

Tratamiento de la Neumonía Asociada a la Ventilación Mecánica: cofactor de mortalidad en pacientes COVID-19 positivos

Proyecto del Programa de Articulación y Fortalecimiento Federal de las
Capacidades en Ciencia y Tecnología COVID-19

Patricia Schilardi^{1,2}; Diego Pissinis¹

¹ Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata – CONICET; ² pls@inifta.unlp.edu.ar

***Dedicado a la memoria de nuestro
querido colega y amigo Diego Pissinis***

Resumen. *La infección por Sars-CoV-2 produce diversos cuadros clínicos, que incluyen la infección asintomática, enfermedad leve del tracto respiratorio superior y neumonía viral grave con insuficiencia respiratoria e incluso la muerte. La necesidad de internación de los pacientes más comprometidos introduce una complicación adicional, que es el riesgo de adquirir una infección intrahospitalaria. Entre éstas, la neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) es una de las más frecuentes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y actualmente es una complicación en el cuadro clínico de pacientes COVID-19 positivos que necesitan asistencia de respiración mecánica. La prevención de la NAV es crucial para eliminar este cofactor de morbimortalidad, así como disminuir los costos asociados a la atención de salud (tiempo de internación, antibióticos, elementos descartables, etc.).*

La NAV ocurre en pacientes que son ventilados por un tubo endotraqueal o por traqueotomía, como respuesta del huésped a la invasión bacteriana. Los pacientes con ventilación mecánica están inconscientes y no hay eliminación de las secreciones en la orofaringe, generando un aumento de la flora oral normal. Los microorganismos colonizadores pasan a lo largo del tubo traqueal formando biofilms en la parte interna y externa del mismo particularmente en la región cercana al bulbo. Finalmente, estos microorganismos son capaces de alcanzar las vías aéreas distales superando la respuesta inmune del huésped y generando neumonía. La propuesta de este trabajo consiste en modificar la superficie de los tubos endotraqueales con agentes

antimicrobianos que inhiban la adhesión y proliferación bacteriana actuando como coadyuvantes de los antibióticos administrados por vía sistémica.

El objetivo general de este trabajo es contribuir a la prevención de la NAV por medio de la funcionalización de las superficies interna y externa del tubo endotraqueal empleado en la ventilación mecánica. La modificación se realiza mediante el depósito de una delgada película de hidrogeles biocompatibles y biodegradables cargados con agentes antimicrobianos convencionales (antibióticos) y no convencionales (nanopartículas de plata, AgNPs) para combatir la formación de los biofilms bacterianos que generan la NAV. Los hidrogeles proporcionan control espacial y temporal sobre la liberación de los agentes terapéuticos debido a su degradabilidad controlable y capacidad para proteger a los medicamentos lábiles, permitiendo, además, alcanzar concentraciones locales superiores a las obtenidas por administración sistémica. Para alcanzar los objetivos, se ha optimizado la síntesis de un hidrogel en base a polietilenglicol capaz de adherirse fuertemente a la superficie de cloruro de polivinilo del tubo endotraqueal. Se logró recubrir la superficie del tubo con el hidrogel, comprobándose una buena estabilidad mecánica tanto para el hidrogel deshidratado como para el mismo hidratado. Se analizaron diferentes rutas de incorporación de los agentes antimicrobianos, encontrándose que la más adecuada es el agregado de éstos al polímero precursor del hidrogel. Los hidrogeles modificados con AgNPs presentan características de adhesión y estabilidad similares a las de los hidrogeles sin modificar. Al momento de escribir este trabajo se están llevando cabo los experimentos tendientes a determinar la capacidad antimicrobiana de las superficies modificadas.

Palabras clave: **neumonía; ventilación mecánica; hidrogeles; biofilms; antimicrobianos**

Recibido: 29/09/2020 Aceptado: 13/10/2020

DOI: <https://doi.org/10.24215/26838559e019>

Ventilator-associated pneumonia treatment: mortality cofactor in positive COVID-19 patients.

