivo 1: Determinar los extractos totales de líquenes antárticos con actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de *A. baumannii*.

Para determinar los extractos totales (ET) de líquenes con actividad antimicrobiana, se realizó el tamizaje mediante difusión en agar con 6 cepas, para de esa manera determinar de forma rápida los ET con actividad. Las cepas fueron:

- *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
- *A. baumannii* A512
- *A. baumannii* A523
- *A. baumannii* A527
- *A. baumannii* A368

Como se observa en las tablas 2 a 5, sólo los extractos totales de *R. terebrata* e *H. lugubris* presentaron actividad contra las cepas de *A. baumannii* ATCC y MDR. Esto implicó que, para el objetivo 2, se ensayaron los extractos totales de estos dos líquenes. Es importante mencionar que no se muestran todos los resultados de *H. lugubris* (tabla 2), si no que sólo los más representativos (los resultados completos se muestran en los anexos).

Tabla 2. Halos de inhibición (mm) de discos impregnados con 3,0 y 6,0 mg de extracto total de *H. lugubris* sobre aislados seleccionados de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y clínicos de *A. baumannii*

Aislado	3,0 mg / disco	6,0 mg / disco	THF* ^α	Meropenem* ^β
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	9,0*	12,0*	6,0	-
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	12,0*	17,0*	6,0	-
<i>A. baumannii</i> A527	10,3 ± 1,15	18,7 ± 0,58	6,0	11,0
<i>A. baumannii</i> A368	11,3 ± 1,53	18,3 ± 0,58	6,0	13,0
<i>A. baumannii</i> A523	12,3 ± 0,58	18,0 ± 1	6,0	13,0
<i>A. baumannii</i> A512	12,0 ± 0	18,3 ± 0,58	6,0	12,0

*Muestra única. THF: Tetrahidrofurano (90 µl / disco). α: Control Negativo. β: Control Positivo (10 µg/disco). Fuente: elaboración propia.

Tabla 3: Halos de inhibición (mm) de discos impregnados con 4,5 mg de extracto total de 3 líquenes distintos sobre aislados seleccionados de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y clínicos de *A. baumannii*

CEPAS BACTERIANAS	<i>R. terebrata</i>	<i>S. alpinum</i>	<i>U. antarctica</i>	THF ^α	Imipenem* ^β
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	30,0 ± 0*			6,0 ± 0	54,0
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	10,7 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0	38,0
<i>A. baumannii</i> A512	9,0 ± 0 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0	10,0
<i>A. baumannii</i> A523	9,3 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0	11,0
<i>A. baumannii</i> A527	7,3 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0	15,0
<i>A. baumannii</i> A368	6,7 ± 0,47	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0	14,0

Ensayos realizados por triplicado. α: THF: Tetrahidrofurano 90 µl (control negativo). *β: Imipenem (10 µg/disco) fue en muestra única, sólo como control positivo (no es aplicable estadística). ‡: Diferencias estadísticamente significativas con el control negativo (p <0,05). Fuente: elaboración propia.

3.2. Objetivo 2: Identificar las fracciones de extractos totales de líquenes antárticos responsables de la actividad antibacteriana sobre cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.

Para determinar la fracción de los extractos totales (ET) responsable de la actividad antimicrobiana, se realizó el tamizaje mediante difusión en agar con las mismas 6 cepas anteriormente mencionadas, para de esa manera determinar de forma rápida las fracciones de ET con actividad.

Como se puede apreciar en las tablas 4 y 5, tanto para *H. lugubris* como para *R. terebrata* la fracción metanólica fue la más activa contra las cepas previamente seleccionadas de *A. baumannii*. Debido a que ya existían trabajos que describían actividad antibiótica de compuestos obtenidos del líquen *R. terebrata* (Paudel *et al.*, 2010), se decidió que los análisis del objetivo 3 se llevarían a cabo con la fracción metanólica de *H. lugubris*, ya que no existía a la fecha literatura que describiera el hallazgo de compuestos antibióticos en este último líquen.

Tabla 4: Halo de inhibición (mm) generado por discos de papel filtro impregnados con 4,5 mg de distintas fracciones del ET de *Himantormia lugubris* sobre aislados seleccionados de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y clínicos de *A. baumannii*

CEPA	<i>Himantormia lugubris</i>			THF*
	Extracto total	Fracción Metanólica	Fracción Acetónica	
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	10,0 ± 0 [¥]	16,3 ± 0,94 [¥]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	6,0 ± 0	15,3 ± 1,25 [¥]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A523	7,7 ± 1,25	12 ± 1,41 [¥]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A527	9,0 ± 0 [¥]	12,7 ± 1,25 [¥]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A368	7,0 ± 0	14,7 ± 1,25 [¥]	6,0 ± 0	6,0 ± 0

*THF: Tetrahidrofurano (control negativo): promedio de halos de discos impregnados con 90 µl de THF. ¥: Diferencias estadísticamente significativas con el control negativo. Fuente: elaboración propia.

Tabla 5: Halo de inhibición (en mm) generado por discos de papel filtro impregnados con 4,5 mg de distintas fracciones del ET de *Ramalina terebrata* sobre aislados seleccionados de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y clínicos de *A. baumannii*

CEPA	<i>Ramalina terebrata</i>			Metanol*
	Extracto total	Fracción metanólica	Fracción acetónica	
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	14,0 ± 0 [‡]	15,0 ± 0 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	16,3 ± 0,47 [‡]	17,0 ± 0 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A512	13,0 ± 0 [‡]	14,7 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A523	13,3 ± 0,47 [‡]	13,7 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A527	13,7 ± 0,47 [‡]	14,7 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0
<i>A. baumannii</i> A368	11,7 ± 0,47 [‡]	11,7 ± 0,47 [‡]	6,0 ± 0	6,0 ± 0

*Metanol (control negativo): promedio de halos de discos impregnados con 90 µl de THF. ‡: Diferencias estadísticamente significativas con el control negativo. Fuente: elaboración propia.

3.3. Objetivo 3: Cuantificar la actividad antibacteriana de compuestos puros obtenidos de las fracciones antes mencionada sobre cepas clínicas de *A. baumannii*

Para cuantificar el nivel de actividad antibacteriana de los derivados de ET que cualitativamente presentaron actividad, se determinó la CMI de éstos mediante el método de microdilución en caldo. Estos ensayos se realizaron en tres etapas:

3.3.1. Etapa 1: Determinación de CMI y CMB con Fracciones de Extracto Total:

Previo a la obtención de compuestos puros provenientes de *H. lugubris*, se decidió cuantificar mediante CMI y CMB la actividad antibiótica de su fracción más activa (la fracción metanólica) contra 26 cepas resistentes a carbapenémicos de *A. baumannii*, divididas según si era susceptibles o resistentes a colistín. Como se puede apreciar en las tablas 6 a 8, tanto para las cepas susceptibles como para las resistentes a colistín las CMI estuvieron entre 625 y 1250 µg/ml, con CMB entre 1250 y 5000 µg/ml. También

destaca en las tablas que al menos el 70% de las cepas tuvieron CMB igual o una dilución mayor que la CMI, lo que implica una actividad antibiótica bactericida.

Tabla 6: CMI y CMB (en $\mu\text{g/ml}$) de la fracción metanólica de *H. lugubris* sobre aislados de *A. baumannii* sensibles a colistín

Aislado de <i>A. baumannii</i>	CMI	CMB	Caracterización de Actividad
A527	2500	2500	Bactericida
A368	2500	2500	Bactericida
A450	1250	1250	Bactericida
A378	1250	5000	Bacteriostática
A396	2500	2500	Bactericida
A442	1250	1250	Bactericida
A370	1250	1250	Bactericida
A397	625	1250	Bactericida
A444	1250	5000	Bacteriostática
A446	1250	2500	Bactericida
A380	1250	2500	Bactericida
A387	1250	1250	Bactericida

Fuente: elaboración propia.

Tabla 7: CMI y CMB (en $\mu\text{g/ml}$) de la fracción metanólica de *H. lugubris* sobre aislados de *A. baumannii* resistentes a colistín

Aislado de <i>A. baumannii</i>	CMI	CMB	Caracterización de Actividad
A417	1250	1250	Bactericida
A419	1250	1250	Bactericida
A523	2500	2500	Bactericida
A512	1250	2500	Bactericida
A430	1250	1250	Bactericida
A496	1250	1250	Bactericida
A503	2500	>5000	Bacteriostática
A500	1250	>5000	Bacteriostática
A440	1250	1250	Bactericida
A530	1250	2500	Bactericida
A439	1250	1250	Bactericida
A507	1250	1250	Bactericida
A490	1250	2500	Bactericida
A511	1250	1250	Bactericida

Fuente: elaboración propia.

Tabla 8: Comparación entre CMI promedio, CMI₅₀ y CMI₉₀ de 12 aislados de *A. baumannii* susceptibles a colistín y 14 aislados de *A. baumannii* resistentes a colistín

	Aislados de <i>A. baumannii</i> sensibles a colistín*	Aislados de <i>A. baumannii</i> resistentes a colistín*
CMI promedio [€]	1510	1429
CMB promedio [€]	2396	2857
CMI₅₀	1250	1250
CMI₉₀	2500	2500
CMB₅₀	2500	1250
CMB₉₀	5000	>5000

*Valores expresados en µg/ml. Sólo se aplicó test estadístico (t de Student) a CMI y CMB promedio, por ser el resto de las variables de tipo descriptivo. €: No hay diferencias significativas entre grupos. Fuente: elaboración propia.

3.3.2. Etapa 2: Determinación de CMI y CMB de Sub-Fracciones de Extracto Total:

Para determinar los eventuales compuestos puros responsables de la acción bactericida de la fracción metanólica de *H. lugubris*, se decidió separar dicha fracción en 8 subfracciones, con objeto de determinar cuáles poseían metabolitos de interés, usando cromatografía en columna por gradiente de polaridad. Hecho esto, se procedió a determinar la CMI y CMB de cada una sobre 2 cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Como se puede apreciar en la tabla 9, las 8 subfracciones presentaron algún grado de actividad antibiótica contra las cepas ensayadas, siendo en todos los casos bactericida. Sin embargo, las fracciones M4 a M8 tendieron a tener una menor CMI, teniendo M5 y M8 una mayor actividad bactericida por poseer menor CMB.

Tabla 9: Actividad antibacteriana (CMI y CMB) de subfracciones de la fracción metanólica de *H. lugubris*

SUB-FRACCIÓN	<i>A. baumannii</i> A-450		<i>A. baumannii</i> A-419	
	CMI*	CMB*	CMI*	CMB*
M1	2500	2500	2500	2500
M2	2500	2500	2500	2500
M3	2500	2500	2500	2500
M4	1250	2500	1250	2500
M5	1250	1250	1250	1250
M6	1250	2500	1250	2500
M7	1250	2500	1250	2500
M8	1250	1250	1250	1250

Réplica única, por lo que los valores tienen un fin descriptivo; *: µg/ml. Fuente: elaboración propia.

3.3.3. Etapa 3: Determinación de CMI y CMB de los Compuestos Puros:

Las 8 subfracciones antes mencionadas fueron analizadas mediante el uso de espectrofotometría de Gas-Masa y HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) para determinar su eventual composición. Luego, fueron sometidas a separación en cromatografía en columna de sílica usando una mezcla hexano-acetato de etilo de polaridad creciente y, una vez llegado al 100% de polaridad, se continuó con una mezcla acetato de etilo-etanol hasta obtener un 100% de polaridad, con objeto de eluir completamente las subfracciones antes mencionadas y obtener separación de los compuestos de las mismas, comprobándose la pureza de los mismos usando cromatografía de capa fina (TLC) y concentrándose mediante rotavaporación. De esta forma, se obtuvo que el compuesto más abundante fue un compuesto color amarillo (rotulado previamente por Cabrera como CI-05), el que fue purificado mediante cristalización por solvente utilizando una mezcla de dietileter/metanol (1:1) y determinada su identidad comparando por TLC con compuestos identificados por Cabrera (2015) mediante Resonancia Nuclear Magnética.

Del análisis anterior surgió atranol, un metabolito secundario liquénico de la vía del acetilpolimalonato (principal vía de síntesis de metabolitos secundarios de líquenes), relacionado con las depsidonas.

Una vez aislado este compuesto, se procedió a determinar su CMI y CMB con inóculo estándar tanto contra cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos como contra la cepa de colección *A. baumannii* ATCC 19606. Como se puede apreciar en la tabla 10, el rango de CMI de las cepas fue entre 125 y 250 µg/ml, con una CMB entre los 250 y los 500 µg/ml, dando cuenta de una actividad bactericida.

Cuando se realizó la determinación de CMI y CMB con un inóculo mayor sobre la cepa A-496 (ver tabla 11), se aprecia un aumento de 4 diluciones (esto es, de 250 a 1000 µg/ml) de la CMI, así como un aumento de 8 diluciones (de 250 a 2000 µg/ml) de la CMB.

Tabla 10: Actividad antibacteriana (CMI y CMB) de atranol con inóculo estándar (5×10^5 ufc/ml), sobre cepas de seleccionadas de *Acinetobacter baumannii*

Cepa	CMI*	CMB*	Caracterización de Actividad
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	250	250	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-419	250	250	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-450	250	250	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-417	250	500	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-496	250	250	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-503	250	250	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-507	250	250	Bactericida
<i>A. baumannii</i> A-523	125	250	Bactericida

Réplica única, por lo que los valores tiene un fin descriptivo; *:µg/ml. Fuente: elaboración propia.

