

TESIS DOCTORAL

Nuevas alternativas terapéuticas frente a *Acinetobacter baumannii*. Estudios pre-clínicos de péptidos híbridos de cecropina A-melitina, una quinolona de nueva generación (UB-8902) y ácido clavulánico.

Rafael López Rojas

Sevilla, enero 2011

Don Jerónimo Pachón Díaz

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “**Nuevas alternativas terapéuticas frente a *Acinetobacter baumannii*. Estudios pre-clínicos de péptidos híbridos de cecropina A-melitina, una quinolona de nueva generación (UB-8902) y ácido clavulánico**” ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado Don Rafael López Rojas, y reúne las condiciones necesarias para ser leído, y defendido como Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expide la presente certificación en Sevilla, a 20 de diciembre de 2010.

Jerónimo Pachón Díaz
Director

Rafael López Rojas
Doctorando

FINANCIACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

- 1.** Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias-FEDER, proyecto de investigación PI040624.
- 2.** Ministerio de Educación y Ciencia, Proyecto de Estímulo a la Transferencia de Resultados de Investigación (PETRI 0957-OP).
- 3.** Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008/0000).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL

Artículos internacionales

ARTÍCULO 1. Enviado a la revista European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

López-Rojas R, Docobo-Pérez F, Pachón-Ibáñez MA, de la Torre B, Fernández-Reyes M, March C, Bengoechea JA, Andreu D, Rivas L, and Pachón J.

Efficacy of cecropin A-melittin peptides on a sepsis model of infection by pan-resistant *Acinetobacter baumannii*.

ARTÍCULO 2. Enviado a la revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

López-Rojas R, Sánchez-Céspedes, Docobo-Pérez F, Domínguez-Herrera J, Vila J, Pachón J.

Pre-clinical studies of a new quinolone (UB-8902) against *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin.

ARTÍCULO 3. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009; 53(10): 4298-4304.

Beceiro A*, López-Rojas^{*†}, Domínguez-Herrera J, Docobo-Pérez F, Bou G, Pachón J and the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI).

In vitro activity and *in vivo* efficacy of clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*.

*Both of these authors contributed equally to this work. †Corresponding author.

Congresos nacionales e internacionales

- López-Rojas R., Docobo-Pérez F., Pachón-Ibáñez M. E., de la Torre B. G., Saugar J. M., Rivas L., Andreu D., Pachón J.

In vivo studies of cecropin A (1-8)-melittin (1-18) hybrid peptide against a pan-resistant *Acinetobacter baumannii* strain.

Acinetobacter 2006, 7th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*.

Barcelona, Spain, 8-10 November 2006.

- López-Rojas R., Docobo-Pérez F., de la Torre B., Pichardo C., Rivas L., Andreu D., Pachón J.

Actividad *in vivo* de péptidos híbridos de cecropina A-melitina en un modelo murino de sepsis peritoneal.

VIII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas.

Almería, 14-16 de diciembre de 2006.

- López-Rojas R., Docobo-Pérez F., Pachón-Ibáñez M.E., de la Torre B.G., Fernández-Reyes M., Pichardo C., Rivas L., Andreu D., Pachón J.

In vivo activity of cecropin A-melittin hybrid peptides (CAMs) against panresistant *Acinetobacter baumannii*.

47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC).

Chicago, USA, 17-20 September 2007.

- López Rojas R., Docobo Pérez F., Sánchez Céspedes J., Vila J., Pachón J.

Estudios pre-clínicos de una nueva quinolona (UB-8902) frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a ciprofloxacino.

IX Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas.

Málaga, 13-15 de diciembre de 2007.

- López-Rojas R., Sánchez-Céspedes J., Docobo-Pérez F., Vila J., Pachón J.
Pre-clinical studies of a new quinolone (UB-8902) against *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin.

18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Barcelona, España, 19-22 de Abril de 2008.

- López-Rojas R., Beceiro A., Domínguez-Herrera J., Docobo-Pérez F., Bou G., Pachón J.

In vitro activity and *in vivo* efficacy of clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*.

48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC).

Washington DC, USA, 25-28 October 2008.

- López Rojas R., Docobo Pérez F., Sánchez Céspedes J., Vila J., Pachón J.

Estudios pre-clínicos de una nueva quinolona (UB-8902) frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a ciprofloxacino.

VIII Jornadas Andaluzas Salud Investiga.

Sevilla, 29-31 de octubre de 2008.

- López-Rojas R., Sánchez-Céspedes J., Docobo-Pérez F., Domínguez-Herrera J., Vila J., Pachón J.

Efficacy of a new quinolone (UB-8902) in an experimental murine pneumonia model caused by *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin.

19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Helsinki, Finlandia, 16-19 May 2009.

A mi abuelo, mi abuela y mi Nina.

A mi madre.

A Jerónimo Pachón, gracias por la confianza depositada en mí desde el primer momento para llevar a cabo esta Tesis Doctoral. Gracias no sólo por ser un excelente jefe y director, sino también por ser un compañero más. Durante este tiempo he podido disfrutar trabajando contigo, pero además compartiendo tus cualidades personales. Gracias.

A los Doctores Jordi Vila y Javier Sánchez-Céspedes del Hospital Clínic de Barcelona, Germán Bou y Alejandro Beceiro del Hospital Juan Canalejo de A Coruña, Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, David Andreu de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona, y José Antonio Bengoechea del Hospital Son Dureta de Mallorca, por vuestra inestimable ayuda y colaboración en las diferentes partes de esta Tesis Doctoral.

A Fernando, de quien he aprendido casi todo lo que sé en esto de la ciencia. En estos últimos años he pasado más tiempo contigo que con cualquier otra persona, y todavía no sé si eres mejor compañero o amigo; gracias por todo. A Menia, “la Doctora”, por haber iniciado “al nuevo” en la investigación, mis primeros pasos fueron contigo y espero que no sean los últimos. A Cristina, por tu tiempo, por estar siempre dispuesta a ayudar. A Juan, por tu implicación y tu trabajo desinteresado. Al resto de compañeros de la caracola (Ale, Alicia, Ana, Fernando, Irene, Juli, Lydia, Mike, Nacho, Omar, Paco, Pilar, Rocío, Rosa, Tarik y Younes), por hacer más llevadero el día a día en el trabajo. A Enrique, por tu ayuda e interés dentro y fuera del laboratorio. A José Miguel, por tu implicación en nuestra investigación. Al resto de los componentes del Servicio de Enfermedades Infecciosas por vuestra colaboración durante todo este tiempo.

A Silvia, por aguantarme pacientemente, por estar siempre ahí, por tu apoyo incondicional, por tu amor y cariño.

A mi madre, porque me has dedicado toda tu vida, porque todo lo que tengo es gracias a ti. No hay palabras que puedan agradecerte lo mucho que te debo.

*La ignorancia afirma o niega rotundamente;
la ciencia duda.*

Voltaire

*La estadística es una ciencia que demuestra que
si mi vecino tiene dos coches y yo ninguno,
los dos tenemos uno*

George Bernard Shaw

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE IMÁGENES	viii

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

1. Infecciones causadas por <i>Acinetobacter baumannii</i>	1
1.1 El género <i>Acinetobacter</i>	1
1.1.1 Género y genospecies de <i>Acinetobacter</i>	1
1.1.2 Identificación en el laboratorio.....	4
1.2 Características microbiológicas de <i>Acinetobacter</i> spp. de mayor interés en la clínica.	10
1.2.1 Supervivencia en el medio ambiente.....	10
1.2.2 Desarrollo de resistencias a múltiples antimicrobianos.....	11
1.3 Especies de <i>Acinetobacter</i> de importancia en la clínica.....	12
1.4 Factores que han determinado la emergencia de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> como causa de infecciones nosocomiales.....	12
1.5 Patogenia y factores de riesgo de las infecciones por <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	13
1.5.1 Factores de virulencia de <i>Acinetobacter</i> spp.	13
1.5.2 Factores predisponentes del huésped.....	15
1.6 Situación epidemiológica y manifestaciones clínicas más frecuentes de las infecciones por <i>Acinetobacter</i> spp.	15
1.6.1 Reservorios, mecanismos de transmisión y situación epidemiológica de las infecciones por <i>Acinetobacter</i>	15
1.6.2 Manifestaciones clínicas más frecuentes.	18
1.6.2.1 Tracto respiratorio.	19
1.6.2.2 Bacteriemia.	20
1.6.2.3 Aparato urinario.....	22
1.6.2.4 Sistema nervioso central.....	22
1.6.2.5 Otras localizaciones.....	23

2.	Resistencia antibiótica en <i>Acinetobacter baumannii</i> : perspectiva histórica y principales mecanismos.	25
2.1	Perspectiva histórica del desarrollo de resistencias en <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
2.2	Principales mecanismos de resistencia antibiótica en <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
2.2.1	Cambios en la permeabilidad de membrana.....	27
2.2.2	Sistemas de expulsión activa.....	28
2.2.3	Betalactamasas.....	32
2.2.4	Enzimas modificadores de aminoglucósidos.....	35
2.2.5	Modificación de las PBPs.....	37
2.2.6	Metilación de ARNr 16S.....	37
2.2.7	Proteínas protectoras de ribosomas.....	37
2.2.8	Mutación de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	38
3.	Tratamiento de las infecciones por <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes.....	39
3.1	Sulbactam.....	39
3.2	Rifampicina.....	42
3.3	Colistina.....	45
3.4	Tigeciclina.....	47
3.5	Combinaciones.....	49
3.6	Nuevas alternativas terapéuticas.....	52
3.6.1	Péptidos antimicrobianos.....	52
3.6.2	Inhibidores de bombas de expulsión.....	54
3.6.3	Inhibidores enzimáticos.....	55
4.	Desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.....	57
4.1	Péptidos híbridos de cecropina A- melitina.....	57
4.2	Quinolonas de nueva generación.....	62
4.3	Inhibidores de betalactamasas: ácido clavulánico.....	68
5.	Modelos experimentales en el estudio de enfermedades infecciosas.....	71
5.1	Importancia y justificación.....	71
5.2	Modelo experimental de sepsis peritoneal.....	73

5.3 Modelo experimental de neumonía bacteriana aguda.	74
5.4 Modelos experimentales de infecciones por <i>Acinetobacter baumannii</i>	76
II. JUSTIFICACIÓN	81
III. HIPÓTESIS	83
IV. OBJETIVOS.....	84
V. RESULTADOS	
1. Efficacy of cecropin A-melittin peptides on a sepsis model of infection by pan-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>	85
2. Pre-clinical studies of a new quinolone (UB-8902) against <i>Acinetobacter baumannii</i> resistant to ciprofloxacin.	106
3. <i>In vitro</i> activity and <i>in vivo</i> efficacy of clavulanic acid against <i>Acinetobacter baumannii</i>	124
VI. DISCUSIÓN.....	132
1. Eficacia de péptidos híbridos de cecropina A-melitina en un modelo de sepsis peritoneal producido por <i>Acinetobacter baumannii</i> panresistente.	133
2. Estudios preclínicos de una nueva quinolona (UB-8902) frente a <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a ciprofloxacino.	138
3. Actividad <i>in vitro</i> y eficacia <i>in vivo</i> del ácido clavulánico frente a <i>Acinetobacter baumannii</i>	140
VII. CONCLUSIONES	144
VIII. BIBLIOGRAFÍA	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía actual del género <i>Acinetobacter</i>	2
Tabla 2. Bombas de expulsión descritas en <i>Acinetobacter baumannii</i> y antibióticos sobre los que actúan.....	31
Tabla 3. Betalactamasas en <i>Acinetobacter baumannii</i> y antibióticos sobre los que actúan.....	34
Tabla 4. Enzimas modificadores de aminoglucósidos en <i>Acinetobacter</i> spp. y antibióticos sobre los que actúan.....	36
Tabla 5. Clasificación de las quinolonas.....	63
Tabla 6. Mutaciones en GyrA, GyrB, ParC y ParE asociadas a la resistencia a quinolonas.....	65

ARTÍCULO 1.

Table 1. In vivo toxicity of cecropin A-melittin hybrid peptides in C57BL/6 mice.....	99
---	----

ARTÍCULO 2.

Table 1. Bacterial minimal lethal dose (BMLD) and bacterial lethal dose 50 (BLD ₅₀).....	117
--	-----

Table 2. Pharmacokinetic/pharmacodinamic (PK/PD) parameters.	119
Table 3. Effect of the therapy with UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin, on the clearance of Ab58 and Ab33 strains from mouse lungs and blood, as well as on mortality.	120

ARTÍCULO 3.

Table 1. MICs and MBCs of CLA and IPM against two strains of <i>A. baumannii</i> at three different inocula.....	127
Table 2. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of CLA (13 mg/kg) and IPM (30 mg/kg).....	129
Table 3. Effects of antibiotic therapy on the clearance of Ab11 and Ab51 strains from mouse lungs, the frequency of sterile blood cultures, and mortality.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del sulbactam.	40
Figura 2. Estructura química de la rifampicina.	42
Figura 3. Estructura química de la colistina.	45
Figura 4. Estructura química de la tigeciclina.	48
Figura 5. Estructura del inhibidor de bombas de flujo MC-207110.	55
Figura 6. Principales estructuras de los péptidos antimicrobianos catiónicos.....	58
Figura 7. Mecanismo de acción de los PAE.....	59
Figura 8. Actividad bactericida de péptidos híbridos de cecropina A-melitina frente a cepas panresistentes de <i>A. baumannii</i> mediante curvas de tiempo-muerte.	62
Figura 9. Estructura química del ácido clavulánico.	69

ARTÍCULO 1.

Figure 1. Haemolytic activity of CA-M peptides on BALB/c mouse erythrocytes.	100
Figure 2. Protective dose 50 (PD ₅₀).	101
Figure 3. Influence of mouse serum on haemolytic activity of CA(1-8)M(1-18).	102
Figure 4. Experimental peritoneal sepsis in mice.	104
Figure 5. TNF- α serum levels in mice.	105

ARTÍCULO 2.

Figure 1. Estructure of UB-8902	115
Figure 2. Time-kill curves of UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin.....	116
Figure 3. Protective dose 50 (PD ₅₀).....	118
Figure 4. Effect of antibiotic therapy with UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin, on the clearance of <i>A. baumannii</i> from mouse lungs.....	121

ARTÍCULO 3.

Figure 1. Time-kill curves of CLA and IPM against strains Ab11 and Ab51.....	127
Figure 2. CLA concentrations during the time-kill curves with strains Ab11 and Ab51	128
Figure 3. Serum CLA and IPM concentrations.....	128
Figure 4. Effect of antibiotic therapy with CLA or IPM on the clearance of <i>A. baumannii</i> from mouse lungs.....	130

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. <i>Acinetobacter baumannii</i> (microscopía electrónica).....	5
Imagen 2. <i>Acinetobacter baumannii</i> (tinción de Gram).....	5
Imagen 3. <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 (placa de agar-sangre).....	6
Imagen 4. <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 (placa de agar MacConkey).....	6

I. INTRODUCCIÓN

1. INFECCIONES CAUSADAS POR *ACINETOBACTER BAUMANNII*

1.1 El género *Acinetobacter*

1.1.1. Género y genoespecies de *Acinetobacter*

El género *Acinetobacter* incluye varias especies con forma cocobacilar, gramnegativas, no fermentadoras, aerobias estrictas, incapaces de reducir nitratos, oxidasa negativas y no móviles [1]. Estas bacterias fueron identificadas por primera vez en la primera década del siglo XX [1], aunque debido a la ausencia de características microbiológicas claramente distintivas, y a que han sido aisladas de manera independiente por diferentes autores y de diferentes fuentes, fueron rebautizados y clasificados con diferentes denominaciones [1-4]. En 1954, se propuso la denominación actual *Acinetobacter*, bacteria inmóvil [5], en 1971 se establecieron claramente las características del género [6], y en 1976 se incluyó a este género dentro de la familia *Neisseriaceae* tras estudios fenotípicos de requerimientos nutricionales [7, 8]. Posteriormente se incorporaron nuevas técnicas en la identificación de las diferentes especies del género, como fenotipaje [9-11], serotipaje [12, 13], caracterización de proteínas de membrana [14-16], estudio de bacteriófagos [17, 18], estudio de ribotipos [19-22], estudio del ADN ribosómico [23, 24] y, sobre todo, estudios de homología en el ADN cromosómico mediante diferentes técnicas [25-29]. Esto ha contribuido a un superior conocimiento del género *Acinetobacter*, y ya en 1986, Bouvet y Grimont realizaron una de las más completas clasificaciones taxonómicas de este género, con doce genoespecies distintas [30]. Sin embargo, en la actualidad, las técnicas de hibridación de ADN han permitido en 2008 ampliar la clasificación a 31 especies genómicas válidas, de las cuales 17 poseen un nombre de especie válido y al resto se le han asignado números [31]. Hoy en día, se siguen proponiendo nombres para las genoespecies que no lo tienen asignado [32], y se siguen proponiendo la inclusión de nuevas especies para el género *Acinetobacter* [33]. A fecha de Agosto de 2010, existen 23 especies con nombres validados [34], continuando el resto de las genoespecies clasificadas mediante números (tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía actual del género *Acinetobacter*.

Nombre de la especie	Especie genómica ^a	Cepa referencia	Bibliografía
<i>A. baumannii</i>	2	ATCC 19606T	[29, 30]
<i>A. baylyi</i>		DSM 14961T	[35]
<i>A. beijerinckii</i>		NIPH 838T	[33]
<i>A. bereziniae</i>	10	ATCC 17924	[29, 30, 32]
<i>A. bouvetii</i>		DSM 14964T	[35]
<i>A. calcoaceticus</i>	1	ATCC 23055T	[29, 30]
<i>A. gernerii</i>		DSM 14967T	[35]
<i>A. grimontii</i>		DSM 14968T	[35]
<i>A. guillouiae</i>	11	ATCC 11171	[29, 30, 32]
<i>A. gyllenbergii</i>		NIPH 2150T	[33]
<i>A. haemolyticus</i>	4	ATCC 17906T	[29, 30]
<i>A. johnsonii</i>	7	ATCC 17909T	[29, 30]
<i>A. junii</i>	5	ATCC 17908T	[29, 30]
<i>A. lwoffii</i>	8/9	ATCC 15309T	[29, 30]
		ATCC 9957	
<i>A. parvus</i>		NIPH384T	[36]
<i>A. radioresistens</i>	12	IAM 13186T	[29, 30, 37]
<i>A. schindleri</i>		NIPH1034T	[38]
<i>A. soli</i>		KCTC 22184(T)	[39]
<i>A. tandoii</i>		DSM 14970T	[35]
<i>A. tjernbergiae</i>		DSM 14971T	[35]
<i>A. townneri</i>		DSM 14962T	[35]
<i>A. ursingii</i>		NIPH137T	[38]
<i>A. venetianus</i>		ATCC 31012	[40]
	3	ATCC 19004	[29, 30]
	6	ATCC 17979	[29, 30]
	13TU	ATCC 17903	[29]
	13BJ, 14TU	ATCC 17905	[29, 41]
	14BJ	CCUG 14816	[41]
	15BJ	SEIP 23.78	[41]
	15TU	M 151a	[29]
	16	ATCC 17988	[41]
	17	SEIP Ac87.314	[41]
	“Between 1 and 3”	10095	[42]
	“Close to 13TU”	10090	[42]

^a A menos que se indique de otra forma, la especie genómica es de acuerdo a Bouvet y Grimont [30] y Bouvet y Jeanjean [41]. BJ, Bouvet y Jeanjean; TU, Tjernberg y Ursing.

La secuenciación mediante PCR del ADN ribosómico 16S de las distintas especies del género *Acinetobacter*, dan como resultado una elevada coherencia filogenética con un nivel de homogeneidad del ADNr 16S del 94% [43]. El análisis de las relaciones intragenéricas por diferentes métodos ha demostrado que, filogenéticamente, la mayoría de las cepas se pueden agrupar en 5 clústeres: el primero agruparía las genoespecies 2 y 13TU, el segundo incluye las genoespecies 3, “close to 13TU” y “between 1 and 3”, el tercero con las genoespecies 6, 8 y 9, el cuarto comprende las 15BJ, 16BJ y 17BJ y, por último, el quinto que incluiría las genoespecies 1, 10, 11 y 14BJ. Las genoespecies 4, 5, 7, 12, 14TU y 15TU forman ramas individuales no relacionadas significativamente con ninguno de los cinco clústeres [43].

En la antigua clasificación, dentro del género se identificaba una única especie, *Acinetobacter calcoaceticus*, y dos subespecies, *A. calcoaceticus* var. *anitratus* y *A. calcoaceticus* var. *lwoffii* [30]. La subespecie *A. calcoaceticus* var. *anitratus*, incluía las cepas acidificadoras de glucosa [30], que corresponden en la nueva clasificación a las genoespecies 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 4 (*A. haemolyticus*), 10 (*A. berezeniae*), y las genoespecies 3, 6, 13TU, 13BJ, 14TU y 14BJ. Por otro lado, la subespecie *A. calcoaceticus* var. *lwoffii* incluía las cepas no acidificadoras de glucosa, correspondientes actualmente con las genoespecies 5 (*A. junii*), 7 (*A. johnsonii*), 8 (*A. lwoffii*), 12 (*A. radioresistens*), 11 (*A. guillouiae*), y las genoespecies 15, 16 y 17BJ [32, 44, 45].

Existe una muy cercana relación entre las genoespecies 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 y 13TU, y ante la dificultad de diferenciarlas por sus características fenotípicas, constituyen el denominado complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, cuyo uso está muy extendido en la clínica.

Aún así, algunos autores todavía informan estos aislamientos como *A. calcoaceticus* subespecie *anitratus*. Esta situación ha llevado a los autores del *Manual of Clinical Microbiology* [46] a afirmar que la mayoría de las especies genómicas no pueden distinguirse con seguridad por las pruebas fenotípicas [46-48]. A pesar de esto, el género *Acinetobacter* está bien definido hoy en día como “cocobacilo gram-negativo no fermentador, con un porcentaje de ADN G+C del 39 al 47%, que es estrictamente aerobio, no móvil, catalasa positivo y oxidasa negativo” [31, 49].

La genoespecie de mayor importancia en la práctica clínica es en la actualidad *A. baumannii*, estando frecuentemente implicada en brotes de infección nosocomial. Es, por tanto, en la que nos vamos a centrar en este trabajo.

Algunas de las otras genoespecies también son, de manera ocasional, productoras de diferentes infecciones en humanos, en la mayoría de las ocasiones de adquisición nosocomial. *A. haemolyticus* se ha descrito como causante de manera aislada de endocarditis protésica y de diarrea sanguinolenta [50, 51]. La genoespecie 3 [52-54] y *A. junii* han sido responsables de recientes brotes nosocomiales de bacteriemia y sepsis [55-57], con casos de endemia donde son más numerosos que *A. baumannii* [52]. *A. junii* ha sido asociado también a un caso de peritonitis tras diálisis peritoneal [58]. *A. johnsonii* se ha aislado en casos de bacteriemias asociadas a catéter [59]. La genoespecie 13TU se ha implicado en diferentes infecciones nosocomiales [60-63]. Por último, *A. lwoffii* se ha aislado en distintas infecciones comunitarias y nosocomiales como meningitis, endoftalmitis postraumática, bacteriemias por catéter y endocarditis de la válvula mitral y de válvula protésica [64-68]. Recientes trabajos muestran que estas genoespecies están siendo aisladas de manera cada vez más frecuente, aunque su baja incidencia no les hace adquirir la importancia clínica de *A. baumannii* [69].

1.1.2 Identificación en el laboratorio

Las especies pertenecientes al género *Acinetobacter* tienen forma de bacilos durante la fase de crecimiento logarítmico, con un tamaño que oscila entre 1,5 y 2,5 μm en esta fase, mientras que en fase estacionaria adquieren una forma más cocoidal (cocobacilos), oscilando su tamaño entre 1 y 1,5 μm , y agrupándose de manera diploide o incluso en cadenas de longitud variable en esta fase (imágenes 1 y 2). Son inmóviles, incoloros, aerobios estrictos, encapsulados y gramnegativos, pero a menudo retienen la tinción violeta, por lo que en ocasiones pueden confundirse con cocos grampositivos [1].

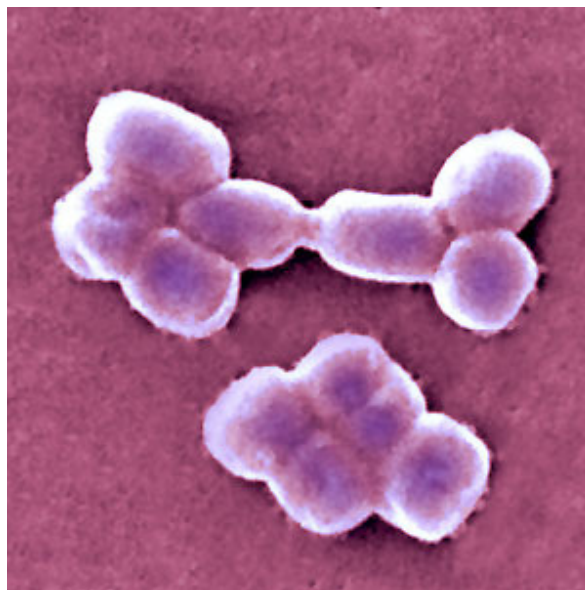


Imagen 1. *Acinetobacter baumannii* (microscopía electrónica).

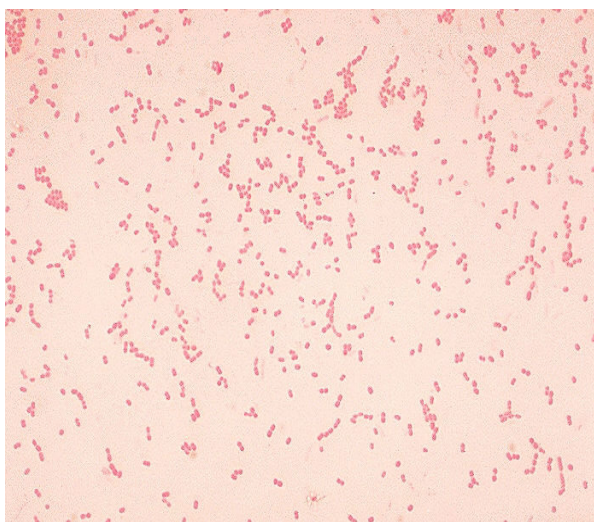


Imagen 2. *Acinetobacter baumannii* (tinción de Gram).

Fenotípicamente se caracterizan por ser oxidasa e indol negativos, no fermentadores, incapaces de reducir nitritos y catalasa positivos. El test de la oxidasa sirve para diferenciar el género *Acinetobacter* de otras bacterias no fermentadoras relacionadas. La mayoría de las especies de *Acinetobacter* pueden crecer en un medio mineral simple que contenga sales de amonio o nitratos y una única fuente de energía y carbono como lactato, acetato, ó piruvato [70]. Esta habilidad para utilizar diferentes fuentes de carbono en su metabolismo, les confiere una resistencia natural a las condiciones ambientales. Crecen fácilmente en los medios habituales para bacterias sin requerimientos nutricionales especiales, formando colonias mucosas, amarillas ó

blanco-grisáceas de 1 a 2 mm de diámetro (imagen 3) [71]. Para el aislamiento directo de cepas clínicas, el uso de medios selectivos como el MacConkey puede ayudar al reconocimiento de estas colonias, si bien es preferible el uso de medios selectivos que impidan el crecimiento de otros microorganismos (imagen 4). Ejemplos de estos medios selectivos son el Herellea agar de Difco [72], con aditivos antibióticos, y el Leeds *Acinetobacter* Medium, útil para la mayoría de genospecies de *Acinetobacter* tanto clínicas como ambientales [70]. EL crecimiento ocurre en un amplio rango de temperaturas, ya que si bien las especies medioambientales prefieren temperaturas de incubación de entre 20 y 30°C, los aislados clínicos crecen normalmente a 37°C, y algunos de ellos incluso a 42°C [70].



Imagen 3. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (placa de agar-sangre).



Imagen 4. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (placa de agar MacConkey).

Como se ha comentado anteriormente las genopecies 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 y 13, son fenotípicamente muy similares y conforman el complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, de fácil identificación en el laboratorio de Microbiología y muy utilizado en la clínica habitual. Sin embargo, la identificación precisa de las genopecies de *Acinetobacter* en muestras clínicas por diferentes métodos, posee gran interés epidemiológico y cada vez se está haciendo más importante y necesaria a la hora de estudiar los mecanismos de transmisión hospitalaria de la infección por *Acinetobacter* [70].

Las técnicas de fenotipaje (biotipaje) son las más extendidas y suelen encontrarse en todos los laboratorios por su sencillez y rapidez. Se basan en la realización de diferentes test bioquímicos y, en general, permiten identificar el género y, de forma presuntiva, la especie [9-11, 73, 74]. Algunos de ellos se encuentran incluidos en paneles comerciales como el API20NE (BioMérieux, France) [75], más extendido en los laboratorios, ó el Mast-ID15 [76], que no alcanzó buenos resultados y no es habitual en la práctica clínica. Estos métodos son en general reproducibles y precisos, pero requieren ser complementados con otros test bioquímicos, como es el test de crecimiento a 44°C para *A. baumannii*, para conseguir su completa identificación [75].

Junto con las técnicas de biotipaje, la determinación del antibiotipo sigue siendo un test útil y fácil, tanto para la práctica clínica como para estudios epidemiológicos [61, 77, 78]. Sin embargo, el biotipaje y el antibiotipo son menos precisos para identificar genopecies comparados con técnicas de biología molecular [42, 45, 79].

Las técnicas de serotipaje y estudio de las proteínas de membrana (perfil proteínico) también han sido utilizadas para la discriminación de las diferentes genopecies y han contribuido al conocimiento del género *Acinetobacter* [12-16]. Entre ellas destacan el serotipaje del lipopolisacárido de membrana [80, 81] y la electroforesis de diferentes enzimas como la malato deshidrogenasa, la glutamato deshidrogenasa, la catalasa y la esterasa [82, 83]. Sin embargo, estos métodos se utilizan menos en la práctica clínica debido al consumo de tiempo y su laboriosidad. Algo similar ocurre con el estudio de los virus bacteriófagos (fagotipaje) que se utiliza tan sólo en estudios experimentales [17, 18].

A pesar de todas estas técnicas, en la actualidad la identificación definitiva de las genopecies de *Acinetobacter* se realiza mediante técnicas de biología molecular, gracias al gran desarrollo de estos procedimientos en los últimos años y a su relativa facilidad

técnica. Los más utilizados son el estudio del ARN ribosómico (ribotipaje), el estudio del ADN ribosómico (análisis de restricción de un fragmento de ADNr 16S amplificado ó ARDRA) y el estudio del ADN cromosómico mediante cuatro técnicas: el estudio del polimorfismo de fragmentos de ADN de restricción (“*restriction fragment length polymorphism*” ó AFLP-RFLP), la electroforesis en campo pulsante de fragmentos de restricción (“*pulsed-field gel electrophoresis*” ó PFGE), la hibridación de ADN (homología de ADN) mediante diferentes técnicas, y las técnicas basadas en la amplificación del ADN mediante PCR, de las cuales las más usadas son el análisis de elementos repetitivos de ADN mediante PCR ó REP-PCR [84] y el análisis de fragmentos arbitrarios mediante PCR ó AP-PCR [21].

Las técnicas de ribotipaje se basan en el análisis y posterior comparación del ARNr, utilizando para ello distintas endonucleasas. Las más usadas son la *EcoRI*, *PvuII*, *SaII* y *ClaI* [19-21]. Han mostrado un alto poder discriminativo en la identificación de genoespecies responsables de brotes nosocomiales, si bien la simplicidad y rapidez de realización de estas técnicas es menor que otras técnicas de biología molecular [21, 85, 86].

El análisis de restricción de un fragmento de ADNr 16S amplificado (*amplified ribosomal DNA restriction analysis* ó ARDRA) también ha sido utilizado para intentar diferenciar las distintas genoespecies responsables de brotes nosocomiales. Como endonucleasas, las más usadas han sido la *AluI*, *CfoI*, *MboI*, *RsaI* y *MspI*, y en los casos en que este panel de 5 endonucleasas no fue capaz de determinar la genoespecie, también se utilizaron la *HaeIII*, *HinfI*, *NciI*, *ScrFI* y *TaqI* [23, 87-89]. Mediante esta técnica se diferenciaron la mayoría de las genoespecies estudiadas excepto seis (las genoespecies 4, 5, 7, 10, 11 y 17). Comparada con las técnicas de hibridación de ADN y la AFLP mostró menor poder discriminativo [23], pero ventajas de la ARDRA son su capacidad para distinguir entre las genoespecies muy relacionadas del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* y la menor tendencia a la contaminación con respecto a la PCR [88].

El AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) se basa en la amplificación selectiva (con *primers* o cebadores radioactivos ó fluorescentes) de determinados fragmentos de restricción de ADN obtenidos mediante dos endonucleasas (las más utilizadas son *HindIII* y *TaqI*) [26, 90]. Posee un alto poder discriminativo para la

diferenciación de genoespecies de *Acinetobacter*, similar a las técnicas de hibridación de ADN [23, 26, 90].

La electroforesis en campo pulsante de fragmentos de restricción del ADN (PFGE) se basa en la obtención de diferentes fragmentos de ADN, identificados mediante electroforesis en gel, tras someter al ADN cromosómico a diferentes enzimas de restricción. Las más utilizadas son la *Apa* I, *Sma* I y *Nhe* I [91-94].

Las técnicas de hibridación ADN-ADN constituyen el patrón para la identificación de genoespecies de *Acinetobacter* y han sido utilizadas con éxito en la determinación de genoespecies responsables de brotes nosocomiales [27, 29, 30, 95, 96]. La REP-PCR utiliza fragmentos repetitivos palindrómicos extragénicos para su amplificación y posterior análisis y se ha demostrado útil en la tipificación epidemiológica de cepas causantes de epidemias nosocomiales [84]. Por último la AP-PCR utiliza iniciadores arbitrarios para la amplificación del ADN y se correlaciona bien con resultados obtenidos con el ribotipaje y otras técnicas de tipaje de cepas [21]. Actualmente estas tres técnicas constituyen las más usadas junto con la AFLP, ARDRA y PFGE [31].

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica en la que la identificación está basada en una matriz de microesferas, que combina un ensayo de extensión de un cebador específico e hibridación con las microesferas [97]. Los autores concluyen que este ensayo tiene una alta especificidad y puede discriminar 13 especies distintas de *Acinetobacter* en menos de 9 horas. Aseguran que este método es muy sensible, detectando cien células de *A. baumannii* por ml de sangre, y pudiendo diferenciar especies clínicas de *Acinetobacter* con una tasa de identificación del 90% [97].

Otras técnicas desarrolladas recientemente para la identificación de *A. baumannii* son la detección del gen *bla*OXA-51 que codifica para una carbapenemasa intrínseca de esta especie, PCR *electrospray ionization mass spectrometry* (PCR-ESI-MS), y una nueva metodología de PCR que analiza las diferencias en los genes *gyrB* permitiendo diferenciar entre *A. baumannii* y la genoespecies 13TU [31].

1.2. Características microbiológicas de *Acinetobacter* spp. de mayor interés en la clínica

Las dos características microbiológicas de mayor interés del género *Acinetobacter* con implicaciones epidemiológicas claves son la facilidad para sobrevivir por períodos prolongados en condiciones ambientales adversas, y la capacidad de desarrollar patrones de multirresistencia frente a diferentes antimicrobianos [49].

1.2.1. Supervivencia en el medio ambiente

Una característica común del género *Acinetobacter* es que se puede encontrar fácilmente tanto en objetos inanimados como en seres vivos, creciendo de hecho en prácticamente el 100% de las muestras del suelo y agua [98]. Se ha aislado de lugares tan diversos como aguas estancadas y de ríos, suelos, establos de diferente ganado, interiores de escuelas y guarderías, alimentos diversos a temperatura ambiente y congelados (leche pasteurizada, carnes envasadas, gambas congeladas, etc.) y aparatos de aire acondicionado o muestras de aire dentro de hospitales [57, 99-101]. En la mayoría de estas superficies inanimadas, tanto secas como húmedas, *Acinetobacter* puede sobrevivir durante días, de manera similar, e incluso más prolongadamente a lo que ocurre con *Staphylococcus aureus* [102-106]. Esta gran resistencia a las condiciones ambientales se debe a su habilidad para utilizar diferentes fuentes de carbono en su metabolismo, ya comentada previamente. Se ha visto que la capacidad de persistir a la desecación depende de la fuente del aislado, ya que cepas clínicas son más resistentes que cepas estándares del *American Type Culture Collection* (ATCC) debido al número de subcultivos que han sufrido estas últimas con el paso del tiempo [104], y que cepas procedentes de fuentes secas sobreviven mejor que las procedentes de fuentes húmedas [106].

También se ha demostrado que *A. baumannii* sobrevive mejor a la desecación que otras especies de *Acinetobacter* [31, 104, 105], lo cual junto a la alta susceptibilidad a los antimicrobianos de las especies de *Acinetobacter* distintas a *A. baumannii*, explica el por qué esta última es la especie mayormente implicada en la aparición de brotes nosocomiales [31]. *A. lwoffii* puede sobrevivir durante 7 días en superficies secas, mientras que *A. baumannii* puede hacerlo durante más de 25 días [103]. Sin embargo, otros bacilos

gramnegativos sólo pueden sobrevivir durante unas pocas horas, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (menos de 24 horas) y de *Escherichia coli* (24 horas) [107].

Esta característica del género conlleva implicaciones epidemiológicas importantes, ya que existen reservorios de esta bacteria en diversos materiales médicos y quirúrgicos.

1.2.2. Desarrollo de resistencias a múltiples antimicrobianos

Inicialmente, las infecciones producidas por *Acinetobacter* spp. en humanos habían sido tratadas eficazmente con los antimicrobianos disponibles, como gentamicina, carbenicilina, ampicilina y minociclina. A finales de la década de los 70 y principios de los 80 aparecieron los primeros trabajos alertando sobre el desarrollo de resistencias en especies de *Acinetobacter* frente a diferentes antimicrobianos [108-112]. A partir de esas fechas, los estudios de susceptibilidad de cepas aisladas en diferentes hospitales constataban el aumento progresivo de cepas resistentes a antimicrobianos usualmente utilizados en el tratamiento de infecciones por bacterias gramnegativas, como eran las aminopenicilinas, ureidopenicilinas y cefalosporinas de segunda y tercera generación, hecho que, evidentemente, constituía un problema importante para el tratamiento de los pacientes con infecciones causadas por estas cepas [59, 78, 110, 112-116]. Además, en la década de los 90, se ha producido un aumento progresivo de las CMIs frente a antimicrobianos que poseían gran actividad y constituían el estándar oro en el tratamiento de infecciones por *Acinetobacter* spp., como carbapenems, aminoglucósidos y quinolonas [89, 117-124]. Al sulbactam, que constituyó durante un tiempo una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones por cepas multirresistentes, tras dos o tres años de uso la mayoría de las cepas han desarrollado resistencias en los hospitales donde se utilizó [125-128]. Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que el perfil de multirresistencia afecta principalmente a aislados de *A. baumannii*, usualmente más resistentes que otras especies de *Acinetobacter* [107], se ha desembocado en la situación actual, en que se observan con frecuencia brotes de infección nosocomial por cepas de *A. baumannii* multirresistentes incluyendo resistencia a carbapenems y sulbactam, siendo en estos casos la colistina la única alternativa terapéutica eficaz [129, 130]. Como cabía esperar, debido al uso cada vez más frecuente de este antimicrobiano y conociendo la biología de *Acinetobacter* [131], en 1998 se comunicó en Taiwán la primera cepa resistente a todos los antimicrobianos

comercialmente disponibles, incluido colistina [132]. Hoy día la aparición de cepas panresistentes sigue aumentando [133-136], siendo necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones producidas por este tipo de aislamientos.

La propensión al desarrollo de resistencias frente a múltiples antimicrobianos se deba probablemente a la ubicuidad de hábitats de *Acinetobacter*, estando expuesto durante toda su evolución a todo tipo de organismos productores de antibióticos naturales que se sabe que existen en los distintos entornos naturales, sobre todo en suelos [49]. De hecho, esta capacidad para adaptarse con prontitud a un medio con elevada presión de antimicrobianos (que no ocurre con otras bacterias oportunistas potenciales), junto con el uso extendido de antimicrobianos en el ámbito hospitalario han sido dos de los cuatro factores, que han contribuido en mayor medida a la difusión de *Acinetobacter* como patógeno nosocomial.

1.3 Especies de *Acinetobacter* de importancia en la clínica

Como ya hemos comentado anteriormente en el punto 1.1.1. de la introducción, la genespecie responsable de la mayoría de los brotes de infección nosocomial hasta la actualidad ha sido *A. baumannii* [49]. Éste será por tanto el microorganismo en el que nos vamos a centrar a partir de ahora, y en el que descansa este trabajo. Ya hemos referido que otras especies de *Acinetobacter* han sido identificadas como causas esporádicas de diferentes infecciones en humanos [50, 53, 55-57, 59-61, 63-67], pero en general son considerados saprofitos ambientales o cutáneos que contaminan las muestras clínicas y la frecuencia de sus aislamientos es mucho menor.

1.4. Factores que han determinado la emergencia de *Acinetobacter baumannii* como causa de infecciones nosocomiales

Son cuatro los factores claves en la difusión y extensión de la epidemia de infecciones nosocomiales por *A. baumannii* [137]:

- a) Adaptabilidad a condiciones ambientales adversas (ya comentado en el apartado anterior).

- b) Capacidad de desarrollo de resistencias a múltiples antimicrobianos, comentada en parte en el apartado anterior; y en la que se profundizará en los distintos mecanismos de resistencia en el punto 2 de esta introducción.
- c) Extensión del uso de antimicrobianos de amplio espectro en el ámbito hospitalario que comentaremos en el apartado 1.6 de epidemiología.
- d) Aumento de potenciales huéspedes susceptibles de adquirir infecciones por *Acinetobacter* spp. que será discutido en el apartado de Patogenia.