Abstract. *Sars-CoV-2 infection produces a variety of clinical pictures, including asymptomatic infection, mild upper respiratory disease, and severe viral pneumonia with respiratory failure and*

even death. The need for hospitalization of the most compromised patients introduces an additional complication, which is the risk of acquiring a hospital infection. Among these, ventilator-associated pneumonia (VAP) is one of the most frequent in Intensive Care Units (ICU) and is currently a complication in the clinical picture of positive COVID-19 patients who need mechanical respiration assistance. The prevention of VAP is crucial to eliminate this cofactor of morbidity and mortality, as well as to reduce the costs associated with health care (long-term care hospitalization, antibiotics, disposable items, etc.).

VAP occurs in patients who are ventilated by an endotracheal tube or tracheotomy, as a host response to bacterial invasion. Patients on mechanical ventilation are unconscious and there is no elimination of secretions in the oropharynx, resulting in an increase in normal oral flora. The colonizing microorganisms pass along the tracheal tube forming biofilms in the internal and external part of the tube, particularly in the region near the bulb. Finally, these microorganisms can reach the distal airways overcoming the immune response of the host and generating pneumonia. The proposal of this work consists of modifying the surface of endotracheal tubes with antimicrobial agents that inhibit bacterial adhesion and proliferation acting as adjuvants of systemically administered antibiotics.

The general objective of this work is to contribute to the prevention of VAP through the functionalization of the internal and external surfaces of the endotracheal tube used in mechanical ventilation. The modification is carried out by depositing a thin film of biocompatible and biodegradable hydrogels loaded with antibiotics and non-conventional antimicrobial agents (silver nanoparticles, AgNPs) to inhibit the formation of bacterial biofilms generating NAV. Hydrogels provide spatial and temporal control over the release of therapeutic agents due to their controllable degradability and ability to protect labile drugs. In addition, higher antibiotic local concentration than those obtained by systemic administration can be reached. To achieve these objectives, the synthesis of a hydrogel based on polyethylene glycol which is capable of strongly adhere to the polyvinyl chloride surface of the endotracheal tube has been optimized. It was possible to cover the surface of the tube with the hydrogel, which showed good mechanical stability for both the dehydrated hydrogel and the hydrated one. Different routes of incorporation of antimicrobial agents were investigated, finding that the most suitable is the addition of these agents to the precursor polymer of the hydrogel. Hydrogels loaded with AgNPs have similar

adhesion and stability to the unloaded hydrogels. Experiments are being carried out to determine the antimicrobial capacity of these modified surfaces.

Keywords: pneumonia; mechanical ventilation; hydrogels; biofilms; antimicrobial

Novedad u originalidad local en el conocimiento

El proyecto tiene como objetivo general contribuir a la prevención de la neumonía asociada a la ventilación mecánica por medio de la funcionalización de las superficies interna y externa del tubo endotraqueal empleado en la ventilación mecánica. Esta funcionalización se realizará mediante el depósito de una fina película de hidrogeles biocompatibles y biodegradables cargados con agentes antimicrobianos para combatir la formación de biofilms bacterianos que generan la NAV. Para el desarrollo y diseño de los tubos endotraqueales modificados deben tenerse en cuenta varios factores: i) Duración de la terapia, como mínimo una semana para evitar las infecciones primarias que ocurren dentro de los 4 días de entubación para ventilación mecánica y las de inicio tardío que aparecen después de los 5 días aproximadamente, relacionada a bacterias multirresistentes; ii) Soportar el esfuerzo mecánico del proceso de entubación y iii) No modificar el diámetro del tubo endotraqueal para permitir el normal funcionamiento de los procesos de aspiración de fluidos biológicos.

La propuesta es innovadora ya que no existen en el país tubos endotraqueales modificados para prevenir y/o tratar la NAV mediante la administración local de

agentes antimicrobianos. El uso de hidrogeles cargados con agentes terapéuticos, particularmente antimicrobianos, constituye una estrategia que permite controlar espacial y temporalmente la liberación de dichos agentes terapéuticos, debido a las propiedades físicas sintonizables de los hidrogeles, su degradabilidad controlable y su capacidad para proteger a los medicamentos lábiles.

Grado de relevancia

Es de público conocimiento que, en diciembre de 2019, la ciudad de Wuhan, capital de la provincia de Hubei en China, se convirtió en el centro de un brote de neumonía de causa desconocida. Para el 7 de enero de 2020, los científicos chinos habían aislado un nuevo coronavirus, el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2; anteriormente conocido como 2019-nCoV), que se designó enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en febrero de 2020 (Huang et al, 2020; Zhou et al, 2020).