Tabla 11: Efecto del tamaño de inóculo en la CMI y CMB de atranol ($\mu\text{g/ml}$) e hipoclorito de sodio (% m/v) sobre *A. baumannii* A-496

Compuesto	Inóculo	CMI	CMB
Atranol	$1,0 \times 10^8$	1000*	2000*
Atranol	$1,0 \times 10^9$	1000*	2000*
Hipoclorito	$1,0 \times 10^8$	0,1**	0,1**
Hipoclorito	$1,0 \times 10^9$	0,1**	0,2**

Réplica única, por lo que los valores tienen un fin descriptivo. *: $\mu\text{g/ml}$. **: porcentaje m/v

3.4. Objetivo 4: Determinar la efectividad como desinfectante de compuestos puros sobre superficies abióticas, contaminadas con cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos

Se procedió a realizar el ensayo de descontaminación de superficie empleando la cepa de *A. baumannii* A-496, caracterizada como resistente a colistín y con gran capacidad de formación de biopelícula. Para esto, se midió la efectividad de atranol a concentración igual a la CMI, 2 veces la CMI y 4 veces la CMI, con tiempos de contacto de 5 min y 30 min.

Destaca el hecho de que atranol no fue capaz de ejercer el mínimo efecto bactericida exigido para pasar el test de desinfección en superficie (es decir, 4 logaritmos de descenso en la población bacteriana) en ninguno de los tiempos de aplicación ni concentraciones ensayados, como se puede apreciar en la tabla 12. Debido a esto, se decidió no realizar los estudios en presencia de materia orgánica. Sin embargo, como se aprecia en la tabla 13, se observa una relación estadísticamente significativa entre la disminución logarítmica de población bacteriana y la dosis aplicada, así como entre la disminución logarítmica de población bacteriana y el tiempo de contacto ($p < 0,05$). Además, para prácticamente todas las condiciones, la disminución de la población fue estadísticamente significativa.

Tabla 12: Efecto de atranol, hipoclorito de sodio y etanol a distintas concentraciones y a distintos tiempos de contacto sobre superficies de acero inoxidable contaminadas con *A. baumannii* A-496.

Compuesto	Concentración de Compuesto	Tiempo de Contacto (min)	Disminución Logarítmica de la Población
Atranol	250*	5	0,63 [¥]
Atranol	250*	30	0,25 [¥]
Atranol	500*	5	0,26 [¥]
Atranol	500*	30	0,55 [¥]
Atranol	1000*	5	0,30
Atranol	1000*	30	0,74 [¥]
Atranol	2000*	5	0,48 [¥]
Atranol	2000*	30	0,95 [¥]
Atranol	4000*	5	1,03 [¥]
Atranol	4000*	30	0,89 [¥]
Hipoclorito de sodio	0,5%**	5	5,41 [¥]
Hipoclorito de sodio	0,5%**	30	5,32 [¥]
Etanol	70%***	5	5,84 [¥]

Ensayos realizados por triplicado. *: µg/ml. **: porcentaje m/v. ***: porcentaje v/v. ¥: Disminución logarítmica de la población bacteriana que logra ser estadísticamente significativa. Fuente: elaboración propia.

Tabla 13: Agrupamiento, según ANOVA de una vía (con $p < 0,05$), de las dosis y tiempo de contacto a las cuales el efecto desinfectante del compuesto es similar.

Disminución Logarítmica de la Población							
Concentración (ug/ml)	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
HSD Tukey ^{ab}							
250 ug/ml en 30 minutos	3	,2500					
500 ug/ml en 5 minutos	3	,2567					
1000 ug/ml en 5 minutos	2	,3000	,3000				
2000 ug/ml en 5 minutos	3		,4767	,4767			
500 ug/ml en 30 minutos	3			,5500			
250 ug/ml en 5 minutos	3			,6300	,6300		
1000 ug/ml en 30 minutos	3				,7400	,7400	
4000 ug/ml en 30 minutos	3					,8900	,8900
2000 ug/ml en 30 minutos	3						,9500
4000 ug/ml en 5 minutos	3						1,0300
Sig.		,992	,075	,170	,555	,189	,258

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,857.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, se decidió determinar si, a los 5 y 30 min de tiempo de contacto, existía una correlación lineal entre la concentración de atranol y la disminución logarítmica de población bacteriana, encontrándose una moderada correlación lineal (coeficiente de Pearson de 0,765 y 0,738, respectivamente, $p = 0,001$) (figuras 1 y 2). Por otro lado, se encontró que la correlación entre concentración de atranol y descenso de la población bacteriana a los 30 min se ajustaba de mejor forma a una curva de tipo logarítmica ($R^2 = 0,848$) (ver figura 2).

Finalmente, se logró determinar que, para algunas de las concentraciones ensayadas, existió una alta correlación lineal entre la disminución de la carga bacteriana y el tiempo de contacto (coeficiente de Pearson $> 0,9$; $R^2 > 0,9$), mientras que para otras esta correlación no logró ser demostrada (ver figura 3).

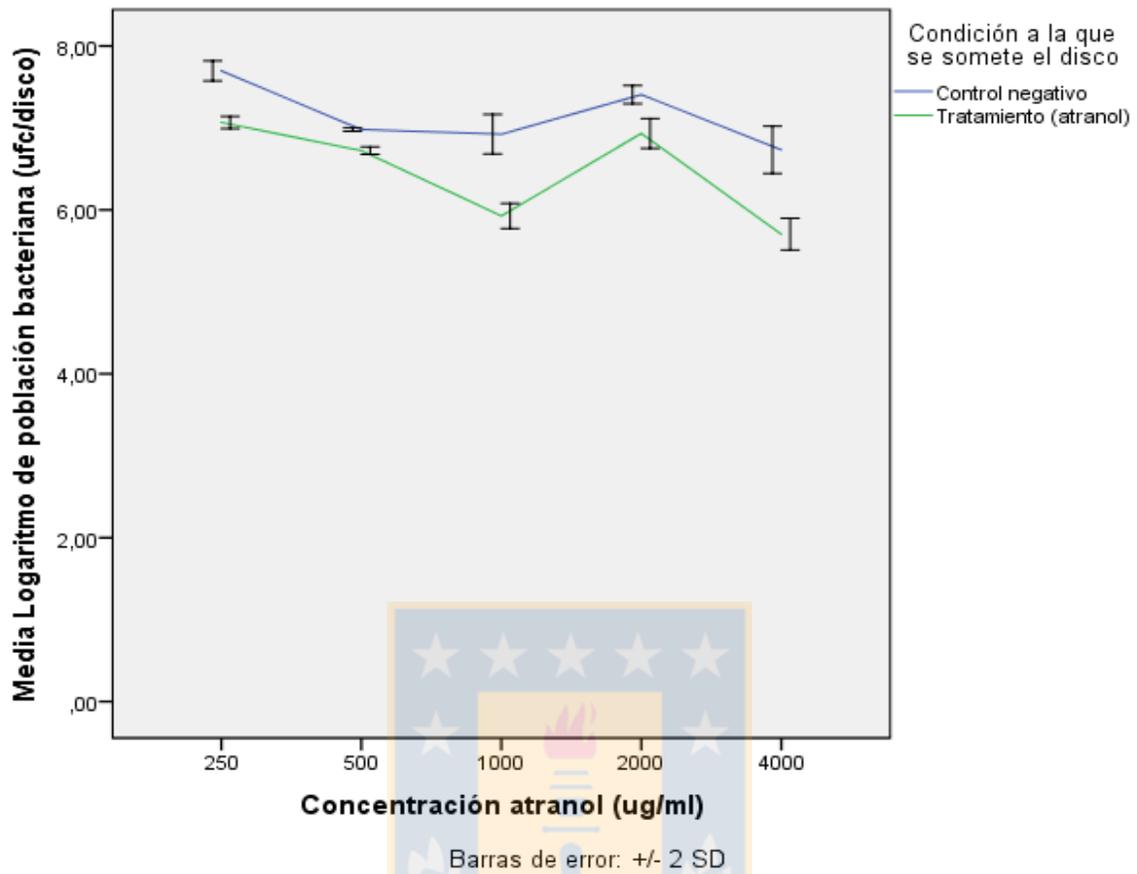


Figura 1: Correlacón entre concentracón de atranol ($\mu\text{g/ml}$) y la carga bacteriana (\log_{10} de ufc/ml) sobre discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro, con un tiempo de contacto de 5 min. Fuente: elaboracón propia.

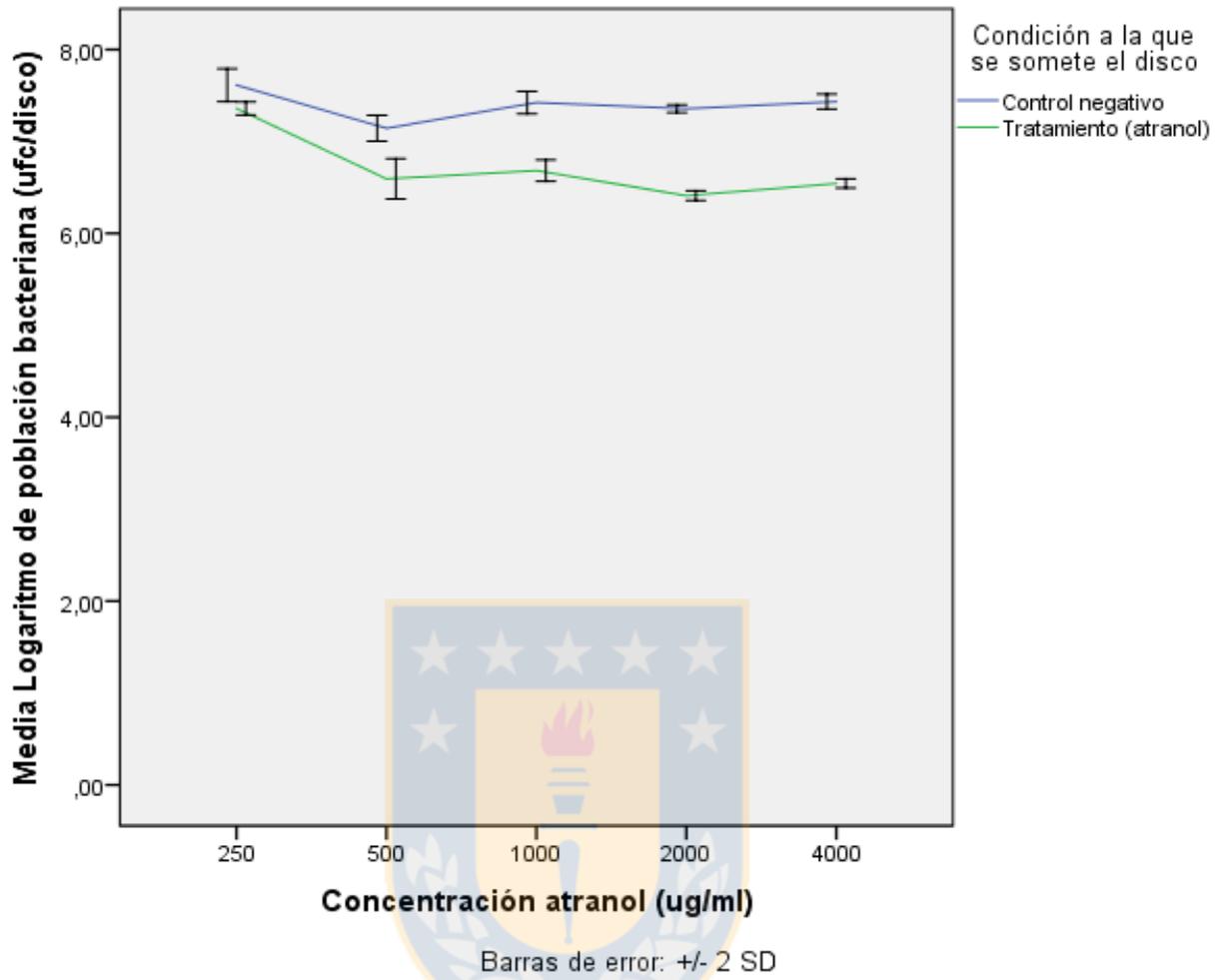
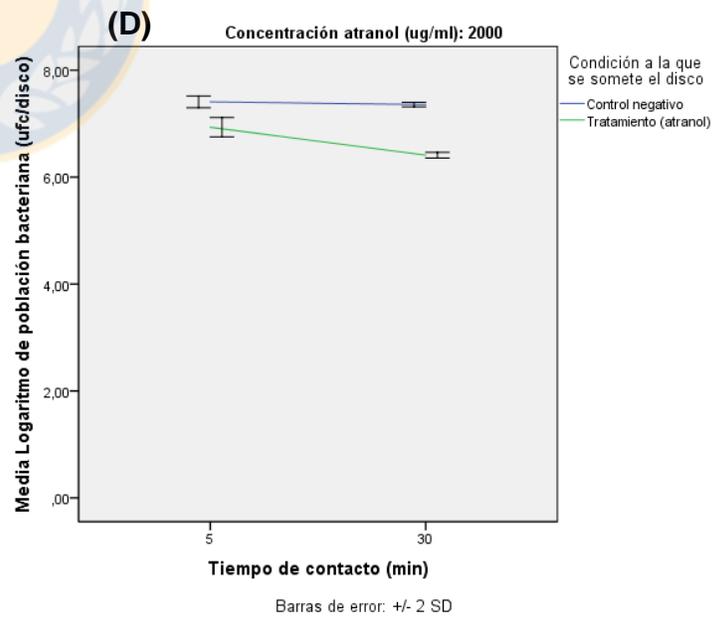
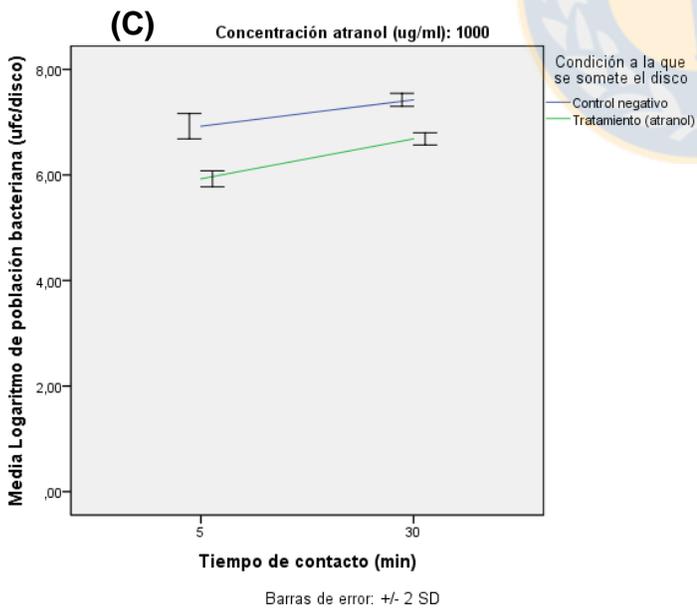
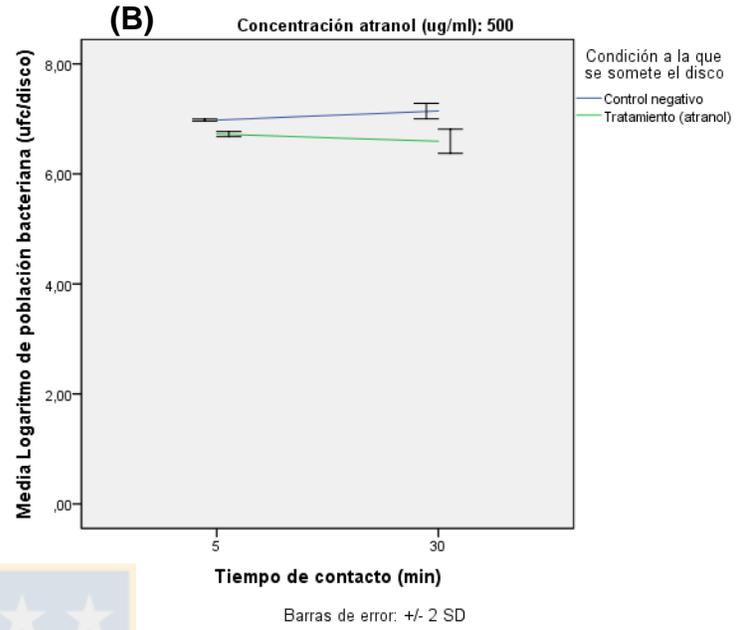
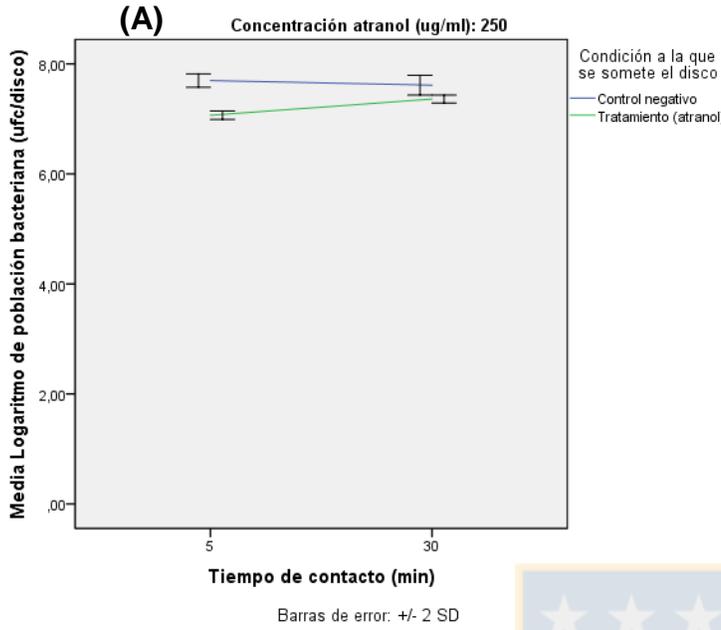