1.5. Patogenia y factores de riesgo de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*

1.5.1. Factores de virulencia de *Acinetobacter* spp.

El género *Acinetobacter* se comporta como un patógeno oportunista con escasos factores de virulencia, por lo que generalmente produce colonizaciones de manera más frecuente que las infecciones [138], y cuando las produce lo hace en huéspedes con déficits diversos de la respuesta inmunitaria [1, 49, 139, 140]. Sin embargo, la aparición de neumonías comunitarias fulminantes sugiere que este microorganismo puede ser altamente patógeno y producir infecciones invasivas [141]. Además, es capaz de producir infecciones letales en animales de experimentación inmunocompetentes; así, en un modelo de neumonía experimental por *A. baumannii* en ratón inmunocompetente desarrollado por nuestro grupo, pudimos demostrar que la neumonía fue letal en un 75%-100% de los ratones inoculados [142].

Aunque los mecanismos precisos implicados en el establecimiento y la progresión de las infecciones producidas por *Acinetobacter* no están claros, se han identificado algunos factores de virulencia. Los principales mecanismos de virulencia son:

- a) La presencia del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular y el lípido A, comunes a otras bacterias gramnegativas, que es responsable de producir en modelos experimentales toxicidad letal en ratones y fiebre elevada en conejos [143]. La producción de endotoxina *in vivo* es probablemente la responsable de los síntomas que ocurren durante la sepsis por *Acinetobacter*. El LPS actúa sinérgicamente con los exopolisacáridos capsulares, y se ha visto que está envuelto en la resistencia al

complemento en suero humano. En gramnegativos, el LPS capsular bloquea el acceso del complemento a la pared celular. Aproximadamente un 30% de las cepas de *Acinetobacter* producen exopolisacáridos que se cree que protegen a la bacteria de las defensas del huésped. Estudios experimentales sugieren que cepas productoras de exopolisacáridos son más patógenas que las no productoras [141]. En un modelo en ratón, se ha demostrado que el LPS de *A. baumannii* es el principal componente inmunoestimulador que activa la respuesta inflamatoria durante la neumonía [138].

- b) La producción de distintas enzimas que pueden dañar el tejido graso [144].
- c) La presencia de una cápsula formada por L-rhamnosa, D-glucosa, D-glucuronato y D-manosa, que hace a la superficie más hidrofílica [145, 146].
- d) La adhesividad a células de diferentes epitelios a través de las fimbrias y el polisacárido capsular [146-148].
- e) El *quorum sensing*, es un mecanismo regulador en gramnegativos implicado en importantes funciones bacterianas, tales como formación de biofilm y biosíntesis de enzimas, antibióticos y factores de virulencia extracelulares [149]. En cepas clínicas de *Acinetobacter* se han descrito 4 moléculas señales diferentes de *quorum sensing*. Esto podría estar implicado en un mecanismo de autoinducción de múltiples factores de virulencia [141], y podría ser responsable del control de varios procesos metabólicos, incluyendo la formación de biofilm [138].
- f) La formación de biofilm, que adquiere gran importancia en la supervivencia de *Acinetobacter* en materiales clínicos inertes, favoreciendo la colonización e infección de pacientes. El biofilm es una congregación de células bacterianas rodeada de una matriz extracelular polimérica [150]. *Acinetobacter* es capaz de formar biofilms mediados por *pilus* en cristales y plásticos, constituyendo un nicho para esta bacteria. Los *pili* de la superficie bacteriana interactúan con las células epiteliales humanas, y junto con los glúcidos hidrofóbicos del LPS promueven la adherencia a las células del hospedador en un primer paso para la colonización del paciente [138].

Además, la ya comentada resistencia a las condiciones ambientales que permite a *Acinetobacter* spp. crecer a bajo pH y bajas temperaturas, pudiendo así invadir y sobrevivir en tejidos desvitalizados [98-106], puede estar relacionada con la formación de biofilm.

g) Las proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*, OMPs). En nuestro grupo, hemos visto que existe una citotoxicidad asociada a proteínas de membrana externa de *A. baumannii*, tanto en una cepa de referencia como en una cepa clínica panresistente, que produce muerte celular en células epiteliales pulmonares humanas [151]. Recientemente se ha demostrado que OmpA, una de las OMPs de *A. baumannii*, está asociada con inducción de citotoxicidad [138, 152, 153], ya que se ha visto que *in vitro*, estas proteínas se unen a las células eucarióticas y se translocan al núcleo, produciéndose la muerte celular.

1.5.2. Factores predisponentes del huésped

Numerosos estudios han tratado de describir los factores de riesgo que predisponen para el desarrollo de infecciones por *A. baumannii*. Obviando las infecciones adquiridas en la comunidad (mayoritariamente del tracto respiratorio), y centrándonos en los factores de los enfermos hospitalizados, se han descrito varias variables. Los pacientes con mayor riesgo son los que presentan largas estancias en UCI por haber sido sometidos a procesos quirúrgicos, o aquellos que presenten enfermedad subyacente grave, los cuales conllevan el uso prolongado de catéteres intravenosos, el sondaje urinario, el soporte ventilatorio mecánico prolongado y el uso previo de antimicrobianos [49, 154-156]. Por otro lado, la terapia previa con antibióticos es el factor de riesgo más frecuente implicado en las infecciones por *A. baumannii* multirresistentes, con los carbapenems y las cefalosporinas de tercera generación como los más implicados, seguidos de fluoroquinolonas, aminoglucósidos y metronidazol [154].

1.6. Situación epidemiológica y manifestaciones clínicas más frecuentes de las infecciones por *Acinetobacter* spp.

1.6.1. Reservorios, mecanismos de transmisión y situación epidemiológica de las infecciones por *Acinetobacter*

Como ya hemos comentado, *Acinetobacter* es un germen ubicuo, muy resistente a las condiciones ambientales, con facilidad para sobrevivir durante días en todo tipo de objetos inanimados, suelos, aguas estancadas, vegetales y en seres vivos [98-106, 137].

Dentro del contexto de la atención a los enfermos se ha aislado en material médico y quirúrgico como respiradores mecánicos [157], catéteres de angiografía [158], endoscopios y duodenoscopios [159], líquido de diálisis peritoneal [160], guantes contaminados [161], cuñas y botellas para orinar [162], agujas hipodérmicas reutilizadas [163], plasma concentrado [164]; así como en mobiliario diverso de hospitales como almohadas [165], grifos [166], sábanas [166] y lavabos [167].

El contexto epidemiológico va a influir en gran medida en la presencia en los diferentes lugares del hospital de *Acinetobacter* spp. Así, durante los brotes epidémicos, en las áreas donde se producen aumenta considerablemente la contaminación ambiental, pudiendo aislarse de fomites, mobiliario diverso (teléfonos, pomos de puertas, mesas), material médico no estéril, aire cercano a pacientes colonizados, etc. [101, 103, 157, 162]. Es necesario tener en cuenta de cara a las medidas de control que la contaminación ambiental se produce únicamente en la cercanía de pacientes que están colonizados.

Por otro lado, el ser humano puede actuar como reservorio de *Acinetobacter* spp., ya que en el ser humano sano se ha aislado de múltiples lugares y muestras biológicas como esputo, orina, heces y secreciones vaginales [98]. Sin embargo, es en la piel donde generalmente se encuentra y crece *Acinetobacter*. En estudios clásicos se encontró que hasta un 25% de la población sana es portadora cutánea de *Acinetobacter*, siendo las regiones con mayor humedad (axilas, ingles, plantas de los pies) las más frecuentemente colonizadas [168-170]. En trabajos más recientes, comparando la tasa de colonización cutánea entre pacientes hospitalizados y voluntarios no hospitalizados, se encontraron que un 42,5% [96] y 44% [171] de voluntarios estaban colonizados por *Acinetobacter* spp. Las genoespecies más frecuentemente aisladas fueron *A. lwoffii* (61% de todas), genoespecie 15BJ (12.5%) y *A. radioresistens* (8%); el complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, el más frecuentemente asociado a infecciones nosocomiales, tan sólo se encontró en un individuo [172]. Ocasionalmente también se ha aislado *Acinetobacter* en la cavidad oral y el tracto respiratorio de adultos sanos, pero la tasa de portadores no hospitalizados en estas localizaciones es baja [168, 172-174]. Sin embargo, en pacientes hospitalizados la tasa de colonización es mucho mayor, aislándose con más frecuencia en la cavidad orofaríngea y el tracto respiratorio en pacientes sometidos a ventilación mecánica [101, 175, 176], traqueostomas [168] y en el tracto gastrointestinal, habiéndose postulado que este último lugar podría constituir un reservorio persistente de cepas multirresistentes [177-179]. En situaciones de brotes epidémicos estas tasas son incluso más elevadas, por lo que con

pacientes hospitalizados con colonización ó infección por *Acinetobacter* spp. las medidas preventivas para evitar la extensión a otros pacientes deben encaminarse al aislamiento de contacto de los pacientes colonizados y al cumplimiento escrupuloso por parte del personal sanitario de las medidas higiénicas universales en el cuidado de los enfermos (lavado de manos, uso de guantes desechables...). La aplicación de estas medidas de control, aunque no erradiquen *A. baumannii*, consiguen reducir las tasas de colonización/infección. Así, en un estudio realizado por Rodríguez-Baño *et al.*, en una situación de endemia de varios años de evolución, se redujo en cinco veces la incidencia de bacteriemia [178].

Estas medidas son tan importantes porque es conocido que el principal mecanismo de transmisión de *Acinetobacter* spp. está en las manos del personal sanitario que se contamina al entrar en contacto con un paciente colonizado y sirve de transmisor del microorganismo a otros pacientes [49, 137, 175, 176]. Otro mecanismo de transmisión frecuentemente encontrado en brotes, en los que inicialmente pasó desapercibido, lo constituyeron aparatos ó instrumentos médicos y fomites que se utilizaban para varios pacientes, como ponen de manifiesto varios brotes descritos asociados a defectos en la descontaminación de material para soporte respiratorio [180-183]. Esporádicamente se han descrito otros mecanismos de transmisión, como líquido de diálisis peritoneal [160] ó de agujas deficientemente esterilizadas utilizadas para la administración intratecal de metotrexate a pacientes con leucemia [163].

La situación epidemiológica actual de las infecciones por *A. baumannii* destaca por la continua aparición de brotes nosocomiales en diferentes lugares, por la aparición en los últimos años de un patrón epidemiológico de endemia en algunos de los centros implicados que dificulta su control y erradicación, y por la emergencia de cepas multirresistentes en aislamientos clínicos. Las características de los brotes varían dependiendo de las condiciones del hospital (si hay una o múltiples fuentes), y de las características de la cepa, ya que se ha visto que hay cepas con una mayor tendencia a la propagación de la endemia que otras [138]. Cepas muy similares pero no relacionadas epidemiológicamente han sido aisladas de lugares distintos en tiempos diferentes. Estos clones son por lo general resistentes a los antibióticos, estables genéticamente y con alta capacidad para sobrevivir en medios hospitalarios; su propagación podría estar relacionada a bajos niveles con el intercambio de pacientes entre hospitales o por su presencia en la comunidad, y ocasionalmente difundirse entre los centros hospitalarios debido a la presión antibiótica selectiva [138]. Los clones denominados I y II son los principales responsables

de brotes en los hospitales en el noroeste de Europa. Sin embargo, el clon I también ha sido aislado en España, Sudáfrica, Polonia e Italia, mientras que el clon II también se ha identificado en España, Portugal, Sudáfrica, Francia, Grecia y Turquía. Por otra parte, el clon III ha sido principalmente aislado en Francia, Bélgica, Países Bajos, Italia y España [184, 185].

Hemos explicado anteriormente que los pacientes colonizados son un importante reservorio de *A. baumannii*; normalmente, una cepa epidémica es introducida en los hospitales a través de un paciente colonizado, y posteriormente transmitida a otros pacientes o al medio [186]. Aunque esporádicamente puede propagarse mediante el aire en forma de aerosol, hemos referenciado ya que la principal vía de transmisión son las manos del personal sanitario [138]. Una colonización inicial puede progresar a infección cuando la bacteria sobrepasa la barrera epitelial [137]; por lo general, será causa de infecciones leves o graves, aunque en algunos casos puede ser fatal. La gravedad de la infección dependerá del sitio de infección y de la vulnerabilidad del paciente a dicha infección [141].

El control de los brotes requiere de un trabajo coordinado en el que se ha de implicar todo el centro sanitario. El control pasa por realizar bien: 1) la identificación precoz de los pacientes colonizados/infectados por *A. baumannii*; 2) el aislamiento de contacto de pacientes colonizados; 3) el cumplimiento de las normas de higiene universales por parte del personal sanitario; 4) y políticas racionales de uso de antimicrobianos [137, 187].

1.6.2. Manifestaciones clínicas más frecuentes

Acinetobacter es un microorganismo ubicuo que coloniza con frecuencia diferentes lugares del organismo tanto en pacientes hospitalizados como en individuos sanos y su aislamiento, por ejemplo, en esputo, orina, frotis de heridas ó quemaduras no siempre es sinónimo de infección. Es, por tanto, fundamental en estos casos una valoración clínica correcta de cara a evitar tratamientos y posibles yatrogenias innecesarios. Sin embargo, como ocurre con todos los demás microorganismos, el aislamiento de *Acinetobacter* en muestras de líquidos biológicos ó tejidos estériles (biopsias, sangre, LCR, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido articular...) conlleva siempre un significado patológico.

A. baumannii puede causar infecciones en cualquier sistema del organismo, en particular cuando éste se ve sometido a determinadas maniobras invasivas que provocan una disrupción de los mecanismos y barreras de defensa naturales. Esporádicamente se han descrito como causa de infecciones comunitarias afectando sobre todo al tracto respiratorio [188-190], aunque cada vez este tipo de infecciones se presentan con más frecuencia, y la mortalidad atribuida es del 40 al 60% [191]. Nos centraremos en comentar las características generales de las diferentes infecciones de adquisición nosocomial, que son las más frecuentemente asociadas a este microorganismo.

1.6.2.1. Tracto respiratorio

Las infecciones del tracto respiratorio, y en concreto la neumonía y la traqueobronquitis, son las infecciones nosocomiales que con mayor frecuencia produce *A. baumannii* [1, 31, 192]. Se ha referido en diferentes estudios que *A. baumannii* constituyó la causa de entre un 3-5% de todas las neumonías nosocomiales [193, 194]. En enfermos ingresados en UCI con requerimientos de ventilación mecánica, sin embargo, *A. baumannii* fue la causa del 5-10% de todas las neumonías incluidas en unos estudios [195] y del 15-24% en otros [155, 196]. Igualmente, en otro trabajo se estudiaron 48 pacientes con ventilación mecánica en los que se sospechaba neumonía, siendo los microorganismos que se aislaron más comúnmente *A. baumannii* (27%), *S. aureus* (24%), *Stenotrophomonas maltophilia* (15%) y *P. aeruginosa* (10%) [197].

Los pacientes ingresados en UCI y con necesidad de ventilación mecánica son el grupo de mayor riesgo para el desarrollo de neumonía por *A. baumannii* [49, 197]. También presentan alto riesgo los pacientes ingresados portadores de traqueostoma por la elevada tasa de colonización del tracto respiratorio superior por *A. baumannii* de los mismos y la propensión para la aspiración de secreciones altas [172]. Otros factores de riesgo como ya se han comentado son el uso de antibioterapia previa, cirugía previa y enfermedad pulmonar crónica subyacente [31].

La neumonía nosocomial por *A. baumannii* suele ser multilobar y puede desarrollar derrame pleural, cavitación y fístulas broncopleurales. Se acompaña de bacteriemia en el 12% de los casos. La neumonía constituye el foco clínico más frecuentemente asociado a la bacteriemia por *A. baumannii* [186]. La mortalidad cruda de

la neumonía nosocomial por *A. baumannii* es muy elevada, (entre el 30% y el 70%) [198, 199]. Por tanto, el pronóstico es sensiblemente peor que el asociado a otros bacilos gramnegativos nosocomiales a excepción de *P. aeruginosa*. En un estudio prospectivo en el que se incluyeron pacientes con neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica diagnosticada mediante cepillo telescópico ocluido, la mortalidad asociada a *Pseudomonas* ó *Acinetobacter* fue significativamente superior (75% contra 55%) a la asociada a otros microorganismos [200]. Sin embargo, dada la situación de gravedad en que se encuentran en general los pacientes que requieren ventilación mecánica, a pesar de los resultados de estos trabajos, resulta difícil establecer si verdaderamente estos pacientes fallecen a causa de la neumonía por *A. baumannii* ó por su estado crítico debido a su(s) patología(s) concomitante(s). En revisiones recientes, se ha visto que la mortalidad atribuible en hospitales es del 8 al 23% [201], y en pacientes ingresados en UCI es del 10 al 46% [202]. Aunque la mayoría de los estudios no demuestran diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad casos y controles, se asume que la patología de *A. baumannii* es tan importante como otros microorganismos. En este sentido, Garnacho *et al.* estudiaron en 2003 el impacto clínico de las neumonías causadas por *A. baumannii* en pacientes intubados [198]. Observaron que 24 de los 60 pacientes fallecieron, representando así una mortalidad del 40%, mientras que en los pacientes controles la mortalidad fue del 28,3%.

Por tanto, la neumonía es la infección nosocomial que *A. baumannii* causa más frecuentemente, siendo los enfermos con mayor riesgo aquellos ingresados en UCI que requieren ventilación mecánica [155]. La neumonía nosocomial por *A. baumannii* conlleva un mal pronóstico, con una mortalidad atribuible en torno al 40%.

1.6.2.2. Bacteriemia

La bacteriemia constituye la segunda infección nosocomial en frecuencia producida por *A. baumannii* [49]. El foco causante de la bacteriemia es en la mayoría de los casos una infección del tracto respiratorio, seguida en frecuencia por la infección de catéteres intravenosos [86, 203]; otros focos menos frecuentes son las infecciones del tracto urinario, infecciones de piel y tejidos blandos, de herida quirúrgica, quemaduras, e infecciones intraabdominales [86, 203], pero hasta en el 44% de los episodios, el origen de la bacteriemia es desconocido [137]. Los grupos de mayor riesgo para el desarrollo de

bacteriemia son los enfermos graves (con patologías médicas, traumáticas ó grandes quemaduras) ingresados en UCI, sometidos a ventilación mecánica, con catéteres vasculares [86, 186, 203, 204]. Otro grupo de riesgo menos frecuente son los recién nacidos ingresados en unidades de UCI neonatológica [180, 199, 205].

Característicamente y, a diferencia de los brotes, las bacteriemias producidas en situaciones de endemia por *A. baumannii* son policlonales. Así, en un análisis de 67 casos consecutivos de bacteriemia mediante REP-PCR (digestión de ADN cromosómico con enzimas de baja frecuencia de corte) se comprobó que estaban causados por seis genotipos distintos de *A. baumannii*, cinco distribuidos a lo largo del periodo de estudio y el restante en forma epidémica durante los 6 primeros meses [206].

Infecciones polimicrobianas también son frecuentes, llegándose a sugerir que la sinergia bacteriana es importante en los casos de bacteriemia [141]. Esto dificulta determinar la verdadera mortalidad atribuible a *A. baumannii* [186]. A pesar de ello, en un trabajo reciente con 24179 casos analizados de bacteriemias en hospitales de Estados Unidos, *A. baumannii* fue el décimo patógeno más usual con un 1,3% de incidencia, siendo mayor en UCI (1,6%, con una mortalidad del 34 al 43,4%) que en pacientes sin necesidad de cuidados intensivos (0,9%, con una mortalidad del 16,3%), y presentando la tercera mortalidad cruda más importante tras *P. aeruginosa* y *Candida* spp. [207].

Por tanto, la bacteriemia nosocomial por *A. baumannii* es la infección que se asocia a este microorganismo más frecuentemente después de la neumonía. Se produce en pacientes con enfermedades de base debilitantes y disrupción de barreras naturales (ventilación mecánica, cirugía, catéteres intravenosos, quemaduras). Su adquisición se produce con mayor frecuencia en áreas de UCI y quemados. Los focos de origen más frecuentes de la bacteriemia en la mayoría de los trabajos los constituyen en orden decreciente el tracto respiratorio, los catéteres intravasculares, las heridas quirúrgicas, quemaduras y el tracto urinario; sin embargo, en un porcentaje elevado el foco queda sin identificar; igualmente, en un porcentaje entre el 19-34% la bacteriemia es polimicrobiana. La mortalidad asociada a esta infección es en general elevada (25-34%), siendo factores predictores de la misma el tipo de enfermedad de base y nivel de gravedad, la presencia de un foco respiratorio (neumonía) como causa de la bacteriemia, la instauración de un tratamiento antimicrobiano inadecuado y la presentación clínica como sepsis grave o shock séptico.

1.6.2.3. Aparato urinario

El aislamiento de *A. baumannii* en orina no siempre es sinónimo de infección activa, pues en muchas ocasiones puede colonizar la uretra terminal de los pacientes sondados [208]. Las infecciones urinarias nosocomiales por *A. baumannii* son infrecuentes, al contrario de lo que ocurre con otros bacilos gramnegativos, como vemos en un trabajo en el que atribuyen a *A. baumannii* el 1,6% de las infecciones urinarias nosocomiales en áreas de hospitalización [195]. Suelen ocurrir en pacientes de edad avanzada, con enfermedades debilitantes y catéter urinario permanente. Ocurre con mucha mayor frecuencia en varones (80% de los casos) probablemente en relación con una prevalencia superior de sondaje urinario en esta población secundaria a la hiperplasia prostática [209].

1.6.2.4. Sistema nervioso central

La infección del sistema nervioso central que produce *A. baumannii* con mayor frecuencia es la meningitis aguda. Clásicamente se describían casos esporádicos de meningitis piógena comunitaria por este microorganismo y constituía una etiología infrecuente de las mismas [66]. Sin embargo, en la actualidad, la mayoría de las meningitis producidas por *A. baumannii* son de adquisición nosocomial, desarrollándose tras procedimientos neuroquirúrgicos (craniotomía, derivaciones ventrículo-peritoneales, ventriculares externas, lumbares...), traumatismos craneoencefálicos [49, 86, 126, 182, 210-214], catéteres intraventriculares y fístula de LCR [215], aunque ocasionalmente se han descrito meningitis espontáneas [216].

La clínica predominante consiste en fiebre y cefalea junto con datos de infección del SNC (deterioro del nivel de conciencia, convulsiones, rigidez de nuca) que se producen en un porcentaje variable de los pacientes. Las características del líquido cefalorraquídeo son las propias de una meningitis piógena y, además, en un porcentaje que varía entre el 30 y 64% de pacientes se puede recuperar *A. baumannii* en hemocultivos. La mortalidad asociada a la meningitis por *A. baumannii* oscila en torno al 25% [126, 212, 215, 216], aunque existen trabajos más recientes que refieren una mortalidad de más del 70% de los pacientes [217], debido en parte a que las cepas productoras que se están seleccionando son cepas multirresistentes [218, 219].

1.6.2.5. Otras localizaciones

Como hemos comentado anteriormente *A. baumannii* puede producir infecciones supuradas en cualquier órgano y sistema del organismo siempre que se produzca una disrupción de las barreras naturales que aíslan al órgano en cuestión del exterior. Los mecanismos que provocan esta interrupción de las barreras naturales son variados y en el caso de *A. baumannii* suelen estar en relación con maniobras diagnósticas, de monitorización ó terapéuticas invasivas que se llevan a cabo en pacientes hospitalizados. Otras infecciones asociadas a *A. baumannii* menos frecuentes son:

- Endocarditis

La endocarditis por *Acinetobacter* spp. es rara a pesar de la elevada frecuencia con que produce bacteriemia. Se han referido casos producidos tanto en pacientes con válvulas nativas sanas ó previamente enfermas y en pacientes portadores de prótesis valvulares [50, 67, 68, 220-224], siendo el curso de la enfermedad más agresivo sobre válvulas nativas que sobre prótesis valvulares. Con tratamiento antimicrobiano correcto la mayoría de los casos curan sin necesidad de recurrir a la cirugía.

- Peritonitis

La peritonitis por *Acinetobacter* es una infección muy poco frecuente. La mayor parte de los casos ocurre en pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal crónica ambulatoria (DPCA). Los primeros casos de esta entidad se comunicaron a finales de la década de 1970 [65, 225] y posteriormente en algunas series *Acinetobacter* spp. ha provocado hasta el 14,3% de las peritonitis en DPCA [160]. La mayoría de los pacientes respondieron adecuadamente al tratamiento antimicrobiano sin necesidad de interrumpir la DPCA [225-227]. Existen pocos datos sobre el tratamiento en esta situación clínica. En un paciente descrito por Sarria *et al.* [228] en 2004, un varón con sepsis por *A. baumannii* y fracaso renal agudo, que requería hemodiálisis crónica, curó con polimixina B intravenosa.

- Infecciones de piel, partes blandas y herida quirúrgica

Las infecciones de piel y partes blandas por *A. baumannii* se han descrito en relación con heridas traumáticas ó quirúrgicas pudiendo estar implicado como único microorganismo causal ó formando parte de flora mixta junto con otros bacilos gramnegativos, *Streptococcus* spp. y anaerobios [229, 230]. También puede causar celulitis

y tromboflebitis superficial en la inserción de catéteres intravenosos. Estas infecciones son en su mayoría nosocomiales y raramente se han descrito de adquisición comunitaria [231].

Las quemaduras también suponen un sustrato relativamente frecuente de infección por *A. baumannii*, sobre todo en grandes superficies quemadas en pacientes ingresados durante largos períodos de tiempo en unidades de grandes quemados [232-234]. En estos lugares puede actuar como mero colonizador ó causar verdaderas infecciones supuradas acompañadas de bacteriemia. En algunos lugares *Acinetobacter* es el microorganismo más frecuentemente aislado [232], o el segundo más frecuente después de *S. aureus* [235], mientras que en otros centros supone tan sólo un 1,1% de los aislamientos de quemaduras [236].

Recientemente este tipo de infecciones han tenido un gran revuelo mediático debido a que se ha aislado a *A. baumannii* como infectante de heridos de guerra, con brotes en hospitales de campaña en Iraq y Afganistán [237-241].

- Otras infecciones

Podemos citar otras localizaciones de infecciones causadas ocasionalmente por *Acinetobacter* spp. como colangitis supurada tras realización de colangiografía transparietohepática y colocación de drenaje biliar externo [242], tiflitis tras trasplante autólogo de médula ósea [243], osteomielitis y artritis séptica asociada a heridas traumáticas de extremidades [244], abscesos hepáticos y pancreáticos [1] e infecciones oculares como conjuntivitis [245], queratitis por contaminación de lentes de contacto [246], endoftalmitis [247] ó tras traumatismos oculares penetrantes [64, 248, 249].

2. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *A. BAUMANNII*: PERSPECTIVA HISTÓRICA Y PRINCIPALES MECANISMOS

2.1. Perspectiva histórica del desarrollo de resistencias en *Acinetobacter baumannii*

Como se ha referido anteriormente, los primeros indicios sobre el desarrollo de resistencia a antimicrobianos de *Acinetobacter* se produjeron a finales de la década de los 70 y principio de los 80. Durante la década de los 80, varios trabajos evaluaron las sensibilidades de aislamientos de *Acinetobacter* spp. [78, 250, 251], viendo como progresivamente, a lo largo de estos años, los aislamientos de *A. baumannii* fueron desarrollando resistencias en grado variable a betalactámicos diversos (amino- y ureidopenicilinas, cefalosporinas), aminoglucósidos y quinolonas, conservando de forma casi universal la sensibilidad a imipenem. Así Seifert *et al.* [252] en un estudio de 180 cepas de hospitales alemanes en 1992 encontró unas sensibilidades del 100% para imipenem, 70% para ceftazidima, 46% para aztreonam, 42% para amikacina, 17% para ciprofloxacino y 13% y 11% para tobramicina y gentamicina, respectivamente.

En 1993 comienzan a describirse brotes de infecciones nosocomiales por cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemes. Urban *et al.* [253] describieron 20 pacientes con infecciones por *A. baumannii* que únicamente conservaba sensibilidad *in vitro* frente a polimixinas, ampicilina/sulbactam y sulbactam, mientras que Gerner-Smidt *et al.*, en un trabajo multicéntrico en Dinamarca, en el que estudiaron las sensibilidades de 112 aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp., encontraron que el 100% de las cepas eran sensibles a imipenem [61]. Los años siguientes se caracterizaron por un aumento progresivo de las resistencias a betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos en los aislamientos de diferentes centros. Con respecto a carbapenemes, la situación variaba mucho de un centro a otro en función del uso autóctono de antimicrobianos. Prueba de esto son los trabajos en los que se encontraban centros con cepas 100% sensibles a imipenem [205, 254, 255], pero con aumento en las resistencias a otros betalactámicos (sobre todo cefalosporinas), quinolonas (ciprofloxacino) y aminoglucósidos, intercalados con estudios de centros en los que la sensibilidad a carbapenems era nula y conservaban sensibilidad exclusivamente a sulbactam y polimixina B [120]. En los años siguientes el patrón de sensibilidades de *A. baumannii* continuó de la misma manera, caracterizado por el mantenimiento de sensibilidad frente a carbapenems en la mayoría de las cepas de centros

en que el uso de estos antimicrobianos se restringió, y un desarrollo progresivo de resistencias a carbapenemes en otros centros con un uso más expandido de estos agentes. En 1999 y 2000 se produjo una extensión por distintos centros de cepas resistentes a carbapenemes por adquisición de carbapenemasas plasmídicas [118, 123, 256, 257]. En un estudio multicéntrico en Nueva York en el que evaluaron la prevalencia de cepas de *A. baumannii* multirresistentes [131], encontraron una elevada endemia de aislamientos resistentes a carbapenemes, demostrando por estudios moleculares transmisión interhospitalaria de estas cepas. También demostraron una clara relación directa entre el mayor uso de antimicrobianos (definido por la dosis diaria por 1000 pacientes-día) y la resistencia a carbapenemes. Los datos de sensibilidad de 233 cepas fueron: polimixina B 99%, amikacina 87%, doxiciclina 77%, imipenem y meropenem 50%, ampicilina/sulbactam 47%, gentamicina 30% y en torno a 25% para piperacilina/tazobactam, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacino y trovafloxacino. En este estudio aislaron tres cepas panresistentes (incluyendo sulbactam y polimixina B), lo que hacía preveer que el uso extendido de este antimicrobiano en infecciones por *A. baumannii* multirresistente haría que la resistencia a polimixina B aumentara en el futuro.

En los últimos años se ha seguido demostrando la extraordinaria rapidez y capacidad de *A. baumannii* para desarrollar resistencias a los antimicrobianos. Los patrones de sensibilidad a antimicrobianos son diferentes entre los distintos hospitales. A modo de ejemplo de nuestro ámbito geográfico, en un trabajo de nuestro grupo de investigación [206] se incluyeron 69 cepas aisladas de bacteriemias, entre las cuales se identificaron 6 clones, agrupándose la mayoría de las cepas en 2 de ellos, con 22 y 27 cepas cada uno, con las siguientes susceptibilidades: imipenem, 40,9% y 33,3%; sulbactam, 43,75% y 73,68%; ceftazidima, 0% y 33,3%; amikacina, 13,63% y 25,92%; y tobramicina: 4,54% y 14,81%; todas las cepas eran sensibles a colistina.

En la última década, *A. baumannii* se ha convertido en un patógeno nosocomial multirresistente, con un patrón de resistencia que incluye con frecuencia a todos los antimicrobianos, con la excepción de colistina. Como era previsible, el cada vez más frecuente uso de colistina, única alternativa terapéutica frente a estas infecciones, y la escala de resistencias que hemos comentado, ha hecho aumentar el número de aislados panresistentes de *A. baumannii*, comunicándose en varios trabajos cepas resistentes a todos los antimicrobianos comercialmente disponibles [133-135, 258, 259]. Estos datos son muy

preocupantes porque las posibilidades terapéuticas actuales se reducen hasta casi desaparecer.

2.2. Principales mecanismos de resistencia antibiótica en *Acinetobacter baumannii*

Una bacteria se considera resistente cuando no puede ser eliminada con niveles terapéuticos de un antibiótico [260]. La resistencia bacteriana puede ser intrínseca, y se denomina así cuando la bacteria la posee de forma natural debido a su propia biología, y suelen ser mecanismos de impermeabilidad celular y de expulsión. También puede ser adquirida, y es cuando una bacteria previamente sensible se hace resistente a través de una mutación o adquiriendo ADN exógeno. La ya comentada facilidad para sobrevivir en el medio y el que el ser humano sea reservorio de *Acinetobacter* favorece la transferencia de resistencias desde otros microorganismos, además de que las resistencias suelen formar parte de elementos genéticos móviles tales como plásmidos, transposones e integrones [114, 261, 262].

La resistencia antibiótica de *A. baumannii* está mediada por todos los principales mecanismos de resistencia conocidos en bacterias, como son la disminución de la concentración intracelular de antibiótico (bien por menor permeabilidad o bien por expulsión activa), inactivación o modificación del agente antimicrobiano y modificación del sitio activo del antibiótico [139, 263, 264].

2.2.1. Cambios en la permeabilidad de membrana

La membrana externa es una bicapa lipídica con baja permeabilidad por los compuestos hidrofílicos. La de los no fermentadores es de 10 a 100 veces más impermeable que la de *E. coli* [265]. En *A. baumannii*, la baja permeabilidad de su membrana externa es una de las características de su resistencia intrínseca a los antibióticos [266]. Para facilitar el intercambio de solutos entre el exterior y el interior celular, la membrana externa bacteriana presenta porinas, que además pueden actuar de diana para la adhesión a otras células o de unión de compuestos bactericidas a la superficie de los bacilos gramnegativos. Variaciones en las estructuras o en la expresión de estas porinas son estrategias para sobrevivir en presencia de antibióticos. Poco sabemos de las

proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*, OMPs) de *A. baumannii*, y de la permeabilidad de su membrana [263], aunque se han descrito algunas OMPs:

- HMP-AB (*Heat-Modifiable Protein*), la principal OMP de *Acinetobacter* [267], homóloga a la OMP A de las enterobacterias y a la OMP F de *P. aeruginosa*, parece servir como proteína de anclaje a la capa de peptidoglicano. Pertenece a la familia de las OmpA, que permiten la difusión de azúcares y betalactámicos. Esta proteína contribuye a los altos niveles de resistencia intrínseca [263].
- OmpA, descrita homológamente para varias especies de *Acinetobacter*, parece ser un emulgente con importantes funciones en la patogénesis, *quorum sensing* y formación de biofilm, regulando la adhesión a diferentes superficies [263, 268].
- Proteína de 33-36 kDa, con características propias de porinas de bacilos gramnegativos, su pérdida está implicada en la resistencia a carbapenems [269, 270].
- Proteína de 29 kDa, denominada CarO, también implicada en la resistencia a carbapenems. No presenta sitio de unión a imipenem, por lo que parece ser una porina inespecífica. Suele estar unida a una proteína de 25 kDa (Omp25) formando una conformación de barril- β , aunque se ha visto que CarO por sí sola es capaz de formar poros [263, 271].
- Proteína de 43 kDa, homóloga a la OprD de *P. aeruginosa*, implicada en el trasvase de aminoácidos básicos, pequeños péptidos, imipenem y meropenem, por lo que parece ser que en *Acinetobacter* puede funcionar como canal específico de carbapenems [263, 272].
- OmpW, similar a las OmpW de *E. coli* y *P. aeruginosa*. En *Acinetobacter* no se conoce bien su función aunque podría estar implicada en la resistencia a colistina y a ceftriaxona [263].

2.2.2. Sistemas de expulsión activa

Los transportadores de eflujo ó bombas de expulsión protegen a las células de los compuestos tóxicos, haciendo disminuir su concentración en el interior celular. Las bacterias sobreexpresan estos transportadores en presencia de antibióticos, y en sinergia

con la baja expresión de proteínas de membrana dan lugar a resistencias a los mismos, siendo los más comunes los macrólidos, tetraciclinas y quinolonas.

Las bombas de expulsión de antimicrobianos, encontradas en *Acinetobacter* y resumidas en la tabla 2, han sido [263, 273]:

- Miembros de la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Son exportadoras dependientes de flujo de protones, y no suelen ser de amplio espectro, sino específicas de algunos antimicrobianos. Las más estudiadas son TetA (implicada en resistencia a tetraciclina) y TetB (resistencia a tetraciclina y minociclina). Estas bombas no afectan a las nueva gliciliclinas, como la tigeciclina. También se han encontrado en *Acinetobacter* bombas de este tipo relacionadas con la resistencia a cloranfenicol, como son la CmlA, y la recientemente caracterizada CraA [274].
- Miembros de la familia RND (*Resistance-Nodulation-Division*). Al igual que las de la familia MFS, también utilizan para el flujo la fuerza protón-motriz. La más común es la bomba AdeABC, cuya sobreexpresión confiere resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclinas y bromuro de etidio. Además, AdeB puede conferir por sí sola resistencia a fluoroquinolonas. Reseñar que AdeABC es una bomba donde interactúan tres componentes para expulsar al tóxico a través de las membranas interna y externa bacteriana sin que se acumule en el citoplasma: una proteína de fusión de membrana (AdeA), un transportador (AdeB) y una OMP (AdeC). Con la misma conformación de tres componentes, se ha descrito recientemente otra bomba de esta familia, la AdeIJK, implicada en resistencias a cloranfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol, y con posibles interacciones con betalactámicos, tetraciclina, eritromicina, lincosamidas, fluoroquinolonas, ácido fusídico, novobiocina, y rifampicina. AdeABC y AdeIJK pueden contribuir de manera aditiva a resistencia a la tigeciclina [275]. Sin embargo, también se ha sugerido que su hiperproducción puede ser tóxica para *A. baumannii* y *E. coli*. Más actual aún es la descripción de un tercer sistema de expulsión de esta familia RND, como es la bomba AdeFGH [276], presente en mutantes seleccionados en laboratorio en presencia de cloranfenicol y norfloxacin. Esta bomba confiere resistencias a fluoroquinolonas, tigeciclina y otras tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, y sondas como el bromuro de etidio y la O safranina.

- Miembros de la familia MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*). Aunque se asocian con el uso de la fuerza protón-motriz y por gradiente de Na⁺ para expulsar tóxicos al exterior celular, hacen uso de la fuerza protón-motriz para expulsar los antimicrobianos. En *A. baumannii* se ha descrito AbeM, que presenta homologías con otras bombas descritas en organismos como *P. aeruginosa* (PmpM), *Vibrio parahaemolyticus* (VcmA), *E. coli* (YdhE) y *Haemophilus influenzae* (HmrH). Tiene descritas resistencias a norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, gentamicina, 40,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), triclosan, acriflavina, daunorubicina, doxorubicina, rodamina 6G y bromuro de etidio.
- Miembros de la familia SMR (*Small Multidrug Resistance*). Recientemente descrita, AbeS es una proteína bacteriana integral de membrana, que se ha visto que disminuye la actividad de quinolonas, macrólidos y cloranfenicol [277].

Tabla 2. Bombas de expulsión descritas en *Acinetobacter baumannii* y antibióticos sobre los que actúan.

Bomba de expulsión	Familia	Antibióticos
TetA	MFS	Tetraciclina
TetB		Tetraciclina y minociclina
CmlA		Cloranfenicol
CraA		Cloranfenicol
AdeABC	RND	Aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclinas y bromuro de etidio. Baja resistencia a fluoroquinolonas
AdeIJK		Cloranfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol
AdeFGH		Fluoroquinolonas, tigeciclina, cloranfenicol, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, bromuro de etidio y O safranina.
AbeM	MATE	Norfloxacinó, ofloxacinó, ciprofloxacino, gentamicina, 40,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), triclosan, acriflavina, daunorubicina, doxorubicina, rodamina 6G y bromuro de etidio
AbeS	SMR	Quinolonas, macrólidos y cloranfenicol

MFS (*Mayor Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance-Nodulation-Division*), MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*), SMR (*Small Multidrug Resistance*).

2.2.3. Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos antes de que éstos lleguen al sitio de unión (PBPs, *Penicillin Binding Proteins*) [138]. En *A. baumannii* se han descrito betalactamasas cromosómicas o intrínsecas, o bien adquiridas mediante transformación natural o conjugación plasmídica. Elementos genéticos como los transposones y los integrones tienen un papel primordial en la diseminación de estos mecanismos genéticos de resistencia [278].

Según la clasificación de Ambler, las betalactamasas se clasifican dependiendo de su secuencia de nucleótidos en cuatro clases, de la A a la D (tabla 3). Las clases A, C y D presentan en su sitio activo una serina, mientras que las de clase B ó metalo-betalactamasas, presentan generalmente cuatro átomos de zinc [279]:

- Betalactamasas de clase A.

Betalactamasas de espectro reducido, que fueron las primeras en aislarse, y son principalmente activas frente a bencilpenicilinas. En esta clase están la TEM-1 y TEM-2 (activas frente a aminopenicilinas), la SCO-1 (activa frente a penicilinas) y la CARB-5 (activa frente a carboxipenicilinas) [138].

Betalactamasas de amplio espectro (ESBL, *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) [50]. Estas enzimas además de en benzilpenicilinas, actúan sobre cefalosporinas y monobactam. En *Acinetobacter* han sido aisladas varias enzimas de espectro extendido, VEB-1, VEB-2, PER-1, PER-2, TEM-92, TEM-116, SHV-5, SHV-12, CTX-M-1 y CTX-M-2 [263, 273].

- Betalactamasas de clase B.