El espectro clínico de la infección por SARS-CoV-2 parece ser amplio, abarcando infección asintomática, enfermedad leve del tracto respiratorio superior y neumonía viral grave con insuficiencia respiratoria e incluso la muerte. Entre los factores identificados como más relevantes, la sepsis fue la complicación más observada, seguida de insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardíaca y shock séptico. La mitad de los no sobrevivientes experimentaron infección secundaria y

neumonía asociada al ventilador que ocurrió en diez (31%) de 32 pacientes que requirieron ventilación mecánica invasiva (Zhou et al, 2020).

A pesar de las condiciones de asepsia de los hospitales, entre las infecciones hospitalarias más comunes se encuentran la neumonía adquirida en el hospital (HAP) y la neumonía asociada a la ventilación (NAV), (<https://www.who.int/infection-prevention/publications/decontamination/en/>). HAP se define como una neumonía que no se incubó en el momento del ingreso al hospital y que ocurre 48 horas o más después del ingreso y NAV se define como una neumonía que ocurre 48 horas después de una intubación endotraqueal (Kalil et al, 2016; Kalanuria et al, 2014). La mortalidad asociada con NAV varía del 24 al 76 %, y es aún mayor entre los pacientes críticos (Charles et al, 2014). NAV aumenta la estadía del paciente en la UCI e indirectamente aumenta el costo del tratamiento del paciente. Según el momento de inicio de NAV, se puede dividir en dos tipos. La NAV de inicio temprano ocurre durante los primeros cuatro días de ventilación mecánica y generalmente es causada por bacterias sensibles a los antibióticos. La NAV de inicio tardío se desarrolla cinco o más días después del inicio de la ventilación mecánica y es causada por patógenos resistentes a múltiples fármacos. El diagnóstico temprano de NAV, así como la aplicación de una terapia adecuada con antimicrobianos convencionales y/o alternativos puede reducir la incidencia y prevalencia de neumonía provocada por microorganismos multirresistentes (Charles et al, 2014).

Grado de pertinencia

La NAV ocurre en pacientes que son ventilados por un tubo endotraqueal o por traqueotomía. La neumonía es una respuesta del huésped a la invasión bacteriana. La fisiología normal del sistema respiratorio es eliminar las secreciones de la laringe y la faringe, ya sea por acción mucociliar o reflejo de la tos. Los pacientes con ventilación mecánica están inconscientes y no hay eliminación de las secreciones, generando un aumento en la flora oral normal del paciente. Estos colonizadores pasan a lo largo del tubo traqueal formando biofilms en la parte interna y externa del mismo particularmente en la región cercana al bulbo. Finalmente, estos microorganismos son capaces de alcanzar las vías aéreas distales superando la respuesta inmune del huésped y generando neumonía. También contribuyen a la NAV el contenido del estómago, los circuitos del ventilador, los humidificadores y los nebulizadores (Miller, 2018; Charles et al, 2014; Hooven et al, 2019) (Figura 1). Los organismos asociados a la NAV y sus patrones de resistencia varían según el grupo de pacientes y el entorno hospitalario. El tratamiento actual de NAV es la administración apropiada de antibióticos intravenosos, siendo especialmente importante cuando la bacteria es multirresistente. La prevención de NAV incluye medidas estándares de cuidado para todas las infecciones y otras específicas para la intervención de ventilación (Charles et al, 2014; Weiss et al, 2017; Kollef et al, 2017). El desarrollo propuesto implica disminuir la incidencia de NAV mediante la funcionalización de las paredes del tubo con agentes antimicrobianos, los que

afectarían la adhesión bacteriana, primer paso para la colonización y formación del biofilm. Asimismo, la inclusión en el hidrogel de antimicrobianos no convencionales, como las nanopartículas de plata, en conjunto con antibióticos apropiados permitirá mitigar el efecto de la resistencia a los antibióticos.