Figura 2: Correlación entre concentración de atranol ($\mu\text{g/ml}$) y la carga bacteriana (\log_{10} de ufc/ml) sobre discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro, con un tiempo de contacto de de 30 min. Fuente: elaboración propia.



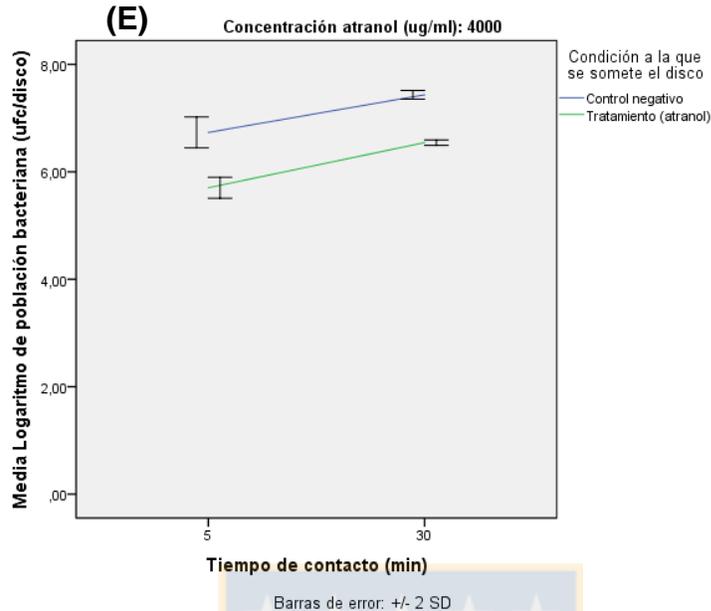


Figura 3: Correlación entre tiempo de contacto (min) y la carga bacteriana (\log_{10} de ufc/ml) en discos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro, a concentraciones de atranol de 250 (A), 500 (B), 1000 (C), 2000 (D) y 4000 (E) $\mu\text{g/ml}$. Fuente: elaboración propia.

3.5. Objetivo 5: Determinar la capacidad de los metabolitos para desagregar la biopelícula formada por cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.

Como se puede apreciar en la tabla 14, en una primera etapa se determinó la formación específica de biopelícula (SBF, por sus siglas en inglés) en condiciones control de todos los aislados de *A. baumannii* extensivamente resistentes (XDR) empleados en este estudio, para de esa forma escoger los que presentan mayor producción de biopelícula para ser empleados en los estudios posteriores. Destaca de los datos obtenidos, la gran heterogeneidad en el nivel de producción de biopelícula, existiendo aislados que prácticamente no producen biopelícula y otros con gran nivel de producción de biopelícula. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados sensibles y resistentes a colistín (t de Student, $p = 0,957$) (ver tabla 15).

Tabla 14: Formación específica de biopelícula (SBF) de cepas de *A. baumannii* en condiciones control a 24 h de incubación, calculada en unidades arbitrarias

CEPA	SBF
A-450	0,03
A-419	0,04
A-446	0,07
A-430	0,07
A-490	0,11
A-527	0,20
A-512	0,23
A-368	0,38
A-370	0,45
A-397	0,53
A-511	0,53
A-530	0,66
ATCC 19606	0,80
A-439	0,98
A-500	1,29
A-387	1,39
A-440	1,41
A-396	1,49
A-417	1,70
A-378	1,85
A-503	1,85
A-436	2,00
A-442	2,06
A-444	2,30
A-380	2,44
A-523	2,47
A-496	2,48
A-507	2,61

Fuente: elaboración propia.

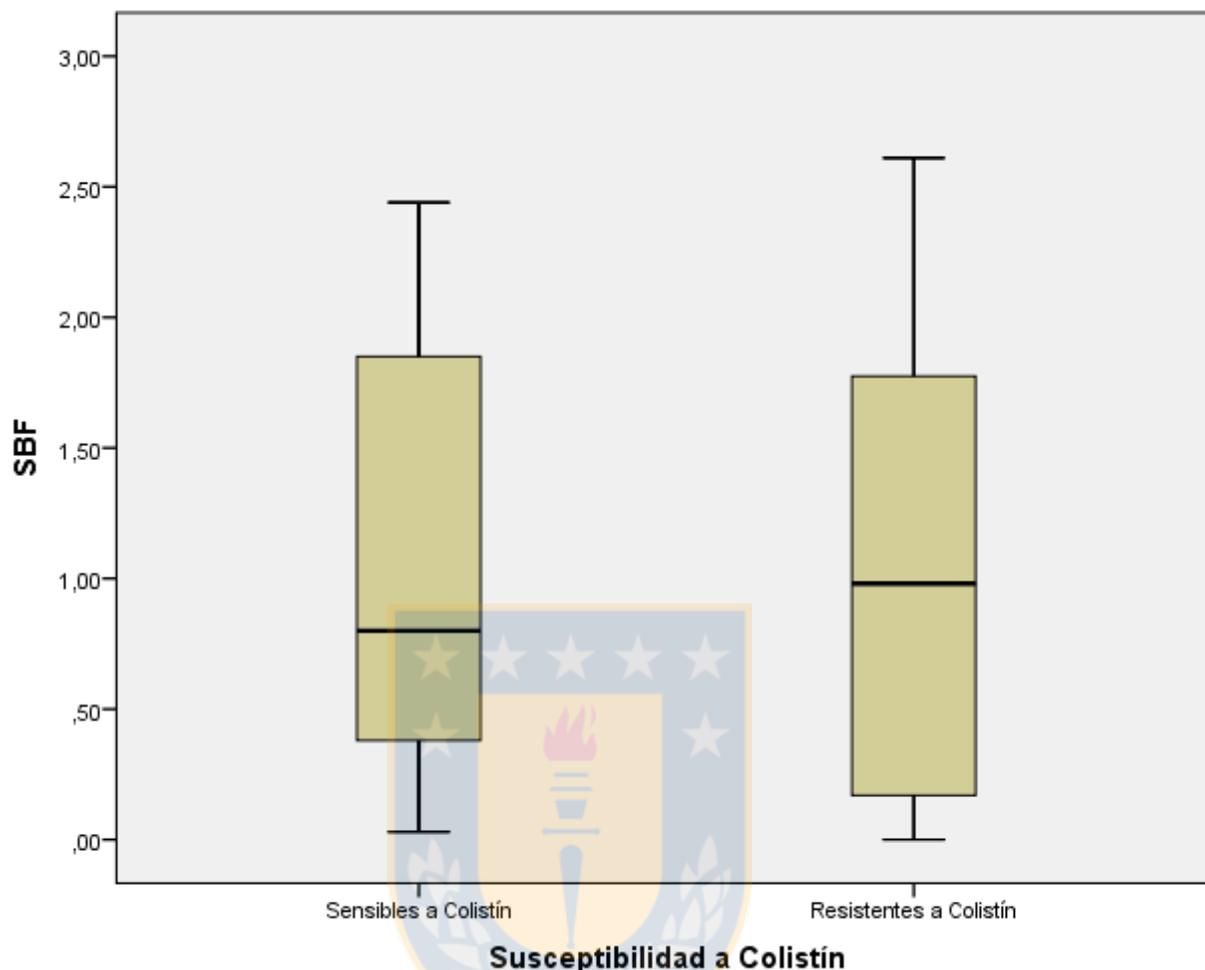


Figura 4: Formación de biopelícula en condiciones control a 24 h de incubación, calculada en unidades arbitrarias, al separar los aislados según nivel de susceptibilidad a colistín. Fuente: elaboración propia.

Con posterioridad, se decidió evaluar la capacidad del compuesto puro a concentraciones subinhibitorias de evitar la formación de biopelícula de 5 cepas resistentes a carbapenémicos y de la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606, usando el método del Cristal Violeta según lo descrito por Danese *et al.* (2000) y O'Toole and Kolter (1998), y seleccionadas de aquellas que presentaban mayor formación de biopelícula en condiciones control. Como se puede apreciar en la tabla 14, la formación de biopelícula en ausencia de compuesto fue de por sí heterogénea. Por otro lado, la formación de biopelícula en presencia de atranol también fue heterogénea, habiendo

inhibición en sólo 4 de los 6 aislados estudiados (tabla 15). Más aún, dicha reducción en la formación de biopelícula sólo fue estadísticamente significativa para el aislado A-417, donde se logra alcanzar una disminución mayor a un 70% en la formación de biopelícula a una dosis de 125 µg/ml ($p = 0,037$).

Interesantemente, al agrupar todos los aislados en un solo grupo, se aprecia una disminución dosis-dependiente de la formación de biopelícula en presencia del compuesto, la que es estadísticamente significativa al comparar el efecto a 125 µg/ml con el efecto a las demás concentraciones de compuesto ($p < 0,041$), alcanzándose un 33% de inhibición de la formación de biopelícula (ver tablas 16 y 17).