Denominadas también metalo-betalactamasas (MBLs), se caracterizan por presentar un ión metálico (normalmente zinc) en su sitio activo, y pueden inactivar penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. En *Acinetobacter* se han identificado tres tipos de estas enzimas, IMP (de IMP-1 a IMP-6, IMP-11), VIM (VIM-1 y VIM-2) y SIM (SIM-1) [273, 279, 280].

- Betalactamasas de clase C.

Las enzimas pertenecientes a esta clase son cefalosporinasas codificadas cromosómicamente, comunes a todas las cepas de *A. baumannii*. Estas enzimas hidrolizan

penicilinas y cefalosporinas, pero no cefepima o carbapenems. Análisis filogenéticos sugieren que los genes que codifican para estas enzimas (*bla* genes) presentan un predecesor común, y se ha propuesto clasificarlos como una familia distinta de betalactamasas denominada *Acinetobacter-derived cephalosporinases* (ADCs). En *A. baumannii* se han identificado 28 genes *bla*ADC [278]. Estos genes se expresan generalmente a bajos niveles, aunque pueden ser activados por la presencia de un promotor anterior al gen. Las secuencias de inserción (*insertion sequences*, IS) son pequeños elementos genéticos móviles con organización simple capaces de insertarse por sí mismos en múltiple sitios de una molécula diana. Pueden producir mutaciones como resultado de su traslocación, pero también activar la expresión de genes adyacentes. En *A. baumannii*, la presencia de la secuencia IS*Aba1* delante de los genes cromosómicos *bla*ADC conllevan la sobreexpresión de las betalactamasas tipo ADC. Estos elementos de inserción sirven de detonante para la expresión de estos genes [138, 281].

- Betalactamasas de clase D.

Son las carbapenemasas más prevalentes en *Acinetobacter* spp., denominadas también betalactamasas de clase D hidrolizadoras de carbapenems (*carbapenemhydrolysing class D β -lactamases*, CHDLs). Se dividen en cuatro subgrupos filogenéticos: el subgrupo 1 (OXA-23-like) contiene las OXA-23, -27 y -49; el subgrupo 2 (OXA-24-like) con las OXA-24, -25, -26 y -40, con un 60% de los aminoácidos similares a los del subgrupo 1; el subgrupo 3, con las variantes de la OXA-51, intrínsecas en *A. baumannii*, con un 56% y un 63% de aminoácidos idénticos a los del subgrupo 1 y 2, respectivamente. La presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* delante de este gen aumenta la expresión de estas carbapenemasas; el subgrupo 4, con los enzimas OXA-58, que comparten un 59% de aminoácidos iguales con la OXA-51, y menos de un 50% con los subgrupos 1 y 2 [138, 280].

Tabla 3. Betalactamasas en *Acinetobacter baumannii* y antibióticos sobre los que actúan.

Betalactamasa	Familia	Antibiótico diana
TEM-1, TEM-2	A, espectro reducido	Aminopenicilinas
SCO-1	A, espectro reducido	Penicilinas
CARB-5	A, espectro reducido	Carboxipenicilinas
VEB-1, VEB-2, PER-1, PER-2, TEM-92, TEM-116, SHV-5, SHV-12.	A, amplio espectro	Benzilpenicilinas, cefalosporinas, monobactam
CTX-M-1, CTX-M-2	A, amplio espectro	Cefotaxima, ceftriaxona.
IMP-1 a IMP-6, IMP-11, VIM-1 y VIM-2, SIM-1	B, metalobetalactamasas	Carbapenems
ADCs	C	Penicilinas y cefalosporinas
OXA-23-like, OXA-24-like OXA-51-like, OXA-58-like	D	Carbapenems

2.2.4. Enzimas modificadores de aminoglucósidos

La resistencia a aminoglucósidos ocurre por modificaciones químicas específicas de los grupos hidroxil o amino del antibiótico. Estas modificaciones están catalizadas por O-fosforiltransferasas (fosfotransferasas), N-acetiltransferasas (acetilasas) y O-adeniltransferasas (adenilasas). Varias de estas enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*aminoglycoside-modifying enzymes*, AMEs) están presentes en *A. baumannii*. La mayoría de los genes que codifican para estas enzimas están presentes únicamente en algunas cepas clínicas, y están asociadas a elementos genéticos móviles tales como plásmidos, trasposones, o dentro de estructuras tipo integrones, sugiriendo que su adquisición es mediante transferencia horizontal [138]. Al menos nueve AMEs se han encontrado en *Acinetobacter* spp. (tabla 4). Más de un enzima puede estar presente en cada cepa y en diferentes combinaciones [138]. Las AMEs no son exclusivas de *A. baumannii*, ya que hay trabajos que muestran que *A. haemolyticus* y otras especies son intrínsecamente resistentes a estos antibióticos debido a la síntesis de una N-acetiltransferasa específica, AAC(6'), codificada cromosómicamente [282].

Tabla 4. Enzimas modificadores de aminoglucósidos en *Acinetobacter* spp. y antibióticos sobre los que actúan.

Nombre	Clase	Antibiótico diana
AAC(3)-Ia	Acetiltransferasa	Gentamicina
AAC(3)-Iia	Acetiltransferasa	Gentamicina, tobramicina
AAC(6')-Ib	Acetiltransferasa	Tobramicina, amikacina
AAC(6')-Ih, AAC(6')-Iad	Acetiltransferasa	Tobramicina, amikacina
APH(3')-Ia	Fosfotransferasa de espectro reducido	Kanamicina
APH(3')-VI	Fosfotransferasa	Amikacina, kanamicina
ANT(2'')-Ia	Adeniltransferasa	Gentamicina, tobramicina
ANT(3'')-Ia	Adeniltransferasa	Estreptomina, espectinomicina

2.2.5. Modificación de las PBPs

El principal mecanismo de resistencia a betalactámicos es la expresión de betalactamasas, pero ocasionalmente la resistencia a imipenem también viene dada por modificaciones de las proteínas diana. En un estudio se seleccionó un mutante *in vitro* que presentaba una hiperproducción de una PBP de 24 kDa y la producción de otras seis PBPs a bajos niveles de expresión [283]. En otro estudio [284], la ausencia de una PBP2a de 73.2 kDa proporciona resistencia a bajo nivel frente a imipenem y/o meropenem, mientras que la ausencia adicional de una PBP2b de 70.1 kDa está asociada con un alto nivel de resistencia a ambos antimicrobianos. Es de reseñar que estas cepas presentaban además pérdida de porinas y producción de betalactamasas, lo que pone de manifiesto la relación entre los diferentes mecanismos de resistencia a los antimicrobianos [278, 280, 284].

2.2.6. Metilación del ARNr 16S

La resistencia a aminoglucósidos se debe principalmente a la producción de AMEs. Sin embargo, existen estudios que refieren la existencia de cepas que producen una metilasa del ARNr 16S, denominada ArmA. El gen que codifica para esta metilasa presenta una diseminación mundial, y está asociado al transposón TN1548, cuya diseminación se realiza por conjugación y transposición. También sugieren que ésta es la causa de la diseminación de la resistencia a aminoglucósidos por metilación del ARNr 16S en Enterobacteriaceae y en *A. baumannii* [285, 286]. Otros trabajos han identificado un gen *armA* plasmídico en cepas clínicas de *A. baumannii* estrechamente relacionadas en sitios dispares a nivel mundial [138, 287-289].

2.2.7. Proteínas protectoras de ribosomas

El primer y único gen identificado en *A. baumannii* que codifica para una proteína de protección ribosomal es el *tetM* [290]. Codifica para una proteína que protege a los ribosomas de la tetraciclina, doxiciclina y minociclina. Este gen presenta una homología del 100% con el mismo gen de *S. aureus*, sugiriendo una transferencia horizontal de material genético entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [290].

2.2.8. Mutación de los genes *gyrA* y *parC*

En *A. baumannii*, además de las ya citadas bombas de expulsión, la resistencia a quinolonas es debido a menudo a mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (*quinolone resistance-determining regions*, QRDR) de los genes *gyrA* y *parC*. Estas mutaciones tienen como consecuencia una menor afinidad de la quinolona por el complejo ADN-enzima [278]. Las mutaciones más comunes en *A. baumannii* son en los aminoácidos Ser-83 y Gly-81 de la proteína GyrA, y en los aminoácidos Ser-80 y Glu-84 de la proteína ParC. Una mutación en la posición Ser-83 de la GyrA es suficiente para producir valores de CMIs por encima de 4 mg/L en ácido nalidíxico ó fluoroquinolonas, sin embargo, la presencia de dobles mutaciones en *gyrA* y *parC*, producen una resistencia a quinolonas de alto grado [291-293].

3. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* MULTIRRESISTENTES

Los antimicrobianos que actualmente mantienen una mayor actividad en conjunto frente a *A. baumannii* son los carbapenems, y continúan siendo el tratamiento de elección para las infecciones por este microorganismo. Con la existencia de situaciones de endemia donde las cepas son resistentes a carbapenems, en estos centros las alternativas que quedan son sulbactam, rifampicina, tigeciclina y colistina, con mayor o menor éxito. A su vez, combinaciones de estos antibióticos han mostrado eficacia frente a cepas multi- y panresistentes, aunque estos brotes siguen presentando porcentajes de mortalidad altos, por lo que realmente no existe una alternativa terapéutica clara para el tratamiento de este tipo de infecciones. A continuación, revisaremos en líneas generales las alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones producidas por *A. baumannii* multirresistente.

3.1. Sulbactam

El sulbactam es un inhibidor de betalactamasas de tipo competitivo irreversible; actúa inhibiendo a estas enzimas, permitiendo así que el betalactámico con el que se administre continúe en circulación por más tiempo. Su combinación con derivados sintéticos de la penicilina, principalmente ampicilina, permite que estos antibióticos betalactámicos recuperen y/o amplíen su espectro antibacteriano frente a microorganismos resistentes. Además, sulbactam tiene *per se* actividad directa sobre *Acinetobacter* spp., siendo el inhibidor de betalactamasas con mayor actividad intrínseca frente a *A. baumannii* [31]. La estructura química del sulbactam se muestra en la figura 1.

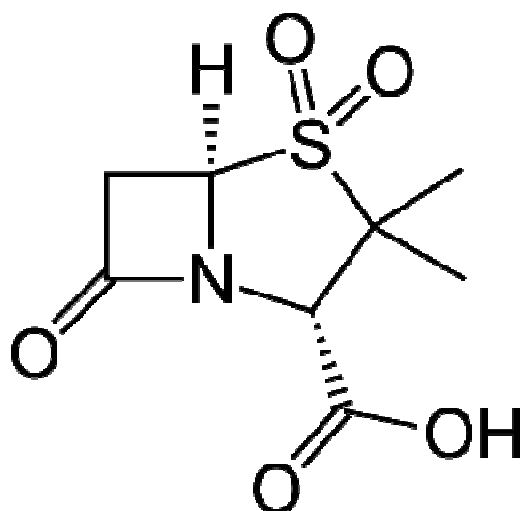


Figura 1. Estructura química del sulbactam.

Varios trabajos han evaluado la eficacia del sulbactam en infecciones producidas por *A. baumannii*. El estudio llevado a cabo por Corbellá *et al.* [125] muestra la eficacia del sulbactam en 42 infecciones leves/moderadas causadas por cepas de *A. baumannii* sensibles a sulbactam, demostrando mejora o curación en 39 casos (93%) con una dosis de 1 g de sulbactam cada 8 horas. Las infecciones que se incluyeron en este estudio fueron mayormente infecciones de herida quirúrgica, traqueobronquitis e infecciones del tracto urinario. En otro trabajo realizado por Wood *et al.* [294], en 14 pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica (*Ventilator-Associated Pneumonia*, VAP) producida por cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem, el tratamiento con ampicilina-sulbactam obtuvo resultados clínicos similares a los obtenidos cuando se trataron con imipenem casos de VAP producidas por *A. baumannii* sensibles a imipenem. En otro estudio, en el que se incluían ocho casos de meningitis nosocomial producidas por *A. baumannii* resistente a imipenem, una dosis de 1 g de sulbactam cada 6 h en siete casos y cada 8 horas en el otro caso, mostró una tasa de curación del 75% (seis casos), demostrando así la eficacia del sulbactam en el tratamiento de infecciones graves por *A. baumannii* [126]. Otros autores describieron en 40 infecciones graves por *A. baumannii* resistente a imipenem, la mayoría bacteremias, neumonías e infecciones del tracto urinario, que una dosis media de 3 g/día de sulbactam curó 27 casos (67.5%), falló en siete (17.5%) y seis (15%) se consideraron como indeterminados porque los pacientes murieron antes de las primeras 48 horas de

tratamiento [295]. Estos autores incluyeron dos casos de meningitis en los que se produjo fallo terapéutico del sulbactam. En nuestro grupo, en un trabajo que recoge 8 casos de bacteriemia tratados con sulbactam, siete (87.5%) de los ocho casos curaron, resultado similar a los obtenidos en 42 casos tratados con imipenem, con una tasa de curación del 83% [186]. Finalmente, en un estudio retrospectivo se analizaron infecciones producidas por *A. baumannii* resistente a carbapenems, predominantemente bacteriemias (62%), neumonías (20%) e infecciones de herida quirúrgica (10%). Ochenta y dos pacientes fueron tratados con polimixinas y 85 con ampicilina-sulbactam, y, aunque no fueron tratamientos en monoterapia (recibieron principalmente vancomicina y carbapenems), concluyen que el tratamiento con ampicilina-sulbactam es más eficaz que el tratamiento con polimixinas, con un porcentaje de cura/mejora del 60% y del 39%, respectivamente, y un porcentaje de mortalidad durante el tratamiento del 33% y del 50%, respectivamente.

Sin embargo, como ocurre con la resistencia a imipenem, un importante número de cepas de *A. baumannii* han desarrollado resistencia a sulbactam, obteniendo en un estudio multicéntrico español sólo un 46.7% de cepas sensibles [296]. Para el tratamiento de estos casos, se ha estudiado la eficacia del sulbactam (administrado como ampicilina-sulbactam) a altas dosis (18/9 versus 24/12 g/24 h) en pacientes con VAP causada por cepas de *A. baumannii* multirresistentes incluyendo sulbactam [297], basado en un estudio desarrollado por nuestro grupo en un modelo experimental, que encontró que la eficacia del sulbactam (usando una cepa sensible a sulbactam e imipenem) fue la misma que la de imipenem, cuando las dosis de sulbactam fueron suficientes para alcanzar concentraciones plasmáticas de sulbactam por encima de la CMI durante la misma cantidad de tiempo [298]. Los autores del estudio clínico [297] obtuvieron éxito clínico y bacteriológico en el 66,7 y 77,8% de los 27 casos de VAP, respectivamente, sin diferencias entre las dos dosis altas usadas y con una tasa de mortalidad a los 14 días del 25,9%. No hubo interrupciones del tratamiento por efectos adversos. En otro trabajo posterior, estos mismos autores compararon el tratamiento con sulbactam a la dosis alta del anterior trabajo (administrada como ampicilina/sulbactam 18/9 g/24 h) con el tratamiento con colistina en pacientes con VAP producidas por cepas de *A. baumannii* multirresistentes [299]. Obtuvieron éxito bacteriológico en el 66,6% vs. 61,5% de los casos tratando con colistina y con ampicilina/sulbactam, respectivamente, con tasas de mortalidad (a 14 y 28 días) del 20% y 33% en el grupo de

colistina, y del 15,3% y 30% en el grupo de ampicilina/sulbactam. Efectos adversos ocurrieron en el 30,7% (15,3% de nefrotoxicidad) con ampicilina/sulbactam y en el 39,6% (33% de nefrotoxicidad) con colistina. En este trabajo concluyeron que ambos tratamientos eran igual de eficaces. Las limitaciones de estos trabajos son que presentan un bajo número de pacientes, pero sobre todo, la falta de estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos que apoyen la hipótesis del estudio. Por tanto, parece prudente esperar a nuevos estudios para apoyar el tratamiento con estas dosis altas de sulbactam.

3.2. Rifampicina

La rifampicina es un antibiótico semisintético de la familia de las rifamicinas, derivado de *Amycolatopsis rifamycinica*, que inhibe la transcripción de ADN a ARN por unión a la subunidad beta de la ARN polimerasa de la bacteria. Tiene de esta manera una acción bactericida al modificar la transcripción del ARN, ya que en el complejo rifampicina-ARN polimerasa, la rifampicina se une en el principal canal ADN/ARN de la polimerasa, donde bloquea estéricamente la elongación del ARN transcrito cuando alcanza una longitud de dos o tres nucleótidos, dando lugar a una transcripción incompleta [1]. La estructura química de la rifampicina se muestra en la figura 2.

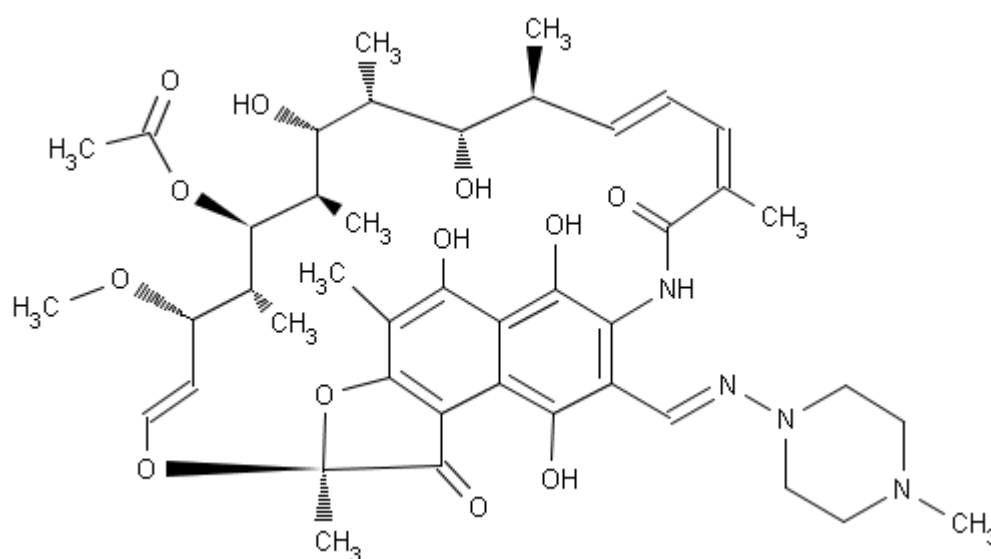


Figura 2. Estructura química de la rifampicina.

Varios estudios han evaluado la eficacia de rifampicina en infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* multirresistentes en modelos experimentales y en ensayos clínicos. En un modelo de neumonía en ratones neutropénicos, usando dos cepas de *A. baumannii* con CMI para rifampicina de 4 y 8 mg/l y para imipenem de 8 y 0,5 mg/l, la monoterapia con rifampicina fue tan eficaz como la de imipenem disminuyendo la concentración bacteriana en pulmón [300]. De igual manera, en un modelo de neumonía murina en animales inmunocompetentes, usando cepas de *A. baumannii* con alta resistencia a imipenem (CMI = 512 mg/l) y con una CMI de rifampicina de 8 mg/l, Montero *et al.* demostraron que la monoterapia con rifampicina fue la más eficaz disminuyendo la concentración bacteriana en pulmón [301]. La eficacia de colistina fue significativamente menor, a pesar de la sensibilidad de la cepa utilizada (CMI colistina = 0,5 mg/l). Además, la combinación de rifampicina más imipenem fue superior que la monoterapia con rifampicina. La colistina en combinación con rifampicina no mostró mayor eficacia que la rifampicina en monoterapia [301]. Otro trabajo llevado a cabo en nuestro grupo ha demostrado que la rifampicina es el antimicrobiano bactericida más eficaz *in vitro*, y que la monoterapia con rifampicina es la más eficaz en el tratamiento de la neumonía experimental murina causada por cepas de *A. baumannii* multirresistentes, comparada con imipenem, sulbactam y colistina [302]. Además, en un modelo en ratas neutropénicas de infección diseminada producida por *A. baumannii*, rifampicina fue más eficaz que colistina [303].

La monoterapia con rifampicina en infecciones con *A. baumannii* presenta el problema de que lleva al desarrollo de resistencias en un corto periodo de tiempo. Este problema puede ser evitado con la administración de rifampicina en combinación con otros antimicrobianos. Usando cepas de *A. baumannii* multirresistentes, con CMI para imipenem, sulbactam y rifampicina de 32, 32 y 4 mg/l, respectivamente, Pachón-Ibáñez *et al.* demostraron que la adición de imipenem o sulbactam a la rifampicina evitó la aparición de mutantes resistentes a rifampicina, tanto *in vitro* como en un modelo de neumonía murina [304]. Otro estudio evaluó los resultados del tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistentes con rifampicina en combinación con imipenem en diez pacientes, demostrando curación en siete de ellos (fallecieron tres pacientes; dos de ellos debido a fallo terapéutico), aunque se desarrolló resistencia a rifampicina en siete de los diez pacientes [305]. Analizando estos siete casos, al principio del tratamiento la resistencia a imipenem fue mayor, con CMI de > 256, 128

y 64 mg/l, en 5, 1 y 1 de las cepas usadas, respectivamente; esto puede explicar las discordancias con los resultados obtenidos por Pachón-Ibáñez *et al.* [304].

Los resultados más prometedores con tratamiento combinado frente a infecciones por *A. baumannii* multirresistentes han sido obtenidos por Motaouakkil *et al.* [306]. El tratamiento en combinación con rifampicina y colistina en 26 casos de infección nosocomial (16 VAP, 9 bacteremias, y 1 meningitis) produjo un 100% de curación de los pacientes. Estos resultados concuerdan con la sinergia observada entre colistina y rifampicina en cepas clínicas sensibles a colistina [307]. Además, en un modelo experimental de infección diseminada en ratas neutropénicas, la actividad de colistina en monoterapia fue potenciada por la co-administración de rifampicina [303]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro grupo en el estudio de neumonía murina causada por cepas multirresistentes [302] donde el tratamiento combinado de rifampicina y colistina fue eficaz disminuyendo la concentración bacteriana en pulmón y el porcentaje de hemocultivos positivos. En otro estudio que incluía 19 casos de VPA y 10 casos de bacteriemia por cepas multirresistentes de *A. baumannii*, el tratamiento con rifampicina en combinación con colistina produjo una tasa de curación del 76%, sin desarrollar resistencia ni a rifampicina ni a colistina [308]. Sin embargo, los resultados de Petrosillo *et al.* [309] no fueron tan prometedores; trataron 14 casos de VAP producidas por *A. baumannii* multirresistentes con colistina en combinación con rifampicina, y 5 casos con ampicilina/sulbactam, con una tasa de curación de sólo el 50%. Estos resultados dispares pueden ser explicados debido a que en los trabajos de Motaouakkil *et al.* [306] y de Bassetti *et al.* [308], la dosis de rifampicina (10 mg/kg cada 12 h) fue mayor que en el estudio de Petrosillo *et al.* (600 mg cada 24 h) [309].

Podemos resumir diciendo que estos pocos estudios clínicos sobre la eficacia del tratamiento con rifampicina presentan limitaciones, como el bajo número de pacientes incluidos y la ausencia de grupos comparativos. Además, la tasa de curación del 100% alcanzada en pacientes con VAP en el estudio de Motaouakkil *et al.* [306] plantea dudas sobre el verdadero papel patogénico de las cepas de *A. baumannii* de los casos evaluados en este estudio.

3.3. Colistina

La polimixina E ó colistina es un polipéptido catiónico cíclico derivado de productos del *Bacillus colistinus*. Son agentes anfipáticos con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que actúan a nivel de la membrana celular de los microorganismos. Penetran en la membrana celular e interactúan con los fosfolípidos provocando la disrupción de dicha membrana. Son bactericidas de manera concentración-dependiente. Son capaces de unirse al lípido A del lipopolisacárido bloqueando la respuesta inflamatoria de las endotoxinas [1]. La estructura química de la colistina se muestra en la figura 3.

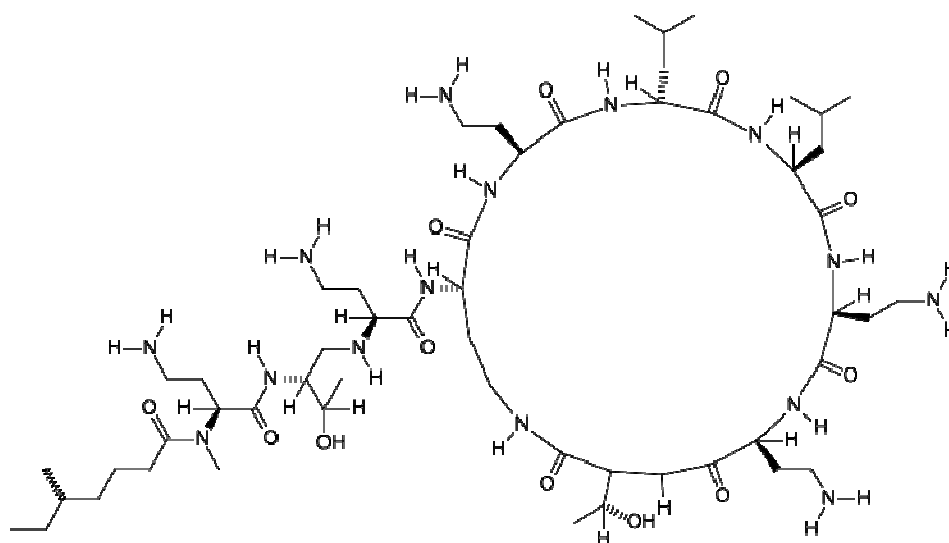


Figura 3. Estructura química de la colistina.

Las polimixinas fueron descubiertas en 1947 y se usaron de manera parenteral hasta el descubrimiento en 1962 de aminoglucósidos anti-*Pseudomonas*. Al principio de la década de los 80 cayeron totalmente en desuso debido a su nefrotoxicidad, quedando relegada al uso oral y tópico. Sin embargo, la aparición de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* han hecho retornar a la colistina para el uso clínico, ya que ha demostrado ser activa frente a este tipo de cepas. Diferentes estudios han observado tasas de curación significativas frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii* sensibles a colistina. Además, se observó un importante efecto post-antibiótico (*post-antibiotic effect*, PAE) de la colistina de 3,9 h usando 19 cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes [310]. Sin embargo, este PAE no ha sido confirmado por otros autores

que utilizaban cepas de *A. baumannii* multirresistentes con heterorresistencia a colistina, quienes también han observado un recrecimiento bacteriano en curvas de tiempo-muerte, incluso con concentraciones de colistina de más de 32 ó 64 veces la CMI de algunas cepas [311].

En un estudio observacional de pacientes con VAP causadas por *A. baumannii*, la colistina fue tan eficaz y segura como el imipenem cuando las cepas infectantes eran sensible a estos antibióticos. Sin embargo, la mortalidad de la neumonía fue alta con ambos tratamientos: 38 y 35,7% en los pacientes tratados con colistina e imipenem, respectivamente, a pesar de la sensibilidad de *A. baumannii* a estos antimicrobianos [312]. Otro estudio retrospectivo comparó casos de VAP causadas por *A. baumannii* o *P. aeruginosa* tratados con colistina o imipenem y mostraron una eficacia clínica favorable con los dos tratamientos, con una mortalidad a los 28 días del 35 y el 25%, respectivamente ($p = 0,22$) [313].

La colistina intravenosa ha sido eficaz en casos de meningitis por *A. baumannii* multirresistente [314]. La colistina también ha sido usada por vía intraventricular o intratecal, sola o en combinación con colistina intravenosa y/o otros antimicrobianos, curando infecciones del sistema nervioso central en el 100% de 14 casos revisados en 2006 [315], en el 83% de una serie de 7 pacientes tailandeses y en el 92% de 17 casos revisados en 2009 [316], y en el 100% de 32 casos revisados en 2010 [317], así como en nuevos casos clínicos más recientemente informados [318]. Como efecto adverso, en algunos casos se observaron meningitis o ventriculitis químicas.

Con el aumento de VAP producidas por cepas multirresistentes de *A. baumannii*, el uso de la colistina nebulizada o en aerosol se está extendiendo cada vez más, bien como adyuvante o bien como única vía de administración. En un estudio reciente en el que se revisan 45 pacientes con VAP a los que se les administró como adyuvante colistina nebulizada, un 37,8% de los casos presentaron curación microbiológica, y un 57,8% mostraron una respuesta clínica favorable [319]. En un estudio con colistina nebulizada como único tratamiento, fueron tratados tres pacientes con VAP por *A. baumannii* multirresistente, y un paciente con VAP y aislamiento de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, de los cuales tres pacientes experimentaron curación o mejora, y uno de ellos falleció [320]. La escasez de trabajos con esta vía de administración y el bajo número de pacientes incluidos en

éstos, hacen necesario ampliar el estudio para resolver el papel de la colistina nebulizada en el tratamiento de las VAP por *A. baumannii* multirresistentes.

Hay algunas discrepancias sobre los resultados clínicos con colistina y aquellos derivados de estudios experimentales. En un modelo experimental de endocarditis, la colistina fue eficaz en el tratamiento de la bacteriemia, medida por el aclaramiento de *A. baumannii* de la sangre y esterilización de hemocultivos. Sin embargo, no mostró eficacia en el descenso de la concentración bacteriana de las vegetaciones, quizás debido a la baja penetración de la colistina en los tejidos [321]. Del mismo modo, utilizando tres cepas de *A. baumannii* con CMI_s a imipenem de 1, 8 y 512 mg/l, respectivamente, en un modelo experimental de neumonía, la colistina fue la menos eficaz de los antimicrobianos utilizados (imipenem, sulbactam y rifampicina), tanto en curvas de tiempo-muerte como *in vivo* (aclaramiento bacteriano en pulmón), a pesar de tener una CMI de 0,5 mg/l frente a las tres cepas [322]. Finalmente, como ya hemos comentado al hablar de la rifampicina, en un modelo experimental de infección diseminada en ratas neutropénicas, la colistina prolongó la supervivencia comparada con los controles, pero fue menos eficaz que la rifampicina en la disminución de la concentración bacteriana de los tejidos. En este estudio, la actividad de la colistina en monoterapia aumentó con la co-administración de rifampicina [303].

Una advertencia para el uso de la colistina en clínica es la posibilidad de efectos adversos. Así, en cinco series clínicas usando colistina para *A. baumannii* o *P. aeruginosa* multirresistentes, la nefrotoxicidad apareció en un rango de entre un 8 y un 36%. Por el contrario, la neurotoxicidad ha sido extremadamente rara [323]. En una revisión más reciente de 54 pacientes, se observó nefrotoxicidad en el 11% de los casos [324]. Además, con el uso de la colistina en aerosol, se han referido casos aislados de insuficiencia respiratoria [325].

3.4. Tigeciclina

La familia de las glicilciclinas, tercera generación de tetraciclinas derivada de la minociclina, presentan una modificación en la posición 9 con respecto a ésta que las hace ampliar el espectro de actividad, incluso a cepas resistentes a las anteriores tetraciclinas. La tigeciclina (GAR-936) es el primer miembro disponible en clínica de

esta familia, presentando un sustituyente 9-*t*-butylglycylamido con respecto a la minociclina [1]. La estructura química de la tigeciclina la vemos en la figura 4.

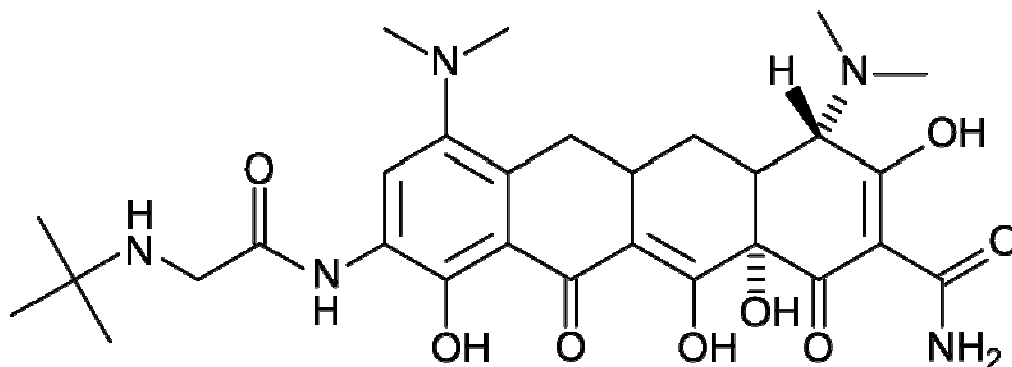


Figura 4. Estructura química de la tigeciclina.

Las tetraciclinas atraviesan la membrana externa de las bacterias gramnegativas por difusión pasiva. Se unen de manera reversible (de ahí su efecto bacteriostático) a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la adición de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica [1].

La tigeciclina presenta actividad frente a *A. baumannii*, incluyendo cepas resistentes a imipenem y multirresistentes [326-330], aunque se han descrito cepas resistentes a este antimicrobiano ($CMI_{90} = 8 \mu\text{g/ml}$) [331, 332]. Además, dos casos de bacteriemias de brecha han sido descritos en pacientes recibiendo tratamiento con tigeciclina para otras indicaciones [333]. Adicionalmente, se ha descrito un rápido aumento de la CMI de tigeciclina en *A. baumannii* tras el tratamiento con este antimicrobiano de infecciones producidas por esta bacteria [334].

En un trabajo en el que se revisan retrospectivamente 34 pacientes que recibieron tigeciclina en monoterapia frente a infecciones por *A. baumannii* multirresistente [335], encontraron mejoría clínica en un 68%, con un 10% de casos con aclaramiento microbiológico. La mortalidad fue elevada (41%), con 9 pacientes con fallecimiento atribuible a la sepsis. Tres pacientes desarrollaron bacteriemia de brecha durante el tratamiento, con uno de ellos presentando resistencia. En otro estudio en el que se incluyen 25 pacientes con VAP o bacteremia tratados con tigeciclina en

monoterapia o en combinación con diferentes antimicrobianos (imipenem o colistina), describen éxito clínico en el 84% de los casos [336]. Los cinco pacientes (tres con VAP y dos con bacteremia) tratados con tigeciclina en monoterapia presentaron curación [336]. Karageorgopoulos *et al.* han revisado recientemente la eficacia de tigeciclina en 8 estudios clínicos, los cuales incluyen 42 pacientes con infecciones causadas por *Acinetobacter* spp. multirresistentes (39 de los casos fueron *A. baumannii*), la mayoría VAP (74% de los casos) [337]. La tigeciclina se administró en combinación en el 67% de los pacientes, con una evolución clínica favorable en 32 de los 42 pacientes incluidos (76%). Hay que señalar que en 3 de los 42 pacientes se aisló *A. baumannii* resistente a tigeciclina durante el tratamiento, con fallo clínico en dos de los pacientes [337]. En un ensayo clínico abierto, no comparativo de pacientes con varios tipos de infección, el tratamiento con tigeciclina produjo una respuesta clínica favorable en el 82,4% de los casos microbiológicamente evaluables, y en el 53,1% en el análisis por intención de tratar modificada [338].

La falta de trabajos concluyentes, las diferentes combinaciones de tratamientos en estos escasos estudios y la emergencia de resistencia durante el tratamiento, no permiten extraer conclusiones definitivas sobre la utilidad clínica de la tigeciclina en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistente.

3.5. Combinaciones

Se han llevado a cabo multitud de trabajos para estudiar el tratamiento en combinación en infecciones por *A. baumannii*. La mayor parte de la información disponible proviene de estudios *in vitro* y experimentales, y sorprendentemente son escasos los datos provenientes de estudios comparativos de infecciones en humanos [339].

Algunos estudios han evaluado la utilidad de la combinación de imipenem con amikacina en modelos experimentales de neumonía causados por cepas de *A. baumannii* sensibles a imipenem. En un modelo experimental de neumonía murina, Rodríguez-Hernández *et al.* mostraron que la combinación de amikacina con imipenem no mejoró los resultados obtenidos con imipenem en monoterapia reduciendo la concentración bacteriana en pulmones [142]. En un modelo experimental de neumonía en cobayas,

Bernabeu-Wittel *et al.* también mostraron que la combinación de amikacina con imipenem no era tan efectiva como la monoterapia con imipenem reduciendo la concentración bacteriana en pulmones, probablemente por una disminución de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos de ambos antimicrobianos debido a la combinación [340]. En resumen, ningún estudio apoya la adición de amikacina a imipenem en el tratamiento de la neumonía por *A. baumannii*.

La eficacia de la combinación de imipenem y sulbactam, sinérgica *in vitro*, se evaluó en un estudio retrospectivo de cohortes en bacteriemias causadas por *A. baumannii* multirresistente [341]. La combinación de un carbapenem con ampicilina-sulbactam fue mejor (n=26 casos, 30,8% de mortalidad) que un carbapenem más amikacina (n=10 casos, mortalidad del 50%) o un carbapenem en monoterapia (n=12 casos, mortalidad del 58,3%). Aunque sea un trabajo retrospectivo, estos resultados apoyan las conclusiones de los estudios experimentales previos.

La combinación de doxiciclina con amikacina puede ser una alternativa al tratamiento con imipenem. En un modelo experimental murino de neumonía por cepas de *A. baumannii* sensibles a imipenem, la combinación fue sinérgica *in vitro* e *in vivo*, y similar a imipenem, reduciendo la mortalidad y la concentración bacteriana en pulmón [142]. Sin embargo, *A. baumannii* ha desarrollado resistencias a doxiciclina y amikacina, permaneciendo sensibles sólo un 32 y un 35% de cepas, respectivamente [296].

Ya hemos comentado que la monoterapia con rifampicina en infecciones por *A. baumannii* desarrolla resistencias en un corto periodo de tiempo. Como ocurre en el tratamiento de otras infecciones por *S. aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*, la combinación reduciría la aparición de resistencias. Como hemos reseñado antes, nuestro grupo demostró que la adición de imipenem o sulbactam a rifampicina evitaba la aparición de mutantes resistentes tanto *in vitro* como en un modelo experimental de neumonía [304]. En un trabajo recientemente publicado llevado a cabo en nuestro laboratorio, en un modelo de neumonía murina por *A. baumannii* multirresistente, se compararon los tratamientos en monoterapia con imipenem, sulbactam, rifampicina y colistina, y las combinaciones de rifampicina más imipenem, rifampicina más sulbactam, rifampicina más colistina y sulbactam más imipenem, siendo los más eficaces en reducir la concentración bacteriana en pulmón la monoterapia con rifampicina, y la combinación de ésta con imipenem o sulbactam [342]. En este mismo

trabajo, pero en un modelo de meningitis en conejos, se compararon las combinaciones antes citadas y las monoterapias con rifampicina y colistina, siendo el tratamiento más eficaz la combinación de rifampicina más colistina [342]. En un estudio reciente realizado en nuestro hospital, se compararon las asociaciones de rifampicina más colistina o tigeciclina o minociclina en pacientes con infecciones por cepas multirresistentes de *A. baumannii* [343]. Se incluyeron 29 pacientes con una tasa de curación/mejora clínica del 65%, presentando rifampicina más tigeciclina los mejores resultados con una tasa global de curación/mejora clínica del 77% (7/9), rifampicina más minociclina una tasa global de curación/mejora clínica del 66% (6/9), y rifampicina más colistina con una tasa global de curación/mejora clínica del 55% (6/11). No se produjeron efectos adversos durante los tratamientos. La erradicación microbiológica total fue del 69%, y el desarrollo de resistencias del 14%. La mortalidad fue del 10% (3 pacientes) y solo uno fue considerado en relación a la infección por *A. baumannii* resistente a carbapenem. Anteriormente hemos comentado, al revisar la rifampicina, que los mejores resultados de tratamientos combinados con este antimicrobiano frente a *A. baumannii* multirresistente han sido obtenidos por Motaouakkil *et al.* [306] usando combinaciones de rifampicina y colistina, y alcanzando curación en el 100% de los pacientes. Estos resultados se alcanzaron con dosis de rifampicina (10 mg/kg cada 12 h) iguales a las administradas en el trabajo comentado anteriormente [343]. Sin embargo, en el trabajo de Petrosillo *et al.* se refieren 14 casos de VAP por *A. baumannii* multirresistente tratados con rifampicina más colistina alcanzando una tasa de curación del 50%, si bien es cierto que en este estudio la dosis de rifampicina administrada era menor (600 mg cada 24 h) [309].

En las combinaciones con tigeciclina, algunos estudios *in vitro* han demostrado su efecto sinérgico frente a *A. baumannii* cuando actúan en combinación con otros antibióticos, tales como imipenem (20%) [344], amikacina (44%), piperacilina/tazobactam (22%), polimixina B (22%), colistina (11%), ampicilina/sulbactam (11%), y rifampicina (11%) [345]. Hasta la fecha no existen estudios en modelos animales para evaluar el tratamiento combinado de tigeciclina frente a *A. baumannii*. Además del trabajo referenciado anteriormente realizado en nuestro hospital [343], donde se comprobó que la combinación de tigeciclina a la rifampicina era más eficaz que las de rifampicina más minociclina o colistina en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistentes, existen pocos estudios

clínicos más donde se evalúe el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo. Schafer *et al.* mostraron que la monoterapia con tigeciclina era igual de eficaz que tigeciclina más imipenem, ambos tratamientos con un 100% de mejoría clínica, y mejores que la combinación de tigeciclina más imipenem más colistina (75% de mejoría) y la de tigeciclina más colistina (57% de mejoría) [336].

En resumen, varias combinaciones de antimicrobianos han sido evaluadas para el tratamiento de infecciones producidas por *A. baumannii* multirresistente, llegándose a estudiar incluso combinaciones con más de dos antimicrobianos [336, 346]. Ante la falta de homogeneidad en los trabajos, el escaso número de pacientes incluidos, o la inexistencia de controles, son necesarios estudios nuevos y más completos para la búsqueda del tratamiento óptimo frente a las infecciones producidas por cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

3.6. Nuevas alternativas terapéuticas

Como ya hemos visto, las infecciones por *A. baumannii* son un problema creciente debido al cada vez más frecuente aislamiento de cepas multirresistentes. La falta de un tratamiento óptimo para las infecciones producidas por este microorganismo, hace necesaria la búsqueda con urgencia de nuevos antimicrobianos activos que ofrezcan alternativas terapéuticas a este problema clínico. Algunas de las que se están desarrollando son detalladas a continuación.