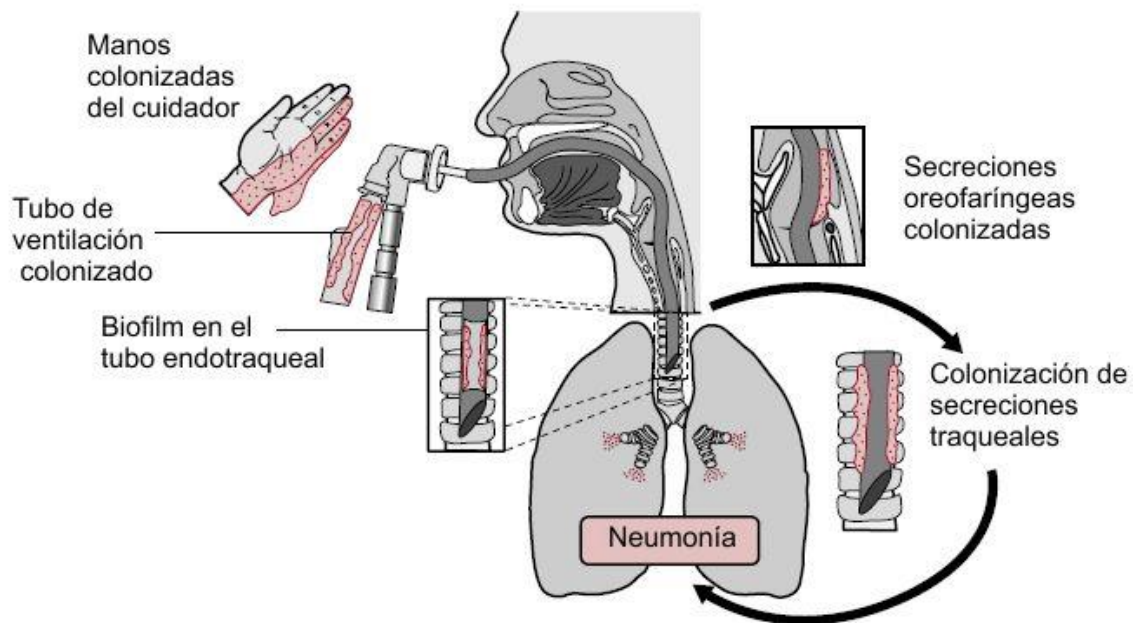


Figura 1. La colonización de la vía aérea superior puede originarse en las manos del personal de atención médica, equipo de ventilación, secreciones orofaríngeas o una biopelícula dentro del tubo endotraqueal. Los organismos patógenos se diseminan hacia la tráquea, donde la población se expande y desciende a las vías respiratorias causando neumonía. Figura adaptada de Kollef et al, 2017.

Figure 1. Colonization of the upper airway may originate from the hands of healthcare personnel, ventilation equipment, oropharyngeal secretions or a biofilm within the endotracheal tube. The pathogenic organisms spread into the trachea, where the population expands and descends into the airways causing pneumonia. Figure adapted from Kollef et al, 2017.

Grado de demanda

La NAV ha sido identificada por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2010) como una prioridad a vigilar en el contexto de las infecciones frecuentes con gran efecto en la mortalidad, la morbilidad, los costos (por ejemplo, más días de hospitalización, mayores costos de tratamiento) y que pueden ser evitables. Actualmente, el Ministerio de Salud propone en casos de “Neumonía grave en paciente definido como caso sospechoso o confirmado de COVID-19”: 1) Tratamiento de sostén, 2) Tratamiento antimicrobiano habitual de neumonía, entre otras recomendaciones luego de la ventilación asistida, (<https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19/abordaje-terapeutico>) y protocolo de intubación orotraqueal en pacientes COVID-19 positivos (<https://www.argentina.gob.ar/recomendaciones-para-equipos-de-salud/manejo-de-pacientes-ventilados-bioseguridad>).

El desarrollo exitoso de esta propuesta brindará una alternativa de tratamiento para mitigar los efectos producidos por la intubación asociada a la respiración mecánica.

Desarrollo del producto

Se describen a continuación los avances del proyecto y algunos resultados preliminares.

Como sustrato a modificar se utilizaron muestras de cloruro de polivinilo (PVC) extraídas de un tubo endotraqueal comercial. Para realizar el recubrimiento se ha

optimizado la síntesis de un hidrogel a base de polietilenglicol (PEG), biocompatible y biodegradable. Para esto se adaptó la metodología descrita por Gyawali et al (2013) (Figura 2).