Tabla 15: Formación Específica de Biopelícula (promedio) de la cepa multisensible ATCC 19606 y diversos aislados extensivamente resistentes de *A. baumannii*, en presencia de distintas concentraciones subinhibitorias de atranol y con un tiempo de incubación de 24 h

AISLADO	1/2 CMI (125 µg/ml)		1/4 CMI (62,5 µg/ml)		1/8 CMI (31,25 µg/ml)		CONTROL (+)	
	SBF*	% de formación de BP**	SBF*	% de formación de BP**	SBF*	% de formación de BP**	SBF*	% de formación de BP**
ATCC 19606	1,24 ± 1,00	62,50	2,07 ± 1,26	104,55	2,21 ± 0,82	107,02	1,98 ± 1,59	100,00
A-417	1,04 ± 1,10 [¥]	28,58	2,57 ± 1,72	70,84	2,76 ± 1,83	76,15	3,63 ± 2,41	100,00
A-496	2,68 ± 0,47	119,62	2,66 ± 0,89	118,81	2,49 ± 0,68	111,18	2,24 ± 0,66	100,00
A-503	1,40 ± 1,04	38,37	2,83 ± 2,03	77,75	3,36 ± 2,47	92,13	3,64 ± 2,93	100,00
A-507	4,31 ± 1,67	118,75	4,24 ± 1,88	116,80	4,86 ± 2,20	133,64	3,63 ± 0,99	100,00
A-523	2,41 ± 1,97	54,01	4,91 ± 3,03	109,89	5,30 ± 3,82	118,75	4,47 ± 2,73	100,00

*SBF: Índice de formación de biopelícula obtenido para la condición ensayada. **% de formación de BP: porcentaje de formación de biopelícula respecto al Control (+). ¥: Diferencias estadísticamente significativas con el control negativo. Fuente: elaboración propia.

Tabla 16: Formación Específica de Biopelícula (promedio) a las 24 h de incubación de los aislados de *A. baumannii* ensayados, agrupados en un solo grupo, en presencia de distintas concentraciones subinhibitorias de atranol.

Concentración Atranol ($\mu\text{g/ml}$)	SBF	Formación Porcentual de Biopelícula**
125 [‡]	2,18 \pm 1,73	66,75
62,5	3,21 \pm 2,17	98,44
32,25	3,48 \pm 2,53	106,62
Control (+)*	3,26 \pm 2,25	100,00

*Control (+): formación de biopelícula en ausencia de atranol. La Formación Porcentual de Biopelícula (**) está expresada en comparación al Control (+). ‡: Diferencias estadísticamente significativas con el control negativo. Fuente: elaboración propia.

Tabla 17: Tabla basada en análisis ANOVA de una vía, en el que se agrupan los SBF promedio obtenidos según concentración de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) y semejanza estadística.

SqRt			
HSD Tukey _{a,b}			
Concentración de compuesto ($\mu\text{g/ml}$)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
125 ug/ml	53	1,3674	
62,5 ug/ml	54		1,6857
Control Positivo	54		1,7009
31,25 ug/ml	54		1,7553
Sig.		1,000	,936

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, como se puede apreciar en la tabla 18, la concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB) para atranol sobre aislados XDR de *Acinetobacter baumannii* fue entre 4 a 8 veces la CMI para los mismos, situación distinta a la observada a los antibióticos control meropenem y colistín.

Tabla 18: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB), Concentración Mínima de Inhibición de Biopelícula (CMIB) y Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB) de atranol sobre distintos aislados clínicos XDR de *Acinetobacter baumannii*

Aislado	CMI*	CMB*	CMIB*	CMEB*	CMI*	CMEB*	CMI*	CMEB*
	atranol	atranol	atranol	atranol	MER	MER	COL	COL
ATCC 19606	250	250	500	1000				
A-417	250	500	500	1000	2	>4096	32	512
A-496	250	250	1000	1000				
A-503	250	250	1000	2000				
A-507	250	250	1000	1000				
A-523	125	250	500	1000				

Réplica única, por lo que los valores tienen un fin descriptivo. *: µg/ml; MER: meropenem; COL: colistín. Fuente: elaboración propia.

4. DISCUSIÓN

4.1. Objetivo 1: Determinar los extractos totales de líquenes antárticos con actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de *A. baumannii*.

De los 4 líquenes sobre los que se evaluó la actividad antibacteriana para 2 de ellos existe literatura que reporta la existencia de metabolitos con actividad antibacteriana: *R. terebrata* y *S. alpinum*, no existiendo publicaciones a la fecha de la actividad antimicrobiana de *U. antarctica* y *H. lugubris*. Esto, a pesar de que Kosanić *et al.* (2012) reportan que otros líquenes del género *Umbilicaria* sí presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

En relación a esto, destaca lo publicado por Paudel *et al.* (2010), quienes reportan la actividad antibiótica de *R. terebrata* sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, informando además que dicha actividad se debe a la presencia de ácido úsnico, reconocido previamente por su efecto antibacteriano sobre bacterias Gram positivas (Ingólfssdóttir, 2002). Por otro lado, Bhattarai *et al.* (2013) reportan la presencia en *S. alpinum* de una pseudodepsidona con efecto antibiótico sobre *B. subtilis* y *S. aureus*.

A pesar de que la gran mayoría de los reportes en la literatura de actividad antibiótica de extractos de líquenes son descripciones de actividad sobre bacterias Gram positivas, existen también reportes de actividad antibiótica sobre bacterias Gram negativas. En este sentido, Shrestha *et al.* (2014) estudiaron la actividad antibiótica de 34 líquenes obtenidos de Norteamérica contra las bacterias *S. aureus* sensible a meticilina, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *P. aeruginosa* y *E. coli*, reportando la gran mayoría de ellos actividad de amplio espectro, tanto en sus extractos metanólico como acetónico.

Es importante mencionar que el único trabajo a la fecha que ha evaluado la actividad antimicrobiana de extractos de líquenes sobre *A. baumannii* es la publicación de

Sökmen *et al.* (2012), en la que se evalúa la actividad antibacteriana de los líquenes *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* y *Evernia prunastri* sobre distintas bacterias, entre ellas *A. baumannii*. Por lo tanto, no es posible realizar comparaciones de los resultados actuales con publicaciones anteriores.

Uno de las posibles explicaciones de por qué sólo 2 líquenes presentaron actividad antimicrobiana contra las cepas de *A. baumannii* incluidas en este estudio, puede residir en el hecho de que los extractos totales se obtuvieron usando metanol, ya que la investigación estaba enfocada en obtener e identificar metabolitos secundarios de líquenes, los que son característicamente poco polares. Esto implica que potenciales compuestos antimicrobianos polares (como péptidos o carbohidratos) que hubiesen estado en los líquenes quedan excluidos de este estudio, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que estén presentes en *S. alpinum* o *U. antarctica*.

En este sentido, también es importante mencionar que buena parte de la literatura en líquenes describe actividad antibiótica fundamentalmente contra bacterias Gram positivas, lo que implica que *S. alpinum* o *U. antártica* pudieran tener efecto inhibitorio del crecimiento de otras bacterias distintas a *A. baumannii*. De hecho, Vartia (1973) reporta que al menos la mitad de los líquenes estudiados a la fecha presentan actividad antimicrobiana.

Finalmente, podemos mencionar que se trata del primer reporte de actividad antibacteriana por parte de extracto de *H. lugubris*.

4.2. Objetivo 2: Identificar las fracciones de extractos totales de líquenes antárticos responsables de la actividad antibacteriana sobre cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.

Los resultados obtenidos en relación a la actividad antimicrobiana que poseía la fracción metanólica sobre *A. baumannii*, concuerdan con lo reportado en trabajos

anteriores (Shrestha y St. Clair, 2013; Srivastava *et al*, 2013), en cuanto a que en varios de ellos la fracción metanólica del extracto total del líquen estudiado tiene efecto antibiótico sobre bacterias seleccionadas.

En publicaciones anteriores (Molnár y Farkas, 2010) se constatan variaciones en qué fracción del extracto total líquénico presenta actividad antimicrobiana, dándose casos en los que más de una fracción presenta efecto antibacteriano. Por ejemplo, Paudel *et al.* (2008) reportan que el extracto metanólico de 5 líquenes antárticos presentan actividad antibacteriana, fundamentalmente sobre bacterias Gram positivas. Por otro lado, Ranković y Mišić (2007) reportan que los extractos etanólico, acuoso y etilacetato de 2 líquenes (*Alectoria sarmentosa* y *Cladonia rangiferina*) presentan efecto antifúngico de amplio espectro, siendo mayor el efecto de la fracción etanólica. Adicionalmente, Srivastava *et al.* (2013) reportan que, en 2 líquenes estudiados, todas las fracciones obtenidas (acetónica, etanólica y metanólica) presentaron efecto antibiótico contra *B. cereus* y *S. aureus*.

A este respecto, es interesante constatar que, a diferencia de lo reportado en publicaciones anteriores, ninguna de las otras fracciones presentó actividad antibacteriana, lo que podría hablar de una menor variedad de compuestos secundarios presentes en los líquenes estudiados.

4.3. Objetivo 3: Cuantificar la actividad antibacteriana de compuestos puros obtenidos de las fracciones antes mencionada sobre cepas clínicas de *A. baumannii*

El compuesto encontrado, atranol, es un benzaldehído derivado de los dépsidos y es un preservante usado de larga data en la industria cosmética, siendo obtenido fundamentalmente del líquen *Evernia prunastri* (L.) ARCH. (Rastogi *et al.*, 2004), aunque también ha sido descrito en el líquen *Stereocaulon vesuvianum* (Caccamese *et al.*, 1986). Este compuesto es reconocido como un potente alérgeno (Rastogi *et al.*,

2004), por lo que la Comisión Europea propuso en 2014 su prohibición de los productos cosméticos (Comisión Europea, 2014).

Respecto a la literatura previa en cuanto a actividad antibacteriana de atranol, Nomura *et al.* (2012) publicaron un estudio en el que se analizan diversos compuestos obtenidos de *E. prunastri*, entre ellos atranol, en relación a su actividad antibacteriana sobre diversas cepas del género *Legionella*. Ellos encontraron que la CMI de este último compuesto estaba entre 53,3 y 128 $\mu\text{g/ml}$ y que su CMB estaba entre 117,3 y 234,7 $\mu\text{g/ml}$, lo que implica una actividad bactericida.

Los resultados del estudio anterior concuerdan con lo encontrado en este estudio, ya que no sólo las CMI para *A. baumannii* fueron similares a lo descubierto por Nomura *et al.* (2012 para *Legionella*, si no que también la actividad antibiótica fue caracterizada como bactericida.

En general, si se compara con otros trabajos de compuestos de origen liquénico con actividad sobre bacterias Gram negativas, la actividad antibacteriana de atranol se puede catalogar de moderada-baja, lo que también ocurre al comparar con los resultados obtenidos con compuestos sobre bacterias Gram positivas. De hecho, Ingólfadóttir (2002) menciona la alta efectividad de ácido úsnico sobre bacterias Gram positivas, registrando CMI entre 4 $\mu\text{g/ml}$ (para *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus faecalis*) y 16 $\mu\text{g/ml}$ (para *Enterococcus faecium*), siendo similar a lo reportado en la misma publicación para bacterias anaerobias, con CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$ (*Propionibacterium acnes*) a 8 $\mu\text{g/ml}$ (*Bacteroides ruminicola* ssp *brevis*).

Por otro lado, destaca lo publicado por Nishanth *et al.* (2015), quienes establecen que el ácido protocetrárico proveniente del liquen *Usnea albopunctata* tendría elevada actividad bactericida contra bacterias Gram negativas (con CMI entre 0,5 y 16 $\mu\text{g/ml}$), pero moderada a baja contra bacterias Gram positivas (con CMI entre 32 y 64 $\mu\text{g/ml}$). Esto último es similar a lo que ocurre con el antibiótico colistín, lo que sugeriría (al menos en parte) un blanco asociado a estructuras propias de las bacterias Gram

negativas como la membrana externa, aunque los autores del estudio no abordan un eventual o demostrado mecanismo de acción.

Es importante mencionar además que, según una revisión de Shrestha y St. Clair (2013), sólo 50 de los aproximadamente 1050 metabolitos secundarios de líquenes reportados a la fecha han sido ensayados para evaluar su efecto antibiótico, por lo que aún queda mucho por investigar en este tópico.

4.4. Objetivo 4: Determinar la efectividad como desinfectante de compuestos puros sobre superficies abióticas, contaminadas con cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos

Los resultados obtenidos con atranol descartan su utilidad como desinfectante, al menos para la cepa estudiada y para las dosis ensayadas. Si se comparan estos resultados con la literatura conocida, se puede apreciar que Møretrø *et al.* (2009) obtienen una reducción de 4 logaritmos de la población de bacterias del género *Legionella* usando etanol al 70%, con un tiempo de contacto de 5 min, siendo este resultado similar a lo obtenido con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 0,5% al ser ensayado contra cepas MDR de *A. baumannii*. Respecto de esto último, llama la atención que el resultado obtenido con hipoclorito de sodio al 0,5% (una reducción de la población bacteriana mayor a los 5 logaritmos con un tiempo de contacto de 5 minutos), contrasta con las recomendaciones habituales de las guías clínicas, en cuanto a que se requieren por lo menos 15 minutos (lo que demora la solución en secarse) para que hipoclorito logre ejercer su acción bactericida; sin embargo, consistente con lo observado por Bloomfield *et al.* (1993), quienes obtuvieron disminuciones mayores a los 6 logaritmos en la población bacteriana en superficies de acero inoxidable usando hipoclorito de sodio. De todas formas, la alta efectividad de hipoclorito iría en línea con lo observado al realizar las CMI y CMB con inóculo aumentado, donde se aprecia que al ser la CMI de 0,1% m/v se avala la recomendación de usar hipoclorito a concentraciones entre 0,1 y 0,5%. Sin embargo, en el trabajo de Møretrø *et al.* antes mencionado se constata que a los 5 minutos de

tiempo de contacto el hipoclorito sólo producía una disminución de 1 logaritmo en la población de *Legionella*, lo que como ya mencionamos contrasta con lo obtenido en nuestro trabajo.