3.6.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos han atraído un creciente interés como potenciales agentes terapéuticos, debido a su habilidad para modular la respuesta inmune innata y a que el desarrollo de resistencias ha sido raramente observado durante su uso. Un número significativo de péptidos antimicrobianos han sido probados *in vitro* frente a diferentes especies del género *Acinetobacter*. Giacometti *et al.* probaron la actividad *in vitro* de diferentes péptidos (buforina II, cecropina P1, indolicidina, magainina y ranalexina) frente a 12 cepas clínicas de *A. baumannii* [347]. Buforina II, cecropina P1 y magainina II fueron los péptidos más activos con valores de CMIs en rangos de 0,25 a 16, 0,5 a 32, y 0,5 a 16 mg/l, respectivamente. Pexiganan, un análogo del péptido

magainina, también exhibió una buena actividad frente a *A. baumannii*, con un valor de CMI₅₀ de 2 µg/ml y una CMI₉₀ de 8 µg/ml [348].

La familia de las cecropinas la constituyen unos péptidos antimicrobianos catiónicos con conformación α -helicoidal que presentan de 35 a 39 aminoácidos. La carga catiónica de las cecropinas permite la atracción y la subsecuente unión a las relativamente aniónicas membranas bacterianas. Urban *et al.* demostraron que una cepa de *A. baumannii* resistente a las polimixinas fue sensible a la cecropina P1 y el rBPI₂₁ (el fragmento amino-terminal recombinante de 21-kDa de la proteína bactericida/permeabilizadora) [349]. La cecropina A, la melitina y los péptidos híbridos de cecropina A-melitina CA(1-7)M(2-9) y CA(1-8)M(1-18), también han mostrado buena actividad *in vitro* frente a *A. baumannii*, incluyendo cepas colistina-resistentes. Los péptidos híbridos fueron los que mostraron una mayor actividad frente a *A. baumannii* [350-353]. Más adelante desarrollaremos en profundidad la actividad de los mismos.

Mangoni *et al.* evaluaron *in vitro* la actividad bactericida de cinco péptidos antimicrobianos naturales [354]. Esculentina [Esc (1-18)] mostró una potente y rápida actividad bactericida, haciendo esta molécula atractiva para el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Otro péptido que ha sido probado frente a *A. baumannii* multirresistente ha sido la β -defensina humana, mostrando actividad bactericida después de la incubación con la bacteria durante 3 minutos a una concentración de 4 µg/ml [355]. Recientemente, también se ha publicado la rápida y potente actividad bactericida del péptido alyteserin-1c y su homólogo [E4K], con actividad bactericida en *A. baumannii* multirresistente en 30 minutos a concentraciones de entre 1,25 y 5 µM [356].

Algunos estudios han mostrado eficacia *in vivo* en modelos animales, como en el tratamiento con un diastereómero del péptido antimicrobiano K6L9 de la bacteriemia murina causada por *A. baumannii* [357], eficacia *in vivo* del péptido derivado de la lactoferrina humana hLF(1-11) en un modelo experimental murina de infección de muslo por *A. baumannii* [358], y eficacia del péptido MSI-78 (pexiganan) en la actividad anti-endotóxica, en la disminución de la concentración bacteriana y mejorando la supervivencia en tres modelos de sepsis en rata [359]. No obstante, queda por

determinar si estos péptidos son útiles para el tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii* multirresistente.

3.6.2. Inhibidores de bombas de expulsión

Existen dos estrategias para combatir la resistencia antibiótica mediada por bombas de expulsión. La primera consiste en modificaciones estructurales del agente antimicrobiano para evitar la bomba de expulsión. Un ejemplo son las tetraciclinas semisintéticas como las glicilciclinas (tigeciclina), que evitan la resistencia mediada por bombas como las TetA y TetB [360]. La segunda estrategia es el diseño de inhibidores de bombas de expulsión (*Efflux Pumps Inhibitors*, EPIs), que pueden ser administrados de manera concomitante con agentes antimicrobianos. Aunque la prevalencia de la sobreexpresión de genes de bombas de expulsión como mecanismo de multirresistencia en cepas clínicas de *A. baumannii* no ha sido investigada en profundidad, algunos estudios sugieren que este acontecimiento puede ser frecuente [361]. Por lo tanto, eludir la actividad de las bombas de flujo podría tener beneficios terapéuticos claros, ya que ello aumentaría la susceptibilidad de *A. baumannii* aumentando la eficacia de los antibióticos utilizados para tratar infecciones causadas por estas bacterias.

Los EPIs en combinación con agentes antimicrobianos incrementarían la potencia antibacteriana, expandirían el espectro de actividad, revertirían resistencias y reducirían importantemente la tasa de desarrollo de nuevas resistencias. Al reducir la resistencia intrínseca, los EPIs disminuirían la emergencia de mutantes resistentes a los antimicrobianos, incluso mutantes con dianas distintas, ya que se ha demostrado que la falta de actividad de las bombas de expulsión impide la selección de resistencia antibiótica debido a mutaciones en otras dianas como las topoisomerasas bacterianas, que son la causa más común de resistencia bacteriana de alto nivel a las quinolonas [362].

Lomovskaya y Bostian han diseñado algunos EPIs potencialmente útiles [362]. Uno de los primeros EPIs con un potencial uso terapéutico es el phenylalanine-arginyl- β -naphthylamide (MC-207110, Daiichi Sankyo Co Ltd; figura 5), una amida dipeptídica sintética, que posee una mínima actividad bactericida intrínseca pero inhibe las bombas de flujo de tipo Mex de *P. aeruginosa*, así como otras bombas relacionadas con las Mex

presentes en *A. baumannii* [362, 363]. Este inhibidor parece unirse al mismo sitio usado por la bomba para unirse al antibiótico, por lo que actúa como un inhibidor competitivo.

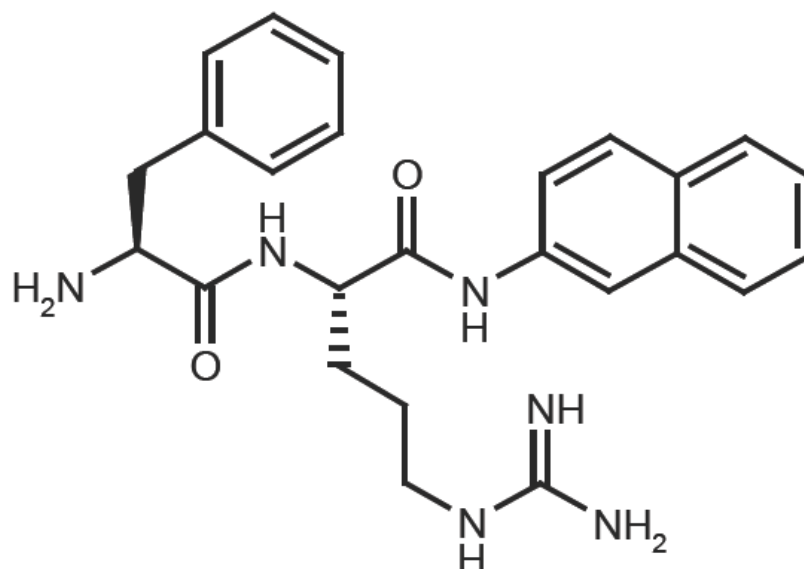


Figura 5. Estructura del inhibidor de bombas de flujo MC-207110.

Se han referido otros EPIs. Pannek *et al.* comunicaron que 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine revirtió la multirresistencia en bacterias que sobreexpresaban bombas de expulsión de tipo RND [364]. Este compuesto es eficaz frente a *A. baumannii*, pero no frente a *P. aeruginosa*.

Conviene señalar que la identificación de EPIs de fuentes naturales está en los albores, y que la diversidad química de plantas y microorganismos así como la necesidad que tienen de sintetizar este tipo de compuestos para combatir a los competidores por los nutrientes, hacen de la búsqueda de EPIs en estas fuentes una opción atractiva [365].

3.6.3. Inhibidores enzimáticos

Varias clases de antibióticos actúan en diferentes reacciones de la ruta de síntesis del peptidoglucano, y han sido ampliamente usados en la práctica clínica. Sin embargo, esta ruta de síntesis es tan compleja que está garantizada la investigación de

inhibidores de enzimas que aún no hayan sido usados como diana antibiótica. Las ligasas muramil-peptídicas implicadas en las fases tempranas de la síntesis de peptidoglucano en particular, representa una diana atractiva para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos [366]. MurC es una ligasa que cataliza la adición de 1-alanina al ácido UDP-N-acetilmurámico. Zawadzke *et al.* han descrito recientemente un compuesto que inhibe la acción de la enzima MurC de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, pero sin embargo no inhibía las de *A. baylyi* ó *P. aeruginosa* [367]. Aunque *A. baylyi* no es un patógeno oportunista aislado a menudo en clínica, este compuesto probablemente no sea activo frente a la MurC de *A. baumannii*.

Otras potenciales nuevas proteínas diana han sido descritas, incluyendo ARNt sintetas, deformilasas peptídicas y enzimas implicados en la síntesis del lípido A [368]. Sin embargo, no se han realizado estudios específicos en *A. baumannii*.

4. DESARROLLO DE NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

Como ya hemos comentado en el apartado precedente, existe una necesidad imperiosa de desarrollar nuevas opciones para el tratamiento de las infecciones causadas por cepas multirresistentes de *A. baumannii*, cada vez más frecuentemente aisladas. La presente Tesis Doctoral está centrada en la investigación pre-clínica, tanto *in vitro* como en modelos animales de infección, de tres potenciales alternativas terapéuticas frente a infecciones causadas por *A. baumannii*. Describiremos moléculas de nueva generación como son los péptidos antimicrobianos híbridos de cecropina A-melitina y una nueva quinolona derivada del ciprofloxacino, ó el ya conocido inhibidor de betalactamasas ácido clavulánico, que como vamos a ver más adelante posee actividad intrínseca frente a *A. baumannii*.

4.1. Péptidos híbridos de cecropina A-melitina

Los péptidos antibióticos de origen eucariótico (PAE) son componentes esenciales de la inmunidad innata, que actúan como primera barrera defensiva frente a las invasiones por microorganismos patógenos [369]. Características generales de estos péptidos, que ayudan a su interacción con la membrana plasmática bacteriana, son su carga neta positiva (imprescindibles en la interacción con los fosfolípidos de membrana), su hidrofobicidad (indispensable para su inserción en la membrana), y su flexibilidad, que les permite cambios de conformación dependiendo de si están en solución o están interaccionando con la membrana plasmática [370]. Estructuralmente los PAE se clasifican en a) α -helices, b) hoja plegada- β , c) giros β , d) estructuras extendidas, y e) estructuras mixtas (figura 6) [370].

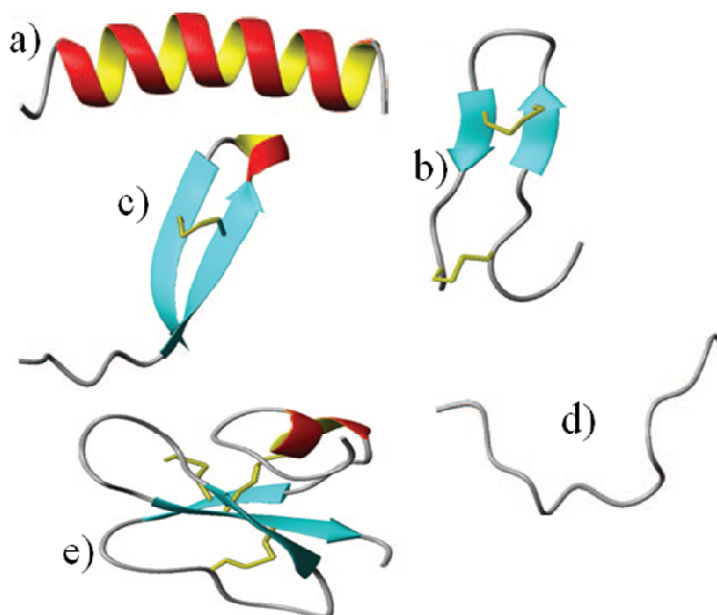


Figura 6. Principales estructuras de los péptidos antimicrobianos catiónicos: a) α -helices, b) hoja plegada- β , c) giros β , d) estructuras extendidas, y e) estructuras mixtas [370].

Aunque existen péptidos catiónicos que poseen dianas intracelulares, el más extendido y más importante mecanismo de acción microbicida de estos péptidos es la formación de poros en la membrana bacteriana, lo que va acompañado de pérdida de homeostasis celular, despolarización de la membrana y liberación de metabolitos intracelulares, debido a la interacción de los fosfolípidos con la estructura anfipática del péptido. La especificidad del proceso se basa en el mayor contenido en fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática de los patógenos respecto a eucariotas superiores, donde dichos fosfolípidos se hallan confinados en la cara citoplásmica de la membrana, inaccesibles al péptido [369].

El mecanismo de acción es por estequiometría. Generalmente, comienza por una acumulación de moléculas de péptido en la cara externa de la membrana, por interacción de sus cargas positivas con los fosfolípidos aniónicos. Una vez que se alcanza una densidad crítica de péptido, algunas moléculas del mismo tienden a orientarse perpendicularmente al plano de la membrana, originando poros de estequiometría variable con flujo de metabolitos y pérdida de asimetría de membrana por intercambio de fosfolípidos entre ambas caras. En una etapa final, se destruye el poro transitorio, relocalizando el péptido a ambos lados de la membrana. El daño de la membrana plasmática es suficientemente extenso para provocar la lisis y la salida del

contenido intracelular [369]. Un esquema de diferentes formaciones del poro se muestra en la figura 7.

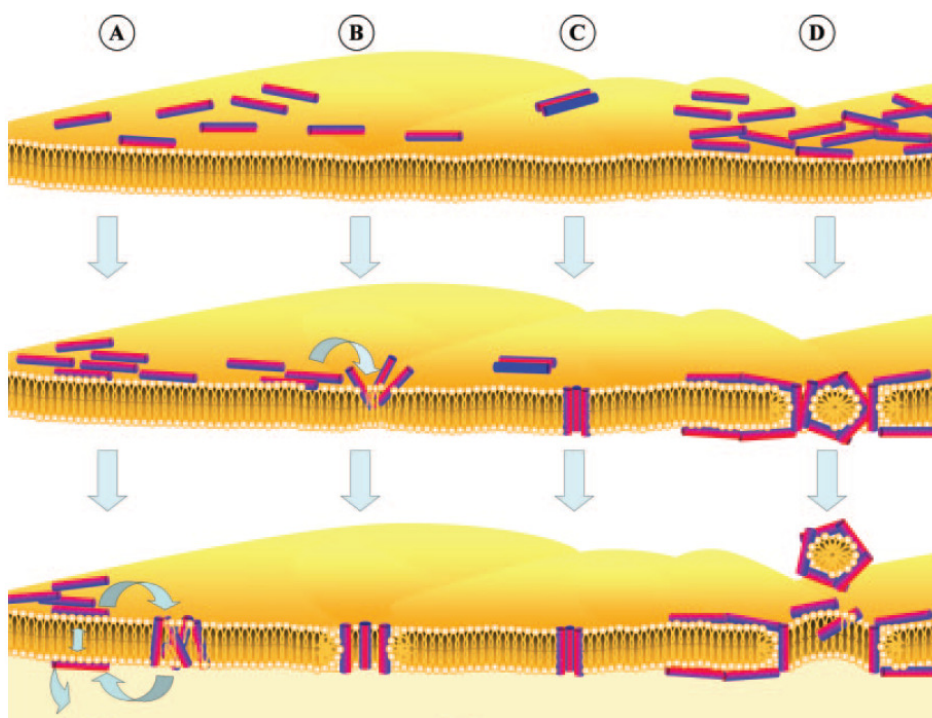


Figura 7. Mecanismo de acción de los PAE [370]. A) Modelo de "agregados", donde los péptidos se reorientan para atravesar la membrana como agregados con forma de micelas compuestas de péptidos y lípidos, pero sin adoptar una orientación particular. B) Modelo del "poro toroidal", donde los péptidos se insertan perpendicularmente al plano de la bicapa lipídica, con las regiones hidrofílicas de los péptidos asociadas con las cabezas de los fosfolípidos y las regiones hidrofóbicas asociadas con el núcleo lipídico. En este proceso, la membrana se curva hacia dentro de forma que se alinea con el poro. C) En el modelo "duelas de barril" los péptidos se insertan con orientación perpendicular al plano de la bicapa, formando las "duelas" en un agregado en forma de barril, con las regiones hidrofílicas de los péptidos hacia el lumen del poro y las regiones hidrofóbicas interactuando con la bicapa lipídica. D) En el modelo de "alfombra" se propone que los péptidos se agregan de forma paralela a la bicapa lipídica, cubriendo pequeñas áreas en forma de "alfombra". Cuando se alcanza la concentración umbral, se produce una formación de micelas y poros de membrana de manera similar a la que producen los detergentes.

Derivados de su mecanismo de acción podemos describir dos de sus características más importantes para su interés clínico: el amplio rango de patógenos susceptibles y la muy baja inducción de resistencias. Al ser la membrana un sistema biológico universal, el diseñar péptidos más activos aumentando su afinidad por membranas ocasionaría pérdida de especificidad y, con ello, efectos citotóxicos. Sin embargo, una ventaja que poseen es que la inducción de resistencias exigiría un cambio excesivo en la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática, con afectación simultánea de los numerosos sistemas enzimáticos y de transporte de ésta [369], procesos altamente improbables. En bacilos gramnegativos, los PAE deben primero desorganizar la membrana externa por interacción con el lipopolisacárido aniónico para acceder a la membrana interna, su diana final. Ya se han descrito en algunos microorganismos sistemas para cambiar la composición de los LPS de membrana, haciéndolos más positivos y evitando así por repulsión estequiométrica la interacción de péptidos catiónicos [371, 372] y polimixinas [373, 374].

La cecropina A es un péptido antibacteriano aislado de la hemolinfa de la larva del lepidóptero *Hyalophora cecropia* [375]. Las cecropinas presentan una alta similitud en su secuencia de aminoácidos y se caracterizan por ser péptidos catiónicos de 35-39 residuos y porque su extremo carboxilo terminal se encuentra amidado. Las cecropinas en solución acuosa no aparecen estructuradas. El péptido adopta una estructura de hélice-bisagra-hélice cuando interacciona con membranas celulares, provocando la permeabilización de las mismas mediante la formación de poros [375].

La melitina es el componente mayoritario del veneno de la abeja melífera europea (*Apis mellifera*). Es un péptido de 26 aminoácidos con una alta actividad citotóxica inespecífica que no requiere receptor [376]. Comparando la estructura de la melitina con la molécula de la cecropina se observa que la polaridad de la secuencia de aminoácidos es opuesta a la de la cecropina, con una región N-terminal hidrofóbica y un extremo carboxiterminal básico, donde reside la actividad citolítica [377]. La melitina en solución acuosa y a baja concentración se encuentra en forma de monómero con poca estructuración. A alta concentración de péptido y alta fuerza iónica la melitina agrega formando tetrámeros, donde la molécula de melitina adopta, al igual que la cecropina, una estructura de hélice-bisagra-hélice.

Los péptidos híbridos de cecropina A-melitina están formados en su extremo N-terminal por la región catiónica amino terminal de la cecropina A, seguida de la secuencia amino terminal de la melitina, conservando el motivo de α -hélices anfipáticas presentes en los péptidos parentales [378]. Estos péptidos híbridos cecropina A-melitina han mostrado una mayor actividad microbiciada así como un mejor espectro de acción que la cecropina A, y al mismo tiempo carecen de actividad hemolítica [350, 378, 379].

En trabajos anteriores hemos demostrado que cuatro análogos de cecropina A-melitina poseen una rápida actividad bactericida frente a cepas panresistentes de *A. baumannii* (figura 8) [353], además de mostrar una mejor actividad permeando la membrana interna bacteriana independientemente del patrón de resistencia de la cepa, principalmente debido a la mayor afinidad de los péptidos híbridos de cecropina A-melitina por el LPS bacteriano respecto a la colistina [352]. Para valorar si estos péptidos híbridos pueden significar una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistente, era necesario continuar con los estudios y evaluar su toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, así como medir su eficacia en modelos animales, trabajo que hemos llevado a cabo en esta Tesis Doctoral y que desarrollaremos más adelante.

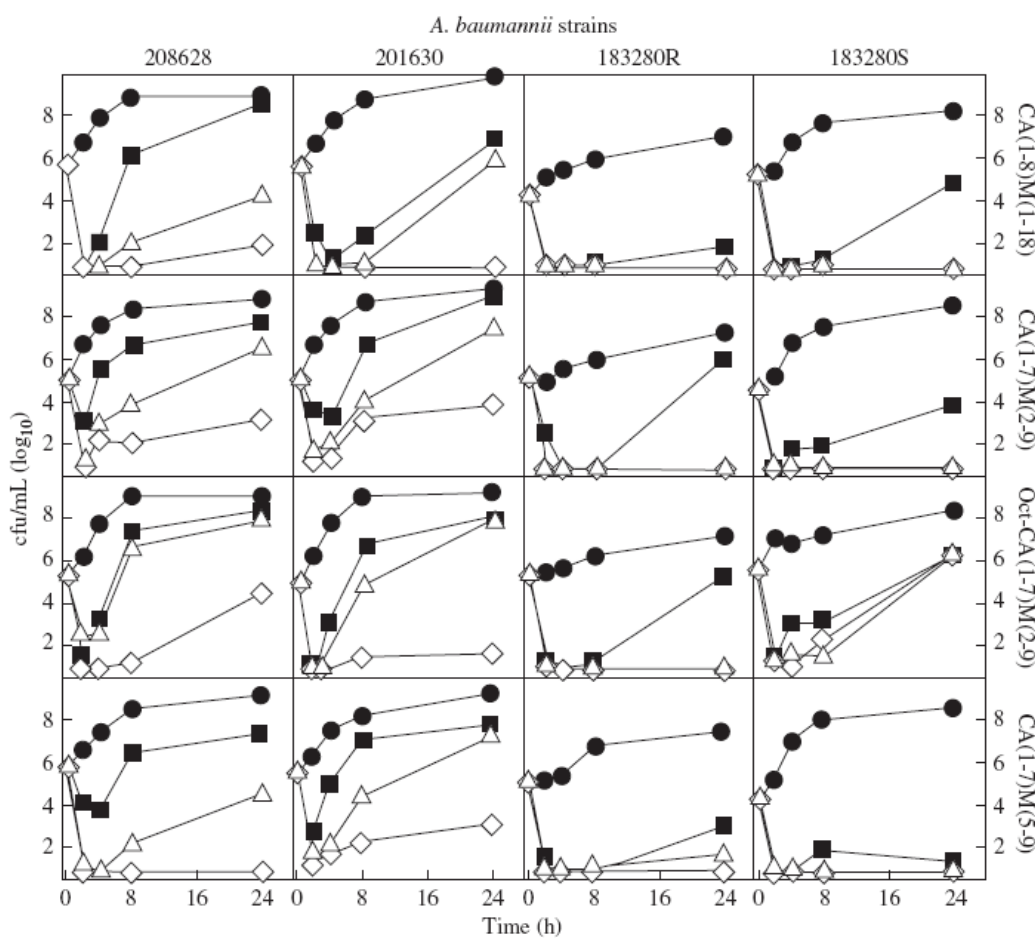


Figura 8. Actividad bactericida de péptidos híbridos de cecropina A-melitina frente a cepas panresistentes de *A. baumannii* mediante curvas de tiempo-muerte.

4.2. Quinolonas de nueva generación

Las quinolonas son agentes antimicrobianos sintéticos de amplio espectro. La primera quinolona se descubrió en 1962, el ácido nalidíxico, con escasa distribución a excepción de en orina y con limitado espectro de acción, por lo que se utilizó para tratar infecciones del tracto urinario producidas por bacilos gramnegativos [380, 381]. Desde entonces se han realizado diversas modificaciones estructurales, siendo una de las más importantes la adición del grupo piperazina en la posición 7 y del átomo de flúor en la posición 6 de la molécula de ácido nalidíxico, dando lugar al norfloxacin, perteneciente a las quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas, ya con un espectro ampliado y mayor actividad frente a bacilos gramnegativos. Desde entonces, múltiples derivados han sido sintetizados mejorando sus características farmacocinéticas

y distribución tisular, así como su espectro de acción (ver tabla 5), dando lugar a las quinolonas de tercera y cuarta generación y llevando a quinolonas, como el ciprofloxacino, a ser el antibiótico más utilizado del mundo [382].

Tabla 5. Clasificación de las quinolonas.

Clasificación	Espectro de actividad	Quinolonas
1ª Generación	Enterobacterias del tracto urinario	Ácido nalidíxico, ácido pipemídico, ácido oxolínico, cinoxacino, ácido piromídico, flumequina
2ª Generación	Bacilos aerobios gramnegativos	Norfloxacino, pefloxacino, enoxacino, nadifloxacino, tosufloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino
3ª Generación	Bacilos aerobios gramnegativos y cocos grampositivos	Levofloxacino, esparfloxacino, grepafloxacino, temafloxacino
4ª Generación	Bacilos aerobios gramnegativos, cocos grampositivos y bacterias anaerobias	Clinafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino, trovafloxacino, sitafloxacino

Las quinolonas son compuestos bactericidas que actúan inhibiendo la actividad de dos topoisomerasas de tipo II bacterianas, la ADN girasa y topoisomerasa IV. Estas enzimas están implicadas en el mantenimiento de la integridad del superenrollamiento de la hélice de ADN durante los procesos de replicación y transcripción. El mecanismo de acción de las quinolonas se basa fundamentalmente en la formación de complejos ternarios entre el ADN y las topoisomerasas tipo II (enzimas diana, ADN girasa y topoisomerasa IV), evitando así el enrollamiento de la doble hélice de ADN y liberando ADN libre, con la consiguiente disrupción cromosómica y muerte celular [383, 384]. Así pues, la acumulación intracelular de las quinolonas es fundamental para su actividad

antibacteriana. Las quinolonas penetran en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembrana de las porinas, o de la capa de los lipopolisacáridos [385].

Los principales mecanismos de resistencia a quinolonas descritos son las mutaciones en los genes que codifican las enzimas diana (ADN girasa y topoisomerasa IV) y la disminución de la acumulación de quinolona por expresión disminuida de porinas y/o sobreexpresión de sistemas de expulsión activa. También, aunque menos importantes, se han descrito resistencias mediada por plásmidos (Qnr, AAC(6')-Ib-cr, QepA) y por transferencia de fragmentos de los genes *gyrA* y/o *parC* [386]. Nos centraremos en las mutaciones de las enzimas diana, puesto que son el mecanismo de resistencia que evita la quinolona de nueva generación evaluada en esta Tesis Doctoral.

Se han descrito mutaciones que conllevan sustituciones aminoacídicas en las proteínas GyrA/GyrB de la ADN girasa y ParC/ParE de la topoisomerasa IV, involucradas en el desarrollo de la resistencia a quinolonas (tabla 6). La prevalencia de las mutaciones en sus respectivos genes codificantes está asociada con el origen (*in vivo* o *in vitro*) de las cepas. Se ha observado que la presencia de mutaciones en la ADN girasa de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas obtenidas *in vitro*, es de manera proporcional en los genes *gyrA* y *gyrB*, mientras que cuando analizamos la presencia de estas mutaciones en cepas clínicas, se obtiene una prevalencia casi exclusiva de las mutaciones en el gen *gyrA* (53, 121, 189). El que GyrA o ParC sean o no la diana primaria de las quinolonas depende del microorganismo en cuestión y de la quinolona específica. Se considera de manera general que en microorganismos gramnegativos GyrA es considerada como la diana principal, mientras que en grampositivos sería ParC (GrlA en *S. aureus*). Sin embargo, algunas quinolonas (moxifloxacino) presentan la misma afinidad por ambas enzimas (177).

Tabla 6. Mutaciones en GyrA, GyrB, ParC y ParE asociadas a la resistencia a quinolonas.

Codón	Aminoácido salvaje	Aminoácidos mutados
GyrA		
51	Ala	Val
67	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106	Gln	Arg, His
GyrB		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu
ParC		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
ParE		
445	Leu	His
458	Ser	Ala

- Mutaciones en la ADN girasa.
 - Mutaciones en el gen *gyrA*. Las alteraciones descritas en la proteína GyrA se encuentran situadas fundamentalmente en la llamada “Región Determinante de la Resistencia a Quinolonas” (RDRQ), localizada entre las posiciones 67 y 106 de la proteína GyrA [387]. Esta región se sitúa cerca de la Tyr-122, donde se postula que la ADN girasa se une al ADN. Se han descrito hasta la fecha numerosas mutaciones responsables del desarrollo de la resistencia a quinolonas; algunas de ellas (codones 51, 67, 82 y 106) sólo han sido detectadas en mutantes generados en el laboratorio, mientras que otras se han encontrado tanto a nivel de laboratorio como en aislamientos clínicos (codones 81, 83, 84 y 87) [388]. La mutación más frecuente es la localizada en la posición Ser-83, la cual se asocia a una moderada resistencia frente a fluoroquinolonas (CMI a ciprofloxacino de entre 0,125-0,25 mg/l) y una resistencia de alto nivel frente al ácido nalidíxico [389, 390]. Se ha descrito una resistencia moderada a fluoroquinolonas (CMI 1–4 mg/l) con la presencia de dos mutaciones, una en el gen *gyrA* y otra en el gen *parC*. La resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas se asocia a la presencia de dos mutaciones en el gen *gyrA* más una mutación adicional en el gen *parC*, generando una CMI frente a ciprofloxacino de entre 8–64 mg/l y finalmente, una cuarta mutación, la segunda en *parC* generaría la resistencia de mayor nivel frente a ciprofloxacino (128 mg/l) [390, 391].
 - Mutaciones en el gen *gyrB*. Las mutaciones en el gen *gyrB* también se han asociado con la resistencia a quinolonas tanto en aislamientos clínicos como en cepas de laboratorio [392]. En *E. coli* sólo se han detectado dos mutaciones responsables de este tipo de resistencia, en las posiciones Asp-426 y Lys-447. Las sustituciones observadas en la posición Asp-426 parecen conferir resistencia a todas las quinolonas, mientras que en la posición Lys-447 generan, por un lado un incremento del nivel de resistencia al ácido nalidíxico, y por el otro, una mayor sensibilidad frente a fluoroquinolonas [392]. La frecuencia de mutaciones en el gen *gyrB* en aislamientos clínicos es mucho menor que para las mutaciones en el gen *gyrA*.

- Mutaciones en la topoisomerasa IV.
 - Mutaciones en el gen *parC*. En aislamientos clínicos de *E. coli* se han encontrado mutaciones en la región de *parC* equivalente a la región determinante de la resistencia a quinolonas del gen *gyrA*. Las mutaciones más frecuentes en enterobacterias se han descrito en los codones 80 y 84 [386]. Como ya se ha mencionado, el desarrollo de una resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas en *E. coli* requiere de una o dos mutaciones en el gen *parC* además de una doble mutación en el gen *gyrA*, mientras que la presencia de una mutación en el gen *gyrA* y otra en el gen *parC* son suficientes para generar alto nivel de resistencia frente al ácido nalidíxico y resistencia moderada frente a ciprofloxacino. Tres sustituciones aminoacídicas (dos en *gyrA* y una en *parC* o una en *gyrA* y dos en *parC*) se asocian a alto nivel de resistencia frente a ciprofloxacino, y cuatro sustituciones (dos en *gyrA* y dos en *parC*) generan el mayor nivel de resistencia [388].
 - Mutaciones en el gen *parE*. El papel del gen *parE* en el desarrollo de la resistencia a quinolonas parece ser irrelevante [393]. Se han descrito sustituciones implicada en la resistencia a quinolonas en las posiciones 445, que parece afectar a la resistencia sólo cuando va acompañado de otra mutación en el gen *gyrA* [394], ó en la posición 458 [395], aunque algunos autores sugieren que no tienen ningún papel en la resistencia a quinolonas [396].

En *A. baumannii*, las mutaciones que se han referido han sido en los genes *gyrA* y *parC* [291, 292]. En el grupo del Dr. Jordi Vila han estado trabajando en estos últimos años en el desarrollo de nuevas quinolonas, concretamente en derivados del norfloxacino y del ciprofloxacino, con el objetivo de que tengan la capacidad de interaccionar con la ADN girasa, poseyendo ésta uno o dos cambios en su subunidad A, permaneciendo a pesar de la presencia de las mutaciones citadas [397]. Para ello, fueron evaluados 46 derivados de ciprofloxacino (CIP) y norfloxacino (NOR) con diferentes sustituyentes en la posición 7 de su molécula frente a diferentes cepas clínicas, con y sin mutaciones. Encontraron que la más activa fue la denominada UB-8902, un derivado del ciprofloxacino que posee un grupo metil en la posición 4 del anillo piperazilo del

ciprofloxacino, incrementando el poder antibacteriano del ciprofloxacino frente cepas salvajes y mutantes resistentes de *A. baumannii*. La CMI₅₀ de UB-8902 frente a *A. baumannii* disminuyó 16 veces con respecto a la CMI₅₀ de ciprofloxacino [397]. Además, se ha demostrado que esta molécula posee una buena y reversible penetración en leucocitos polimorfonucleares humanos, alcanzando concentraciones intracelulares 6 veces mayores que las extracelulares [398]. Con estos resultados preliminares, en esta Tesis Doctoral hemos trabajado con la UB-8902 en nuevos experimentos *in vitro*, así como en ensayos de toxicidad, farmacocinética y eficacia en modelos animales de infecciones, en aras de esclarecer si esta nueva quinolona puede ser tenida en cuenta como nueva alternativa terapéutica para las infecciones causadas por *A. baumannii*.

4.3. Inhibidor de betalactamasas ácido clavulánico

Los inhibidores de betalactamasas poseen una débil actividad antibacteriana, pero son potentes inhibidores de la mayoría de las betalactamasas codificadas por plásmidos y algunas de las cromosómicas [1]. Actúan solamente frente a las betalactamasas clase A de Ambler, esto es, penicilinasas. Pueden restaurar la actividad antibacteriana de amoxicilina, ampicilina, piperacilina, mezlocilina y cefoperazona, los cuáles pueden ser destruidos por betalactamasas comúnmente producidas por bacterias gramnegativas y grampositivas [1]. Aunque se ha descrito inhibición competitiva [399], los inhibidores de betalactamasas actúan principalmente como sustratos suicidas que forman un intermediario estable, dejando a la betalactamasa inactiva. Actualmente existen tres inhibidores de betalactamasas en uso clínico, el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Cada inhibidor está disponible en preparaciones fijas en combinación con un antibiótico betalactámico, en España como amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam y ampicilina-sulbactam. Existen pocas diferencias entre ellos en la potencia, actividad y farmacología, y clínicamente pueden ser considerados equivalentes terapéuticamente excepto por el género *Klebsiella*, frente al cuál el ácido clavulánico inhibe cepas resistentes a sulbactam y tazobactam [1].

El ácido clavulánico fue aislado del microorganismo *Streptomyces clavuligerus*. Presenta en su estructura el anillo betalactámico característico de los antibióticos de esta familia (figura 9). Sin embargo, la similitud en la estructura química de la molécula no le confiere una gran actividad bactericida intrínseca, pero le permite

interactuar con las betalactamasas segregadas por ciertas bacterias que confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos. El ácido clavulánico es un inhibidor suicida que se une covalentemente a un residuo de serina del sitio activo de las betalactamasas, presentando éstas una mayor afinidad por el inhibidor que por el betalactámico, produciéndose una inactivación de la betalactamasa.

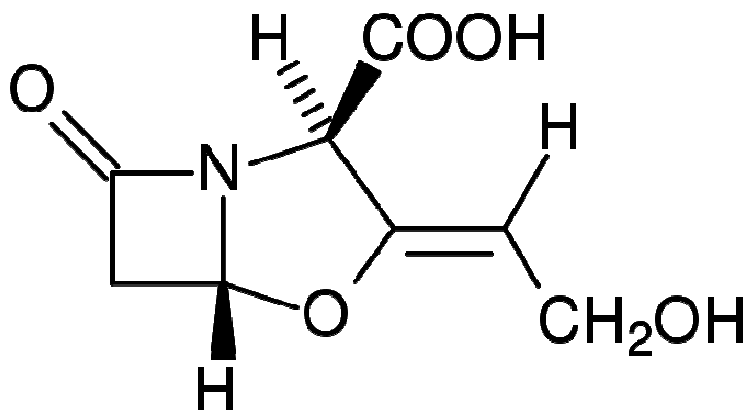


Figura 9. Estructura química del ácido clavulánico.

Cuando anteriormente hemos hablado sobre las alternativas terapéuticas para las infecciones por *A. baumannii*, comentamos la actividad intrínseca que presenta el sulbactam frente a *A. baumannii in vitro*, y su eficacia en modelos animales y en infecciones clínicas. Aunque la actividad del ácido clavulánico frente a *A. baumannii* es menor que la del sulbactam, ha mostrado tener actividad intrínseca frente a este patógeno. Dos estudios publicados recientemente, realizados sobre 100 y 115 cepas clínicas genéticamente diferentes, han mostrado rangos de CMIs de ácido clavulánico de 2 a 256 mg/l, con CMIs ≤ 8 mg/l en el 29% y el 40,9% de las cepas, respectivamente [400, 401]. En otro estudio se analizó la actividad *in vitro* de varios betalactámicos, junto con inhibidores de betalactamasas, frente a 68 cepas de *Acinetobacter* spp., mostrando que el clavulánico fue más activo que otros antibióticos como la ceftriaxona, la cefotaxima y la piperacilina [402]. Cuando en otro trabajo se analizaron combinaciones no clásicas de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, el clavulánico incrementó la eficacia de las combinaciones probadas tanto *in vitro* como *in vivo* [300].

Estos datos previos ponen de manifiesto la actividad intrínseca del ácido clavulánico frente a *A. baumannii*, si bien son necesarios nuevos experimentos para

dilucidar si este inhibidor de betalactamasas puede convertirse en una alternativa terapéutica para las infecciones causadas por este microorganismo, al igual que lo hizo el sulbactam. Para intentar dar respuesta a esta pregunta, en esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo estudios comparativos de los tratamientos con imipenem *vs.* ácido clavulánico en un modelo de neumonía murina causada por *A. baumannii*, que detallaremos más adelante.

5. MODELOS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

5.1. Ventajas y justificación

En la actualidad los modelos experimentales de infección constituyen un eslabón intermedio fundamental entre los estudios *in vitro* y los estudios clínicos, y resulta casi inconcebible el desarrollo de todo nuevo agente antimicrobiano sin verificar *in vivo* en modelos de infección en animales su eficacia y seguridad. Las guías para la evaluación clínica de antimicrobianos consideran que la eficacia y toxicidad de nuevos antimicrobianos ó combinaciones novedosas de los mismos en modelos experimentales, debe constituir un requisito previo que debe cumplirse siempre antes de plantear estudios clínicos [403].

La información que permiten obtener los modelos experimentales de infección es muy cuantiosa. En el plano de la patogenia nos permite conocer los mecanismos principales de producción de las infecciones y la interacción entre el microorganismo y los mecanismos de defensa del huésped. Por otro lado, en el plano terapéutico, nos permite conocer las características farmacocinéticas, farmacodinámicas, la eficacia antimicrobiana, la toxicidad y rutas metabólicas, así como las interacciones con los mecanismos defensivos del huésped de todo nuevo agente antiinfeccioso. Sin embargo, es importante subrayar que la información obtenida de los estudios *in vivo* en modelos animales hay que interpretarla con cautela y no se puede establecer una extrapolación directa a lo que ocurriría en el ser humano, sino que más bien estos datos deben utilizarse como base para diseñar estudios en humanos [404].

Las principales ventajas técnicas que se obtienen al utilizar modelos experimentales para la evaluación del tratamiento antimicrobiano son la posibilidad de establecer grupos del tamaño adecuado para el análisis estadístico, de establecer variaciones de diferentes parámetros en el modelo y comprobar diferencias en los resultados y la reproducibilidad. La principal limitación a la hora de interpretar los resultados de un tratamiento antimicrobiano en un modelo experimental de infección la constituye la farmacocinética, que puede llegar a ser muy diferente a la del ser humano. Esta limitación ha llevado al desarrollo en los últimos años de modelos con pautas de tratamiento que semejen lo mejor posible los parámetros farmacocinéticos del fármaco

en humanos, siendo los más importantes en este sentido el pico plasmático para el cálculo de la dosis y la vida media para el cálculo del intervalo de dosificación.

Se cuentan por más de mil los diferentes modelos de infecciones experimentales descritos hasta la actualidad. Entre ellos se encuentran modelos de diferentes infecciones bacterianas (peritonitis, absceso intraabdominal, infección urinaria, neumonía, endocarditis, meningitis por diferentes microorganismos, sífilis...); fúngicas y parasitarias (candidiasis, criptococosis, aspergilosis, paludismo, leishmaniasis, esquistosomiasis, equinococosis...); y virales (distintos herpesvirus, gripe, hepatitis B, VIH...). Desde el punto de vista del análisis de resultados y reproducibilidad, los modelos experimentales se han clasificado en dos grandes grupos: los modelos de *screening* ó no discriminativos y los modelos discriminativos.