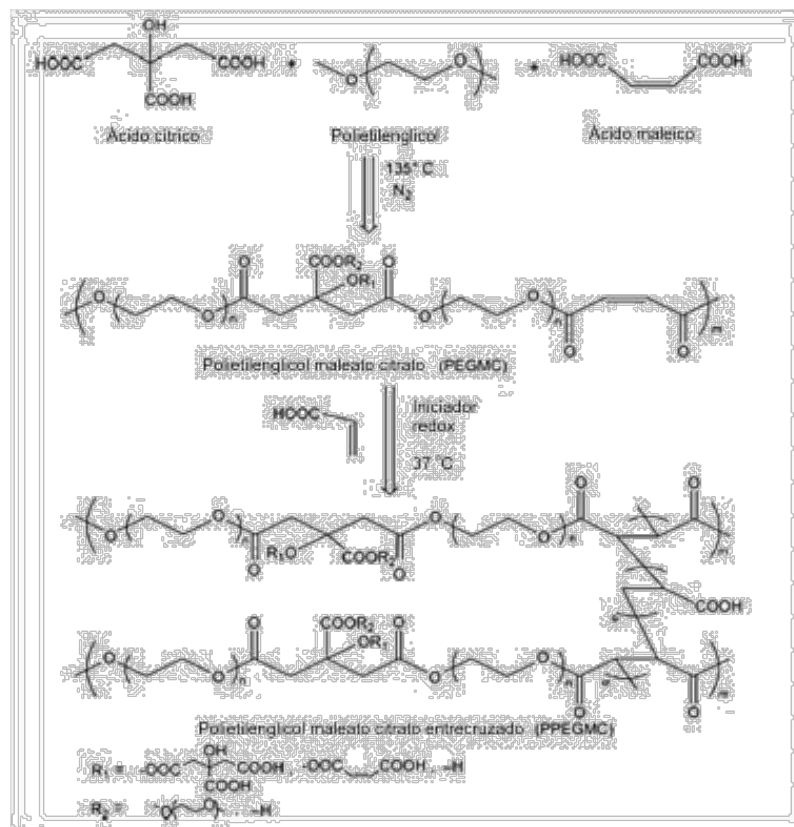


Figura 2. Ruta de síntesis del hidrogel. Figura adaptada de Gyawali et al, 2010.

Figure 2. Hydrogel synthesis pathway. Adapted from Gyawali et al, 2010.

En primer lugar, se sintetiza el prepolímero polietilenglicol maleato citrato (PEGMC) por medio de una reacción de condensación de ácido cítrico (AC), polietilenglicol (PEG) y ácido maleico (AM). En una segunda etapa se realiza el entrecruzamiento del PEGMC para formar el hidrogel PPEGMC por iniciación redox usando persulfato de

amonio (APS) como catalizador, tetrametil-etilen-diamina (TEMED) como iniciador y ácido acrílico (AA) como entrecruzador. Se ensayó la relación molar de AM en el polímero precursor PEGMC y la relación de AA en la formación del hidrogel para encontrar la condición óptima de fluidez.

Una vez encontradas las condiciones óptimas de síntesis, se depositó una delgada capa del hidrogel sobre la superficie de PVC mediante la inmersión de las muestras durante 30 minutos o 60 minutos en la mezcla de reacción (prepolímero + entrecruzador) a 37 C. Los sustratos así modificados se colocaron en estufa a 37 C durante 24 h y se secaron al vacío. Mediante este procedimiento se logró el anclaje del hidrogel a la superficie sin que se observen desprendimientos macroscópicos evidentes del mismo. Las superficies de PVC modificadas con el hidrogel se analizaron mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) (Figura 3). Se observa que la película del hidrogel obtenida a 30 min de inmersión cubre parcialmente la superficie de la muestra, generándose islas de espesores variables (entre 65 nm y 130 nm, Figura 3c). En el caso de los sustratos modificados luego de 60 minutos de inmersión, pareciera que el hidrogel cubre la superficie más homogéneamente. Las muestras modificadas se sometieron a fricción, encontrándose que no sufren modificaciones, tal como lo indican las imágenes AFM, similares antes y después del tratamiento mecánico.