Una de las explicaciones a estos resultados insatisfactorios podría estar en que atranol presentaría un mecanismo de acción lento, algo que ya se ha descrito con otros compuestos antimicrobianos como los beta-lactámicos. A este respecto, Ahmad y Viljoen (2015) reportan que la combinación de plata con el aceite esencial de *Cymbopogon* presentan un potente efecto bactericida que tarda al menos 6 horas en producir un descenso de población de 3 logaritmos tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, mostrando que algunos bactericidas potentes pueden tener un mecanismo de acción lento. Esta situación también ha sido descrita para *A. baumannii*, ya que Sampson *et al.* (2012) lograron establecer que antibióticos “rápidos” y reconocidamente bactericidas como las polimixinas requieren al menos 30 min para disminuir la carga bacteriana de 10^8 a 10^5 ufc/ml.

Respecto a lo mencionado en el párrafo anterior, es interesante constatar que, en las condiciones estudiadas, tanto el tiempo de contacto como la dosis de atranol juegan un rol en el nivel de disminución de la carga bacteriana logrado por este compuesto, por lo que se podría teorizar que al prolongar el tiempo de contacto más allá de los 30 minutos se podría obtener una mayor disminución de la carga bacteriana; sin embargo, esto sería poco práctico para su uso como desinfectante, ya que la rapidez de acción se considera un atributo deseable de los mismos.

La hipótesis anterior se ve reforzada por el hecho de que a los 30 min, la correlación entre concentración de atranol y disminución logarítmica de la carga bacteriana tiene un comportamiento de tipo logarítmico, lo que sugiere que a ese tiempo de contacto llega un punto en que el aumento de la concentración de atranol no permite una mayor desinfección. Esto implicaría que, independiente de la concentración de atranol, se requiere de un tiempo de contacto mayor a 30 minutos para alcanzar una disminución

de la carga bacteriana de al menos 3 logaritmos. Empero, en las condiciones ensayadas, el tiempo de contacto no fue un mejor predictor de efecto bactericida que la concentración de atranol, ya que para algunas de las concentraciones ensayadas del compuesto el prolongar el tiempo de contacto no incrementó la disminución en la carga bacteriana de los discos de acero inoxidable.

Por otro lado, para algunos antimicrobianos está descrito que la carga bacteriana juega un rol en la eficacia del compuesto, tal como lo publican Udekwu *et al.* (2009) para la bacteria *S. aureus*. Este grupo de investigación demostró que para algunos antibióticos como daptomicina pasar de un inóculo inicial 10^5 bacterias a un inóculo de 10^8 bacterias implicaba que el antibiótico dejara de ser bactericida y pasara a ser bacteriostático a dosis equivalentes a la CMI. Ellos especulan que un factor clave en esta situación sería la relación A_0/D , es decir, la cantidad de moléculas de antibiótico por bacteria afectada, lo que implicaría que, a mayor inóculo inicial, menor cantidad de antibiótico por bacteria y por ende menor efectividad de la misma dosis, lo que podría ser un factor clave en tratamiento de infecciones con alta carga bacteriana, misma situación que según Bulitta *et al.* (2010) se daría igualmente con colistín y *P. aeruginosa*. Éste último grupo de investigación (Bulitta *et al.*, 2009) establece la misma conclusión respecto a ceftazidima sobre *P. aeruginosa*, especulando que otro factor a considerar sería la expresión de vías de señalización del tipo *Quorum sensing* que aumentarían la resistencia de las bacterias a los antibióticos. También se describe la existencia de este efecto inóculo en relación a la resistencia a beta lactámicos, ya que en cepas productoras de beta lactamasas de espectro extendido (BLEE) el mayor inóculo se asocia a elevación de la CMI para cefalosporinas de tercera generación (Thomson y Moland, 2001).

A este respecto, cabe destacar que el inóculo inicial en los ensayos de CMI por microdilución en caldo (como se describe tanto en la norma CLSI como en el protocolo descrito por Michels *et al.*) es de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml, mientras que el inóculo inicial en el ensayo de Bloomfield *et al.* (1993) es de 10^9 ufc/ml, lo que podría

explicar la disparidad de resultados entre los ensayos de superficie y la determinación de CMI y CMB. Esta aseveración queda demostrada al realizar las CMI/CMB con inóculo aumentado para la cepa A-496 (misma usada en los ensayos de desinfección en superficie), presentándose un aumento de 250 a 1000 µg/ml en la CMI (2 diluciones de diferencia) y de 250 a 2000 µg/ml en la CMB (4 diluciones). Sin embargo, este “efecto inóculo” descubierto no explicaría por qué a una dosis equivalente a 1 y 2 veces la CMB para 10⁹ ufc/ml (es decir, 2000 y 4000 µg/ml) la disminución de la población con un tiempo de contacto máximo de 30 minutos fue apenas cercana a 1 logaritmo, ni que no hubiera diferencias estadísticamente significativas al comparar el descenso de población a 2000 y 4000 µg/ml a cualquiera de los 2 tiempos de contacto ensayados.

Debido a la poca actividad como desinfectante en el experimento anterior con inóculo puro, se decidió no incorporar el factor “material orgánico” para analizar la actividad desinfectante del compuesto atranol. Dado que tal como lo demostraron Hammer *et al.* (1999) al investigar el efecto de aceites esenciales de la planta del té sobre bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas en presencia de 1% de materia orgánica se observa una disminución de la eficacia bactericida de estos productos.

4.5. Objetivo 5: Determinar la capacidad de los metabolitos para desagregar la biopelícula formada por cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a los antibióticos.

Recientemente, se ha reportado que existe una gran variabilidad entre las diversas cepas de *A. baumannii* en cuanto a su capacidad de formación de biopelícula (De Breij *et al.*, 2010; Gopal *et al.*, 2014; M'hamedi *et al.*, 2014), siendo estos datos de la literatura similares a los hallazgos experimentales de la tesis, los que arrojaron desde aislados con muy baja producción de biopelícula a aislados con abundante producción la misma. La situación anterior tendría varias posibles explicaciones, siendo una de ellas el nivel de hidrofobicidad de la superficie de las bacterias (M'hamedi *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados a la fecha en la bibliografía científica internacional no han

sido concluyentes. Por otro lado, existe bibliografía contradictoria en cuanto a la correlación entre capacidad de formación de biopelícula y el nivel de resistencia a antibióticos de los aislados de *A. baumannii* (Longo *et al.*, 2014). A este respecto, cabe destacar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de biopelícula al separar los aislados entre sensibles y resistentes a colistín, de lo que se podría inferir que, para los aislados estudiados, el mecanismo de resistencia a colistín no ejerce un efecto deletéreo en la formación de biopelícula, algo ya esbozado previamente en algunos trabajos (Duarte *et al.*, 2016), aunque va en sentido contrario a lo visto en otros trabajos (Dafopoulou *et al.* (2016).

El benzaldehído ensayado (atranol) presenta actividad inhibitoria dosis-dependiente de la formación de biopelícula a concentraciones subinhibitorias. Esto va en línea con lo reportado por Francolini *et al.* (2004), quienes muestran que otro compuesto de origen liquénico (ácido úsnico) disminuye la formación de biopelícula en *S. aureus* y en *P. aeruginosa*. Esto es reforzado por lo publicado por Pompilio *et al.* (2013), quienes reportan que las concentraciones sub-inhibitorias tanto de ácido úsnico como de atranorina inhiben la adhesión y formación de biopelícula de *S. aureus*, siendo este efecto dosis-dependiente. Sin embargo, nuestro experimento no fue capaz de demostrar que este efecto sea estadísticamente significativo para todos los aislados de forma individual, salvo para el aislado A-417. Por otro lado, destaca el hecho de que no todas las cepas se comportaron igual en presencia de atranol, ya que algunas de éstas presentaron una disminución de la formación de biopelícula en presencia del compuesto, mientras otras aumentaron la producción de biopelícula, un fenómeno que también ha sido descrito en otras publicaciones con otros antibiopelículidas (Nait Chabane *et al.*, 2014). Lo anterior podría deberse hipotéticamente a:

- a. El compuesto presenta, en algunas cepas, actividad potenciadora de la formación de biopelícula mediante un efecto agonista de alguna vía de señalización bacteriana, siendo el *Quorum sensing* una de las posibilidades, pudiendo ser en este caso el compuesto un mimético de acil-homoseril-lactonas (AHL) (Kalia, 2013).

Esta hipótesis se plantea factible considerando que se ha demostrado el rol que las AHL juegan en la formación de la biopelículas de *A. baumannii* (Anbazhagan *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2014).

- b. El compuesto actúa como fuente de carbono para algunas de las cepas. Esta alternativa es factible, ya que se ha visto que la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 es capaz de usar fuentes de carbono alternativas para su crecimiento (Mara *et al.*, 2012).

Interesantemente, al agrupar todos los aislados en un solo grupo, sí se logran obtener diferencias estadísticamente significativas para el efecto inhibitorio de atranol sobre la formación de biopelícula, fundamentalmente al comparar la máxima concentración ensayada (125 µg/ml) con el control positivo, lográndose una disminución aproximada de un 50% de la formación de biopelícula. Esto puede tener relación con lo descrito en algunas publicaciones en cuanto a la variabilidad de los datos obtenidos por el método de cristal violeta de medición de biopelículas, lo que implicaría que se requiere un número elevado de muestras para obtener valores con significancia estadística. Esta situación haría a este compuesto un candidato interesante para su uso en dispositivos médicos y de esta forma evitar la colonización de los mismos, siendo este efecto además comparable con lo obtenido con otras sustancias prometedoras como galio (Runci *et al.*, 2015) y virstatina (Nait Chabane *et al.*, 2014), aunque algo menor que lo obtenido por Szczepanski y Lipski (2014) con aceites esenciales, ya que estos últimos logran inhibiciones superiores al 90% a dosis máximas, siendo además este efecto dosis dependiente (similar a los resultados obtenidos con atranol). De todas formas, faltarían estudios en modelos vivos (por ejemplo, catéteres venosos en ratones) para corroborar esta proyección de los resultados.

Respecto a la actividad sobre biopelículas ya formadas, es importante realzar que la concentración mínima para erradicar biopelículas fue sólo entre 4 y 8 veces mayor a la CMI, lo que es comparable a colistín, que por su efecto detergente presenta buena

actividad antibiopelículas (Naparstek *et al.*, 2014), y muy superior a los carbapenémicos, que requieren dosis >1000 veces mayores a la CMI (Wang *et al.*, 2016), situación que fue corroborada también en nuestro laboratorio con el aislado A-417 en la etapa de calibración de los experimentos. Este aspecto hace que atranol sea un buen candidato para eliminar biopelículas de superficies y objetos de uso clínico. Sin embargo, hay 2 elementos que juegan en contra de esta posibilidad:

- a. En el caso de las superficies clínicas, no logró disminuir en al menos 1000 veces la carga bacteriana de la superficie de discos de acero con inóculo de 10^8 ufc/ml, ni a los 5 ni 30 min de tiempo de contacto, lo que habla de un mecanismo de acción lento (ya discutido más arriba).
- b. En el caso de su potencial uso como recubrimiento de dispositivos médicos (dado además su capacidad de inhibir la formación de biofilm a concentraciones subinhibitorias), atranol está previamente descrito como alérgeno al ser usado como preservante de cosméticos (Rastogi *et al.*, 2004). Sin embargo, otros materiales ampliamente usados en clínica (como el látex) también son alérgenos ampliamente reconocidos, por lo se requieren mayores investigaciones para determinar si esta situación sería un real impedimento para una aplicación clínica real.

5. CONCLUSIONES

Nuestros resultados permiten comprobar la hipótesis planteada, debido a que:

1. De los líquenes estudiados, *Himantormia lugubris* y *Ramalina terebrata* presentan actividad antibacteriana contra *Acinetobacter baumannii*:
2. La mayor actividad antibacteriana de *Himantormia lugubris* está concentrada en la fracción metanólica. Además, esta actividad es de tipo bactericida.
3. La fracción metanólica antes mencionada presenta un compuesto puro de la familia de los benzofuranos, que tiene actividad antibiótica de tipo bactericida, con CMI en el rango de 125 a 250 $\mu\text{g/ml}$ y CMB en el rango de 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$ para los 8 aislados multirresistentes de *A. baumannii*.
4. Adicionalmente atranol presenta, a concentraciones subinhibitorias, actividad antagonista de la producción de biopelícula de algunas cepas XDR de *A. baumannii*, obteniéndose reducciones en la formación de biopelícula mayores a 33%, y que son comparables a otros compuestos descritos en la literatura científica.
5. Este compuesto presenta además actividad desagregante de biopelícula a concentraciones entre 4 y 8 veces la CMI, lo que es igual o mejor que muchos antibióticos disponibles en el mercado.
6. El compuesto, a las concentraciones ensayadas, presenta pobre actividad como desinfectante de superficie, produciendo una reducción de la población bacteriana menor a 4 logaritmos. Sin embargo, esta actividad es estadísticamente significativa y directamente afectada por el tiempo de contacto y la dosis ensayada.

6. PROYECCIONES

1. Realizar ensayos de eficacia antibacteriana en modelo de *Galleria mellonella*, lo que además permitiría determinar la eventual toxicidad del compuesto.
2. Realizar ensayos en modelos animales mamíferos, empleando atranol como recubrimiento de dispositivos médicos y determinar su eficacia como prevención de infecciones asociadas a los mismos.
3. Indagar en el mecanismo de acción del compuesto sobre *Acinetobacter baumannii*.
4. En vista de que el compuesto es obtenido de un líquen, indagar en cómo se podría obtener por síntesis química. Por otro lado, ver si es posible modificar el compuesto para mejorar su potencia.