- Los modelos de *screening* son los más utilizados en la fase inicial de evaluación *in vivo* de todo nuevo agente antimicrobiano. Se basan en producir una infección sistémica mortal en el animal de laboratorio y evaluar la dosis de antimicrobiano que reduce la mortalidad al 50%. El más conocido es el modelo de sepsis en ratón. Estos estudios son relativamente sencillos y consumen poco tiempo; sin embargo, la relevancia de los resultados obtenidos aplicada a la quimioterapia en humanos es limitada [405-407].
- Los modelos discriminativos se diseñan para semejar lo más estrechamente posible la enfermedad infecciosa en el ser humano y permiten, por su metodología, diferenciar la eficacia obtenida con distintas pautas de antimicrobianos y dosis, y las que podrían ser más efectivas en el ser humano. Los requisitos que debe cumplir un modelo discriminativo de infección experimental son tres: 1) La técnica para establecer la infección debe ser simple y el mecanismo patogénico ser idéntico ó semejarse lo más estrechamente posible al que se produce en el ser humano; 2) La afectación del órgano/tejido en cuestión (pulmón, LCR...), gravedad, curso y duración de la enfermedad producidos deben ser predecibles, reproducibles y analizables; y 3) Los resultados obtenidos con el tratamiento deben ser medibles y reproducibles. Numerosos modelos se adecúan bien a estos requisitos. Entre ellos los más significativos han sido los modelos de endocarditis en conejos, de neumonía en ratones, cobayas y perros inmunocompetentes ó inmunocomprometidos, meningitis en ratones y cobayas, infecciones urinarias en cerdos y ratas,

osteomielitis en ratas y en conejos, entre otros. Todos estos modelos han permitido un mejor conocimiento de la patogenia de distintas enfermedades infecciosas y han dado un impulso fundamental al desarrollo de estudios clínicos de tratamiento antimicrobiano que se han basado en resultados de modelos experimentales.

En resumen, podemos decir que los modelos de infección en animales constituyen el método ideal para estimar la eficacia y tolerancia de todo nuevo antimicrobiano antes de plantear el uso en humanos; y también para explorar nuevas aproximaciones en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas.

5.2. Modelo experimental de sepsis peritoneal

En 1905 Kindborg *et al.* demostraron el efecto letal de los neumococos inyectados en el peritoneo del ratón, y el efecto del aumento de virulencia que producía su paso por el ratón [408]. El concepto de estudiar el efecto *in vivo* de un antimicrobiano tratando un ratón inoculado intraperitonealmente fue introducido por Morgenroth *et al.* en el 1911, con un ensayo de la optoquina frente a neumococos. La inoculación intraperitoneal de varios microorganismos en ratones para producir peritonitis o sepsis ha sido usada para diferentes propósitos, tales como estudiar virulencia, patogénesis, curso de la infección, respuesta inmunitaria, y otros tipos de respuestas del hospedador a la inoculación de bacterias u hongos [409]. La popularidad de este modelo viene dada por la facilidad de uso, incorporando animales pequeños y baratos, fáciles de estabular y manejar, produciendo experimentos de corta duración con infecciones reproducibles. Este modelo puede servirnos para determinar puntos finales simples (supervivencia o muerte) en una primera fase de *screening* para estudiar los efectos de antimicrobianos *in vivo*, o puede servirnos para diseñar estudios sobre los efectos de la infección y tratamientos más detallados en modelos discriminativos [408].

La especie animal que más se utiliza en este tipo de modelos es el ratón, además de por razones económicas, para asegurar una población homogénea que muestre la relevancia de un posible efecto antibacteriano y permita estudiar variaciones inmunológicas u otros factores del huésped. Normalmente se usan cepas inmunocompetentes consanguíneas con una gran similitud genética entre individuos,

aunque también suelen utilizarse cepas de ratones transgénicos para el estudio de aspectos particulares.

La inoculación puede ser fácilmente llevada a cabo por una persona, normalmente mediante inyección intraperitoneal en uno de los cuadrantes inferiores del abdomen. Inmediatamente después de la infección, el sistema inmune del animal comienza a responder. En cepas poco virulentas incapaces de establecer una infección por sí mismas, la respuesta del sistema inmune suele ser ralentizada con el uso de adjuvantes como la mucina porcina gástrica [410]. También es posible la inhibición de este sistema inmune, mediante el pretratamiento de los animales con ciclofosfamida, aunque el uso de animales neutropénicos no es el más común en el modelo de peritonitis.

Este modelo, además de las consideraciones que hay que tener en cuenta al extrapolar desde un animal tan pequeño como el ratón a humanos, presenta otras desventajas. Una de las principales es la producción de la infección con altos inóculos que inducen mortalidad, que aunque pueden ser una ventaja cuando la supervivencia es utilizada como parámetro para medir el efecto de un antimicrobiano, difiere demasiado del curso normal de la peritonitis o sepsis peritoneal en humanos. Otra de las desventajas que presenta es que un ratón puede ser usado sólo una vez cuando el parámetro a medir es el recuento bacteriano en un órgano o fluido, por lo que son necesarios varios animales para medir este parámetro a lo largo del tiempo, con la consecuente variabilidad. Además, es necesario tener cautela con ciertos antimicrobianos que son más tóxicos que en humanos, como los macrólidos y el ácido fusídico.

A pesar de las desventajas descritas, el modelo murino de sepsis peritoneal es excelente para evaluar la interacción (sinergismo o antagonismo) entre fármacos *in vivo*, y continua siendo un utilísimo instrumento en las primeras fases de la evaluación de los efectos de numerosos compuestos antimicrobianos frente a patógenos humanos [408].

5.3. Modelo experimental de neumonía aguda

Los modelos experimentales de neumonía bacteriana aguda se describieron desde antes del uso clínico de las sulfonamidas en 1936 [411]. Inicialmente, los modelos de

neumonía experimental fueron casi exclusivamente de neumonías neumocócicas. Posteriormente, ante el aumento de casos en humanos de neumonías por bacilos gramnegativos y *S. aureus*, se desarrollaron modelos experimentales de neumonías causados por estos microorganismos [412-415]. Como hemos comentado anteriormente, este modelo se ha utilizado para evaluar distintos planos de esta enfermedad infecciosa como patogénesis, farmacocinética de antimicrobianos en el pulmón y eficacia de distintos antimicrobianos en neumonías producidas por distintos agentes.

Las especies animales más utilizadas, en los últimos años, en modelos experimentales de neumonía bacteriana aguda son cobayas ó ratones. La elección de una especie animal u otra dependerá de las características de la bacteria que se quiera estudiar, que debe producir una infección reproducible y eventualmente mortal, lo que vendrá condicionado por los objetivos del estudio. También dependerá de la farmacocinética de los antimicrobianos que se vayan a utilizar, de la facilidad del modelo y del coste. Las dos formas de inoculación más empleadas han sido la aspiración, a través de instilación intratraqueal o intrabronquial [416], y la utilización de aerosoles en cámaras a tal efecto para introducir el inóculo en vías respiratorias, lo cual facilita la inoculación simultánea de varios animales [417, 418].

Como hemos resaltado en el apartado anterior los modelos experimentales de neumonía bacteriana aguda reúnen las características de modelos discriminativos y han sido utilizados cada vez más frecuentemente para estudios preclínicos del desarrollo de nuevos antimicrobianos y para evaluar la actividad *in vivo* de antimicrobianos conocidos ó combinaciones distintas de ellos frente a bacterias con distintos mecanismos de resistencia.

El modelo de neumonía bacteriana aguda en cobayas inicialmente descrito por Esposito y Pennington, es el que se sigue en la actualidad por la mayoría de investigadores. Éste fué descrito inicialmente para la evaluación de diferentes pautas de tratamiento antimicrobiano y para el conocimiento de la patogénesis de la neumonía por *P. aeruginosa* [419-421]. Las ventajas que presenta este modelo son la facilidad de manejo de los animales en el laboratorio, la similitud del sistema inmunológico de los cobayas y el humano y la ausencia de colonización endémica de las vías respiratorias que suele ocurrir en otros animales de laboratorio como las ratas. Las limitaciones principales del modelo son la ausencia de letalidad del mismo cuando se utilizan otros microorganismos gramnegativos en cobayas inmunocompetentes y el coste elevado de los animales. A pesar

de estas limitaciones y gracias a sus importantes ventajas, el modelo de Esposito y Pennington ha sido utilizado posteriormente en el estudio de neumonías bacterianas agudas de otra etiología como *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y otros microorganismos [415, 418].

5.4. Modelos experimentales de infecciones por *Acinetobacter baumannii*

En los últimos años las líneas de investigación en modelos experimentales de enfermedades infecciosas han adquirido un importante impulso y desarrollo. Por otro lado, como hemos comentado en el apartado 1 de la Introducción, *A. baumannii* constituye en la actualidad un reto por el aumento en la incidencia de diferentes infecciones nosocomiales que produce, y por la progresiva adquisición de patrones de multirresistencia, lo que hace sumamente difícil el tratamiento, siendo necesario por tanto acudir a nuevos antimicrobianos y combinaciones alternativas de los mismos. Sin embargo, existen pocos trabajos de infecciones experimentales por *A. baumannii* que hayan evaluado la patogénesis y la eficacia de las diferentes alternativas terapéuticas que se pueden utilizar.

Obana *et al.* [108, 422], en 1985 y 1986 respectivamente, evaluaron la actividad de distintos antimicrobianos así como la posible patogenicidad de *A. calcoaceticus* en infecciones monomicrobianas y mixtas con otros microorganismos gramnegativos en ratones. En 1992, Soothill *et al.* [423] evaluaron el tratamiento con bacteriófagos en un modelo de infección experimental en ratones producida por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Otros estudios experimentales, evaluando varios antimicrobianos *in vivo* fueron realizados a principios de la década de 1990, pero ninguno de estos modelos fue discriminativo en su metodología [424-426].

Los trabajos experimentales discriminativos de infecciones por *A. baumannii* son recientes y, aunque escasos, la importancia de este microorganismo y la falta de tratamientos eficaces hace que estos estudios estén aumentando en número. Detallaremos brevemente algunos de ellos.

Joly-Guillou *et al.* [427] en 1997 describieron un modelo de neumonía letal por una cepa de *A. baumannii* sensible a imipenem (CMI=0,5 mg/l) en ratones neutropénicos y evaluaron el efecto postantibiótico de imipenem *in vivo*; observaron un

efecto postantibiótico prolongado *in vivo*, mientras que *in vitro* no hubo efecto postantibiótico.

Wolff *et al.* [300], en 1999, evaluaron en el mismo modelo de neumonía en ratón neutropénico producida por dos cepas de *A. baumannii* (una cepa sensible y otra con sensibilidad intermedia a carbapenemes), la eficacia de diferentes combinaciones de betalactámicos, inhibidores de betalactamasa y rifampicina; observaron una mayor supervivencia con las pautas que contenían sulbactam y rifampicina. El principal interés de estos estudios fue la elección del modelo de neumonía, que como sabemos es la infección que más frecuentemente causa *A. baumannii* en el ser humano y la descripción del primer modelo discriminativo de infección por *A. baumannii*.

Cuberos *et al.* [428], en 1999, desarrollaron un modelo de endocarditis aórtica en conejos inmunocompetentes por una cepa de *A. baumannii* multirresistente y con sensibilidad intermedia a imipenem y evaluaron la eficacia de diferentes pautas de antimicrobianos, encontrando que imipenem fue el antimicrobiano más eficaz en el aclaramiento bacteriano de las vegetaciones; al igual que en el modelo anterior, la combinación de imipenem y amikacina no mejoró los resultados obtenidos con imipenem en monoterapia. La ventaja de este modelo, además de utilizar animales inmunocompetentes, fue que al ser un modelo bacteriémico por definición, constituyó una herramienta eficaz en el estudio de las alternativas terapéuticas de la bacteriemia por *A. baumannii*, que como sabemos es la segunda infección en frecuencia asociada a este microorganismo.

Rodríguez-Hernández *et al.* [142], en 2000, describieron un nuevo modelo de neumonía letal por una cepa de *A. baumannii* multirresistente pero sensible a imipenem en ratones inmunocompetentes y evaluaron la eficacia del tratamiento con imipenem, amikacina y doxiciclina, en monoterapia ó combinados. Encontraron que imipenem fue el antimicrobiano más eficaz y que las combinaciones con amikacina no mejoraban los resultados obtenidos con imipenem. Este modelo tuvo la ventaja de utilizar animales inmunocompetentes, lo que se acerca más a lo que ocurre en la clínica, pues la mayoría de los pacientes que desarrollan neumonía por *A. baumannii* no presentan neutropenia como factor de riesgo.

Joly-Gillou *et al.*, en 2000, evaluaron la actividad de levofloxacinó administrado solo o en combinación con imipenem, en un modelo de neumonía en ratón

usando dos cepas de *A. baumannii*, una sensible y otra con sensibilidad intermedia. Comprobaron que la combinación no mejoró la eficacia de levofloxacino [429].

Rodríguez Hernández *et al.*, en 2001, compararon la eficacia de sulbactam e imipenem en un modelo de neumonía experimental causado por una cepa sensible de *A. baumannii* en ratones inmunocompetentes y en un modelo experimental de endocarditis en conejos, usando una cepa de *A. baumannii* con sensibilidad intermedia. Encontraron en el modelo de neumonía que los resultados de ambos antimicrobianos eran similares si la farmacodinamia también lo era, mientras que en el modelo de endocarditis imipenem era más eficaz que sulbactam [298].

Montero *et al.*, en 2002, estudiaron la eficacia de colistina frente a betalactámicos, aminoglucósidos y rifampicina en monoterapia en un modelo de neumonía en ratón causado por cepas de *A. baumannii* multirresistente. Concluyeron que colistina no es una buena opción en el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemes [322].

Fetiye *et al.*, en 2004, compararon imipenem, meropenem y cefoperazona-sulbactam frente a cepas hospitalarias de *A. baumannii* en un modelo de abscesos subcutáneos en ratas, encontrando que cefoperazona-sulbactam es comparable a los carbapenemes en este modelo [430].

Ko *et al.*, en 2004, evaluaron la eficacia terapéutica de la combinación meropenem-sulbactam en un modelo murino *in vivo* usando una cepa endémica de *A. baumannii* multirresistente, hallando que la combinación podía tener más actividad antimicrobiana frente a este tipo de cepas que los antimicrobianos administrados en monoterapia [431].

Rodríguez Hernández *et al.*, en 2004, estudiaron la eficacia de colistina en un modelo experimental de endocarditis en conejos, usando una cepa de *A. baumannii* sensible a colistina y con sensibilidad intermedia a imipenem. Encontraron que la colistina no es un tratamiento adecuado en las endocarditis causadas por estas bacterias, quizá por la pobre penetración que tiene en las vegetaciones y la baja proporción C_{max}/C_{MI} en tejido [321].

Montero *et al.* [301], en 2004, estudiaron la sinergia entre distintos antimicrobianos frente a 2 cepas de *A. baumannii* multirresistentes. Encontraron que las

asociaciones de rifampicina al resto de antimicrobianos eran efectivas en estas infecciones causadas por este tipo de cepas.

Bernabeu-Wittel *et al.* investigaron en 2005 la eficacia en un modelo de neumonía murina de imipenem en monoterapia frente a la combinación con amikacina, así como sus farmacocinéticas. Concluyeron que la monoterapia era mejor que la combinación de ambos antibióticos, probablemente debido a un antagonismo entre ellos que resultaba en un decremento de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos [340].

Pachón-Ibáñez *et al.* estudiaron en 2006 mediante un modelo murino de neumonía la prevención de la aparición de mutantes resistentes a rifampicina mediante su administración en combinación con imipenem y sulbactam. Concluyen desaconsejando el uso de rifampicina en monoterapia para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistente [304].

Pantopoulou *et al.* en 2007, en un modelo de infección de muslo en ratas neutropénicas, analizaron la coadministración de colistina y rifampicina, encontrando que el tratamiento con colistina frente a *A. baumannii* multirresistente es eficaz, y que la coadministración con rifampicina aumenta dicha eficacia [303].

Song *et al.* [432] estudiaron diversos tratamientos en monoterapia, así como las combinaciones de rifampicina más imipenem o colistina, en un modelo de neumonía murina en animales neutropénicos. Usaron tres cepas carbapenem-resistentes con tres mecanismos de resistencia diferentes. Encontraron que en monoterapia solamente rifampicina fue eficaz, mientras que la adición de imipenem o colistina resultó en sinergia. Hay que señalar que, a pesar de las similares CMIs de rifampicina de las cepas, encontraron que los resultados *in vivo* fueron cepa-dependientes. Ello es un elemento a tener en cuenta, puesto que como ya hemos visto, son diversos y no bien conocidos los mecanismos de virulencia de *A. baumannii*, y existen trabajos que demuestran la cepa-dependencia de la patogenicidad en este microorganismo [433].

Crane *et al.* han desarrollado en 2009 un modelo de osteomielitis en ratón por cepas multirresistentes de *A. baumannii* aisladas de heridos de guerra, en el que compararon el tratamiento con colitina parenteral vs. el tratamiento local con perlas de polimetilmetacrilato impregnadas con colistina. Concluyeron que el tratamiento con las

perlas fue eficaz en el 70,8% de los animales, mientras que el tratamiento parenteral fracasó [434].

Cirioni *et al.* han estudiado en 2009 la eficacia de la rifampicina, del péptido antimicrobiano buforina II, y de la combinación de ambos, en un modelo de sepsis peritoneal en rata. Encontraron que la buforina II fue activa disminuyendo la concentración bacteriana y disminuyendo la inflamación debida a la sepsis, así como un efecto sinérgico en el tratamiento combinado [435].

Chiang *et al.* [436] han evaluado en 2009 la eficacia en un modelo de neumonía por *A. baumannii* carbapenem-resistentes de la administración intratraqueal de la colistina. Demostraron una mayor eficacia tanto en supervivencia como en disminución de la concentración bacteriana de la administración intratraqueal de la colistina comparada con colistina intraperitoneal, y con imipenem más sulbactam intraperitoneal.

Pichardo *et al.* han evaluado en 2010 la eficacia del tratamiento con imipenem vs. tigeciclina en un modelo de neumonía murina por cepas de *A. baumannii* sensibles e intermedias a imipenem. Concluyeron que el tratamiento con imipenem fue más eficaz que la tigeciclina, puesto que ambos tratamientos redujeron la concentración bacteriana en pulmón, pero únicamente el imipenem fue capaz de disminuir la mortalidad [437].

Por último, Pachón-Ibáñez *et al.* en 2010 han comparado la eficacia de rifampicina y sus combinaciones con imipenem, sulbactam y colistina, en modelos de neumonía y meningitis por cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem. En este trabajo concluyen que en el modelo de meningitis, los tratamientos eficaces fueron la rifampicina en monoterapia y su combinación con colistina, mientras que en el modelo de neumonía los tratamientos más eficaces fueron la monoterapia con rifampicina y sus combinaciones con imipenem o sulbactam [342].

Los trabajos realizados han recogido las inquietudes principales de la comunidad científica en lo que respecta a estas infecciones, centrándose en la eficacia comparativa de distintas pautas de tratamiento antimicrobiano y combinaciones alternativas de los mismos de cara a su futura exportación al escenario clínico.

II. JUSTIFICACIÓN

Acinetobacter baumannii se ha convertido en un paradigma de microorganismo nosocomial emergente, debido a la importancia e implicación en situaciones de endemia y brotes nosocomiales de infección. La difusión y extensión de la epidemia de infecciones nosocomiales por *A. baumannii* se debe principalmente a cuatro factores claves, dos inherentes a la especie que la convierten en única para perpetuarse y diseminarse en el medio hospitalario, y dos derivados de la práctica médica y características de los pacientes hospitalizados en los últimos años. Estos factores son: a) la adaptación de *A. baumannii* a condiciones ambientales adversas, pudiendo sobrevivir en superficies inertes mucho más que otros microorganismos; b) la enorme capacidad natural de desarrollo de resistencias a múltiples antimicrobianos; c) la extensión del uso de antimicrobianos de amplio espectro en el ámbito hospitalario en los últimos años que contribuye a la selección y supervivencia de esta especie entre otros microorganismos nosocomiales con menor resistencia natural a antibióticos; y d) el aumento de potenciales huéspedes susceptibles de adquirir infecciones por *Acinetobacter* spp., al haber aumentado en los últimos años el número de pacientes con comorbilidades subyacentes, inmunosupresión y de pacientes sometidos a técnicas agresivas de monitorización (catéteres venosos, arteriales, sondaje urinario) y tratamiento (soporte ventilatorio invasor, drenajes de cavidades), que conllevan la disrupción de las barreras naturales.

Actualmente la situación epidemiológica de las infecciones por *A. baumannii* se caracteriza por la continua y creciente aparición de nuevos brotes nosocomiales provocados por cepas multirresistentes en diferentes lugares, lo cual dificulta enormemente el tratamiento. Además, en los últimos años algunos de los centros implicados poseen un patrón epidemiológico de endemia que dificulta su control y erradicación.

El tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* se ha convertido en un problema, ya que existe un progresivo desarrollo en los últimos años de resistencias a distintos antimicrobianos previamente activos, como penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósidos. El patrón de sensibilidad de los últimos años se ha caracterizado por el mantenimiento de sensibilidad frente a carbapenemes en la mayoría de centros en que el uso de estos antimicrobianos se restringió y por el desarrollo progresivo de resistencias a carbapenemes en otros centros con un uso más expandido de los mismos. La resistencia a imipenem, en los centros hospitalarios en los que ocurre,

frecuentemente se asocia a un patrón de multiresistencia, que incluye eventualmente resistencia a colistina, tornándose las cepas en panresistentes a todos los antimicrobianos disponibles para su uso en humanos.

En el tratamiento de las infecciones por estas cepas multirresistentes no existen alternativas con eficacia probada. Antibióticos anteriormente en desuso o no utilizados habitualmente para el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos, tales como la colistina, rifampicina ó tigeciclina, se usan tanto en monoterapia como en combinación, con resultados contradictorios y provenientes de estudios clínicos abiertos y de modelos experimentales. Por todo ello, la carencia actual de un tratamiento estándar óptimo para las infecciones producidas por este tipo de microorganismos, hacen imperiosa la necesidad de la búsqueda de nuevas moléculas que puedan servir como alternativas terapéuticas.

Los modelos de infección en animales constituyen el método ideal para explorar nuevas aproximaciones en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas que plantean problemas terapéuticos, como es el caso de las infecciones por *A. baumannii*. Además, es un paso necesario en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, ayudando a dilucidar aspectos tan importantes de las nuevas moléculas tales como su toxicidad, farmacocinética y eficacia *in vivo*, siendo imprescindibles estudios de este tipo previamente al planteamiento de cualquier ensayo clínico en humanos.

Por tanto, son necesarios nuevos estudios experimentales, *in vitro* e *in vivo*, que evalúen nuevas alternativas terapéuticas para la infección por *A. baumannii*, teniendo en cuenta la frecuencia cada vez más alta de infecciones por cepas multirresistentes. De los resultados de modelos experimentales podrían derivarse conclusiones de importancia, las cuales impulsarán el diseño de nuevos estudios clínicos para determinar si estas nuevas moléculas pueden servir como alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones graves causadas por *A. baumannii*.

III. HIPÓTESIS

LAS HIPÓTESIS DEL ESTUDIO SON:

1. Todos los antimicrobianos utilizados (péptidos híbridos de cecropina A-melitina, UB-8902 y ácido clavulánico) muestran actividad bactericida *in vitro* frente a *Acinetobacter baumannii*.
2. Los antimicrobianos anteriores presentan baja toxicidad, presentando dosis letales suficientemente superiores a las dosis efectivas en el animal de experimentación.
3. Todos los antibióticos utilizados son eficaces en el tratamiento de las infecciones murinas graves por *A. baumannii*, en términos de supervivencia y aclaramiento bacteriano en tejidos.
4. Estos antimicrobianos son igual de eficaces en el tratamiento de las infecciones murinas graves por *A. baumannii*, valorando dicha actividad mediante la dosis efectiva 50 (DE₅₀) y el aclaramiento bacteriano en tejidos.
5. Existe relación entre la actividad bactericida *in vitro* y la eficacia *in vivo*. Así, todos los antibióticos utilizados en el estudio muestran actividad bactericida *in vitro* en las curvas de letalidad a concentraciones iguales o inferiores a la C_{max} alcanzada en el plasma de ratón.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es evaluar la actividad de nuevas moléculas antibióticas *in vitro* y en modelos murinos de infecciones producidas por cepas clínicas de *A. baumannii* con diferentes patrones de sensibilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la eficacia de nuevas moléculas híbridas de cecropina A-melitina [CA(1-8)M(1-18), octanoil-CA(1-7)M(2-9), CA(1-7)M(2-9) y CA(1-7)M(5-9)] en un modelo murino de infección sistémica utilizando cepas de *A. baumannii* panresistente, incluyendo resistencia a colistina, a través de un modelo no discriminativo como el paso inicial necesario en la valoración de nuevas moléculas antibióticas. Adicionalmente, se comparará la actividad *in vivo* con la observada *in vitro* y se evaluará la respuesta inflamatoria tras el tratamiento con dichos péptidos.
2. Evaluar la actividad de un nuevo derivado del ciprofloxacino (UB-8902) *in vitro* y su eficacia *in vivo*, tanto en un modelo experimental no discriminativo de sepsis peritoneal como en un modelo de neumonía murina producidos por *A. baumannii* resistente a ciprofloxacino.
3. Determinar la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* del inhibidor de β -lactamasas ácido clavulánico, en un modelo experimental de neumonía murina causado por cepas clínicas de *A. baumannii*.

V. RESULTADOS

OBJETIVO 1. Estudiar la eficacia de nuevas moléculas híbridas de cecropina A-melitina [CA(1-8)M(1-18), octanoil-CA(1-7)M(2-9), CA(1-7)M(2-9) y CA(1-7)M(5-9)] en un modelo murino de infección sistémica utilizando cepas de *A. baumannii* panresistente, incluyendo resistencia a colistina.

ARTÍCULO 1. Submitted to European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

Title: Efficacy of cecropin A-melittin peptides on a sepsis model of infection by pan-resistant *Acinetobacter baumannii*.

Authors: Rafael López-Rojas^{1*}, Fernando Docobo-Pérez¹, María Eugenia Pachón-Ibáñez¹, Beatriz G. de la Torre², María Fernández-Reyes³, Catalina March⁴, José Antonio Bengoechea⁴, David Andreu², Luis Rivas³, and Jerónimo Pachón¹.

¹Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/Universidad de Sevilla/CSIC Sevilla, 41013 Sevilla, Spain; ²Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; ³Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain; ⁴Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears and Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CibeRes), 07110 Bunyola, Spain.

*Corresponding author: Rafael López-Rojas. Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Sevilla, Spain. Phone: +34-955013651. Fax: +34-955013345. E-mail: rlopezrojas@hotmail.com

ABSTRACT

Purpose. Pan-resistant *Acinetobacter baumannii* have prompted the search for therapeutic alternatives. We evaluate the efficacy of four cecropin A-melittin hybrid peptides (CA-M) in vivo.

Methods. Toxicity was determined in mouse erythrocytes and in mice (lethal dose parameters, LD₀, LD₅₀, LD₁₀₀). Protective dose 50 (PD₅₀) was determined by inoculating groups of 10 mice with the minimal lethal dose of *A. baumannii* (BMLD) and treating with doses of each CA-M from 0.5 mg/kg to LD₀. The activity of CA-Ms against *A. baumannii* was assessed in a peritoneal sepsis model. Mice were sacrificed at 0 and 1, 3, 5, and 7 h post-treatment. Spleen bacterial concentration and peritoneal fluid, and serum TNF- α levels, were measured.

Results. CA(1-8)M(1-18) was the less haemolytic on mouse erythrocytes. LD₀ (mg/kg) was 32 for CA(1-8)M(1-18), CA(1-7)M(2-9), and Oct-CA(1-7)M(2-9), and 16 for CA(1-7)M(5-9). PD₅₀ was not achieved with non-toxic doses (\leq LD₀). In the sepsis model, all CA-Ms were bacteriostatic in spleen, and decreased bacterial concentration ($p < 0.05$) in peritoneal fluid, at 1 h post-treatment, concomitant with a rise of serum TNF- α levels; at later times, bacterial regrowth was observed in peritoneal fluid.

Conclusions. CA-Ms showed local efficacy of short duration in the peritoneal sepsis model caused by panresistant *Acinetobacter baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, cecropin A-melittin hybrid peptides, experimental sepsis model, bacterial panresistance, new antimicrobials.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative coccobacillus that causes an increasing number of mainly nosocomial infections, with pneumonias, bacteremias, urinary tract infections, surgical site infections, and meningitis as the most frequent ones [1]. This pathogen has relevant clinical implications as it survives on almost every surface and develops resistance to all available antibiotics [2]. Thus, several outbreaks associated to a high morbidity and mortality have been caused by multi-drug resistant or even pan-resistant *A. baumannii* strains [3, 4], with a dramatic reduction in the available antimicrobial armamentarium, including the last gold-standard imipenem [5, 6], and colistin [7]. Therefore, an urgent need exists for new agents to treat MDR *A. baumannii* nosocomial infections.

Eukaryotic antimicrobial peptides (EAPs) are important components of the innate immune response of higher organisms against invasive pathogens [8]. Despite their diverse size and structures, nearly all EAPs have a strong cationic character and fold into amphipathic structures, two features that are critical for bacterial killing. This is achieved by disruption of the pathogen membranes, by stoichiometric interaction of the EAP with the anionic phospholipids on the extracellular leaflet of the cell membrane of prokaryotes and lower -though not higher- eukaryotes [9-12]. As a result, EAPs show broad spectrum activity, fast killing rates, and scarce induction of resistance. Other advantages are their anti-endotoxic properties [13-15] and potential synergism with classical antibiotics. On the downside are their rather short life in biological fluids, poor tissue penetration, and high production costs [9, 10]. Being gene-encoded, EAPs show simple, if any posttranslational modifications, which makes optimization of their microbicidal activity easily achievable by genetic or chemical manipulation of the primary structure [16, 17]. In this regard, the cecropin A-melittin (CA-M) hybrid peptides are paradigmatic. CA-M peptides are formed by juxtaposing the cationic N-amino terminus of cecropin A (CA) to the hydrophobic N-terminus of melittin (M) [18, 19]. The result is a significant reduction of the toxicity with respect to M, and a substantial improvement of the antibiotic activity on Gram-positive bacteria, fungi and protozoa relative to CA [19-22].

In a previous work we demonstrated the in vitro antibiotic efficacy of four CA-M hybrids against four pan-resistant *A. baumannii* strains by membrane permeabilization, regardless of the resistance pattern of the strain [23, 24]. The present study aims to determine the in vivo potential of CA-M peptides as chemotherapeutic alternative on *A. baumannii*, evaluated on an experimental model of peritoneal sepsis.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains. The clinical pan-resistant *A. baumannii* strain 208628 (Ab208628), chosen from a previous work by its high colistin MIC (64 µg/mL) [23], was used. The isolate was stored at -70 °C until required.

Antimicrobial peptides. Peptides (Table 1) were synthesized by solid phase methods using Fmoc chemistry as described [21]. They were purified by reverse phase HPLC (>98%), characterized by MALDI-TOF mass spectrometry and quantified by tryptophan absorbance [21].

Animals. For the sepsis animal model, immunocompetent C57BL/6 female mice [25] (16-20 g), obtained from the animal facility of Seville University were used. Animals had pathogen-free sanitary status and assessed genetic authenticity. For haemolytic activity assays, BALB/c mice (22-28 g, from the animal facility at Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain) were chosen due to their high blood volume (10.75 mL/100 g) [26]. Animals were housed in regulation cages with food and water ad libitum. Surviving mice were sacrificed after 7 days with a 5% (wt/vol) overdose of thiopental. Clearance from the Ethics and Clinical Research Committee of the Virgen del Rocío University Hospitals and Centro de Investigaciones Biológicas were obtained.

Haemolytic activity. Haemolysis was chosen as a parameter for peptide cytotoxicity on mice cells. Erythrocytes from blood withdrawn by cardiac puncture were washed twice in Hank's medium (140 mM NaCl, 4.0 mM Na₂HPO₄, 1.0 mM KCl, 4.8 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, pH 7.2) to eliminate serum and free haemoglobin. The resulting erythrocytes were resuspended in the same medium at 4x10⁷ cells/mL; 50 µL aliquots were transferred into Eppendorf tubes. An equal volume of the peptide in Hank's was added. After incubation (4h, 37°C), the suspension was centrifuged (Hettich, Mikro 200, 3 min, 3000 x g). An aliquot (90 µL) of the supernatant, containing the released haemoglobin, was carefully withdrawn, transferred into a 96 microwell plate, and measured in a BioRad 680 plate reader at 550 nm. Full haemolysis (100%) was achieved by lysis with Triton X-100 (0.1%, final concentration) [27]. Experiments were repeated at least twice using samples by triplicate.

In vivo toxicity. The Reed and Munch method [28] was applied. Groups of six C57BL/6 mice were intraperitoneally (i.p.) inoculated with a single 250 µL dose of peptide, starting at 0.5 mg/kg and serially duplicated until 100% mortality was reached. Maximum tolerated dose (LD₀), lethal dose 50 (LD₅₀), and lethal dose 100 (LD₁₀₀), were defined as those causing 0%, 50%, and 100% mortality, respectively. Other signs of toxicity (piloerection, handicapped motility), were additionally monitored.

Determination of bacterial minimal lethal dose (BMLD) and bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀). To assess BMLD (minimal inoculum causing a 100% mortality) and BLD₅₀, groups of ten C57BL/6 mice were inoculated i.p. with 250 µL of a ten-fold serially diluted inoculum, starting at 10⁸ CFU/mL [28], obtained from a 24 h of Ab208628 culture in Mueller-Hinton II broth, cation adjusted (MHBCA; Becton Dickinson, Cockeysville, MD) at 37° C. Dilutions were done with saline solution plus 5% (wt/vol) porcine gastric mucin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The animals were observed for 7 days and their cumulative survival rates recorded.

As a control group, ten mice were inoculated with 250 µL of porcine mucin as above, to discard an intrinsic toxic effect of mucin.

Determination of protective dose. The protective dose for 50% of the population (PD₅₀) was determined for each peptide [28]. Groups of 10 mice were infected i.p. with a BMLD inoculum. Four hours later, animals were treated i.p. with two-fold increasing doses of each peptide (0.5 mg/kg to LD₀), in physiological serum (0.5 mL final volume), and observed for 7 days to measure cumulative survival rates.

Influence of serum on activity of CA(1-8)M(1-18). Two complementary experiments were carried out: a) CA(1-8)M(1-18) at 25 µg/mL (80% haemolysis) was mixed with serum at different concentrations (0-20% vol/vol), and incubated (15 min, 37°C) prior to its addition to the erythrocyte suspension. Afterwards, the haemolysis was assayed as above. b) Variation of haemolysis with CA(1-8)M(1-18) concentration (0-200 µg/mL), was checked at a fixed 10% serum concentration. CA(1-8)M(1-18) was then incubated with 10% autologous mouse serum (15 min, 37°C), prior to its addition to erythrocyte suspension, and haemolysis assayed by the standard procedure.

The inhibition by serum of the bactericidal activity of CA(1-8)M(1-18) and its all-D enantiomer was tested at a concentration equal to their MIC calculated in the absence of serum (4 µg/mL). To this end, peptide was incubated with serum (0-20% vol/vol) for 15 min at 37°C before its addition to bacterial suspension (initial inoculum 5x10⁵ CFU/mL, final volume 100 µL). The bacteria were allowed to grow 24h at 37°C and read at 600 nm. The intrinsic effect of different amounts of serum on bacterial growth was corrected, inhibition percentages being referred to their respective growth rate.

Experimental peritoneal sepsis in mice. Groups of 25 female C57BL/6 mice were i.p. inoculated with BMLD. After 4 hours, animals were i.p. injected with a single dose of each peptide (16 mg/kg) diluted in physiological serum (0.5 mL final volume). This dose corresponds the LD₀ for CA(1-7)M(5-9) and the dose previous to LD₀ for the other peptides. A group of 25 infected but untreated mice was used as a control (control A).

Groups of 5 mice were sacrificed at 4, 5, 7, 9, and 11 h after bacterial inoculation (0, 1, 3, 5 and 7 h post-treatment). The CFUs in peritoneal fluid were determined by i.p. injection of 2 mL sterile saline serum and, after mild abdominal massage, 1 mL of peritoneal fluid was aspirated with a sterile pipette tip. One hundred μ L aliquots of serial ten-fold dilutions were plated on Columbia sheep blood agar and incubated at 37°C. CFUs were counted after 24 h and expressed as median (P_{25} , P_{75}) of \log_{10} CFU/mL. Spleens were aseptically removed and homogenized (2 min), in 2 mL of sterile saline solution (Stomacher 8, Tekmar Co., Cincinnati, OH). After ten-fold dilution of the homogenate, 100 μ L aliquots were plated on Columbia sheep blood agar and CFUs determined as above and expressed as median (P_{25} , P_{75}) of the \log_{10} CFU/g of tissue.

Inflammatory response in vivo. To ascertain the inflammatory response in mice treated with CA-M peptides, serum TNF- α levels were measured (ELISA, BioSource, Nivelles, Belgium) in: a) control A and the four sets treated with each peptide in the experimental peritoneal sepsis; b) groups of 25 uninfected mice receiving nothing (control B) or a single i.p. dose of 16 mg/kg of each CA-M; and c) Mock group (25 mice) inoculated with porcine gastric mucin and 4h later with saline serum without peptide (control C). Serum was obtained by retro-orbital (orbital sinus) bleeding, followed by blood centrifugation (15 min, 3000 x g), 4, 5, 7, 9, and 11 hours post-bacterial inoculation. TNF- α levels were determined by duplicate in pooled sera (5 animals per group), according to manufacturer instructions. Results are expressed after subtraction of the 4 h values.

RESULTS

Haemolytic activity. The results of the haemolytic activity of the CA-M hybrid peptides on mouse erythrocytes are shown in Figure 1. Haemolysis rises steeply with peptide concentration, reaching >60% at 5 μ g/mL, except for CA(1-8)M(1-18) with a less pronounced increase. Interestingly, despite the increase in overall hydrophobicity caused by octanoylation of CA(1-7)M(2-9), the haemolysis of Oct-CA(1-7)M(2-9) is moderately lower than its non acylated parental peptide.

In vivo toxicity. Lethal parameters, LD₀, LD₅₀, and LD₁₀₀ of each peptide are summarized in Table 1. LD₀ ranged between 16 and 32 mg/kg, and LD₁₀₀ between 64 and 128 mg/kg. As adverse effects, transitory movement disorders and muscle spasms were observed with dose-dependent duration, from 4 mg/kg except for CA(1-8)M(1-18), which starts at 8 mg/kg.

Determination of bacterial minimal lethal dose (BMLD) and bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀). The BMLD of Ab208628 was 2.5×10^6 CFU. This value was used for the rest of animal assays. BLD₅₀ was 5×10^5 CFU. A 2.5×10^4 CFU inoculum did not cause mortality.

Protective dose determination. Four hours after the i.p. inoculation with the BMLD of Ab208628, peptides ranging from 0.5 mg/kg up to the respective LD₀ (Table 1) were administered to the animals. PD₅₀ was not achieved at non-toxic doses of any peptide. Results are shown in Figure 2.

Influence of serum on activity of CA(1-8)M(1-18). The haemolytic activity of CA(1-8)M(1-18) at 25 µg/mL was severely reduced with increasing serum concentration (Figure 3A). Additionally, the haemolysis extent for CA(1-8)M(1-18) at 10% serum was considerably lower than in absence of serum (Figure 3B).

The bactericidal activity of CA(1-8)M(1-18) and its all-D enantiomer, assayed at their MICs on Ab208628, was inhibited by preincubation with serum in a concentration-dependent manner. It is worth noting that the percentage of inhibition for the all-D enantiomer, impervious to proteolytic activity, was consistently lower than the all-L peptide (Figure 3C).

Experimental peritoneal sepsis in mice. The bacterial concentration in the peritoneal fluid was consistently reduced ($p < 0.05$, Mann-Whitney *U* test) by CA-M peptides with respect to 4 h values in the control group. Nevertheless, a later bacterial re-growth ensued for all CA-M hybrids (Figure 4). In the spleen, the increase of approximately 1 log of spleen CFUs observed at later times in untreated mice was abolished by all the peptides. Furthermore, a slight reduction in original CFUs was observed for Oct-CA(1-7)M(2-9). This decrease is delayed with respect to that for peritoneum with a maximal reduction at 7 h post infection (3 h after peptide inoculation) (Figure 4).

Inflammatory response in vivo. A significant increase of serum TNF-α at 11 h was observed in the untreated, infected control A. In infected and treated mice, an increase of TNF-α level was perceived relative to non-treated mice between 5 and 9 h, with the exception of CA(1-8)M(1-18), which only increased the TNF-α level at the 5 h time-point (Figure 5). There is a relationship between the decrease of CFU concentration in peritoneal fluid and the increase of TNF-α level due to the treatment (Pearson correlation coefficients [*r*] were 0.543 for controls, and -0.691, -0.869, -0.691, and -0.842 for CA(1-8)M(1-18), CA(1-7)M(2-9), Oct-CA(1-7)M(2-9), and CA(1-7)M(5-9), respectively [$p < 0.01$]). Throughout the 11 h time-point of the experiment, a nil increase in serum TNF-α was observed for controls B and C, and for the four uninfected groups receiving CA-M peptides.

DISCUSSION

The lack of optimal alternatives for treatment of MDR *A. baumannii* infections, including the recently introduced tigecycline, has prompted the search of new therapeutic options, especially for nosocomial infections [2, 29]. We and others have postulated that EAPs alone or in combination with conventional antibiotics may present a feasible alternative against the ever-raising multiresistance of microorganisms [30, 31]. Another appealing application is their role as anti-endotoxic agents, underscored by their binding to bacterial endotoxins, as illustrated by EAPs such as ranalexin [15], pexiganan [32], and rBPI [33], which block LPS-dependent TNF- α induction in macrophages.

A number of EAPs have been tested in vitro on *Acinetobacter* with in vitro MICs in the $\mu\text{g/mL}$ range, even in the presence of large serum percentages [34]. CA-M hybrids and their parent peptides, CA, and M, exhibit good activity against *A. baumannii* [35, 36], including colistin- and pan- resistant strains [23, 24].