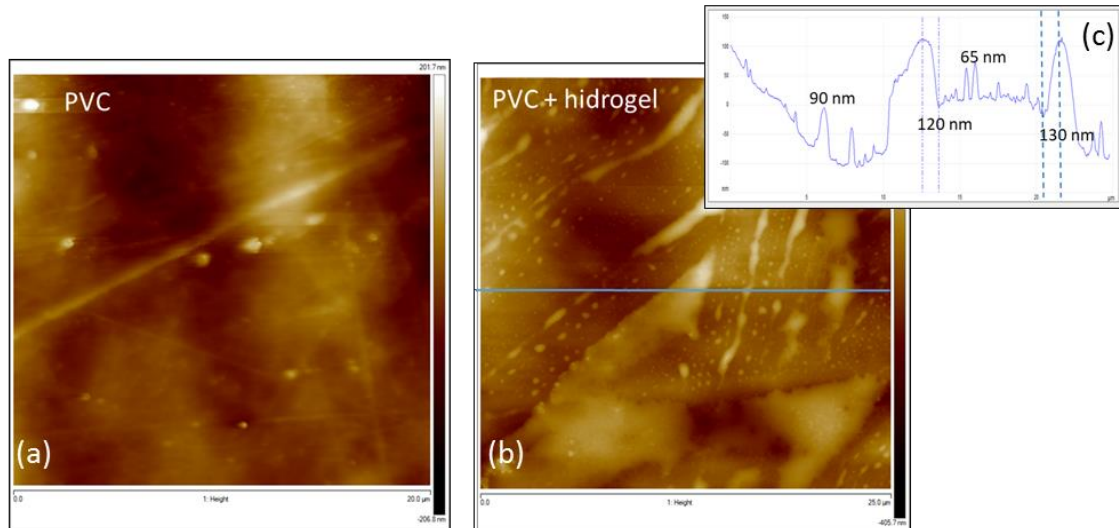


Figura 3. Imágenes AFM (20 µm x 20 µm) de una superficie de PVC (a) y de una superficie modificada con el hidrogel (30 min de inmersión) (b). (c) Sección transversal a lo largo de la línea celeste en la imagen (b) mostrando la altura de la capa de hidrogel.

Figure 3. AFM images (20 µm x 20 µm) of (a) PVC surface and (b) hydrogel-modified PVC surface (30 min immersion). (c) Cross section along the light blue line in (b) showing the height of the hydrogel layer.

Una vez optimizada la síntesis del hidrogel y el protocolo para la modificación superficial, se buscó la metodología adecuada para incorporar a la matriz del hidrogel nanopartículas de plata (AgNPs) como agente antimicrobiano. Los ensayos preliminares indican que el agregado de las mismas a la solución del prepolímero no alteraría la adhesión a la superficie de PVC, aunque disminuiría el tiempo de polimerización.

Asimismo, se realizaron ensayos de adhesión bacteriana sobre superficies modificadas con el hidrogel y con el hidrogel conteniendo AgNPs. Para esto, las muestras se pusieron en contacto con un césped de *Staphylococcus aureus* durante

24 h para permitir la adhesión bacteriana. Luego se enjuagaron las muestras con agua estéril, se tiñeron con SYTO-9 y se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un filtro adecuado para detectar las bacterias adheridas a la superficie. Como control se utilizó una superficie de PVC sin modificar. Los resultados preliminares (Figura 4) muestran una menor adhesión bacteriana a la superficie modificada con el hidrogel conteniendo AgNPs.