REFERENCIAS

Ahmad A., Viljoen A. 2015. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine*. **22**(6):657-665

Allegranzi B., Pittet D. 2009. Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. *J Hosp Infect*. **73**(4):305-315

Altun O., Almuhayawi M., Ullberg M., Özenci V. 2013. Clinical Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel in Identification of Bacteria and Yeasts from Positive Blood Culture Bottles. *J. Clin. Microbiol*. **51**(12):4130-4136

Anbazhagan D., Mansor M., Yan G. O., Md Yusof M. Y., Hassan H., Sekaran S. D. 2012. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One*. **7**(7): e36696. doi: 10.1371/journal.pone.0036696.

Apisarnthanarak A., Pinitchai U., Thongphubeth K., Yuekyen C., Warren D. K., Fraser V. J. 2008. A Multifaceted Intervention to Reduce Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Colonization and Infection in 3 Intensive Care Units in a Thai Tertiary Care Center: A 3-Year Study. *Clin Infect Dis*. **47**(6):760-767

Barbolla R. E., Centrón D., Maimone S., Rospide F., Salgueira C., Altclas J. et al. 2008. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* spread in an adult intensive care unit under an endemic setting. *Am J Infect Control* **36**(6):444-452.

Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*. **45**(4):493-496.

Bauer K. A., West J. E., Balada-Llasat J.-M., Pancholi P., Stevenson K. B., Goff D. A. 2010. An Antimicrobial Stewardship Program's Impact with Rapid Polymerase Chain Reaction Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*/*S. aureus* Blood Culture Test in Patients with *S. aureus* Bacteremia. Clin Infect Dis. **51**(9):1074-1080

Bello H., Domínguez M., Sepúlveda M., Cerda F., González G., Mella S., Zemelman R. 2000. Actividad de imipenem y meropenem sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales chilenos (1990-1998). Rev Esp Quimioter. **13**(4):405-407

Bhargava N., Sharma P., Capalash N. 2010. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. Crit Rev Microbiol., **36**(4):349–360

Bhattarai H. D., Kim T., Oh H., Yim J. H. 2013. A new pseudodepsidone from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum* and its antioxidant, antibacterial activity. J Antibiot (Tokyo). **66**(9):559-561.

Bloomfield S.F., Arthur M., Looney E., Begun K., Patel H. 1991. Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. Letters in Applied Microbiology **13**:233-237

Bloomfield S. F., Arthur M., Begun K., Patel H. 1993. Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods. Letters in Applied Microbiology **17**:119-125

Bloomfield S. F., Arthur M., Van Klingeren B., Pullen W., Holah J.T., Elton R. 1994. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. J Appl Bacteriol. **76**(1):86-94

Blot S., Vandewoude K., Colardyn F. 2003. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive Care Med.* **29**(3):471–475

Boucher H. W., Talbot G. H., Benjamin Jr D. K., Bradley J., Guidos R. J., Jones R. N. et al. for the Infectious Diseases Society of America. 2013. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* **56**(12):1685-1694.

Bulitta J. B., Ly N. S., Yang J. C., Forrest A., Jusko W. J., Tsuji B. T. 2009. Development and qualification of a pharmacodynamic model for the pronounced inoculum effect of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(1):46-56.

Bulitta J. B., Yang J. C., Yohann L., Ly N. S., Brown S. V., D'Hondt R. E., Jusko W. J., Forrest A., Tsuji B. T. 2010. Attenuation of Colistin Bactericidal Activity by High Inoculum of *Pseudomonas aeruginosa* Characterized by a New Mechanism-Based Population Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(5):2051-62

Byrne-Bailey K. G., Gaze W. H., Kay P., Boxall A. B. A., Hawkey P. M., Wellington E. M. H. 2009. Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(2):696-702

Cabrera, C. 2015. Aislación y evaluación biológica de metabolitos secundarios desde liquen antártico *Himantormia lugubris* (Hue.) Lamb. Tesis para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. Facultad de Farmacia. Escuela de Química y Farmacia. Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales.

Caccamese S., Compagnini A., Toscano R. M., Cascio O. 1986. Methyl β -Orcinolcarboxylate and Atranol from the Lichen *Stereocaulon vesuvianum*. J. Nat. Prod. **49**(6):1159–1160

Ceri H., Olson M. E., Stremick C., Read R. R., Morck D., Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. J. Clin. Microbiol. **37**(6):1771.

Chahine E. B., Nornoo A. O. 2011. Ceftobiprole: The First Broad-Spectrum Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Beta-Lactam. J Exp Clin Med **3**(1):9-16.

Chang D., Garcia R. A., Akers K. S., Mende K., Murray C. K., Wenke J. C., Sanchez C. J, Jr. 2016. Activity of Gallium Meso- and Protoporphyrin IX against Biofilms of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. Pharmaceuticals (Basel). **9**(1):16.

Chen Y., Pi B., Zhou H., Yu Y., Li L. 2009. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol. **58**(8):1086-1091.

Cheng B., Cao S., Vasquez V., Annamalai T., Tamayo-Castillo G., Clardy J., Tse-Dinh Y. C. 2013. Identification of Anziaic Acid, a Lichen Depside from *Hypotrachyna* sp., as a New Topoisomerase Poison Inhibitor. PLoS One. **8**(4):e60770. doi: 10.1371/journal.pone.0060770.

Chuang Y. C., Sheng W. H., Li S. Y., Lin Y. C., Wang J. T., Chen Y. C., Chang S. C. 2011. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. Clin Infect Dis. **52**(3):352-360

Chuang Y. C., Cheng C. Y., Sheng W. H., Sun H. Y., Wang J. T., Chen Y. C., Chang S. C. 2014. Effectiveness of tigecycline-based versus colistin- based therapy for

treatment of pneumonia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a critical setting: a matched cohort analysis. *BMC Infect Dis.* **14**:102. doi: 10.1186/1471-2334-14-102.

Cifuentes-D M., Silva F., García P., Bello H., Briceno I., Calvo-A M., Labarca, J. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Rev. Chil. Infectol.* **31**(2): 123-130

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline.* CLSI document M26-A. September 1999 Arthur L. Barry, Ph.D. William A. Craig, M.D. Harriette Nadler, Ph.D. L. Barth Reller, M.D. Christine C. Sanders, Ph.D. Jana M. Swenson, M.M.Sc.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition.* CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.* CLSI document M07-A9. January 2012.

Comisión Europea. 2014. Public consultation on fragrance allergens in the framework of Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/dgs_consultations/ca/consultation_cosmetic-products_fragrance-allergens_201402_en.htm Consultado: 16/08/2016.

Coyne S., Courvalin P., Périchon B. 2011. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(3):947-953.

Dafopoulou K., Xavier B. B., Hotterbeekx A., Janssens L., Lammens C., Dé E., Goossens H., Tsakris A., Malhotra-Kumar S., Pournaras S. 2016. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains with deficient biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* **60**(3):1892–1895.

Danese P. N., Pratt L. A., Kolter R. 2000. Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. *J Bacteriol.* **182**(12):3593-3596

De Breij A., Dijkshoorn L., Legendijk E., van der Meer J., Koster A., Bloemberg G., Wolterbeek R., van den Broek P., Nibbering P. 2010. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One.* **5**(5):e10732. doi: 10.1371/journal.pone.0010732.

De Gregorio E., Del Franco M., Martinucci M., Roscetto E., Zarrilli R., Di Nocera P. P. 2015. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics.* **16**(1):933 doi: 10.1186/s12864-015-2136-6.

Dijkshoorn L., Nemec A., Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* **5**(12):939-951.

Diomedi A. 2005. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev. Chil. Infectol.* **22**(4):298-320

Djeribi R., Bouchloukh W., Jouenne T., Mena B. 2012. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am J Infect Control.* **40**(9):854-859

Duarte A., Ferreira S., Almeida S., Domingues F. C. 2016. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **45**:29-33.

Ehrenkranz N. J., MacIntyre A. T., Hebert P. R., Schneider W. R., Hennekens C. H. 2011. Control of Health Care-associated Infections (HAI): Winning Both the Battles and the War. *J Gen Intern Med.* **26**(3):340-342.

Espinal P., Martí S., Vila J. 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect.* **80**(1):56-60.

Espinal P., Seifert H., Dijkshoorn L., Vila J., Roca I. 2012. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* **18**(11):1097–1103

Eveillard M., Kempf M., Belmonte O., Pailhoriès H., Joly-Guillou M.-L. 2013. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *International Journal of Infectious Diseases* **17**(10):802–805

Falagas M. E., Bliziotis I. A., Siempos I. I. 2006. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care.* **10**(2):R48

Falagas M. E., Rafailidis P. I. 2007. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care.* **11**(3):134

Food and Drug Administration (FDA). Tygacil® Label and Approval History. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory#apphist. Última actualización: 29/06/2016.

Fournier P. E., Vallenet D., Barbe V., Audic S., Ogata H., et al. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet **2**(1):e7.

Garnacho-Montero J., Dimopoulos G., Poulakou G., Akova M., Cisneros J. M., De Waele J., Petrosillo N., Seifert H., Timsit J. F., Vila J., Zahar J. R., Bassetti M. 2015. Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. Intensive Care Med. **41**(12):2057-2075

Gentile V., Frangipani E., Bonchi C., Minandri F., Runci F., Visca P. 2014. Iron and *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation. Pathogens. **3**(3):704–719

Guerra F. Q. S., Mendes J. M., de Oliveira W. A., de Souza F. S., Trajano V. N., Coutinho H. D. M. et al. 2013. Antibacterial activity of the essential oil of *Citrus limon* against multidrug resistant *Acinetobacter* strains. Rev. Bras. Farm. **94**(2):142-147.

Gopal R., Kim Y. G., Lee J. H., Lee S. K., Chae J. D., Son B. K., Seo C. H., Park Y. 2014. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother. **58**(3):1622-1629

Göttig S., Gruber T. M., Higgins P. G., Wachsmuth M., Seifert H., Kempf V. A. J. 2014. Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. J Antimicrob Chemother. **69**(9):2578-2579

Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. 1999. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. J Appl Microbiol. **86**(3):446-452

Hasman H., Hammerum A., Hansen F., Hendriksen R., Olesen B., Agersø Y., Zankari E., Leekitcharoenphon P., Stegger M., Kaas R., Cavaco L., Hansen D., Aarestrup F., Skov R. 2015. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. Euro Surveill. **20**(49). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085.

Hedrick T. L., Sawyer R. G. 2005. Health-Care–Associated Infections and Prevention. Surg Clin North Am. **85**(6):1137-1152, ix.

Higgins P., Wislinghoff H., Krut O., Seifert H. 2007. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13 TU. Clinical Microbiol Infect **13**(12):1999-1201

Houang E. T., Chu Y. W., Leung C. M., Chu K. Y., Berlau J., Ng K. C., Cheng A. F. 2001. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. J Clin Microbiol. **39**(1):228-34.

Hu H., Johani K., Gosbell I. B., Jacombs A. S., Almatroudi A., Whiteley G. S., Deva A. K., Jensen S., Vickery K. 2015. Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. J Hosp Infect. **91**(1):35-44

Humphries R. M., Yang S., Hemarajata P., Ward K. W., Hindler J. A., Miller S. A., Gregson A. 2015. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. Antimicrob. Agents Chemother. **59**(10):6605-6607

Huneck S. 1999. The Significance of Lichens and Their Metabolites. Naturwissenschaften **86**(12):559–570.

Infectious Diseases Society of America. 2010. The 10 x '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. Clin Infect Dis. **50**(8):1081-1083

Ingólfssdóttir K. 2002. Usnic acid. Phytochemistry **61**(7):729–736

Innovotech. Instructions: The MBEC™ High-throughput (HTP) Assay For antimicrobial susceptibility testing of biofilms:

http://www.innovotech.ca/MBEC_HTPInstructions_Rev1.pdf

Consultado: 02/07/2014.

Kalia V. C. 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. Biotechnol Adv. **31**(2):224-245

Kampf G., Löffler L., Gastmeier P. 2009. Hand hygiene for the prevention of nosocomial infections. Dtsch Arztebl Int. **106**(40):649-655.

Karakus B., Odabasoglu F., Cakir A., Halici Z., Bayir Y., Halici M., Aslan A., Suleyman H. 2009. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. Phytother. Res. **23**(5):635–639.

Kerr K. G., Snelling A. M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. **73**(4):338-344

Kirkland K. B., Homa K. A., Lasky R. A., Ptak, J. A., Taylor E. A., Splaine M. E. 2012. Impact of a hospital-wide hand hygiene initiative on healthcare-associated infections: results of an interrupted time series. BMJ Qual Saf **21**(12):1019-1026.

Klevens R. M., Edwards J. R., Richards C. L. Jr, Horan T. C., Gaynes R. P., Pollock D. A. et al. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. Public Health Rep. **122**(2):160-166.

Koljalg S., Naaber P., Mikelsaar M. 2002. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. J Hosp Infect. **51**(2):106-113

Labarca J., Araos R. 2009. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. Rev Chil Infect **26**(Supl 1):8-9

Lee H.-W., Koh Y. M., Kim J., Lee J.-C., Lee Y.-C., Seol S.-Y., Cho D.-T., Kim J. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect **14**(1):49–54.

Lee M.-H., Chen T.-L., Lee Y.-T., Huang L, Kuo S.-C., Yu K.-W., Hsueh P.-R., Dou H.-Y., Su I.-J., Fung C.-P. 2013. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *Bla_{OxA-23}* from hospitals in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. **46**(6):419-424

Longo F., Vuotto C., Donelli G. 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiol. **37**(2):119-127

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.