In this work, after CA-M peptide administration, all peptides caused an early drop of the bacterial load in the peritoneal cavity, CA(1-8)M(1-18) being the most effective. Of all peptides, only Oct-CA(1-7)M(2-9) caused a transitory decrease in CFUs in the spleen, whereas the other three remaining peptides, including the non-acylated parent peptide CA(1-7)M(2-9), only halted the bacterial load increase to about 1 log order, relative to untreated animals. Thus, the singularity of Oct-CA(1-7)M(2-9) appears to derive from its additional acyl chain. Other EAPs with similar replacements are resistant to degradation, either by shielding of the cleavage site, or by promoting conformations less accessible to peptidases [37].

In this work we sought to assay CA-M peptides under stringent conditions, similar to those at the onset of clinical treatment; the inoculum size consisted in a lethal dose of bacteria, and peptide administration was delayed for 4 h after inoculation, thus forcing peptide activity on an ongoing, well-established and disseminated infection. Other EAPs halt infection in animals, but administered with short delays (1-2 h, even simultaneously) after inoculation [14, 22, 34, 38]. Proteolytic degradation or sequestration by serum are two major hurdles for in vivo EAPs application. For CA-M peptides, trypsin or serum led to inactivation of microbicidal activity, as shown by comparison between the two enantiomers of CA(1-8)M(1-18). Thus, substantial degradation and inactivation of CA-M peptides appears to occur after their injection, accounting for the inability to attain a PD₅₀ in the murine sepsis model.

We have also chosen to work on CA-M peptides composed exclusively of proteinogenic amino acids, to reduce the cost of chemical synthesis and to allow

eventual production by recombinant methods [39]. The inclusion of D- or β - amino acids, or the replacement of peptide bonds by peptidomimetics, is a powerful strategy to increase EAP proteolytic resistance [40]. Thus, protection of mice against *A. baumannii* infection was not achieved by all-L K₆L₉, whereas one of its diastereomer analog, with five D-residues, was effective [34]. In our study, even the peptide with the highest toxicity, CA(1-7)M(2-5) (LD₀ 16 mg/kg) compares favorably with K₆L₉ diastereomer (80% exitus at 9 mg/kg) [34].

Another constraint imposed on our model was restricting the treatment to a single dose. Under this regime, only a transitory reduction in *A. baumannii* ensued. This contrasts with natural scenarios, where EAPs face an initial small number of invading bacteria and are continuously supplied by cells surrounding the infective focus, hence achieving very favourable peptide-pathogen ratios. Our results fit well with an accepted view of the role of EAPs in nature, namely that, rather than wiping out the pathogens, they delay their dissemination and collaborate with antigen-specific immunity until it is fully established [41]. Indeed, repeated EAP administration results in increased survival rates of infected animals, as demonstrated on *A. baumannii* with the K₆L₉ diastereomer [34], or on *Pseudomonas aeruginosa* with MBI-28, a close relative of CA(1-8)M(1-18) [38]. In our case, however, we purposefully restricted administration to a single shot of the LD₀ of CA(1-7)M(5-9), and the dose previous to LD₀ for the other peptides.

While, taken together, our results allow moderate optimism on the use of CA-M hybrids to fight sepsis caused by *A. baumannii*, it is clear that additional fine-tuning of the prototypes is required. Thus, it seems worthwhile to concentrate efforts on short analogs, whose performance was similar or even better than longer counterparts, and which benefit from lower production costs and possibly lower immunogenicity. Second, analogs more resistant to in vivo inactivation must be developed, either by strategic replacement of vulnerable residues or by inclusion of D-residues, as shown by the comparison between the enantiomers of CA(1-8)M(1-18), in tune with data from K₆L₉ diastereomers [34]. A further concern is dosage; our assumption that a single shot of peptide would achieve full pathogen elimination was indeed naïve; rather, an increased and, if possible, steady level of peptide delivery at the higher sub-toxic dose at least for several hours appears to be desirable. While this obviously increases the peptide requirements, they can be nonetheless diminished by the choice of shortened, proteolysis-resistant analogs. Another alternative for reducing peptide requirements could be synergy with conventional antibiotics. For CA-M hybrids, synergy was reported on other Eubacteria such as *Escherichia coli* [42] or *P. aeruginosa* [43]; more

specifically, for *A. baumannii*, in vitro synergy between CA(1-7)M(2-9) and β -lactams including imipenem was reported [35].

Of further concern is the inflammatory effect observed for *Acinetobacter* with CA-M peptides. Inflammation is a double-edged sword, useful to eradicate infection, but deleterious if uncontrolled. In our experiments, inflammatory effects of the CA-M peptides appear to be transitory, with maximal values overlapping with the highest drops in CFUs, probably resulting from the elimination of bacteria. Other possibilities, e.g., peptide interaction with immune cells other than macrophages through serendipitous receptor binding [44], is not only unlikely but probably easy to overcome by minor structural changes in the peptide, including chirality reversal at selected residues.

In summary, the findings of the present work, used as a proof-of-principle, allow for a moderately optimistic view on the efficacy of EAPs in this regard. The CA-M peptides of this work, bactericidal against pan-resistant *A. baumannii* [23], show a local efficacy in the *A. baumannii* peritoneal sepsis model, but are only bacteriostatic on the spleen. Thus, several drawbacks must be overcome before EAPs become useful antimicrobials, such as to improve the feasibility of their systemic administration, in contrast with the hitherto demotion of EAPs to topical or mucosal administration.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant PET2006-0139 to D.A. and L.R.), and by the Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigaciones Sanitarias-FEDER, grants PI061125 and PI040827 to L.R., PI040885 to D.A., PI041854 to J.A.B. and PI040624 to J.P.) Additional funding from the regional governments of Madrid (S-BIO-0260/2006 to L.R.) and Catalonia (SGR2005-00494 to D.A.) is acknowledged. L.R. belongs to the COMBACT Network (BIO260) (Comunidad Autónoma de Madrid). J.P. belongs to the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III-FEDER. CIBERES is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

- [1] Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martinez-Martinez L, Bou G, Pachon J (2004) Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:819-824
- [2] Vila J, Pachon J (2008) Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother* 9:587-599
- [3] Fournier PE, Richet H (2006) The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 42:692-699
- [4] Villegas MV, Hartstein AI (2003) *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24:284-295
- [5] Poirel L, Nordmann P (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12:826-836
- [6] Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M (2008) Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 14:161-167
- [7] Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernandez-Cuenca F, Garnacho-Montero J, Cisneros JM, Ortiz C, Pachon J, Aznar J (2009) Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:257-263
- [8] Ganz T (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* 327:539-549
- [9] Andrea Giuliani GP, Silvia Fabiole Nicoletto (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2:33
- [10] Jenssen H, Hamill P, Hancock RE (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19:491-511
- [11] Khandelia H, Ipsen JH, Mouritsen OG (2008) The impact of peptides on lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1778:1528-1536
- [12] Matsuzaki K (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1788:1687-1692
- [13] Rivas L, Andreu D (2003) Cecropin-melittin hybrid peptides as versatile templates in the development of membrane active antibiotics agents. In Menestrina G and Dalla Serra M (eds) *Pore-forming peptides and protein toxins*, Harwood Academic Publishers, Reading, Berkshire, United Kingdom, pp 215-259

- [14] Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, D'Amato G, Del Prete MS, Orlando F, Kamysz W, Lukasiak J, Saba V, Scalise G (2003) Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin induced mortality in bile duct ligated rats. *Gut* 52:874-878
- [15] Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Orlando F, Mocchegiani F, Pacci AM, Scalise G, Saba V (2001) Therapeutic efficacy of the polymyxin-like peptide ranalexin in an experimental model of endotoxemia. *J Surg Res* 100:183-188
- [16] Giuliani A, Pirri G, Bozzi A, Di Giulio A, Aschi M, Rinaldi AC (2008) Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci* 65:2450-2460
- [17] Zelezetsky I, Tossi A (2006) Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et biophysica acta* 1758:1436-1449
- [18] Andreu D, Ubach J, Boman A, Wahlin B, Wade D, Merrifield RB, Boman HG (1992) Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett* 296:190-194
- [19] Boman HC, Boman IA, Andreu D, Li ZQ, Merrifield RB, Schlenstedt G, Zimmermann R (1989) Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. *J Biol Chem* 264:5852-5860
- [20] Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B (1998) Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 11:218-227
- [21] Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L (2001) N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2441-2449
- [22] Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, Yan H, Hancock RE (1999) Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1542-1548
- [23] Rodriguez-Hernandez MJ, Saugar J, Docobo-Perez F, de la Torre BG, Pachon-Ibanez ME, Garcia-Curiel A, Fernandez-Cuenca F, Andreu D, Rivas L, Pachon J (2006) Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 58:95-100
- [24] Saugar JM, Rodriguez-Hernandez MJ, de la Torre BG, Pachon-Ibanez ME, Fernandez-Reyes M, Andreu D, Pachon J, Rivas L (2006) Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1251-1256

- [25] C57BL/6 Datasheet. Harland.
http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/inbred_mice/c57bl6j_inbred_mice.hl. Accessed 13 December 2010
- [26] BALBc Datasheet. Harland.
http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/inbred_mice/balbc.hl. Accessed 13 December 2010
- [27] Solanas C, de la Torre BG, Fernandez-Reyes M, Santiveri CM, Jimenez MA, Rivas L, Jimenez AI, Andreu D, Cativiela C (2009) Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *Journal of medicinal chemistry* 52:664-674
- [28] O'Reilly T, Cleeland R, Squires EL (1996) Evaluation of Antimicrobials in Experimental Animal Infections. In Lorian V. (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams and Wilkins, MD, USA, pp 604–765
- [29] Pachon J, Vila J (2009) Treatment of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Investig Drugs* 10:150-156
- [30] Pereira HA (2006) Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Current pharmaceutical biotechnology* 7:229-234
- [31] Zhang L, Falla TJ (2006) Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert Opin Pharmacother* 7:653-663
- [32] Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, Kamysz W, Rocchi M, D'Amato G, Mocchegiani F, Silvestri C, Lukasiak J, Saba V, Scalise G (2005) Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. *Peptides* 26:207-216
- [33] Levy O (2002) Therapeutic potential of the bactericidal/permeability-increasing protein. *Expert Opin Investig Drugs* 11:159-167
- [34] Braunstein A, Papo N, Shai Y (2004) In vitro activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3127-3129
- [35] Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, Lukasiak J, Scalise G (2003) Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 24:1315-1318
- [36] Saugar JM, Alarcon T, Lopez-Hernandez S, Lopez-Brea M, Andreu D, Rivas L (2002) Activities of polymyxin B and cecropin A-,melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:875-878

- [37] Avrahami D, Shai Y (2003) Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry* 42:14946-14956
- [38] Gough M, Hancock RE, Kelly NM (1996) Antitoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infection and immunity* 64:4922-4927
- [39] Zhang L, Falla T, Wu M, Fidai S, Burian J, Kay W, Hancock RE (1998) Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochemical and biophysical research communications* 247:674-680
- [40] Seebach D, Beck AK, Bierbaum DJ (2004) The world of beta- and gamma-peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. *Chemistry & biodiversity* 1:1111-1239
- [41] Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE (2005) A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current protein & peptide science* 6:35-51
- [42] Zhang L, Benz R, Hancock RE (1999) Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry* 38:8102-8111
- [43] Piers KL, Brown MH, Hancock RE (1994) Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2311-2316
- [44] Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock REW (2009) Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends in Biotechnology* 27:582-590

Table 1. **In vivo toxicity of cecropin A-melittin hybrid peptides in C57BL/6 mice.**

Peptide	Sequence	MW	LD₀^a	LD₅₀^a	LD₁₀₀^a
CA(1-8)M(1-18)	KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS-NH ₂	2793.78	32.0	64.0	128.0
CA(1-7)M(2-9)	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	1770.19	32.0	45.2	64.0
Oct-CA(1-7)M(2-9)	¹ N ^α -octyl -KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	1898.50	32.0	45.2	64.0
CA(1-7)M(5-9)	KWKLFKKVLKVL-NH ₂	1544.07	16.0	39.4	128.0

^a.- Expressed as mg/kg

Figure 1. Haemolytic activity of CA-M peptides on BALB/c mouse erythrocytes.

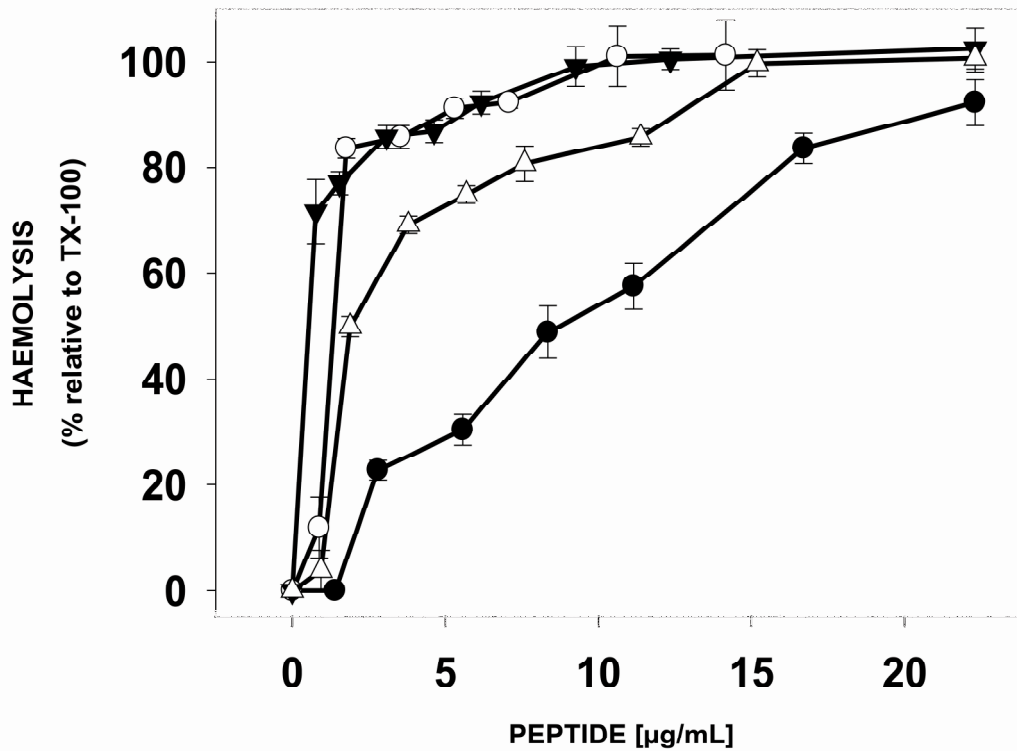


Figure 1. Haemolytic activity of CA-M peptides on BALB/c mouse erythrocytes.

Peptides were incubated with BALB/c mouse erythrocytes (4h, 37°C) and the haemoglobin released measured at. Full permeabilization (100%) was considered as that achieved with 0.1% Triton X-100.

Legend: CA(1-8)M(1-18), closed circle; CA(1-7)M(2-9), empty circle; Oct-CA(1-7)M(2-9), empty triangle up; CA(1-7)M(5-9), filled triangle down.

Figure 2. **Protective dose 50 (PD₅₀).**

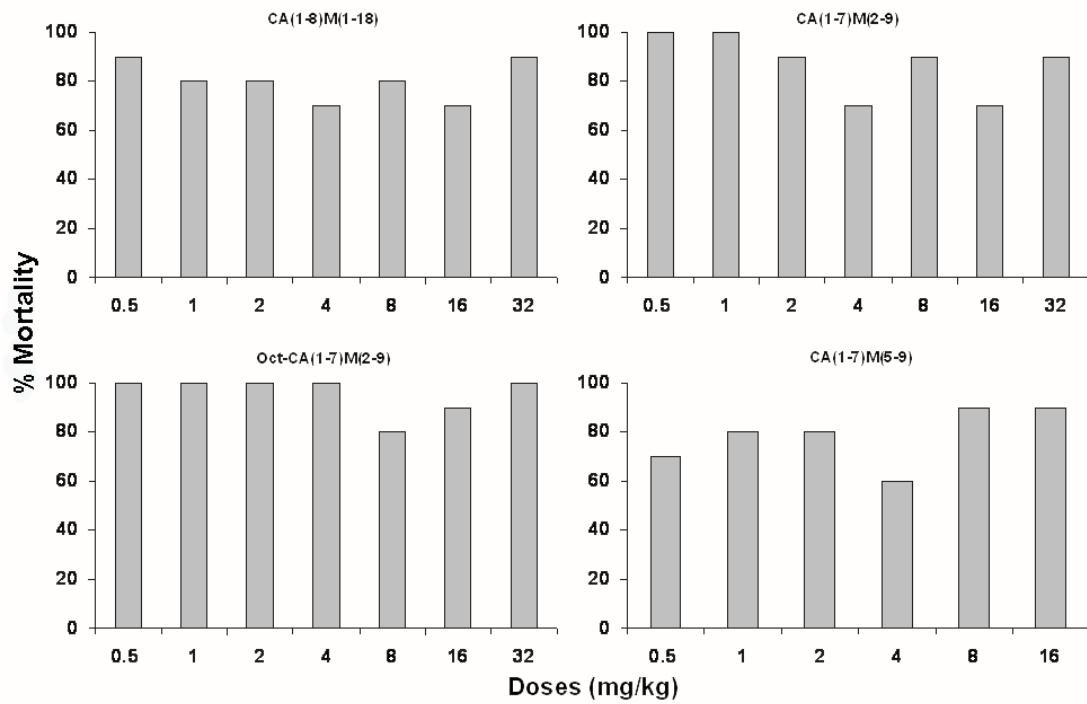


Figure 2. **Protective dose 50 (PD₅₀) results.** Groups of 10 mice were inoculated with Ab208628 BMLD. Four hours later, animals were treated with increasing in log₂ doses of each peptide (from 0.5 mg/kg to LD₀).

Figure 3. Influence of mouse serum on haemolytic activity of CA(1-8)M(1-18).

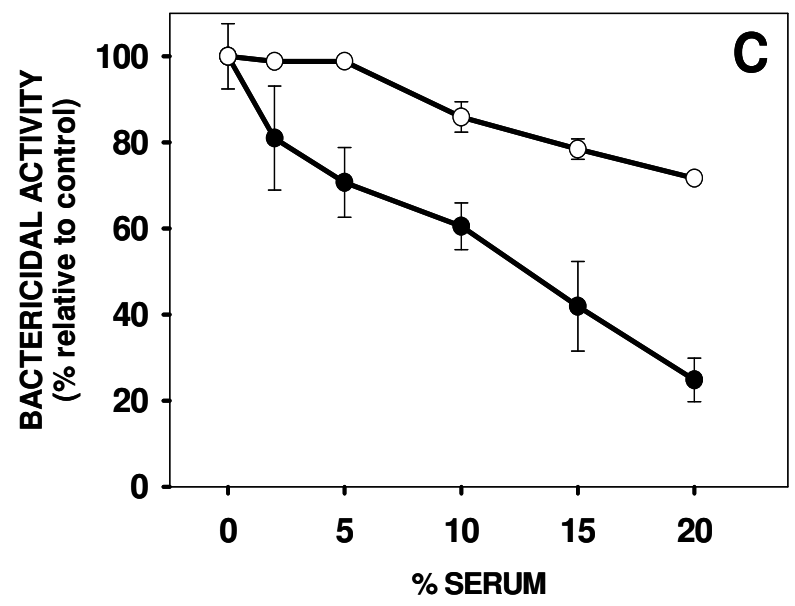
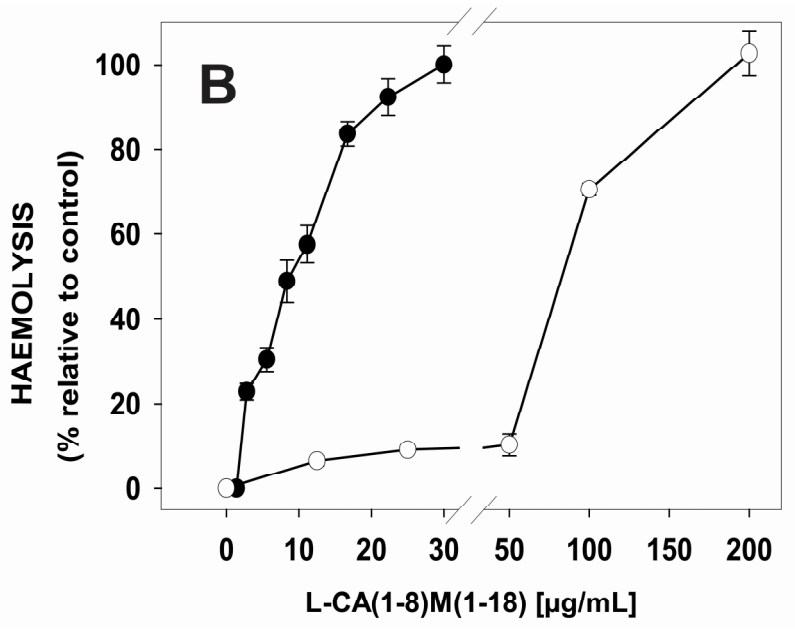
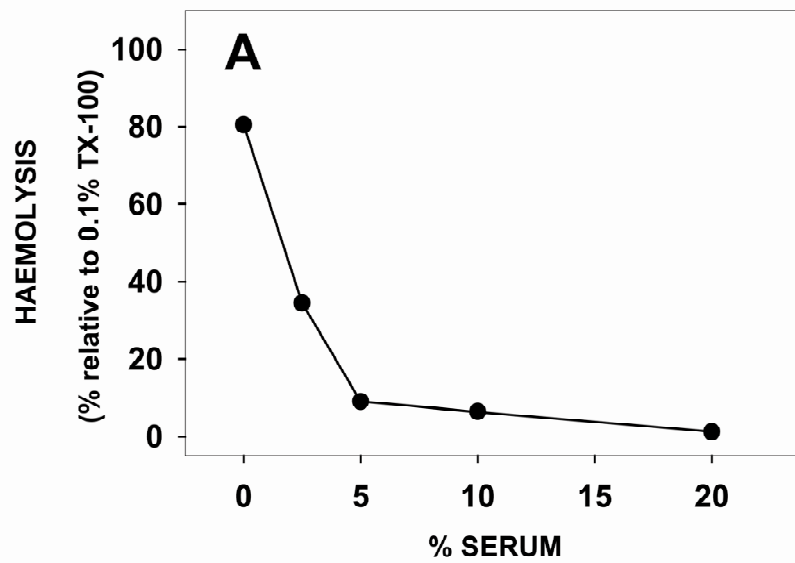


Figure 3. **Influence of mouse serum on the biological activities of CA(1-8)M(1-18).**
A) Inhibition of haemolysis caused by L-CA(1-8)M(1-18) by serum at a constant peptide concentration of 25 µg/mL. B) Variation of the haemolytic activity of L-CA(1-8)M(1-18) in presence (open circle) or absence (closed circle) of 10% heat inactivated autologous serum. C) Serum inhibition of microbicidal activity of L-CA(1-8)M(1-18) (closed circle), and its all-D-enantiomer (empty circle), at a constant peptide concentration equivalent to their MIC in absence of serum (4 µg/mL).

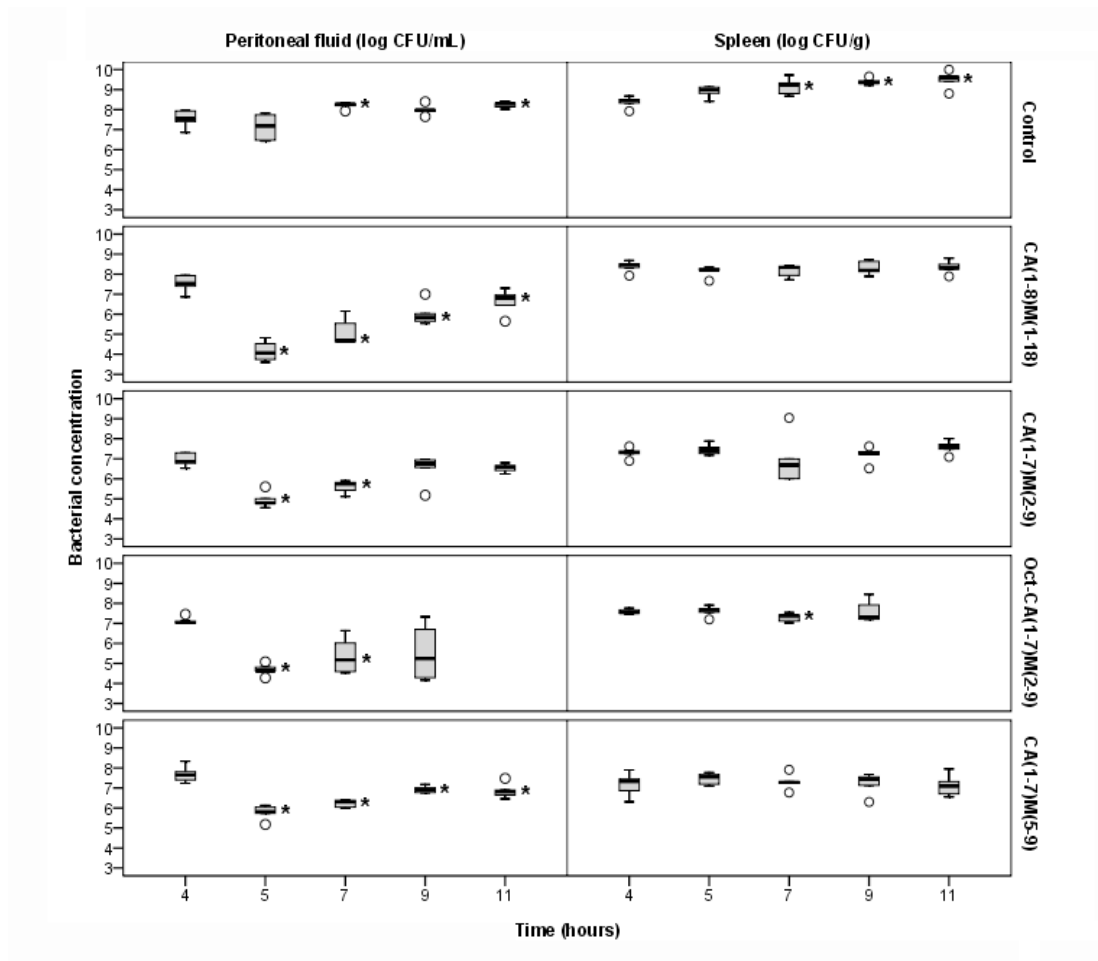
Figure 4. **Experimental peritoneal sepsis in mice.**

Figure 4. **Experimental peritoneal sepsis in mice.** After i.p. inoculation of Ab208628 (t=0) at its BMLD, peptide (32 mg/kg, except for CA(1-7)M(2-9), that was 16 mg/kg) was injected 4h later. Samples removed from either peritoneum or spleen for CFU determination as described in Material and Methods For Oct-CA(1-7)M(2-9) data at 11h were omitted as mice died earlier.

* p<0.05 respect to 4 h, Mann-Whitney *U* test.

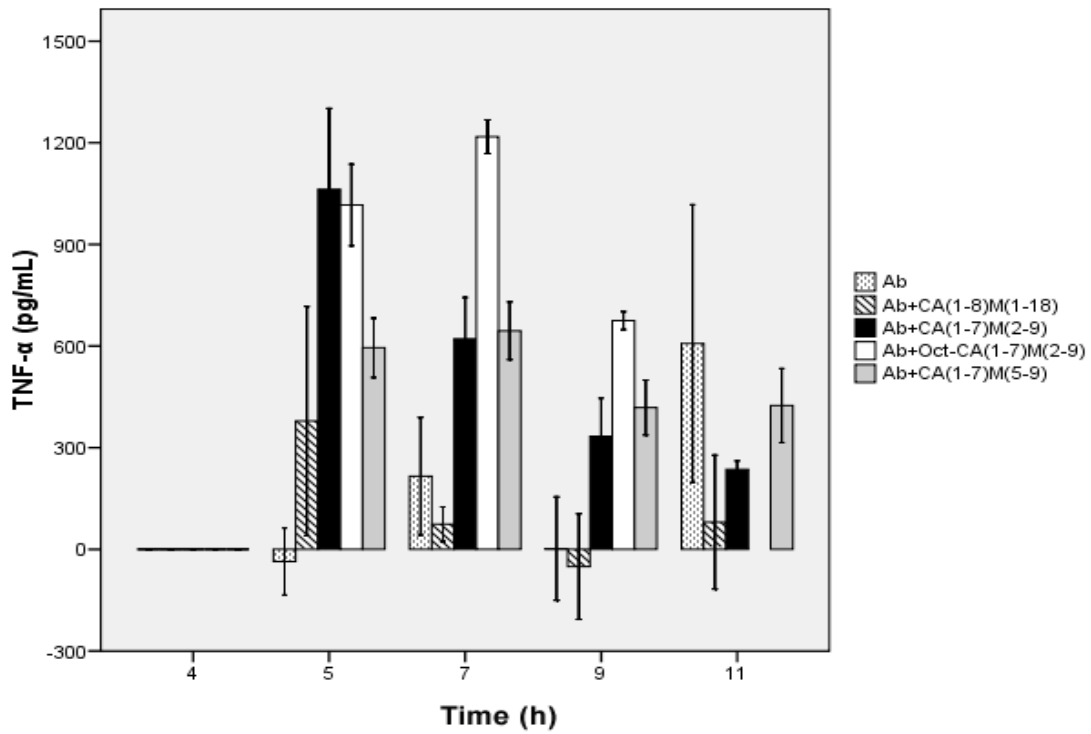
Figure 5. **TNF- α serum levels in mice.**

Figure 5. **TNF- α serum levels in mice.** Data represents the increase, respect to 4 hours, of TNF- α serum levels in group of infected with Ab208628 mice (Ab), and in groups of infected and treated mice (Ab + CAMs). Results are expressed as mean \pm SD.

OBJETIVO 2. Evaluar la actividad de un nuevo derivado del ciprofloxacino (UB-8902) *in vitro* y su eficacia *in vivo*, tanto en un modelo experimental no discriminativo de sepsis peritoneal como en un modelo de neumonía murina producidos por *A. baumannii* resistente a ciprofloxacino.

ARTÍCULO 2. Submitted to Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Title: Pre-clinical studies of a new quinolone (UB-8902) against *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin.

Authors: López-Rojas R.^{1,3*}, Sánchez-Céspedes J.^{2,3}, Docobo-Pérez F.^{1,3}, Domínguez-Herrera J.^{1,3}, Vila J.^{2,3}, Pachón J.^{1,3}

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/Universidad de Sevilla/CSIC. Sevilla, Spain.

²Service of Microbiology, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, CRESIB, Barcelona, Spain.

³Spanish Network for the Research of Infectious Diseases (REIPI, ISCIII RD06/0008).

***Corresponding author:** Rafael López-Rojas. Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Sevilla, Spain. Phone / Fax: +34-955013651 / +34-955013345; E-mail: rlopezrojas@hotmail.com

Running title: Efficacy of UB-8902 against *A. baumannii*

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, experimental pneumonia, quinolones, UB-8902, ciprofloxacin resistance, pharmacokinetic/pharmacodynamic.

This work was presented in part at:

- 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, 19-22 April 2008, poster 551.
- 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Helsinki, 16-19 May 2009, poster 1106.

SYNOPSIS

Background. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates requires new antimicrobial alternatives. This work evaluates the in vitro activity and in vivo efficacy of a new ciprofloxacin derivative (UB-8902).

Methods. Time-kill curves were performed for ciprofloxacin, moxifloxacin, and UB-8902 against ciprofloxacin-susceptible (Ab58) and -resistant *A. baumannii* strains (Ab661, Ab33). Using C57BL/6 female mice, we studied the UB-8902 toxicity, protective dose 50 (PD₅₀, peritoneal sepsis model), the pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters, and its efficacy in a pneumonia model.

Results. In vitro bactericidal activity of UB-8902 was similar to ciprofloxacin and moxifloxacin against studied strains. The maximum tolerated dose of UB-8902 was 512 mg/kg. The PD₅₀ (mg/kg) were 16, 128, and 32, for Ab58, Ab661, and Ab33, respectively. Pharmacokinetic parameters of UB-8902 were similar to moxifloxacin and lower than ciprofloxacin, while pharmacodynamic parameters were better than ciprofloxacin. In the pneumonia model, UB-8902 decreased the bacterial lung concentration (4.62 and 4.15 log₁₀ CFU/g) and positive blood cultures (60 and 62.5%) of Ab58 and Ab33, respectively.

Conclusions. The new quinolone UB-8902 presents bactericidal activity against *A. baumannii* resistant to ciprofloxacin. Moreover, it is effective reducing mortality in a model of peritoneal sepsis with a dose lower than the toxic one, and is efficacious in a pneumonia model.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii are gram-negative, aerobic, non-fermentative coccobacilli which have a remarkable ability to survive at every surface, such as soil, water, and human skin ¹. This bacterium, an important opportunistic pathogen that causes different nosocomial infections, mainly in ICUs, has acquired an increasing clinical importance because of its extraordinary ability to develop resistance against most of the clinically used antibiotics ². Due to the increasing number of multidrug resistant *A. baumannii* isolates ³, and the lack of available treatments for these infections, it is mandatory the development of new antimicrobials as therapeutic alternatives.

Quinolones are drugs with bactericidal concentration-dependent activity. They act by inhibiting DNA gyrase and topoisomerase IV, enzymes that are essential for the DNA synthesis. Quinolones modify the normal activity of these enzymes altering the bacterial DNA synthesis and ultimately inducing bacterial cell death ⁴. Quinolones presented a good activity against *A. baumannii* isolates until the end of the eighties ⁵, but a rising resistance left quinolones without activity against this bacteria. In *A. baumannii*, the resistance to quinolones has been linked to mutations in the *gyrA* gene, with alterations in the quinolone-resistance-determining region (QRDR) of GyrA ⁵, and in the topoisomerase IV *parC* gene ⁶. Understanding the way of action of quinolones and its mechanism to bind to these enzymes has been key to approach the development of new quinolones that overlap the resistance of the bacteria to this class of antimicrobials ⁷.

With this purpose, in the last years, we have developed enhanced ciprofloxacin (CIP) and norfloxacin derivatives ⁸. Thus, we obtained a CIP derivative molecule adding a methyl group at the position 4 of the piperazine ring of CIP, named UB-8902, that proved to be the most active, decreasing the MIC₅₀ for *A. baumannii* 16-fold respect to that of CIP ⁸. Moreover, this molecule presents a good and reversible penetration into human polymorphonuclear leukocytes (PMNs), reaching intracellular concentrations 6-fold higher than the extracellular ⁹.

The aim of the present work is to evaluate the activity of UB-8902 against *A. baumannii* susceptible and resistant to CIP, in vitro and in vivo in an experimental non-discriminative murine sepsis model and in a murine pneumonia model.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Three clinical *A. baumannii* strains ⁸ were used, one wild-type CIP-susceptible (Ab58), and two CIP-resistant, Ab661 and Ab33, with a mutation in the *gyrA* gene (Ser83Leu).

Antimicrobials and susceptibility test. The antibiotics used in the study were CIP and moxifloxacin (MOX), obtained from Bayer Health Care (Barcelona, Spain), and the new quinolone UB-8902 (Figure 1), gently provided by Cenavisa, S.A. Laboratories (Reus, Spain). For these antibiotics, MICs were performed by the broth microdilution according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) methods ¹⁰.

Time-kill curves. The in vitro bactericidal activity of UB-8902, CIP, and MOX were calculated using the time-kill method as described by the NCCLS ¹¹. Briefly, an initial inoculum of 5×10^5 CFU/mL of each strain was incubated at 37°C in 20 mL of MHBCA (Mueller Hinton Broth Cation Adjusted, Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA), with concentrations of the antibacterial agents at 1, 2, and 4xMIC, and their *C_{max}* in mice (see below). As controls, tubes containing 20 mL of MHBCA with the same inoculum and without antibiotic were used. The bacterial concentration (\log_{10} CFU/mL) was determined at 0, 2, 4, 8, and 24 h. An antibiotic was considered bactericidal when it produced a decrease of $\geq 3 \log_{10}$ CFU/mL compared to the initial inoculum. Experiments were performed in duplicate.

Animals. Immunocompetent C57BL/6 female mice, weighing 16-18 g, and having a sanitary status of MPF (murine pathogen free), were obtained from the University of Seville. They were previously assessed for genetic authenticity. Animals were housed in regulation cages with food and water *ad libitum*. The study was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of the University Hospital Virgen del Rocío.

In vivo toxicity. The Reed and Munch method ¹² was used. Groups of six mice received a single 500 μ L intraperitoneal dose of UB-8902, starting at 0.5 mg/kg and serially duplicated until 100% mortality was reached. Maximum tolerated dose (LD₀), lethal dose 50 (LD₅₀), and lethal dose 100 (LD₁₀₀), were defined as those causing 0%, 50%, and 100% mortality, respectively. Mice were monitored during 7 days and other signs of toxicity (piloerection, diminished motility, spasms) were additionally monitored.

Determination of the bacterial minimal lethal dose (BMLD) and the bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀). To assess the BMLD (minimal inoculum causing a 100% mortality) and the BLD₅₀ of Ab58, Ab661, and Ab33, groups of ten mice were inoculated intraperitoneally with 500 μ L of a ten-fold serially diluted inoculum, starting at 10^8 CFU/mL ¹², obtained from a 24 h bacterial culture in Mueller-Hinton II broth, cation adjusted (MHBCA; Becton Dickinson, Cockeysville, MD) at 37°C. Dilutions were done with saline solution plus 5% (wt/vol) porcine gastric mucin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The animals were observed for 7 days and their cumulative survival rates recorded.

As a control group, ten mice were inoculated intraperitoneally with 500 μ L of porcine mucin as above, to discard an intrinsic toxic effect of the mucin.

Evaluation of the protective dose. We studied the efficacy of UB-8902 in a non-discriminative test by using the protective dose for 50% of the population (PD_{50})¹², with modifications. We use an experimental model of peritoneal sepsis. Briefly, groups of 10 mice were infected intraperitoneally with the BMLD inoculum of each strain. Four hours later, animals were treated intraperitoneally with two-fold increasing doses of UB-8902 (until LD_0 or until a 50% of survival was reached), in physiological serum (0.5 mL final volume), and monitored for 7 days to measure cumulative survival rates. In order to avoid an unnecessary use of animals, we started with an arbitrary dose of 8 mg/kg to be followed by lower doses in case we reached a PD_{50} with this dose.

Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) studies. Serum levels of UB-8902, CIP, and MOX were determined after the administration of a single dose of each antimicrobial (20 mg/kg intraperitoneally) to groups of 24 uninfected animals. After 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, and 240 min, blood was drawn from the orbital plexus of three anesthetized mice per time point. The serum concentrations of drug were calculated in triplicate with a bioassay using *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626 as control strain. The parameters determined were the maximum serum concentration (C_{max} ; expressed in mg/L), the area under the concentration-time curve (AUC; expressed in mg·h/L), the terminal half-life ($T_{1/2}$; expressed in h)¹³, AUC/MIC, C_{max} /MIC, and the time during which the serum concentration remained above the MIC (T_{MIC} ; expressed in h), which was estimated by extrapolation from the regression line of serum elimination using the MIC obtained. The intraday and interday variations of the assays were $3.12\% \pm 3.74\%$ and $1.71\% \pm 1.48\%$ for UB-8902, $6.27\% \pm 1.45\%$ and $5.96\% \pm 0.57\%$ for CIP, and $4.45\% \pm 3.49\%$ and $4.97\% \pm 1.98\%$ for MOX. The linearity (r^2) of the assay was 0.99 ± 0.00 , 0.96 ± 0.04 , and 0.88 ± 0.07 , respectively. The lower limits of detection were 0.4, 0.9, and 0.1 mg/L.

Pneumonia model. A 72 h murine pneumonia model¹⁴ was used to evaluate the efficacy of UB-8902, CIP, and MOX, against *A. baumannii* strains. Animals were anesthetized intraperitoneally with 5% w/v sodium thiopental (Braun) and inoculated intratracheally with 50 μ L of the bacterial suspension, grown during 18 h in MHBCA at 37° C, and mixed 1:1 with a saline solution of porcine mucin at 10% w/v. The final inoculum was 8.72 ± 0.11 CFU/mL for Ab58, 8.39 ± 0.10 CFU/mL for Ab661, and 8.44 ± 0.10 CFU/mL for Ab33. As Ab661 strain did not produce mortality in the control group, and animals spontaneously cleared bacterial lungs, we decided not to perform the treatment groups with this strain in the pneumonia model. Treatments began 4 h after inoculation. Prior to the pneumonia model, a group of 5 un-infected mice were

treated with the dose regimen selected for the three antimicrobials to evaluate their toxicity.

To ascertain the efficacy of UB-8902, 60 mice for each strain (Ab58 and Ab33) were inoculated and randomly allocated to four groups of 15 animals. The control group did not receive antimicrobials. The other three groups were treated with UB-8902, CIP, or MOX (20 mg/kg, intraperitoneally) every 8 hours. The dose administered was chosen attending to the dose that gives an $AUC_{0-24 \text{ hrs}} / MIC$ for CIP (the reference antibiotic) and Ab58 (the susceptible strain) similar to 100, which has been demonstrated to be predictive of outcome in the treatment with quinolones against murine pathogens infections¹⁵, and also has been previously demonstrated to be efficacious in a murine pneumonia model¹⁶. The animals were observed for mortality during 72 h, and all the animals were analyzed immediately after death. Blood and lung samples were obtained and processed as previously described¹⁴. The results are expressed as means \pm standard deviation of the \log_{10} CFU/g of lung, sterile blood culture frequencies, and mortality frequencies.