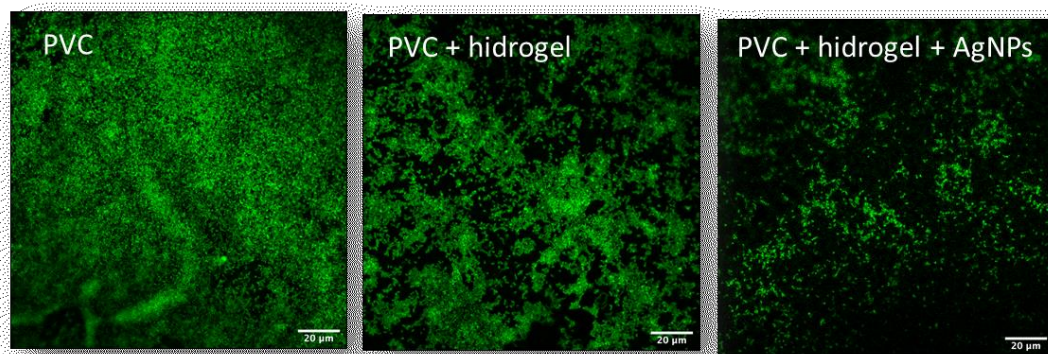


Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de *Staphylococcus aureus* adheridos a superficies de PVC, PVC modificado con el hidrogel y PVC modificado con el hidrogel al que se le han incorporado AgNPs.

Figure 4. Confocal microscopy images of *Staphylococcus aureus* adhered on PVC surface, hidrogel-modified PVC and AgNPs-containing hidrogel modified PVC.

Financiamiento

Este desarrollo es financiado mediante el Programa de Articulación y Fortalecimiento Federal de las Capacidades en Ciencia y Tecnología COVID-19, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Argentina (2020).

Agradecimientos

Integrantes del Proyecto: Diego Pissinis (Director), Patricia Schilardi, Carolina Diaz, Fiorela Ghilini, Irene Sille, María Noel Urrutia, Alejandro Miñan, Sofía Mosqueira, Sofía Guerin Stabile, Julián Broitman, Natalia Fagali, Mónica Fernández Lorenzo de Mele.

Referencias bibliográficas

Charles, M. P., Kali, A., Easow, J. M., Joseph, N. M., Ravishankar, M., Srinivasan, S., Kumar, S., & Umadevi, S. (2014). Ventilator-associated pneumonia. *The Australasian medical journal*, 7(8), 334–344. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2014.2105>

Gyawali, D., Nair, P., Kim, H. K., & Yang, J. (2013). Citrate-based Biodegradable Injectable hydrogel Composites for Orthopedic Applications. *Biomaterials science*, 1(1), 52–64. <https://doi.org/10.1039/C2BM00026A>

Gyawali, D., Nair, P., Zhang, Y., Tran, R. T., Zhang, C., Samchukov, M., Makarov, M., Kim, H. K., & Yang, J. (2010). Citric acid-derived in situ crosslinkable biodegradable polymers for cell delivery. *Biomaterials*, 31(34), 9092–9105. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.022>

Hooven, T. A. y Polin, R.A. (2019) CHAPTER 8 Ventilator-Associated Pneumonia, Editor: Eduardo Bancalari, *The Newborn Lung* (Third Edition), Elsevier Inc, 147-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54605-8.00008-8>

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* , 395 (10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

Kalanuria, A. A., Ziai, W., & Mirski, M. (2014). Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Critical care (London, England)*, 18(2), 208. <https://doi.org/10.1186/cc13775>

Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B., Napolitano, L. M., O'Grady, N. P., Bartlett, J. G., Carratalà, J., El Solh, A. A., Ewig, S., Fey, P. D., File, T. M., Jr, Restrepo, M. I., Roberts, J. A., Waterer, G. W., Cruse, P., Knight, S. L., & Brozek, J. L. (2016). Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(5), e61–e111. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw353>

Kollef, M. H., & Burnham, C. D. (2017). Ventilator-Associated Pneumonia: The Role of Emerging Diagnostic Technologies. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 38(3), 253–263. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1599224>

Miller, F. (2018). Ventilator Associated Pneumonia. *Intensive Care Tutorial* 382, 1–6. https://www.wfsahq.org/components/com_virtual_library/media/5e63c8f14e8a46c186bb0f73eafa2950-atow-382-00-01.pdf

Weiss, E., Essaied, W., Adrie, C., Zahar, J. R., & Timsit, J. F. (2017). Treatment of severe hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: a systematic review of inclusion and judgment criteria used in randomized controlled trials. *Critical care (London, England)*, 21(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1755-5>

World Health Organization. (2002) Prevention of Hospital-Acquired Infections: A Practical Guide, 2nd ed.; G. Ducel, J. F. and L. N., Ed.; Geneva, Switzerland.

Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England)*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)