<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>. Consultado: 13/08/2016.

Liu Y. Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L. X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L. F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H., Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. **16**(2):161-168.

Lumbsch H. T. 2002. Analysis of Phenolic Products in Lichens for Identification and Taxonomy. In: Kranner I., Beckett R., Varna A. (eds.). Protocols in Lichenology. Cap 17, 281-295.

Maciazg-Dorszynska M., Wezgrzyn G., Guzow-Krzeminska B. 2014. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. FEMS Microbiol Lett. **353**(1):57-62

Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G. et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. **18**(3):268-281

Manian F. A., Griesenauer S., Senkel D., Setzer J. M., Doll S. A., Perry A. M. et al. 2011. Isolation of *Acinetobacter baumannii* Complex and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Hospital Rooms Following Terminal Cleaning and Disinfection: Can We Do Better? Infect Control Hosp Epidemiol. **32**(7):667-672

Mara K., Decorosi F., Viti C., Giovannetti L., Papaleo M. C., Maida I., Perrin E., Fondi M., Vanechoutte M., Nemec A., van den Barselaar M., Dijkshoorn L., Fani R. 2012. Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. Res Microbiol. **163**(3):161-172

McConnell M. J., Actis L., Pachón J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev **37**(2):130–155

McGann P., Snesrud E., Maybank R., Corey B., Ong A. C., Clifford R., Hinkle M., Whitman T., Lesho E., Schaecher K. E. 2016. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and

*bla*_{CTX-M} on a Novel IncF Plasmid: First report of *mcr-1* in the USA. Antimicrob Agents Chemother. **60**(7):4420-4421

M'hamedi I., Hassaine H., Bellifa S., Lachachi M., Terki I. K., Djeribi R. 2014. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the University Hospital of Tlemcen (Algeria). Afr. J. Microbiol. Res. **8**(3): 270-276

Michels K., Heinke R., Schöne P., Kuipers O. P., Arnold N., Wessjohann L. A. 2015. A fluorescence-based bioassay for antibacterials and its application in screening natural product extracts. J Antibiot (Tokyo). **68**(12):734-740

Molnár K., Farkas E. 2010. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. Z. Naturforsch. C. **65**(3-4):157 – 173

Møretrø T., Vestby L. K., Nesse L. L., Storheim S. E., Kotlarz K., Langsrud S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. J Appl Microbiol. **106**(3):1005-1012

Nait Chabane Y., Mlouka M. B., Alexandre S., Nicol M., Marti S., Pestel-Caron M., Vila J., Jouenne T., Dé E. 2014. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. **14**:62. doi: 10.1186/1471-2180-14-62.

Naparstek L., Carmeli Y., Navon-Venezia S., Banin E. 2014. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. **69**(4):1027-1034

Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., van der Reijden T. J., Deschaght P., Passet V., Vanechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex

with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. **162**(4):393-404

Nicolau D. P. 2011. Current challenges in the management of the infected patient. Curr Opin Infect Dis **24**(suppl 1):S1–S10

Nishanth K. S., Sreerag R. S., Deepa I., Mohandas C., Nambisan B. 2015. Protocetraric acid: an excellent broad spectrum compound from the lichen *Usnea albopunctata* against medically important microbes. Nat Prod Res. **29**(6):574-577

Nomura H., Isshiki Y., Sakuda K., Sakuma K., Kondo S. 2012. The antibacterial activity of compounds isolated from oakmoss against *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. Biol Pharm Bull. **35**(9):1560-1567.

Nordmann P., Poirel L., Dortet L. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. **18**(9):1503–1507.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Consultado el <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

Opazo A., Mella S., Domínguez M., Bello H., González G. 2009. Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. Rev Chil Infect **26**(6):499-503.

Opazo, A. 2014. Prevalencia y contribución de las secuencias de inserción en la resistencia a carbapenémicos y colistín en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales chilenos (página 28). Tesis Magister en Ciencias con Mención en Microbiología. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos.

O'Toole G. A., Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* **28**(3):449–461.

Paudel B., Bhattarai H. D., Lee J. S., Hong S. G., Shin H. W., Yim J. H. 2008. Antibacterial Potential of Antarctic Lichens against Human Pathogenic Gram-positive Bacteria. *Phytother. Res.* **22**(9):1269–1271

Paudel B., Bhattarai H. D., Lee H. K., Oh H., Shin H. W., Yim J. H. 2010. Antibacterial activities of ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Z Naturforsch C.* **65**(1-2):34-38.

Peleg A. Y., Seifert H., Paterson D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* **21**(3):538-582.

Peterson L. R. 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited. *Clin Infect Dis.* **49**(6):992-993. Correspondence.

Pompilio A., Pomponio S., Di Vincenzo V., Crocetta V., Nicoletti M., Piovano M., Garbarino J. A., Di Bonaventura G. 2013. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol.* **8**(2):281-92.

Poon H., Chang M. H., Fung H. B. 2012. Ceftaroline Fosamil: A Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Clin Ther.* **34**(4):743-765

Porcile V. 2014. Efecto del extracto de líquenes en la formación de biopelículas del patógeno intrahospitalario *Acinetobacter baumannii*. Memoria Ingeniero en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales.

Rajamohan G., Srinivasan V. B., Gebreyes W. A. 2010. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. J Antimicrob Chemother. **65**(2):228-232

Ranković B., Mišić M. 2008. The Antimicrobial Activity of the Lichen Substances of the Lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresa*. Biotechnology & Biotechnological Equipment **22**(4):1013-1016

Rao R. S., Karthika R. U., Singh S. P., Shashikala P., Kanungo R., Jayachandran S., Prashanth K. 2008. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Microbiol. **26**(4):333-7.

Rastogi S. C., Bossi R., Johansen J.D., Menné T., Bernard G., Giménez-Arnau E., Lepoittevin J. P. 2004. Content of oak moss allergens atranol and chloroatranol in perfumes and similar products. Contact Dermatitis. **50**(6):367-70.

Ray A., Perez F., Beltramini A. M., Jakubowycz M., Dimick P., Jacobs M. R. et al. 2010. Use of Vaporized Hydrogen Peroxide Decontamination during an Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection at a Long-Term Acute Care Hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. **31**(12):1236-1241.

Reyes G. 2013. Caracterización de cepas del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* aisladas de pacientes críticos y de su entorno en la UPCA del Hospital Clínico Herminda Martín de Chillán. Tesis Magister en Ciencias con Mención en Microbiología. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos.

Rivera G., Bulnes J., Castillo C., Ajenjo M. C., Garcia P., Labarca J. 2016. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in a university hospital: Role of inter-hospital transmission. J Infect Dev Ctries. **10**(1):96-99

Ruiz M., Bello H., Sepúlveda M., Domínguez M., Martínez M. A., Pinto M. E., González G., Mella S., Zemelman R. 1998. Adherencia de *Acinetobacter baumannii* al tejido de tráquea de la rata. Rev Med Chil. **126**(10):1183-1188

Runci F., Bonchi C., Frangipani E., Visca P. 2015. Effect of gallium on *Acinetobacter baumannii* biofilm. Trabajo presentado en el 10th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, 3-5 junio de 2015, Atenas, Grecia.

Sader H. S., Castanheira M., Flamm R. K., Farrell D. J., Jones R. N. 2014. Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam Tested against Contemporary (2012) Gram-negative Organisms Collected from United States (USA) Medical Centers. Antimicrob Agents Chemother. **58**(3):1684-1692

Sampson T. R., Liu X., Schroeder M. R., Kraft C. S., Burd E. M., Weiss D. S. 2012. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. Antimicrob Agents Chemother. **56**(11):5642-5649

Schleicher X., Higgins P. G., Wisplinghoff H., Körber-Irrgang B., Kresken M., Seifert H. 2013. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). Clin Microbiol Infect **19**(8):737–742

Scott P., Deye G., Srinivasan A., Murray C., Moran K., Hulten E. et al. 2007. An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. Clin Infect Dis. **44**(12):1577-1584

Semmelweis I. P. 1861. The Etiology, the Concept and the Prophylaxis of Childbed Fever. Pest, Hungary (Translation by: Carter K. C. 1983. The University of Wisconsin Press. Madison, WI, United States).

Sechi L. A., Karadenizli A., Deriu A., Zanetti S., Kolayli F., Balikci E., Vahaboglu H. 2004. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med Sci Monit*, **10**(6): 180-184

Sepulveda M., Ruiz M., Bello H., Dominguez M., Martínez M. A., Pinto M. E., Gonzalez G., Mella S., Zemelman R. 1998. Adherence of *Acinetobacter baumannii* to rat bladder tissue. *Microbios*. **95**(380):45-53

Siegel J. D., Rhinehart E., Jackson M., Chiarello L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>

Shrestha G., St. Clair L. L. 2013. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rev* **12**(1):229–244

Shrestha G., Raphael J., Leavitt S. D., St Clair L. L. 2014. In vitro evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens. *Pharm Biol*. **52**(10):1262-1266

Singh M., Sharma R., Gupta P. K., Rana J. K., Sharma M., Taneja N. 2012. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: India. *Indian J Crit Care Med*. **16**(3):123-129

Singh H., Thangaraj P., Chakrabarti A. 2013. *Acinetobacter baumannii*: A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management. J Clin Diagn Res. **7**(11):2602-2605

Sökmen B. B., Kinalioglu K., Aydin S. 2012. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* and *Evernia prunastri* Lichens collected -from Black Sea Region. GU J Sci, **25**(3):557-565

Srivastava P., Upreti D. K., Dhole T. N., Srivastava A. K., Nayak M. T. 2013. Antimicrobial Property of Extracts of Indian Lichen against Human Pathogenic Bacteria. Interdiscip Perspect Infect Dis. **2013**:709348. doi: 10.1155/2013/709348

Szczepanski S., Lipski A. 2014. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. Food Control **36**(1):224-229

Takei S., Hotomi M., Yamanaka N. 2013. Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media. J Infect Chemother. **19**(3):504-509

Tan M., Zhou L., Huang Y., Wang Y., Hao X., Wang J. 2008. Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. Nat Prod Res. **22**(7):569-575

Thomson K. S., Moland E. S. 2001. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. **45**(12):3548-3554.

Udekwu K. I., Parrish N., Ankomah P., Baquero F., Levin B. R. 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. J Antimicrob Chemother. **63**(4):745-57.

Vartia, K. O. 1973. Lichen antibiotics. *The lichens*. Academic Press, New York, 547-561.

Vidal R., Dominguez M., Urrutia H., Bello H., Garcia A., Gonzalez G., Zemelman R. 1997. Effect of imipenem and sulbactam on sessile cells of *Acinetobacter baumannii* growing in biofilm. *Microbios*. **91**(367):79-87

Wang C., Wang J., Pan H., Hu W., Li Y. 2015. Multidrug resistance and biofilm formation contribute to the nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. In: Méndez-Vilas A. (Ed.). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Vol 1, 452-461.

Wang Y. C., Kuo S. C., Yang Y. S., Lee Y. T., Chiu C. H., Chuang M. F., Lin J. C., Chang F. Y., Chen T. L. 2016. Individual or combined effects of meropenem, imipenem, sulbactam, colistin, and tigecycline on biofilm-embedded *Acinetobacter baumannii* and biofilm architecture. *Antimicrob Agents Chemother*. **60**(8):4670-4676

Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P., Trüper H. G. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol* **37**(4):463-464.

Wilharm G., Skiebe E., Poppel M. T., Leser S., Heider C., Heindorf M., Böhland K., Cuny C., Kasprzak M., Bochenski M, Tobółka M, Żońnierowicz K. M., Seifert H., Higgins P. G., Pfeifer Y., Jerzak L. 2015. Avian reservoirs of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii*. Trabajo presentado en el 10th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, 3-5 junio de 2015, Atenas, Grecia.

Yokoe D. S., Mermel L. A., Anderson D. J., Arias K. M., Burstin H., Calfee D. P. et al. 2008. A Compendium of Strategies to Prevent Healthcare-Associated Infections in Acute Care Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**: S12-S21.

Yoon, E.-J., Nait Chabane, Y., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., Grillot-Courvalin, C. 2015. Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, **6**(2), e00309–e00315. doi: 10.1128/mBio.00309-15

Zimlichman E., Henderson D., Tamir O., Franz C., Song P., Yamin C. K. et al. 2013. Health Care–Associated Infections: A Meta-analysis of Costs and Financial Impact on the US Health Care System. *JAMA Intern Med.* **173**(22):2039-2046.



ANEXOS

ANEXO 1: Halos de inhibición promedio (mm) generados por discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 3 y 6 mg de extracto total de *Himantormia lugubris* sobre cepas de *A. baumannii*

Aislado <i>A. baumannii</i>	HL 3 mg	S.D.	HL 6 mg	S.D.	THF*	Meropenem**
A368	11,33	1,53	18,33	0,58	6,00	13,00
A370	8,00	1,73	15,00	0,00	6,00	12,00
A378	13,00	2,00	17,67	1,53	6,00	14,00
A380	10,00	0,00	12,33	0,58	6,00	13,00
A387	10,33	0,58	17,00	1,00	6,00	14,00
A396	11,00	0,00	17,33	0,58	6,00	14,00
A397	10,67	0,58	14,33	1,15	6,00	13,00
A417	11,00	1,73	17,50	0,71	6,00	14,00
A419	11,33	0,58	18,00	0,00	6,00	13,00
A430	12,00	0,00	18,00	1,00	6,00	14,00
A439	9,67	0,58	13,00	1,00	6,00	10,00
A440	10,00	0,00	15,00	0,00	6,00	13,00
A442	11,33	0,58	15,33	2,08	6,00	10,00
A444	10,00	0,00	14,00	1,00	6,00	ND
A446	9,00	0,00	13,67	0,58	6,00	ND
A450	10,67	1,15	17,67	0,58	6,00	12,00
A490	10,00	0,00	13,67	0,58	6,00	13,00
A496	11,00	1,00	17,00	1,00	12,00	8,00
A500	10,33	1,15	15,67	0,58	6,00	8,00
A503	10,00	1,00	17,33	1,15	6,00	13,00
A507	9,33	0,58	13,67	0,58	6,00	6,00
A511	11,67	0,58	17,33	0,58	6,00	29,00
A512	12,00	0,00	18,33	0,58	6,00	12,00
A523	12,33	0,58	18,00	1,00	6,00	13,00
A527	10,33	1,15	18,67	0,58	6,00	11,00
A530	10,33	0,58	13,67	1,15	¿12?	14,00

ND: No determinado. *THF: Tetrahidrofurano (Control negativo), 120 µl/disco. **Control positivo (10 µg/disco). Fuente: elaboración propia.