Statistical analysis. The means of \log_{10} CFU/g of lung of the different treatment groups were compared by ANOVA. If the differences were significant, comparison among groups was made using Dunnett and Tukey *post hoc* tests. Frequency of sterile tissues, sterile blood cultures and survival were analyzed by chi-square test. The statistical package SPSS version 15.0 was used (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

In vitro studies. The MICs (mg/L) of UB-8902, CIP, and MOX, were: for Ab58, 0.03, 0.25, and 0.016 respectively, and for Ab661 and Ab33, 0.5, 8, and 1, respectively.

Time-kill curves are represented in Figure 2. UB-8902 was bactericidal like CIP and MOX for the three strains, at 4xMIC and at its murine *Cmax* (7.91 mg/L); only MOX did not show bactericidal effect at 4xMIC against Ab58. A general regrowth was observed in the three strains at 1xMIC of each antibiotic, and in some cases (in Ab58 for the three antibacterial agents and in Ab661 for UB-8902) at 2xMIC. Even a 24 hours regrowth was shown in Ab58 at 4xMIC for UB-8902.

In vivo studies. Toxicity. The LD_0 , LD_{50} , and LD_{100} , of UB-8902 were 512, 963.6, and 2048 mg/kg, respectively. Adverse effects such as transitory movement disorders, muscle spasms, and sedation, were observed dose-dependently from the 128 mg/kg dose.

Determination of the bacterial minimal lethal dose (BMLD) and the bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀). The BMLD was reached with the same inoculum for

the three strains (7.2 log CFU), administered in 0.5 mL with a concentration of 7.5 log CFU/mL. This value was used to determine the protective dose. The BLD₅₀ was 5.92 log CFU (6.22 log CFU/mL) for Ab58, and 6.70 log CFU (7 log CFU/mL) for Ab661 and Ab33 (Table 1).

Evaluation of the protective dose. Four hours after the intraperitoneal inoculation with the BMLD of each strain, UB-8902 ranging from 8 mg/kg to the LD₀ was administered to the animals. The PD₅₀ was achieved at 16 mg/kg in Ab58, at 128 mg/kg in Ab661, and at 32 mg/kg in Ab33 (Figure 3).

Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) studies. The PK characteristics of UB-8902, CIP, and MOX, in mice following single intraperitoneal doses of 20 mg/kg, and the PD parameters referred to Ab58 and Ab33, are shown in table 2. Similar AUC and *C*_{max} between MOX and UB-8902 were obtained, being both lower than the obtained with CIP. Regarding to the PD, UB-8902 and MOX parameters were better than those presented by CIP. It is noteworthy that the AUC_{0-24 hrs} /MIC data obtained for CIP and Ab58 (105.48) was similar to the value that best predicts outcome in animal models of infections treated with quinolones¹⁵, and it was used as reference to design the regimen dose.

Pneumonia model. In groups inoculated with the Ab58 strain, susceptible to CIP, the treatments with CIP, UB-8902, and MOX were effective compared to the non-treated control group, decreasing 5.93, 4.62, and 5.88 log₁₀ CFU/g of lung (p<0.001), respectively. The frequency of sterile blood cultures increased in the CIP group (80%, p<0.01), as well as in the UB-8902 and MOX groups (86.7%, p<0.005), compared with the control group (26.7%). In the groups inoculated with the CIP-resistant Ab33, UB-8902 and MOX treatments were effective compared to the control group, decreasing 4.15 and 3.48 log₁₀ CFU/g of lung (p≤0.001), respectively; however, CIP treatment was not effective in the clearance of bacterial burden in lung. Regarding to the frequency of sterile blood cultures, all the antimicrobials (CIP 60%, UB-8902 81.3%, and MOX 76.5%) were efficacious (p<0.01) compared to the control group (18.8%). The results are detailed in Table 3 and Figure 4. There was no toxicity observed with any of the treatments in the non-infected mice group.

DISCUSSION

The increasing emergence of multidrug-resistant *A. baumannii* strains has caused the rapid development of new antimicrobials to be used as alternative therapeutics against this bacterium^{17, 18}. In this way we have developed a new ciprofloxacin-derivative, named UB-8902, with an improved MIC respect to its predecessor, that was proved to be extremely active against multiresistant bacteria like

A. baumannii and *Stenotrophomonas maltophilia* when compared to CIP⁸. Moreover, it showed a good penetration into human PMNs that gives to this new quinolone an intracellular level 6-fold higher than the extracellular one⁹.

In the present work we have tested the in vitro bactericidal activity of this compound in time-kill curves, showing that it is as effective as CIP and MOX against CIP-susceptible and resistant *A. baumannii* strains. The similar results of CIP compared with UB-8902 against the CIP-resistant strain, using the *Cmax*, is explained because of this concentration was higher than the MIC of CIP for this strain. Similar results were obtained with CIP and MOX against the CIP-susceptible *A. baumannii* ATCC 19606¹⁹, but MOX showed better activity reaching bactericidal activity at 4xMIC.

In vivo the LD₀ of UB-8902 was 512 mg/kg, pointing out the high tolerability of this compound. Adverse effects such as sedation, spasms, and movement disorders were observed from the dose of 128 mg/kg. Similar adverse effects were observed with moxifloxacin starting at 30 mg/kg per oral²⁰, and presenting an oral LD₅₀ of 435-758 mg/kg²¹, lower than the LD₅₀ of UB-8902. These data suggest that this new quinolone presents an experimental safety profile comparable to those of other fluoroquinolones.

In a first step to assay the activity of the new quinolone in vivo, we carried out a non-discriminative murine peritoneal sepsis model. We found a PD₅₀ with UB-8902, against CIP-susceptible and resistant strains, at doses much lower than the lethal ones, although with one of the strains it was necessary a dose where adverse effects appeared. Other works have found low PD₅₀ with new generation quinolones^{22, 23}, but these authors used susceptible strains and administered the treatment at the same time of the infection, or with several doses, contrary to the design of our experiments. Also, when the resistant strains were used²⁴, the treatment was administered at the time of infection and with several doses. It is worthwhile to note that we found the PD₅₀ using a single dose and administering the treatment 4 hours after infection, when the sepsis features had been established. This efficacy reducing the mortality in the non-discriminative model, allowed us to evaluate the effectiveness in a discriminative murine pneumonia model.

The pharmacokinetic studies showed that for MOX and UB-8902 similar AUC and *Cmax* values were obtained, being both lower than those obtained with CIP. However, respect to the PD parameters, UB-8902 and MOX took advantage versus CIP due to their lower MIC against the *A. baumannii* strains used, predicting a better in vivo outcome when the same regimen dose is followed, since AUC/MIC is the parameter that best predict therapeutic success^{15, 25}.

In the pneumonia model against the CIP-susceptible *A. baumannii* strain, the three quinolones showed efficacy in the bacterial lung clearance, without significant

differences between them. This efficacy was also demonstrated in the sterilization of blood cultures. However, when mortality was measured, the new quinolone showed a trend to diminished mortality rate but without statistical significance. The similar in vivo results of CIP compared with MOX and UB-8902 are in consonance with the AUC_{0-24h}/MIC equal or higher than 100 with the three drugs. On the other hand, when the CIP-resistant strain was used, treatment with CIP did not decrease the bacterial lung concentration, being both UB-8902 and MOX the most effective treatments. It is necessary to note that the efficacy against this strain was reached with $AUC_{0-24 hrs}/MIC$ parameters of UB-8902 and MOX of 19.65 and 14.19 respectively, much lower than the value of 100 that is recommended, as we have previously demonstrated ¹⁶. The greater efficacy of UB-8902 with this strain in the pneumonia model could be attributed to its good in vitro bactericidal activity, but actually could be better explained by its pharmacokinetic profile together with the lower MICs obtained, conferring it excellent pharmacodynamic parameters. Similar results have been showed with other new quinolones in the treatment of experimental pneumococcal pneumonia, although some molecules needed much higher doses to be efficacious ²⁶.

In summary, the present results show that this new quinolone, UB-8902, has in vitro activity against ciprofloxacin-susceptible and resistant *A. baumannii* strains, being as bactericidal as CIP and MOX. Moreover, UB-8902 is efficacious in murine experimental models of peritoneal sepsis and pneumonia, including those caused by CIP-resistant *A. baumannii* strains. These results support the further development of this molecule, to test if it could represent a new therapeutic alternative against multiresistant *A. baumannii* infections.

FUNDINGS

This study has been supported by the Spanish Ministry of Science (PETRI 0957-OP to JV), by 2009 SGR 1256 from the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, and by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III - co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). This work has also been supported by funding from the European Community (AntiPathoGN contract HEALTH-F3-2008-223101).

TRANSPARENCY DECLARATIONS

None to declare.

Figure 1. Structure of UB-8902.

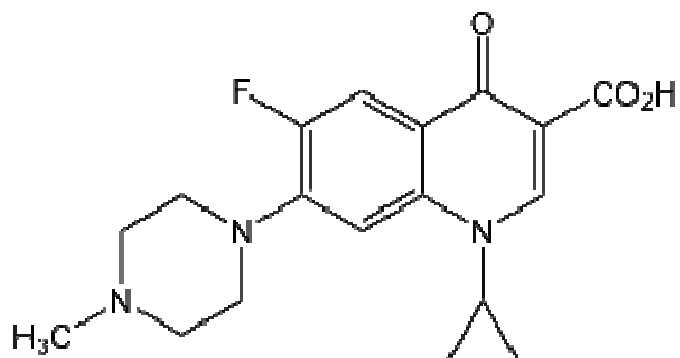


Figure 2. Time-kill curves of UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin.

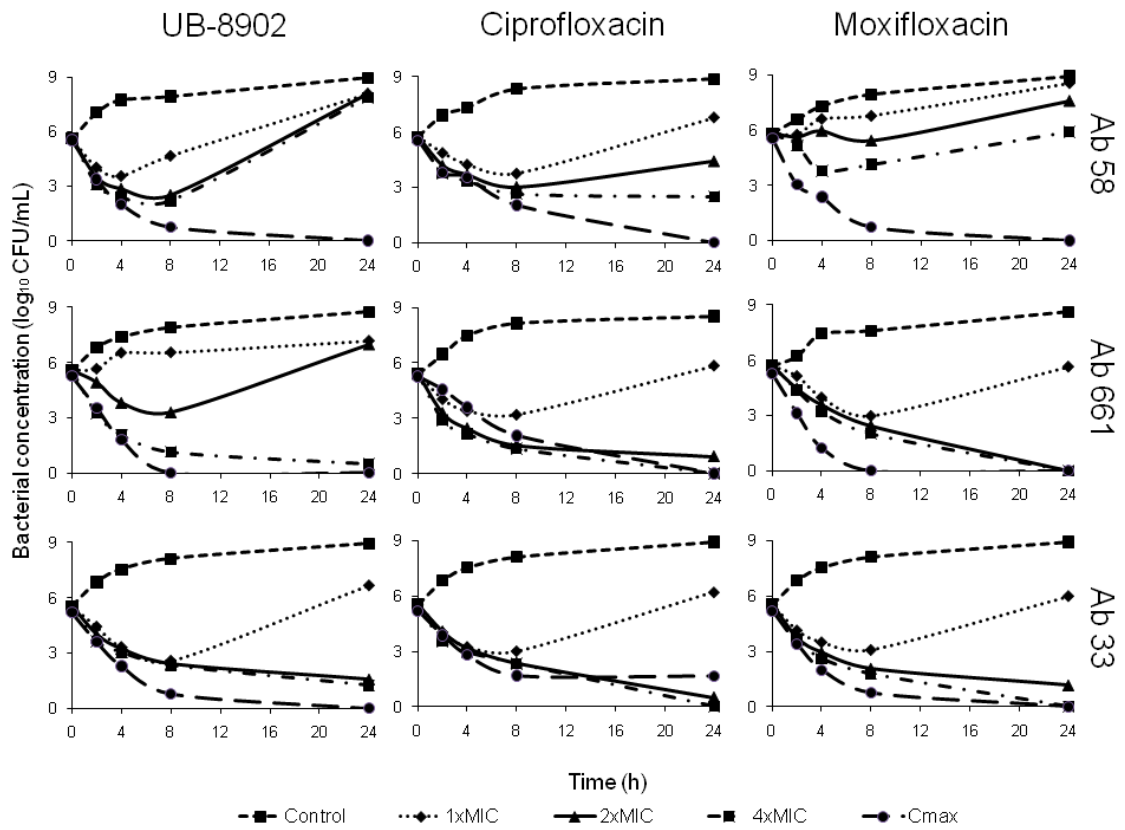


Figure 2. Time-kill curves of UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin. The antimicrobial is shown at the top of the corresponding columns, and the strains are shown at the right side of each row. Ab58 is a wild type strain while Ab661 and Ab33 have a mutation in the *gyrA* gene (Ser83Leu). Control, short dashed line and squares; 1xMIC, dotted line and diamonds; 2xMIC, solid line and triangles; 4xMIC, dash-dot line and squares; Cmax, long dashed line and circles.

Table 1. Bacterial minimal lethal dose (BMLD) and bacterial lethal dose 50 (BLD₅₀). Groups of ten mice were inoculated intraperitoneally with 500 µL of a ten-fold serially diluted inoculum, obtained from a 24 h culture of each strain, starting at 10⁸ CFU/mL.

Strain	BMLD (Log CFU/mL)	BLD ₅₀ (Log CFU/mL)	BLD ₀ (Log CFU/mL)
Ab58	7.5	6.11	5.5
Ab661	7.5	7	6.5
Ab33	7.5	7	6.5

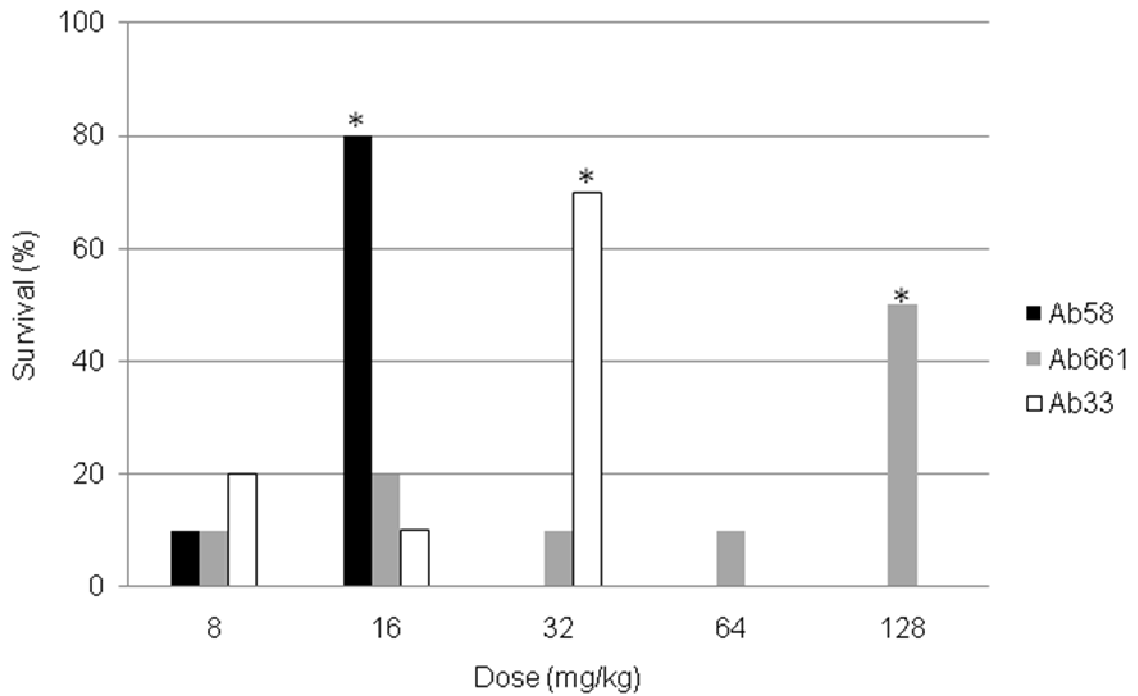
Figure 3. Protective dose 50 (PD₅₀).

Figure 3. Protective dose 50 (PD₅₀). Groups of 10 mice were inoculated with the BMLD of each strain. Four hours later, animals were treated with increasing in log₂ doses of UB-8902 (from 8 mg/kg to reach PD₅₀). PD₅₀ is marked with asterisks. Ab58, black bars; Ab661, grey bars; Ab33, white bars.

Table 2. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters. The PK and PD values administering a 20 mg/kg single i.p. dose of UB-8902, ciprofloxacin (CIP), and moxifloxacin (MOX) in C57BL/6 mice.

Pharmacokinetic parameters			
	CIP	MOX	UB-8902
AUC (mg·h/L)	8.79	3.56	3.28
C_{max} (mg/L)	11.57	6.84	7.91
T_{1/2} (h)	0.27	0.34	0.23

Pharmacodynamic parameters						
	CIP		MOX		UB-8902	
	Ab58	Ab33	Ab 58	Ab33	Ab 58	Ab33
MIC (mg/L)	0.25	8	0.016	1	0.03	0.5
AUC/MIC (h)	35.16	1.10	222.71	3.56	109.18	6.55
AUC_{0-24 hrs} /MIC	105.48	3.30	668.13	10.68	327.54	19.65
C_{max}/MIC	46.28	1.45	427.50	6.84	263.67	15.82
Δt/MIC (h)	1.40	0.73	1.47	1.14	0.94	0.89

Table 3. Effect of the therapy with UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin, on the clearance of Ab58 and Ab33 strains from mouse lungs and blood, as well as on mortality.

	Ab58			Ab33		
	Log ₁₀ CFU/g of lung (mean ± SD)	Sterile blood cultures (%)	Mortality (%)	Log ₁₀ CFU/g of lung (mean ± SD)	Sterile blood cultures (%)	Mortality (%)
Control	8.86 ± 0.94	26.7	80	8.12 ± 1.09	18.8	68.8
UB-8902	4.24 ± 2.49 ^a	86.7 ^a	53.3	3.97 ± 3.32 ^a	81.3 ^a	37.5
Ciprofloxacin	2.67 ± 2.83 ^a	80 ^a	26.7 ^a	6.57 ± 1.99	60 ^a	66.7
Moxifloxacin	2.98 ± 2.42 ^a	86.7 ^a	33.3 ^a	4.64 ± 2.26 ^a	76.5 ^a	47.1

^a $P < 0.01$ relative to the control group (ANOVA, post hoc Tukey and Dunnett tests, and chi-square tests).

Figure 4. Effect of antibiotic therapy on the clearance of *A. baumannii* from mouse lungs.

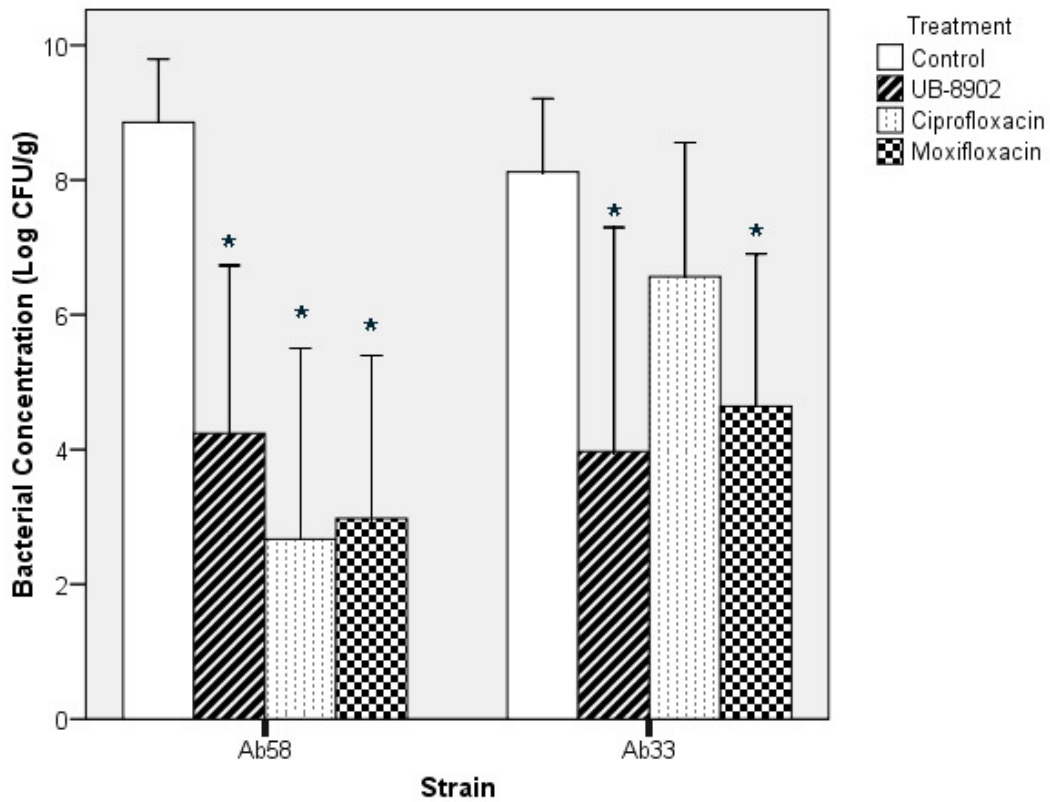


Figure 4. Effect of antibiotic therapy with UB-8902, ciprofloxacin, and moxifloxacin, on the clearance of *A. baumannii* from mouse lungs. Control, empty bars; UB-8902, dashed bars; Ciprofloxacin, dotted bars; Moxifloxacin, squared bars.

* $P < 0.001$ relative to the control group (by ANOVA and Tukey and Dunnett post hoc tests).

REFERENCES

1. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**: 751-62.
2. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*; **35**: 219-26.
3. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1271-81.
4. Blondeau JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 2004; **49 Suppl 2**: S73-8.
5. Vila J, Ruiz J, Goni P *et al.* Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1201-3.
6. Vila J, Ruiz J, Goni P *et al.* Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39**: 757-62.
7. Madurga S, Sanchez-Cespedes J, Belda I *et al.* Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. *Chembiochem* 2008; **9**: 2081-6.
8. Vila J, Sanchez-Cespedes J, Sierra JM *et al.* Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28**: 19-24.
9. Ballesta S, Garcia I, Sanchez-Cespedez J *et al.* Intracellular penetration and activity of UB-8902 in human polymorphonuclear leukocytes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-17th Informational supplement. CLSI document M100-S17*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2007.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents-Approved standard M26-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1999.
12. O'Reilly T, Cleeland R, Squires EL. Evaluation of Antimicrobials in Experimental Animal Infections. In Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. MD, USA: Williams and Wilkins, 1996; 604–765.
13. Usansky JL, Desai A, Tang-Liu D. PK functions for Microsoft Excel. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA. <http://www.boomer.org/pkin/soft.html> (10 October 2010, date last accessed).

14. Rodriguez-Hernandez MJ, Pachon J, Pichardo C *et al.* Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45**: 493-501.
15. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1-10; quiz 1-2.
16. Rodriguez-Martinez JM, Pichardo C, Garcia I *et al.* Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 691-7.
17. Pachon J, Vila J. Treatment of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; **10**: 150-6.
18. Vila J, Pachon J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother* 2008; **9**: 587-99.
19. Higgins PG, Coleman K, Amyes SG. Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter* spp. in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45 Suppl 1**: 71-7.
20. McGee DH, Holt WF, Kastner PR *et al.* Safety of moxifloxacin as shown in animal and in vitro studies. *Surv Ophthalmol* 2005; **50 Suppl 1**: S46-54.
21. von Keutz E, Schluter G. Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother* 1999; **43 Suppl B**: 91-100.
22. Huband MD, Cohen MA, Zurack M *et al.* In vitro and in vivo activities of PD 0305970 and PD 0326448, new bacterial gyrase/topoisomerase inhibitors with potent antibacterial activities versus multidrug-resistant gram-positive and fastidious organism groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1191-201.
23. Otsu Y, Yanagihara K, Fukuda Y *et al.* In vivo efficacy of a new quinolone, DQ-113, against *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3699-703.
24. Otani T, Tanaka M, Ito E *et al.* In vitro and in vivo antibacterial activities of DK-507k, a novel fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3750-9.
25. Bedos JP, Azoulay-Dupuis E, Moine P *et al.* Pharmacodynamic activities of ciprofloxacin and sparfloxacin in a murine pneumococcal pneumonia model: relevance for drug efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **286**: 29-35.
26. Hoshino K, Inoue K, Murakami Y *et al.* In vitro and in vivo antibacterial activities of DC-159a, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 65-76.

OBJETIVO 3. Determinar la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* del inhibidor de β -lactamasas ácido clavulánico, en un modelo experimental de neumonía murina causado por cepas clínicas de *A. baumannii*.

ARTÍCULO 3. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009; 53(10): 4298-4304.
***In Vitro* Activity and *in Vivo* Efficacy of Clavulanic Acid against *Acinetobacter baumannii*.**

Running title: Clavulanic acid against *A. baumannii*.

Alejandro Beceiro^{1*}, Rafael López-Rojas^{2*†}, Juan Domínguez-Herrera², Fernando Docobo-Pérez², Germán Bou¹, Jerónimo Pachón² and the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI).

¹Servicio de Microbiología-Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, 15006 La Coruña; ²Servicio de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain.

*Both of these authors contributed equally to this work.

†Corresponding author: Rafael López-Rojas. Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Sevilla, Spain. Tel/Fax: +34-955013651/ +34-955013345; E-mail: rlopezrojas@hotmail.com

This work was presented in part at the 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting, B-066, Washington DC, October 25-28, 2008.

In Vitro Activity and In Vivo Efficacy of Clavulanic Acid against *Acinetobacter baumannii*[∇]

Alejandro Beceiro,¹† Rafael López-Rojas,^{2*}† Juan Domínguez-Herrera,² Fernando Docobo-Pérez,² Germán Bou,¹ Jerónimo Pachón,² and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI)

Servicio de Microbiología-Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, 15006 La Coruña,¹ and Servicio de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, 41013 Seville,² Spain

Received 9 March 2009/Returned for modification 11 May 2009/Accepted 15 July 2009

Clavulanic acid (CLA) exhibits low MICs against some *Acinetobacter baumannii* strains. The present study evaluates the efficacy of CLA in a murine model of *A. baumannii* pneumonia. For this purpose, two clinical strains, Ab11 and Ab51, were used; CLA MICs for these strains were 2 and 4 mg/liter, respectively, and the imipenem (IPM) MIC was 0.5 mg/liter for both. A pneumonia model in C57BL/6 mice was used. The CLA dosage (13 mg/kg of body weight given intraperitoneally) was chosen to reach a maximum concentration of the drug in serum similar to that in humans and a time during which the serum CLA concentration remained above the MIC equivalent to 40% of the interval between doses. Six groups ($n = 15$) were inoculated with Ab11 or Ab51 and were allocated to IPM or CLA therapy or to the untreated control group. In time-kill experiments, CLA was bactericidal only against Ab11 whereas IPM was bactericidal against both strains. CLA and IPM both decreased bacterial concentrations in lungs, 1.78 and 2.47 log₁₀ CFU/g ($P \leq 0.001$), respectively, in the experiments with Ab11 and 2.42 and 2.28 log₁₀ CFU/g ($P \leq 0.001$), respectively, with Ab51. IPM significantly increased the sterility of blood cultures over that for the controls with both strains ($P \leq 0.005$); CLA had the same effect with Ab51 ($P < 0.005$) but not with Ab11 ($P = 0.07$). For the first time, we suggest that CLA may be used for the treatment of experimental severe *A. baumannii* infections.

Acinetobacter baumannii is a gram-negative, nonfermenting, nonmobile, strictly aerobic, oxidase-negative bacterium that is able to grow in general culture media without specific requirements (4) and is often associated with nosocomial infections and outbreaks (16, 21, 22). This pathogen can produce different types of infections, such as septicemia, endocarditis, meningitis, wound and skin and soft-tissue infections, urinary tract infections (4), and nosocomial pneumonia, especially in patients with mechanical ventilation (8, 26). The attributable mortality of *A. baumannii* infections ranges from 7.8% to 23% (17, 18).

The standard treatment for infections caused by *A. baumannii* has been imipenem (IPM). This pathogen exhibits a great adaptive capacity and a great ability to acquire numerous effective antibiotic resistance mechanisms, and it may be considered the paradigm of multiresistant nosocomial bacteria. The frequent isolation of strains with resistance to the most commonly used antimicrobials, including IPM, has prompted the evaluation of diverse therapeutic alternatives, such as sulbactam and colistin, which have shown efficacy similar to that of IPM, rifampin (rifampicin), and tigecycline and are under evaluation for the treatment of *A. baumannii* infections, and antimicrobial peptides, which are still in experimental preclinical

studies. Thus, the absence of an optimal treatment necessitates the development of new therapeutic alternatives (44).

The commercial β -lactamase inhibitors (clavulanic acid [CLA], tazobactam, and sulbactam) generally have low antibiotic activity against most microorganisms and therefore are not used alone as antimicrobial agents. Sulbactam shows good bactericidal activity in vitro against *A. baumannii*, and it has been observed that the efficacy of sulbactam against susceptible strains is similar to that of IPM in an experimental pneumonia model (33). CLA was the first β -lactamase inhibitor to be used commercially (35). It is a suicide inhibitor, leading to an irreversible union with β -lactamase. This inhibitor has high affinity for class A β -lactamases, including TEM, SHV, and CTX enzymes.

Although the activity of CLA against *A. baumannii* is lower than that of sulbactam, two studies with 100 and 115 genetically different clinical strains have been published recently, showing a range of CLA MICs from 2 to 256 mg/liter, with MICs of ≤ 8 mg/liter for 29% and 40.9% of strains, respectively (3, 27); the MICs at which 50% of isolates were inhibited (MIC₅₀s) and MIC₉₀s ranged from 16 to 32 and 64 to 512 mg/liter, respectively (3, 27). In another study, the in vitro activities of various β -lactams, along with β -lactamase inhibitors, against 68 strains of *Acinetobacter* spp. were analyzed, showing that CLA was more active than other antimicrobials, such as ceftriaxone, cefotaxime, and piperacillin (41). In another work, nonclassical combinations of β -lactams and β -lactamase inhibitors were studied, and CLA increased the efficacy of the combinations tested, both in vitro and in vivo (45).

The aim of this study was to compare the efficacy of the

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain. Phone: 34-955013651. Fax: 34-955013345. E-mail: rlopezrojas@hotmail.com.

† A.B. and R.L.-R. contributed equally to this work.

[∇] Published ahead of print on 27 July 2009.

β -lactamase inhibitor CLA with that of IPM in an experimental murine pneumonia model using two clinical *Acinetobacter baumannii* strains.

(This work was presented in part at the 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy/46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, Washington, DC, 25 to 28 October 2008 [29a].)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Two clinical *A. baumannii* strains with different susceptibility patterns, Ab11 and Ab51, were selected from 244 *Acinetobacter* isolates characterized in a previous work (3, 5). The strains were identified phenotypically and were confirmed by amplified rRNA gene restriction analysis (43). The epidemiological relationships of the two *Acinetobacter* isolates were determined by repetitive extragenic palindromic-PCR (5). The strains were chosen due to their susceptibility to CLA and their ability to produce infections in the murine pneumonia model.

Antimicrobials and susceptibility tests. CLA was obtained from GlaxoSmithKline (Madrid, Spain), IPM from Merck, Sharp & Dohme (Madrid, Spain), sulbactam from Pfizer (Orsay, France), and tazobactam from Wyeth Pharmaceuticals (Philadelphia, PA). For these antibiotics, MICs were determined by broth microdilution according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) methods (9). The activities of CLA and IPM were tested using three different inocula: 10^5 , 10^6 , and 10^7 CFU/ml. For ampicillin, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, meropenem, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, amikacin, and colistin, MICs were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) according to the manufacturer's instructions.

Minimal bactericidal concentrations (MBCs) were determined by subculturing 100- μ l aliquots from wells containing antimicrobial concentrations greater than or equal to the MIC of CLA or IPM onto antimicrobial-free Mueller-Hinton agar. Plates were incubated at 35°C for 24 to 48 h, and viable colonies were counted. The MBC was determined as the concentration that killed $\geq 99.9\%$ of the initial inoculum.

Time-kill curves. The in vitro bactericidal activities of CLA and IPM were measured using the time-kill method as described by the NCCLS (30). Briefly, 20 ml of MHBCA (Mueller-Hinton broth, cation adjusted; Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD) was incubated at 37°C with a concentration of antibiotic equivalent to the MIC, twice the MIC, or four times the MIC (1 \times , 2 \times , or 4 \times MIC) and an inoculum of 5×10^5 CFU of strain Ab11 or Ab51/ml. As a control, tubes containing 20 ml of medium broth with the inoculum and without antibiotic were used. The bacterial concentration (expressed in log₁₀ CFU per milliliter) was determined at 0, 2, 4, 8, and 24 h. An antibiotic was considered bactericidal when it produced a decrease of ≥ 3 log₁₀ CFU/ml from the initial inoculum.

PAE. The in vitro postantibiotic effect (PAE) was determined by exposing both strains to CLA and IPM at concentrations of 1 \times , 2 \times , and 4 \times MIC for 60 min in MHBCA. Antibiotic was removed by centrifuging three times at $4,500 \times g$ for 10 min, removing the supernatant, and resuspending the pellet in prewarmed broth. The number of CFU per milliliter was counted at 0, 2, 4, 8, and 24 h. A growth control was performed in the same way without exposure to the antibiotic (12).

In vitro inactivation of CLA. Twenty milliliters of MHBCA with 1 \times , 2 \times , and 4 \times MIC of CLA was inoculated with 5×10^5 CFU/ml of Ab11 or Ab51. The cultures were incubated at 37°C, and the concentration of CLA was determined at 0, 2, 4, 8, and 24 h. Aliquots (50 μ l) of each culture were collected and centrifuged at $4,500 \times g$ for 10 min, and the bacterium-free supernatant was analyzed. The CLA concentration was calculated with a bioassay using *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 (31) as an indicator. Two 10- μ l aliquots from each time point were loaded onto blank disks, and the size of the inhibition zone was measured. Concentrations were estimated by extrapolation from the standard curve. The intraday and interday variations of the assays are described below.

Studies of AmpC enzymes. For the kinetics experiments, a total-protein extract was prepared by sonication of each strain. The steady-state kinetics parameters (K_m - and maximum rate of metabolism [V_{max}]-like parameters) for CLA were determined at 25°C using a Nicolette Evolution 300 spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). Each rate was determined three times in phosphate-buffered saline, with quartz cuvettes with a 1-cm path length. The K_m values were calculated as K_i values in competitive assays with nitrocefin (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). The V_{max} was calculated by considering a CLA concentration four times the K_m (28).

Animals. Immunocompetent C57BL/6 female mice, weighing 16 to 18 g, were obtained from the University of Seville; they had a sanitary status of MPF (murine pathogen free) and were assessed for genetic authenticity. Animals were housed in regulation cages with food and water ad libitum. The study was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of the University Hospitals Virgen del Rocío.

Drug pharmacokinetics. Several doses of CLA were assayed in mice in order to produce serum CLA concentrations similar to the maximum concentration in serum (C_{max}) for humans (data not shown). Finally, the serum pharmacokinetics of CLA was determined after intraperitoneal administration of a single dose of 13 mg/kg of body weight. The dose of IPM (30 mg/kg given intramuscularly) was chosen because of its known efficacy against *A. baumannii* in this experimental pneumonia model (34). In both cases, after 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, and 240 min, blood was extracted from the periorbital plexuses of three anesthetized mice per time point. The serum drug concentrations were calculated by a bioassay using *K. pneumoniae* ATCC 29665 for CLA and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 for IPM. The parameters determined were C_{max} (expressed in milligrams per liter), the area under the concentration-time curve (AUC, expressed in micrograms \cdot hour/liter), the terminal half-life ($t_{1/2}$, expressed in hours) (37), and the time during which the serum CLA concentration remained above the MIC (T_{MIC} , expressed in hours), which was estimated by extrapolation from the regression line of serum elimination using the MIC obtained (20). The intraday and interday variations of the assays were $3.21\% \pm 1.28\%$ and $2.96\% \pm 2.92\%$ for CLA and $2.62\% \pm 2.44\%$ and $3.22\% \pm 1.91\%$ for IPM; the linearity (r^2) of the assay was 0.99 ± 0.01 and 0.97 ± 0.02 , respectively; the lower limits of detection were 0.25 and 0.01 mg/liter.

Animal model. An experimental murine pneumonia model (34) was used to evaluate the efficacies of CLA and IPM against *A. baumannii* strains. The animals were anesthetized intraperitoneally with 5% (wt/vol) sodium thiopental (Braun) and were inoculated with 50 μ l of the bacterial suspension, for which the bacteria had been grown for 18 h in MHBCA at 37°C and had then been mixed 1:1 with a saline solution of porcine mucin at 10% (wt/vol). The final inoculum was 8.6 log₁₀ CFU/ml for Ab11 and 8.58 log₁₀ CFU/ml for Ab51. Treatments were begun 4 h after inoculation. Prior to the use of the pneumonia model, a group of 10 uninfected mice were treated with the dose regimen selected for CLA to evaluate its toxicity.

To ascertain the efficacy of CLA, 45 mice were inoculated with each strain and were randomly allocated to three groups of 15 animals. The first group did not receive antimicrobial treatment and was used as a control. The other two groups were treated with CLA (13 mg/kg, given intraperitoneally) or IPM (30 mg/kg, given intramuscularly). Because both antimicrobials assayed are β -lactams, the dose regimen was calculated to produce serum concentrations above the MIC during 40% of the interval between doses (11); thus, the intervals between doses for CLA were 2.5 h and 2 h for strains Ab11 and Ab51, respectively, and the intervals between doses for IPM were 3.5 h for both strains. The animals were observed for mortality over 24 h, and all the animals were analyzed immediately after death. Blood and lung samples were obtained and processed as described previously (34). The results are expressed as means \pm standard deviations of the log₁₀ CFU per gram of lung and as frequencies of sterile blood cultures.

Statistical analysis. The mean log₁₀ CFU per gram of lung for the different treatment groups were compared by analysis of variance (ANOVA). If the differences were significant, comparisons among groups were made using Dunnett and Tukey post hoc tests. Frequencies of sterile tissues, sterile blood cultures, and survival were analyzed by chi-square tests. The SPSS (version 15.0) statistical package was used (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

In vitro studies. The MICs and MBCs of CLA and IPM against Ab11 and Ab51 are shown in Table 1. For both strains and both antibiotics, a low inoculum effect was observed.

Sulbactam MICs were 1 and 2 mg/liter, respectively. Tazobactam had a MIC of 16 mg/liter against both strains. For these two β -lactamase inhibitors, only one inoculum (10^5) was tested.

Strains Ab11 and Ab51 were susceptible to piperacillin, piperacillin-tazobactam, meropenem, and colistin and were resistant to ampicillin, cefotaxime, and cefepime. Moreover, against ceftazidime, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gen-

TABLE 1. MICs and MBCs of CLA and IPM against two strains of *A. baumannii* at three different inocula

Strain, antimicrobial, and inoculum (CFU/ml)	MIC (mg/liter)	MBC (mg/liter)
Ab11		
CLA		
10 ⁵	2	2
10 ⁶	4	4
10 ⁷	4	8
IPM		
10 ⁵	0.5	0.5
10 ⁶	0.5	0.5
10 ⁷	1	2
Ab51		
CLA		
10 ⁵	4	4
10 ⁶	8	8
10 ⁷	8	16
IPM		
10 ⁵	0.5	0.5
10 ⁶	0.5	0.5
10 ⁷	1	2

tamicin, and amikacin, Ab11 was susceptible and Ab51 was resistant.

Time-kill curves are represented in Fig. 1. CLA at 4× MIC showed bactericidal activity at 8 h against Ab11; against Ab51, CLA was not bactericidal. IPM was bactericidal at 1×, 2×, and 4× MIC against Ab11 at 8 h; against Ab51, IPM was bacteri-

cidal at 1×, 2×, and 4× MIC at 24 h. No PAE of CLA or IPM was observed with either of the strains.

The increase in the growth of strain Ab51 at 24 h in the time-kill curve experiment with CLA was remarkable, reaching the growth level of the antibiotic-free control (Fig. 1). Figure 2 shows the decrease in the CLA concentration in the culture medium during the assay with strain Ab51 but not with strain Ab11. As stated above, one possible explanation is that somehow CLA is either sequestered or inactivated by β-lactamase enzymes. In this respect, the relative enzymatic efficiency (V_{max}/K_m -like) parameters of the Ab51 AmpC enzyme (0.02597 min⁻¹) were twice that of the Ab11 AmpC enzyme (0.01255 min⁻¹), which can explain the decrease in the CLA drug concentration in MHBCA along the time-kill curves. On the other hand, the presence of additional β-lactamases was discarded by isoelectric focusing gel experiments (data not shown).

In vivo studies. (i) Pharmacokinetics/pharmacodynamics. The $t_{1/2}$ values of CLA and IPM after doses of 13 mg/kg and 30 mg/kg, respectively, were 0.24 and 0.26 h. The T_{MIC} s were 0.93 and 0.79 h for CLA with Ab11 and Ab51, respectively, and 1.27 h for IPM with both strains. The pharmacokinetics curves are shown in Fig. 3. The calculated pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters are detailed in Table 2.