ANEXO 2: Comparación de actividad de HL sobre cepas de *A. baumannii*.

Como se aprecia en (A), el promedio de los halos de inhibición de discos cargados con 3 y 6 mg de HL arroja diferencias estadísticamente significativas entre sí y contra un control negativo con THF (solvente) (ANOVA de un factor, $p < 0,001$), mostrando por tanto un efecto dependiente de dosis. Por otro lado, cuando se hace el desglose por susceptibilidad a colistín, no existen diferencias significativas en la actividad sobre cepas sensibles y resistentes a colistín, efecto que se aprecia tanto a con una masa de 3 mg de HL por disco (t de Student, $p = 0,478$) (B) como con una masa de 6 mg del mismo extracto (t de Student, $p = 0,789$) (C).

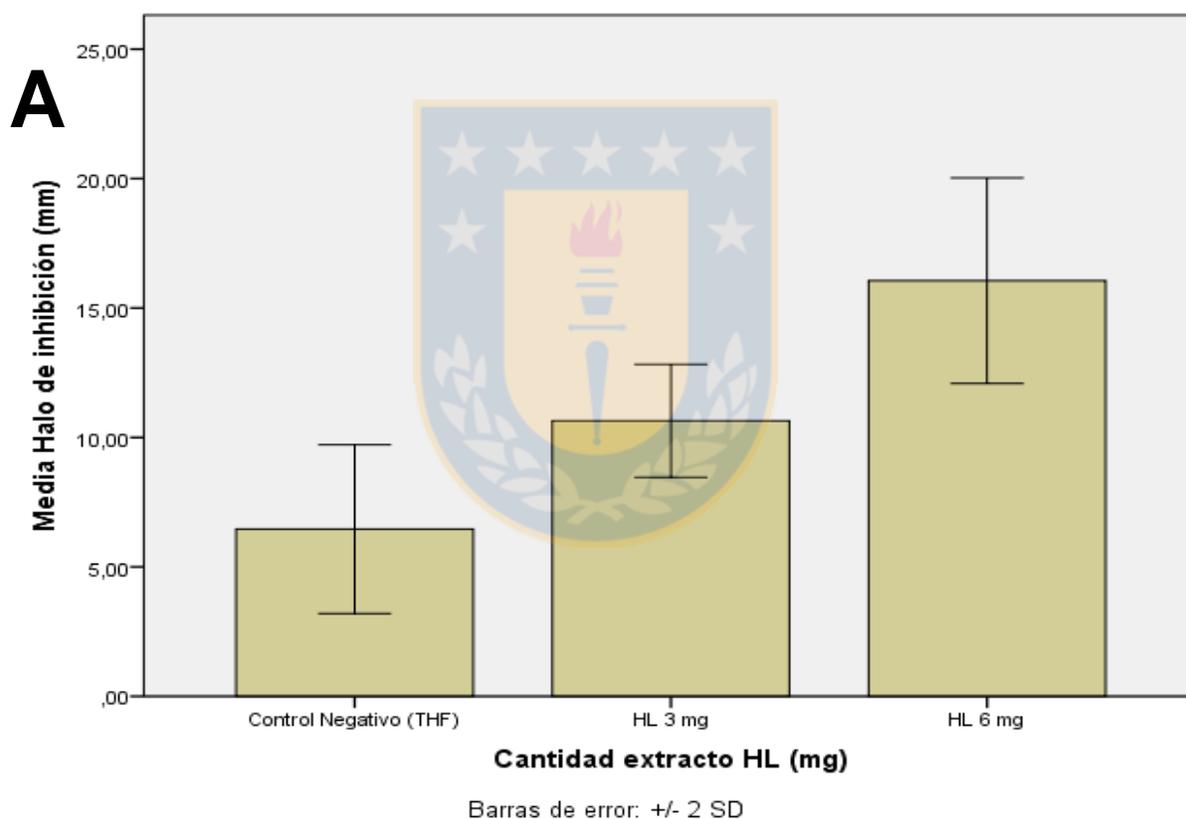


Figura A: Actividad antibacteriana promedio del extracto total del líquen *Himantormia lugubris* (HL), determinada por el método de difusión en agar, sobre diversos aislados extensamente resistentes (XDR) de *Acinetobacter baumannii*, usando 3 y 6 mg de extracto HL por disco. Se empleó como control negativo discos con 120 μ l de tetrahydrofurano (THF, solvente). Fuente: elaboración propia.

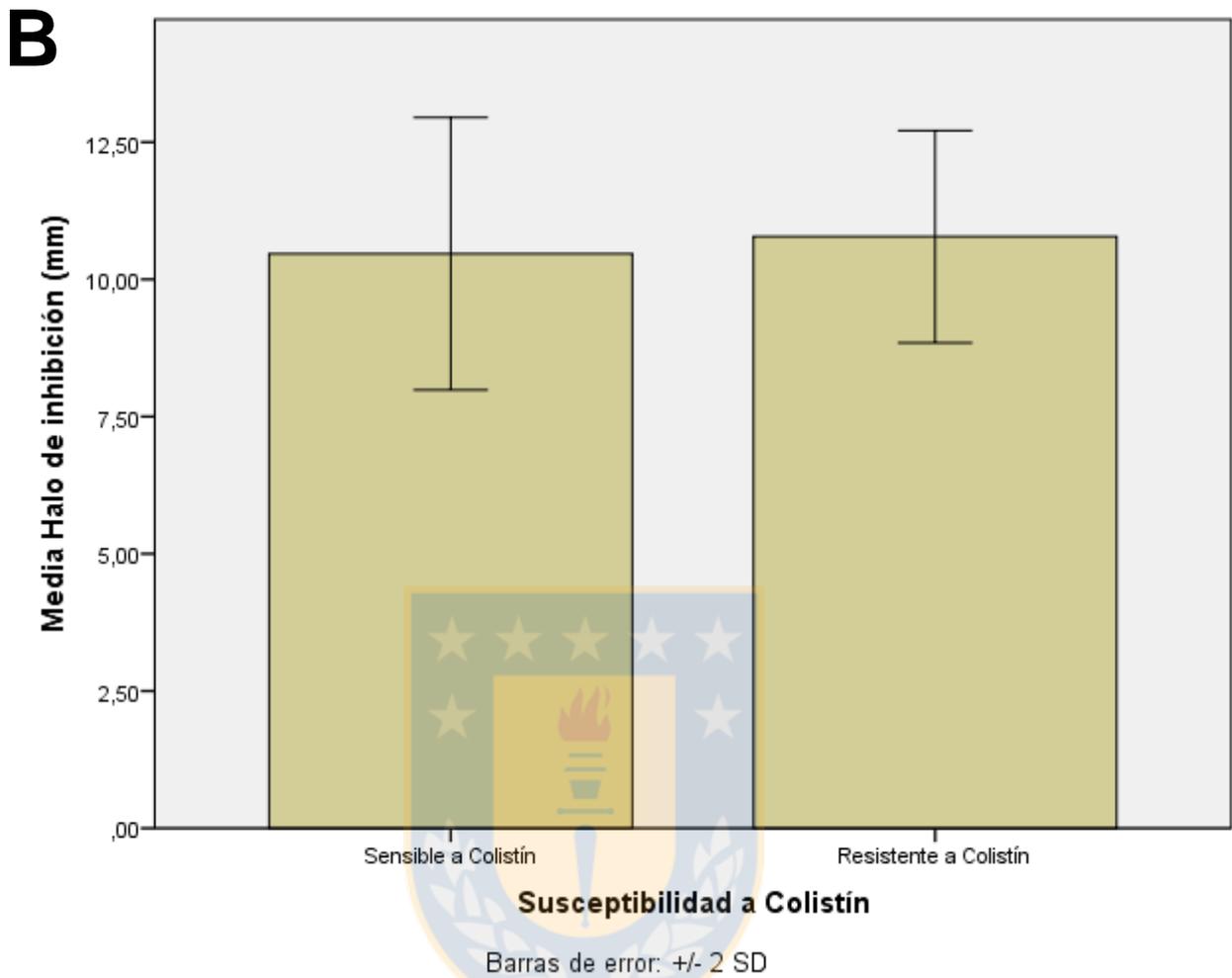


Figura B: Actividad antibacteriana promedio del extracto total del líquen *Himantormia lugubris* (HL), determinada por el método de difusión en agar, sobre diversos aislados extensamente resistentes (XDR) de *Acinetobacter baumannii*, usando 3 mg de extracto HL por disco y desglosando los aislados según perfil de susceptibilidad a colistín. Fuente: elaboración propia.

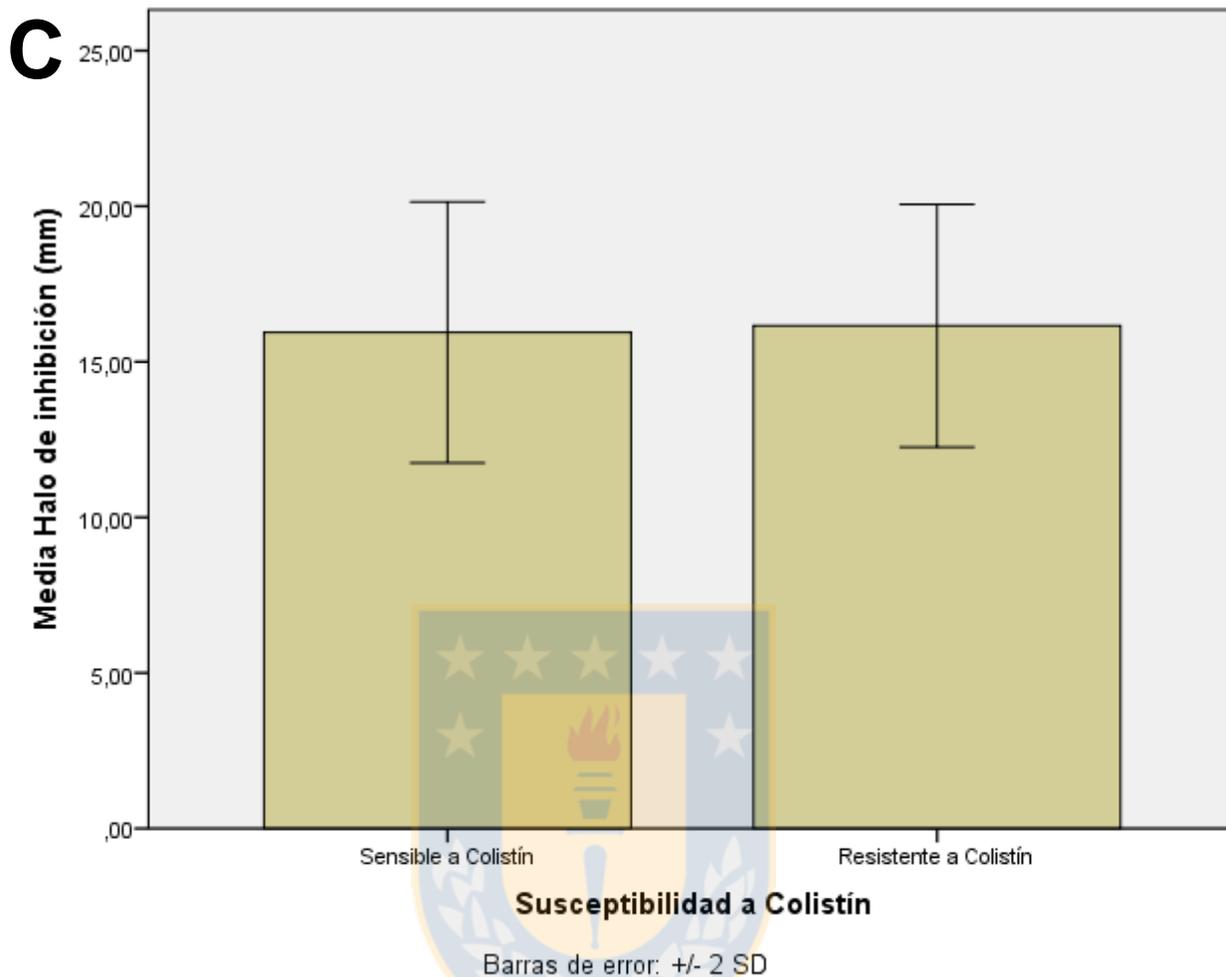


Figura C: Actividad antibacteriana promedio del extracto total del líquen *Himantormia lugubris* (HL), determinada por el método de difusión en agar, sobre diversos aislados extensamente resistentes (XDR) de *Acinetobacter baumannii*, usando 6 mg de extracto HL por disco y desglosando los aislados según perfil de susceptibilidad a colistín. Fuente: elaboración propia.