(ii) Efficacy of treatment in experimental pneumonia. In groups inoculated with strain Ab11, both treatments (CLA and IPM) were effective compared to the untreated control group, decreasing the bacterial load by 1.78 log₁₀ CFU/g lung and 2.47

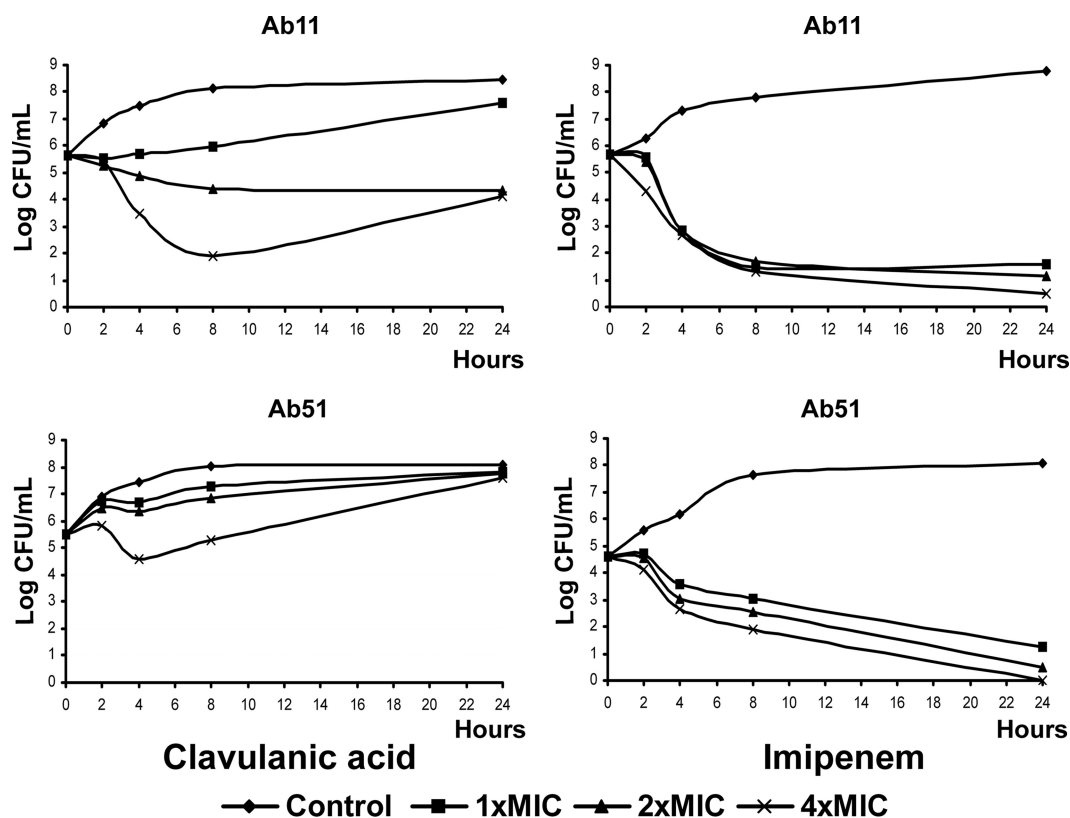


FIG. 1. Time-kill curves of CLA and IPM against strains Ab11 and Ab51. The control has no antibiotic.

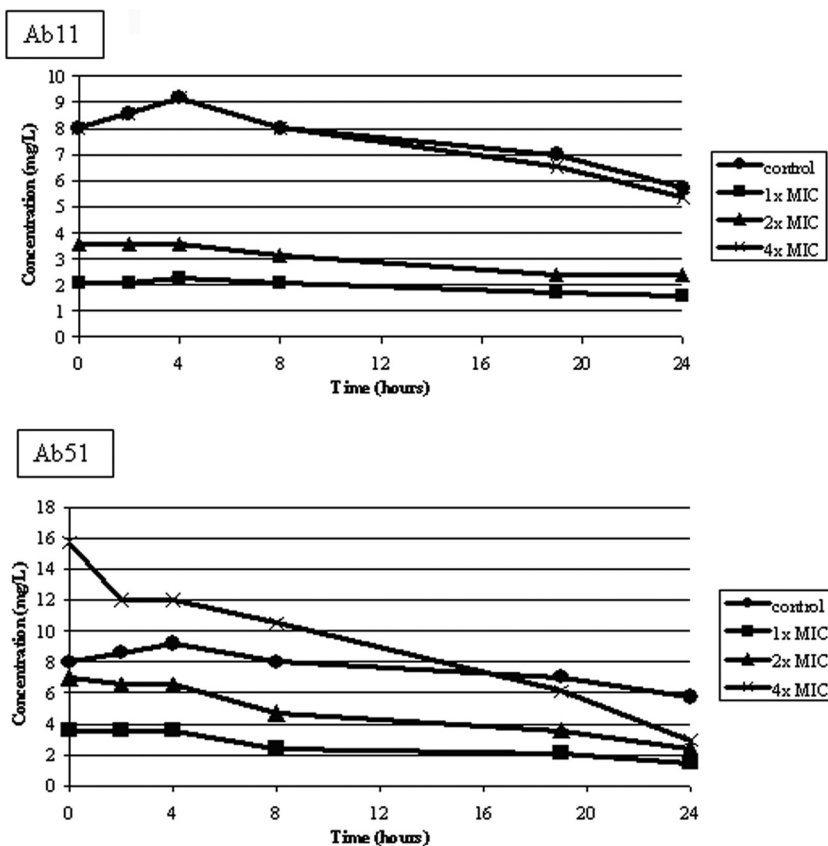


FIG. 2. CLA concentrations during the time-kill curves with strains Ab11 and Ab51. The control has no bacteria and 8 mg of CLA/liter.

log₁₀ CFU/g lung, respectively ($P < 0.001$). The frequency of sterile blood cultures increased to 80% in the IPM group ($P = 0.005$) and 60% in the CLA group ($P = 0.07$) compared with the control group (26.67%). In the groups inoculated with Ab51, both treatments (CLA and IPM) were effective compared to the control group, decreasing the bacterial load by 2.41 log₁₀ CFU/g lung ($P < 0.001$) and 2.28 log₁₀ CFU/g lung, respectively ($P = 0.001$). The IPM and CLA groups had higher frequencies of sterile blood cultures (100% and 93.3%, respec-

tively; $P < 0.001$) than the control group (20%). The results are detailed in Table 3 and Fig. 4. No toxicity was observed with CLA in the group of uninfected mice.

DISCUSSION

The results of the present study show, for the first time, that CLA is effective in the treatment of *A. baumannii* in experimental murine pneumonia, in terms of reduction of lung bacterial concentrations, sterilization of blood cultures, and survival, with the last two effects being strain dependent. The results with CLA are similar to those with IPM, which is the gold standard for the treatment of clinical *A. baumannii* infections and has shown high efficacy in the treatment of experimental pneumonia with this bacterium (34), although CLA was slightly less efficacious in the sterilization of blood cultures than IPM with one of the strains assayed.

Due to the high frequency of antimicrobial multiresistance among clinical isolates of *A. baumannii*, new therapeutic alternatives are being evaluated (44). Among the β-lactamase inhibitors, sulbactam has shown good efficacy in treating *A. baumannii* infections, both in experimental murine pneumonia and in clinical infections (10, 29, 33), but less is known about the activities of the other β-lactamase inhibitors, such as tazobactam or CLA. CLA has wide antibacterial activity (19), especially against pathogens such as *Neisseria* spp., *Chlamydia* spp., *Legionella pneumophila*, and *Enterobacteriaceae*. In an in vitro study with 68 isolates of *Acinetobacter* spp., CLA was

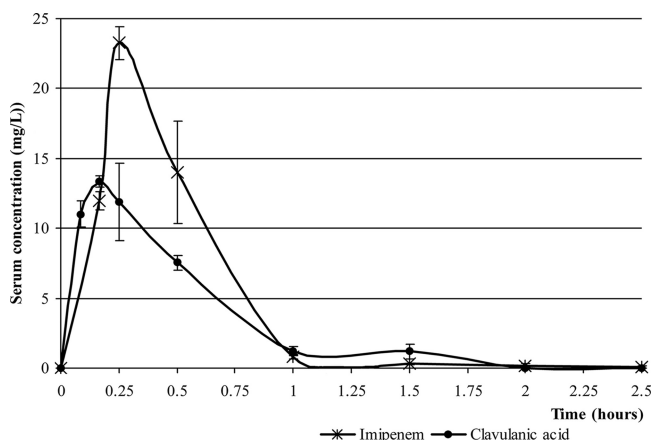


FIG. 3. Serum CLA and IPM concentrations. CLA was administered at 13 mg/kg, and IPM was administered at 30 mg/kg.

TABLE 2. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of CLA (13 mg/kg) and IPM (30 mg/kg)

Antimicrobial and strain	MIC (mg/liter)	Pharmacokinetic parameter			Pharmacodynamic parameter		
		C_{max} (mg/liter)	AUC (mg · h/liter)	$t_{1/2}$ (h)	AUC/MIC (h)	C_{max}/MIC	T_{MIC} (h)
CLA		13.38	8.17	0.24			
Ab11	2				4.03	6.69	0.93
Ab51	4				2.02	3.35	0.79
IPM	0.5 ^a	23.25	11.29	0.26	22.57	46.5	1.27

^a The IPM MIC is the same for strains Ab11 and Ab51, and consequently the pharmacodynamic parameters for the two strains are the same.

more active than other β -lactams, such as ceftriaxone, cefotaxime, and piperacillin; the MIC₅₀ and MIC₉₀ of CLA were 15.4 and 28.4 mg/liter, respectively (41). In two studies with 100 and 115 epidemiologically defined strains of *Acinetobacter* spp., the CLA MIC was ≤ 8 mg/liter for 29% and 40.9% of the strains, respectively, and CLA MIC₅₀s were 32 and 16 mg/liter (3, 27).

In the time-kill curves, a bactericidal effect was observed against strain Ab11, but not against Ab51, at 4 \times MIC. To explain this unexpected result, the CLA concentration in the culture medium was determined, and a significant decrease was observed with strain Ab51, from 16 to 2.5 mg/liter after 24 h of incubation at 4 \times MIC, but not with Ab11. This effect could be due to hydrolysis or a sequestration-like effect of the AmpC enzyme that decreases the CLA concentration in the medium. Indeed, it has been shown previously that CLA can inhibit AmpC from *A. baumannii*, which demonstrates the interaction of this inhibitor with the naturally occurring AmpC enzyme from this microorganism (6). Another possible explanation could be an increase in CLA MICs during the time-kill experiments; however, we determined CLA MICs against both strains before and after a 24-h incubation with a CLA concentration of 8 mg/liter, and we observed no changes in the MICs (data not shown).

As occurs with other β -lactams against gram-negative bacilli, except in the case of IPM (39), we have found absent or minimal PAE with CLA against the strains studied. Previously, it has been shown that the addition of CLA to amoxicillin (amoxicilline) produced an extended PAE against β -lactamase-negative strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Escherichia coli* (24). Other authors (42) found a lack of enhancement of the amoxicillin PAE by CLA, and they explained the findings of the previous work (24) by the high concentrations of CLA used, which have antibac-

terial activity per se. We have found no PAE with IPM, in spite of the results of other authors (39).

Different in vitro studies of pathogens such as *S. pneumoniae* (15, 36), *L. pneumophila* (40), *E. coli* (25), and *Acinetobacter* spp. (39) suggest that CLA has affinity for penicillin-binding proteins, although the activity can differ greatly depending on the microorganism. It seems that an important factor in considering the activity of CLA, especially when it is combined with other β -lactams, such as amoxicillin or ticarcillin, is the interaction with the immune system. In two works in which *Klebsiella pneumoniae* infections in renal transplant patients (13) and patients with chronic hemodialysis (14) were studied, addition of amoxicillin-clavulanate at 0.5 \times MIC restored the activity of human polymorphonuclear cells to levels similar to those in healthy subjects. In agreement with these results, the association of amoxicillin and CLA resulted in a synergistic potentiation of the activity of both drugs on polymorphonuclear cell activity against *S. pneumoniae* in such a manner that the bacteria became more susceptible either to phagocytosis or to the microbicidal activities of phagocytes (15). The use of subinhibitory concentrations of amoxicillin-clavulanate may increase the expression of the proinflammatory cytokines interleukin-8 and interleukin-1 β (32). The interaction between amoxicillin-clavulanate and the immune cells seems clear, but further studies are necessary to determine the involvement of CLA in this interaction.

Animal infection models are very useful for the observation of new potential uses of antibiotics already established in clinical practice. For example, good in vitro activity of CLA was observed against *Chlamydia trachomatis* (7). Later, the efficacy of treatment with CLA was demonstrated in experimental murine pneumonia caused by *C. trachomatis*, in which CLA protected 75% of mice, amoxicillin protected 90%, and the combination of the two protected 100% (2). In the treatment of *L. pneumophila* in neutropenic rats, CLA was highly efficacious,

TABLE 3. Effects of antibiotic therapy on the clearance of Ab11 and Ab51 strains from mouse lungs, the frequency of sterile blood cultures, and mortality

Treatment group (n)	Ab11			Ab51		
	Bacterial load (mean log ₁₀ CFU/g of lung \pm SD)	% Sterile blood cultures	% Mortality	Bacterial load (mean log ₁₀ CFU/g of lung \pm SD)	% Sterile blood cultures	% Mortality
Control (15)	8.28 \pm 1.40	26.7	40	7.75 \pm 1.07	20	93.3
IPM (15)	5.81 \pm 1.13 ^a	80 ^a	53.3	5.46 \pm 1.55 ^a	100 ^a	40 ^a
CLA (15)	6.50 \pm 0.81 ^a	60	26.7	5.33 \pm 1.88 ^a	93.3 ^a	33.3 ^a

^a $P < 0.01$ relative to the control group (by ANOVA, post hoc Tukey and Dunnett tests, and chi-square tests).

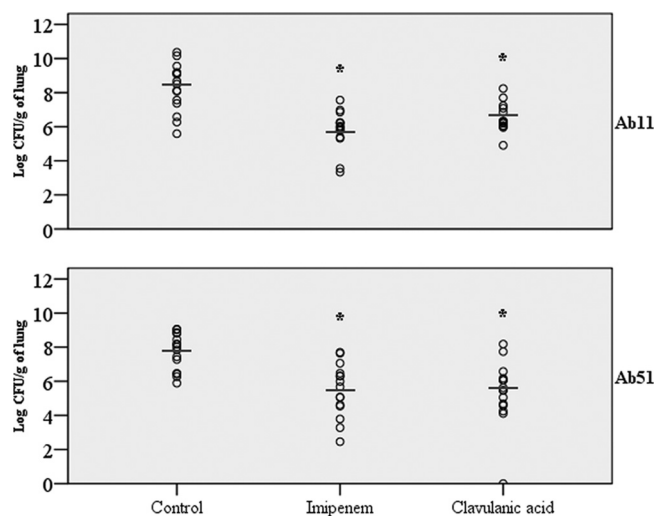


FIG. 4. Effect of antibiotic therapy with CLA or IPM on the clearance of *A. baumannii* from mouse lungs. *, $P \leq 0.001$ relative to the control group (by ANOVA and Tukey and Dunnett post hoc tests).

similar to the gold standard, erythromycin; amoxicillin-clavulanate was not more effective, while amoxicillin alone was ineffective (38). This correlates with the results obtained in vitro, in which the CLA MIC was 0.1 to 0.25 mg/liter (40).

In the murine model, both CLA and IPM treatments were efficacious in pulmonary bacterial clearance, as determined by comparison with clearance in the group without treatment, and increased the number of sterile blood cultures. There were no significant differences between two treatments in these parameters, although the number of sterile blood cultures was higher (and significantly different from that for the control) with IPM than with CLA. The model was not used beyond 24 h because of the high number of doses that had to be administered to the animals to reach a serum concentration above the MIC for at least 40% of the time between doses. In spite of this, CLA decreased the mortality rate in the model with strain Ab51, which produced a mortality rate of 93.3% in the control group.

In an experimental *A. baumannii* pneumonia model in neutropenic mice, the addition of CLA to ticarcillin, using a strain for which ticarcillin and ticarcillin-clavulanate MICs were 32 mg/liter, decreased the lung bacterial concentration, whereas ticarcillin alone was not efficacious in comparison with the control group. In this work, IPM alone was also efficacious in comparison with the control group, showing no differences from ticarcillin plus CLA (45).

Data about the pharmacokinetics of CLA in humans are scarce. In the present experiments, the dose of CLA was chosen to produce a C_{max} similar to that in humans. Thus, the C_{max} of CLA after a dose of 200 mg in humans is 11.4 mg/liter (1), and in the mice it was 13.38 mg/liter. The $t_{1/2}$ in humans receiving the same dose is 0.8 to 1 h (1), higher than the $t_{1/2}$ found in our experiments with mice, which was 0.24 h, as is the rule for small animals. Also, in human bronchial mucosae, the levels of CLA are 118% of the corresponding levels in serum (23). These data suggest that CLA may be used to treat human lung infections with *A. baumannii* strains for which the CLA MIC is ≤ 8 mg/liter, such as those in the present study, taking

into account that a similar C_{max} is obtained with a 200-mg dose and that the interval between doses may be the same as that obtained when CLA is used as a β -lactamase inhibitor because of its higher $t_{1/2}$ in humans than in mice.

In summary, the present study suggests that CLA is effective in the treatment of experimental murine pneumonia caused by *A. baumannii* and that it thus warrants future assessment of its efficacy with *A. baumannii* strains showing higher CLA MICs than those in the present study. Studies of humans, such as those performed with sulbactam, are necessary to confirm these results.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III–FEDER, Fondo de Investigación Sanitaria (PI061368, PI081613), and Consellería de Sanidad PS07/90. A.B. has an Angeles Alvario research contract from Xunta de Galicia.

None of the authors has a conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Bamberger, D. M., J. W. Foxworth, D. L. Bridwell, C. S. Shain, and D. N. Gerdin. 2005. Extravascular antimicrobial distribution and the respective blood and urine concentrations in humans, p. 719–814. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Beale, A. S., E. Faulds, S. E. Hurn, J. Tyler, and B. Slocombe. 1991. Comparative activities of amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* in cell culture and in an experimental mouse pneumonitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 27:627–638.
- Beceiro, A., F. Fernandez-Cuenca, A. Ribera, L. Martinez-Martinez, A. Pascual, J. Vila, J. Rodriguez-Bano, J. M. Cisneros, J. Pachon, and G. Bou. 2008. False extended-spectrum beta-lactamase detection in *Acinetobacter* spp. due to intrinsic susceptibility to clavulanic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:301–308.
- Bergogne-Berezin, E., and K. J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:148–165.
- Bou, G., G. Cervero, M. A. Dominguez, C. Quereda, and J. Martinez-Beltran. 2000. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 6:635–643.
- Bou, G., and J. Martinez-Beltran. 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:428–432.
- Bowie, W. R. 1986. In vitro activity of clavulanic acid, amoxicillin, and ticarcillin against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:713–715.
- Cefai, C., J. Richards, F. K. Gould, and P. McPeake. 1990. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J. Hosp. Infect.* 15:177–182.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100–S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Corbella, X., J. Ariza, C. Ardanuy, M. Vuelta, F. Tubau, M. Sora, M. Pujol, and F. Gudiol. 1998. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:793–802.
- Craig, W. A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* 26:1–10.
- Craig, W. A., and S. Gudmundsson. 1991. Postantibiotic effect, p. 403–431. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Cuffini, A. M., V. Tullio, F. Giacchino, A. Bonino, N. Mandras, N. Bianchi, J. Roana, D. Scalas, F. Bonello, and N. A. Carlone. 2001. Improved phagocyte response by co-amoxiclav in renal transplant recipients. *Transplantation* 71:575–577.
- Cuffini, A. M., V. Tullio, F. Giacchino, N. Mandras, D. Scalas, P. Belardi, C. Merlino, and N. A. Carlone. 2001. Impact of co-amoxiclav on polymorphonuclear granulocytes from chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 37:1253–1259.
- Cuffini, A. M., V. Tullio, A. Ianni Palarchio, A. Bonino, G. Paizis, and N. A. Carlone. 1998. Enhanced effects of amoxicillin/clavulanic acid compared

- with amoxicillin and clavulanic acid alone on the susceptibility to immunodefenses of a penicillin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Drugs Exp. Clin. Res.* **24**:173–184.
16. **Dijkshoorn, L., H. M. Aucken, P. Gerner-Smidt, M. E. Kaufmann, J. Ursing, and T. L. Pitt.** 1993. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **31**:702–705.
 17. **Falagas, M. E., I. A. Bliziotis, and I. I. Siempos.** 2006. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit. Care* **10**:R48.
 18. **Falagas, M. E., and P. I. Rafailidis.** 2007. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit. Care* **11**:134.
 19. **Finlay, J., L. Miller, and J. A. Poupard.** 2003. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:18–23.
 20. **Frimodt-Moller, N., M. W. Bentzon, and V. F. Thomsen.** 1986. Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with in vivo effect for 14 cephalosporins. *J. Infect. Dis.* **154**:511–517.
 21. **Gerner-Smidt, P., and W. Frederiksen.** 1993. *Acinetobacter* in Denmark: I. Taxonomy, antibiotic susceptibility, and pathogenicity of 112 clinical strains. *APMIS* **101**:815–825.
 22. **Gerner-Smidt, P., and I. Tjernberg.** 1993. *Acinetobacter* in Denmark. II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS* **101**:826–832.
 23. **Gould, I. M., G. Harvey, D. Golder, T. M. Reid, S. J. Watt, J. A. Friend, J. S. Legge, and J. G. Douglas.** 1994. Penetration of amoxicillin/clavulanic acid into bronchial mucosa with different dosing regimens. *Thorax* **49**:999–1001.
 24. **Gould, I. M., K. Milne, and C. Jason.** 1991. Post antibiotic effect of coamoxiclav, abstr. 1360. *Progr. abstr. 5th Eur. Cong. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
 25. **Greenwood, D., F. O'Grady, and P. Baker.** 1979. An in vitro evaluation of clavulanic acid, a potent, broad-spectrum beta-lactamase inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* **5**:539–547.
 26. **Hartstein, A. I., A. L. Rashad, J. M. Liebler, L. A. Actis, J. Freeman, J. W. Rourke, Jr., T. B. Stibolt, M. E. Tolmasky, G. R. Ellis, and J. H. Crosa.** 1988. Multiple intensive care unit outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* respiratory infection and colonization associated with contaminated, reusable ventilator circuits and resuscitation bags. *Am. J. Med.* **85**:624–631.
 27. **Higgins, P. G., H. Wisplinghoff, D. Stefanik, and H. Seifert.** 2004. In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1586–1592.
 28. **Hujer, K. M., N. S. Hamza, A. M. Hujer, F. Perez, M. S. Helfand, C. R. Bethel, J. M. Thomson, V. E. Anderson, M. Barlow, L. B. Rice, F. C. Tenover, and R. A. Bonomo.** 2005. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2941–2948.
 29. **Jimenez-Mejias, M. E., J. Pachon, B. Becerril, J. Palomino-Nicas, A. Rodriguez-Cobacho, and M. Revuelta.** 1997. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin. Infect. Dis.* **24**:932–935.
 - 29a. **López-Rojas, R., A. Beceiro, J. Domínguez-Herrera, F. Docobo-Pérez, G. Bou, and J. Pachón.** 2008. In vitro activity and in vivo efficacy of clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*, poster B-066. *Abstr. 48th Annu. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* American Society for Microbiology, Washington, DC.
 30. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
 31. **Reading, C., and M. Cole.** 1977. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:852–857.
 32. **Reato, G., A. M. Cuffini, V. Tullio, A. I. Palarchio, A. Bonino, R. Foa, and N. A. Carlone.** 1999. Co-amoxiclav affects cytokine production by human polymorphonuclear cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:715–718.
 33. **Rodriguez-Hernandez, M. J., L. Cuberos, C. Pichardo, F. J. Caballero, I. Moreno, M. E. Jimenez-Mejias, A. Garcia-Curiel, and J. Pachon.** 2001. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:479–482.
 34. **Rodriguez-Hernandez, M. J., J. Pachon, C. Pichardo, L. Cuberos, J. Ibanez-Martinez, A. Garcia-Curiel, F. J. Caballero, I. Moreno, and M. E. Jimenez-Mejias.** 2000. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:493–501.
 35. **Rolinson, G. N.** 1994. A review of the microbiology of amoxicillin/clavulanic acid over the 15 year period 1978–1993. *J. Chemother.* **6**:283–318.
 36. **Severin, A., E. Severina, and A. Tomasz.** 1997. Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:504–510.
 37. **Shumaker, R. C.** 1986. PKCALC: a BASIC interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metab. Rev.* **17**:331–348.
 38. **Smith, G. M., K. H. Abbott, and R. Sutherland.** 1992. Bactericidal effects of co-amoxiclav (amoxicillin clavulanic acid) against a *Legionella pneumophila* pneumonia in the immunocompromised weanling rat. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**:525–534.
 39. **Spivey, J. M.** 1992. The postantibiotic effect. *Clin. Pharm.* **11**:865–875.
 40. **Stokes, D. H., B. Slocombe, and R. Sutherland.** 1989. Bactericidal effects of amoxicillin/clavulanic acid against *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother.* **23**:43–51.
 41. **Suh, B., T. Shapiro, R. Jones, V. Satishchandran, and A. L. Truant.** 1995. In vitro activity of beta-lactamase inhibitors against clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:111–114.
 42. **Thorburn, C. E., S. J. Molesworth, R. Sutherland, and S. Rittenhouse.** 1996. Postantibiotic and post-beta-lactamase inhibitor effects of amoxicillin plus clavulanate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2796–2801.
 43. **Vanechoutte, M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. de Vos, G. Claeys, and G. Verschraegen.** 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**:11–15.
 44. **Vila, J., and J. Pachon.** 2008. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin. Pharmacother.* **9**:587–599.
 45. **Wolff, M., M. L. Joly-Guillou, R. Farinotti, and C. Carbon.** 1999. In vivo efficacies of combinations of beta-lactams, beta-lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1406–1411.

VI. DISCUSIÓN

Los cada vez más frecuentes aislamientos de cepas de *A. baumannii* multirresistentes, incluyendo resistencia a imipenem y colistina, hacen que para el tratamiento de las infecciones causadas por este tipo de patógenos no exista una alternativa óptima [264, 368]. Como ya hemos comentado anteriormente, el sulbactam ha demostrado eficacia en varios estudios [264], aunque el aumento de su uso ha provocado también un aumento de las cepas resistentes, por lo que lo hacen inapropiado para el tratamiento de estas infecciones. La rifampicina también ha sido valorada para su uso en el tratamiento de *A. baumannii* multirresistente, pero el desarrollo de resistencias en cortos periodos de tiempo cuando se usa en monoterapia, hacen necesaria su administración en combinación con otros antimicrobianos. Estas combinaciones, como rifampicina más colistina, han demostrado eficacia en trabajos experimentales y estudios clínicos [368], pero con las limitaciones del pequeño número de pacientes incluidos y la ausencia de grupos comparativos en los ensayos clínicos. Parecido es lo que ocurre con la tigeciclina, donde la rápida aparición de resistencias durante el tratamiento, incluso con casos de bacteriemias de brecha por *A. baumannii* en pacientes que reciben tratamiento con tigeciclina para otra indicación, hacen que no sea un tratamiento de elección. Por estas y otras razones no se dispone de un tratamiento óptimo para este tipo de infecciones, y la falta de antimicrobianos activos frente a estas cepas hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

1. Eficacia de péptidos híbridos de cecropina A-melitina en un modelo de sepsis peritoneal producido por *Acinetobacter baumannii* panresistente.

La falta de nuevas moléculas eficaces frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii* deja a los péptidos antimicrobianos de origen eucariótico (*eukaryotic antimicrobial peptides*, EAPs) como una de las opciones mejor situadas para el desarrollo de un tratamiento óptimo. Estos EAPs están siendo estudiados como posible alternativa debido a varias características. La principal es su mecanismo de acción que, debido a su afinidad electrostática y las características de su estructura secundaria, hacen que los EAPs tengan varias dianas bacterianas tales como los lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucano y fosfolípidos de membrana, así como dianas intracelulares que alteran la formación de la membrana citoplasmática, inhibición de la pared celular, ácidos nucleicos y síntesis de proteínas, entre otros [438, 439]. Esto hace difícil generar resistencias frente a estos péptidos, ya que serían necesarios cambios drásticos en moléculas vitales para la bacteria. Otra ventaja de los EAPs es que presentan un efecto antiendotóxico protector, como se ha visto en moléculas como la ranalexina [440], pexiganan [441], y el rBPI [442], uniéndose al LPS bacteriano y bloqueando la síntesis de TNF- α , evitando así la cascada de mediadores endógenos.

A la vez que el mecanismo de acción de estos péptidos es su mayor ventaja, también puede ser su principal desventaja: se necesitan concentraciones determinadas para su acción estequiométrica, que son fáciles de alcanzar en tubos de ensayo, pero su extremada sensibilidad a la degradación proteolítica *in vivo* afecta negativamente a su farmacocinética y restringe sus posibilidades para aplicaciones sistémicas, ya que este tipo de administración requeriría una considerable cantidad de péptido [438]; por esta razón, los ensayos clínicos con péptidos antimicrobianos están principalmente diseñados para aplicación tópica [443]. Otras desventajas que presentan son su incapacidad para alcanzar una alta actividad microbiológica bajo condiciones fisiológicas de sal, pH y suero, y la falta de información sobre la toxicidad de péptidos de gran tamaño y altamente cargados.

Un significativo número de péptidos antimicrobianos han sido probados *in vitro* frente a diferentes especies del género *Acinetobacter*. Algunos de estos péptidos han mostrado actividad *in vitro* con bajas CMI_s y rápida actividad bactericida, como en

el trabajo de Braunstein *et al.* [357], donde probaron un péptido antimicrobiano y su análogo diastereómero frente una cepa de *P. aeruginosa* sensible a gentamicina y una cepa de *A. baumannii* resistente a gentamicina. Obtuvieron CMIs de 5,6 mg/l ensayando con un 30% de suero humano, y una rápida actividad bactericida a su CMI pero sin suero. Giacometti *et al.* estudiaron la actividad *in vitro* de diferentes péptidos (buforina II, cecropina P1, indolicidina, magainina II y ranalexina) frente a 12 cepas clínicas de *A. baumannii* [347]. Buforina II, cecropina P1 y magainina II fueron los más activos, con rangos de CMIs desde 0,25 a 16, 0,5 a 32, y 0,5 a 16 mg/l, respectivamente. El pexiganan, un análogo de la magainina II, ha mostrado también una buena actividad frente a *A. baumannii*, con una CMI₅₀ de 2 mg/l y una CMI₉₀ de 8 mg/l [348]. Urban *et al.* demostraron que una cepa de *A. baumannii* resistente a las polimixinas fue sensible a la cecropina P1 y el rBPI₂₁ (fragmento recombinante amino-terminal de 21-kDa de la proteína bactericida/permeabilizadora) [349]. La cecropina A, melitina y los péptidos híbridos de cecropina A-melitina (CAMs), CA(1-7)M(2-9) y CA(1-8)M(1-18), han mostrado buena actividad frente a *A. baumannii*, incluyendo cepas resistentes a colistina, siendo mejor la actividad de los CAMs que la de sus predecesores [350-352].

Nuestro grupo, en un trabajo previo [353], también ha demostrado la actividad bactericida *in vitro* de los cuatro CAMs usados en el presente trabajo, con incluso mejores CMIs (2-8 mg/l) y CMBs (2-8 mg/l) frente a 13 cepas panresistentes de *A. baumannii*. Estos ensayos se hicieron en ausencia de suero. Sin embargo, cuando en nuestro trabajo medimos la actividad del péptido CA(1-8)M(1-18) en presencia de un 25% de suero de ratón, la CMI aumentó desde 4 mg/l a más de 512 mg/l, pudiendo ser explicado por la inactivación o degradación del péptido en presencia de suero que, como se ha comentado anteriormente, es uno de los principales hándicaps de los péptidos antimicrobianos [438]. Los resultados de la influencia del suero sobre la hemólisis corroboran esta hipótesis. Además, también lo demuestra el hecho de que en los experimentos de la inhibición producida por el suero sobre la actividad bactericida de los dos enantiómeros del péptido CA(1-8)M(1-18), el péptido con aminoácidos no proteinogénicos (aminoácidos dextrógiros, D-) fue menos inhibido que el enantiómero con aminoácidos proteinogénicos (aminoácidos levógiros, L-).

De la misma manera, esta inactivación del suero podría explicar el fracaso para obtener una dosis efectiva 50 (dosis que produce un 50% de supervivencia, DE₅₀) en un modelo murino de sepsis. Una consecuencia de esto puede ser la escasez de actividad

sistémica de los CAMs en este modelo, como sugiere el efecto bacteriostático observado en la concentración bacteriana en bazo. Sin embargo, se obtuvo un importante y rápido efecto bactericida local en términos de disminución de la concentración bacteriana en lavado peritoneal, durante la primera hora post-tratamiento, siendo el CA(1-8)M(1-18) el péptido más eficaz con una disminución de 3,5 log₁₀ ufc/ml.

Esta rápida actividad bactericida produjo un aumento de concentración sérica de TNF- α una hora después del tratamiento, la cual fue similar o mayor que la que se obtuvo en los animales infectados y no tratados a las 11 horas. Este aumento de TNF- α puede ser debido a la lisis bacteriana masiva producida por los péptidos, con la consiguiente liberación de LPS bacteriano, debida al tratamiento, ya que existe una clara relación entre la disminución de la concentración bacteriana en el peritoneo y el incremento del TNF- α . Además, este incremento post-tratamiento de TNF- α puede ayudar a la no obtención de DE₅₀ con ninguno de los CAMs, puesto que se observa en el estado de los animales un empeoramiento con respecto a los no tratados. El efecto antiendotóxico que hemos comentado de los péptidos catiónicos [440, 444, 445] es manifestado en los CAMs en los experimentos *in vitro* llevados a cabo por J.A. Bengoechea *et al.* (datos no mostrados). Es necesario aclarar que en estos experimentos con cultivos celulares, existen condiciones fisiológicas similares a las que existen *in vivo*, pero el suero utilizado está inactivado por calor, por lo que se evita la acción proteolítica de las proteasas sobre los CAMs. Así, estos péptidos mantienen su actividad antiendotóxica uniéndose al LPS bacteriano, y evitando en cultivos celulares el incremento de TNF- α que se ha mostrado en el modelo animal.

Giacometti *et al.* en un trabajo con el péptido MSI-78 (pexiganan) [359], investigaron la actividad antimicrobiana y antiendotóxica *in vivo* de este análogo de la magainina II, comparado con piperacilina, en tres modelos diferentes de sepsis en rata: administración intraperitoneal de LPS bacteriano, peritonitis por *E. coli* ATCC 25922, y modelo de punción y ligación cecal. MSI-78, en una dosis de 1 mg/kg administrada 6 h después de la infección fue eficaz, disminuyendo los niveles de endotoxina plasmática y de TNF- α en los tres modelos, así como mejorando la supervivencia, esterilización de hemocultivos y reducción de concentración bacteriana en lavado peritoneal respecto a los controles no tratados en los dos modelos de peritonitis. A pesar de esta eficacia, en este trabajo sólo muestran el dato farmacocinético de la *Cmax*, siendo de 2,7 mg/l a los

30 minutos tras una única dosis de 1 mg/kg de MSI-78. Este péptido ha mostrado eficacia *in vivo* frente a *E. coli* ó enterobacterias, pero con esta distribución sistémica parece improbable que el MSI-78 pueda ser eficaz en un modelo de sepsis causado por cepas de *A. baumannii* multirresistentes, como las cepas con CMIs de 2-16 mg/l que estos autores utilizaron para demostrar la eficacia *in vitro* [348], ó cepas panresistentes como la utilizada en nuestro modelo. En realidad, la eficacia del pexiganan ha sido evaluada en ensayos clínicos sólo en administración tópica. En este ensayo se compara con ofloxacino en administración sistémica, para el tratamiento de infecciones leves en úlceras de pie diabético [446]. Ambos tratamientos mostraron resultados equivalentes, así como la no emergencia de resistencia a pexiganan en pacientes tratados con el péptido, mientras que en pacientes tratados con ofloxacino aparecieron algunas cepas resistentes a la quinolona. De todas formas, parece inexistente la posibilidad de que este péptido pueda ser utilizado en administración sistémica, o incluso vía tópica en infecciones graves o producidas por cepas resistentes.

Existen trabajos que han demostrado eficacia de péptidos catiónicos en modelos animales de infecciones por *A. baumannii* multirresistentes, si bien usan modelos no discriminativos. En el estudio de Braunstein *et al.* [357] evalúan, frente a *P. aeruginosa* sensible a gentamicina y *A. baumannii* resistente a gentamicina, la actividad *in vivo* en términos de mortalidad de las formas levógira y dextrógira de un péptido catiónico. Obtuvieron tasas de supervivencia del 80% frente a la cepa sensible con ambos péptidos, y frente a la cepa resistente solamente con el enantiómero dextrógiro. El régimen de tratamiento fue de 6 mg/kg/día divididos en dos inyecciones de 3 mg/kg cada 12 horas. Una limitación de este trabajo es que la eficacia observada puede ser discutida a causa de la prontitud con la que se inicia el tratamiento, ya que administran el péptido sólo una hora después de la infección. En nuestro modelo de sepsis, el tratamiento comenzó 4 horas después de la inoculación, tiempo suficiente para que la infección sistémica esté establecida. Además, Braunstein *et al.* determinaron la toxicidad de los péptidos, no obteniendo mortalidad con 3 mg/kg, un 20% de mortalidad con 6 mg/kg y un 80% de exitus con 9 mg/kg al día. La toxicidad de nuestros CAMs fue menor, alcanzando una dosis máxima tolerada (100% de supervivencia) con 16 mg/kg del péptido CA(1-7)M(5-9), y con 32 mg/kg de los demás.

Es necesario tener en cuenta que en nuestro modelo de infección, además de que, como ya hemos comentado, está producido por una cepa panresistente y se

administra el tratamiento 4 horas después de la inoculación, los péptidos utilizados están compuestos exclusivamente por aminoácidos proteínogénicos para reducir los costes de la síntesis [447]. Existen estrategias para incrementar la resistencia proteolítica de los EAPs, tales como la inclusión de aminoácidos dextrógiros o modificados artificialmente, desarrollar moléculas cíclicas, introducir enlaces o grupos protectores, o disminuir el tamaño [448, 449]. Todas ellas requieren un encarecimiento de la producción de la molécula, pero como hemos visto en nuestro ensayo *in vitro* con los dos enantiómeros del CA(1-8)M(1-18), y en el trabajo de Braunstein *et al.* [357] donde solamente el análogo D- y no el L- fue eficaz *in vivo* frente a la cepa resistente, estas modificaciones pueden hacer que las vidas media de estas moléculas en presencia de suero se vean favorecidas. Además, recientemente ha sido publicado por Fernández-Reyes *et al.* que una modificación consistente en la trimetilación de residuos de lisina en un CAM, aunque tienden a disminuir el potencial bactericida, hacen que estos análogos disminuyan de manera importante la hemólisis, a la vez que son más resistentes a la acción de las proteasas, por lo que aumenta considerablemente el índice terapéutico de la molécula [450].

En resumen, los CAMs usados en este trabajo, los cuáles poseen actividad bactericida *in vitro* frente a cepas panresistentes de *A. baumannii* [353], muestran una eficacia local y de corta duración en un modelo experimental de sepsis murina causada por una cepa de *A. baumannii* panresistente, con un efecto bacteriostático en la concentración bacteriana del bazo. Además, estos péptidos poseen un efecto antiendotóxico *in vitro* bloqueando la producción de TNF- α en cultivos celulares eucarióticos. Sin embargo, su baja tolerabilidad y la incapacidad de alcanzar una dosis efectiva 50 en un modelo de sepsis, hacen que estos péptidos no sean útiles para una administración sistémica, aunque podrían ser considerados como opción para tratamientos vía tópica. Finalmente, es necesario introducir modificaciones estructurales para mejorar el índice terapéutico de estas moléculas, disminuyendo los parámetros de toxicidad y, sobretodo, para soslayar el principal hándicap de estos péptidos, que no es otro que disminuir su susceptibilidad a las proteasas séricas y así aumentar la estabilidad sistémica.

2. Estudios preclínicos de una nueva quinolona (UB-8902) frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a ciprofloxacino.

Las quinolonas han dejado de estar disponibles para el tratamiento de las infecciones producidas por *A. baumannii* debido al aumento de las resistencias en la mayoría de los hospitales. Por este motivo, se necesitan cambios estructurales en moléculas de esta familia de antibióticos que provoquen un aumento de su actividad bactericida. En los últimos años, el grupo del Dr. Jordi Vila ha estado trabajando en nuevas quinolonas que salven el principal mecanismo de resistencia de *A. baumannii* a las quinolonas, como son los cambios en GyrA y ParC. Así, han desarrollado un nuevo derivado del ciprofloxacino, el UB-8902, que presenta valores de CMI mejorados con respecto a su predecesor, y ha mostrado ser extremadamente activo frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii* comparado con ciprofloxacino [397].

En el presente trabajo, hemos determinado la actividad bactericida *in vitro* de esta nueva molécula mediante curvas de tiempo-muerte, mostrando que es tan efectiva como ciprofloxacino y moxifloxacino frente a cepas de *A. baumannii* sensibles y resistentes a ciprofloxacino. Resultados similares se han publicado con ciprofloxacino y moxifloxacino frente a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a ciprofloxacino [451], pero con la diferencia de que moxifloxacino mostró mejor actividad alcanzando actividad bactericida a 4xCMI, mientras que en nuestro trabajo se mostró bacteriostático con un posterior recrecimiento a partir de las 8 horas.

Tras los estudios *in vitro*, se comenzaron los experimentos *in vivo* para investigar la toxicidad de la nueva fluoroquinolona, alcanzándose una dosis letal (DL_{100}) a la concentración de 2048 mg/kg para UB-8902. La dosis máxima tolerada (DL_0) de UB-8902 fue de 512 mg/kg, demostrando la alta tolerabilidad de este compuesto. Se observaron efectos adversos tales como sedación, espasmos y descoordinación de movimientos, a partir de la dosis de 128 mg/kg. Efectos adversos similares fueron reportados para el moxifloxacino por vía oral comenzando a 30 mg/kg [452], y con una DL_{50} de 435-758 mg/kg [453], menor que la DL_{50} de UB-8902. Estos datos sugieren que esta nueva quinolona presenta un perfil de seguridad experimental comparable e incluso mejorando al de otras fluoroquinolonas.

En un primer paso para determinar la actividad *in vivo* de la nueva quinolona, se llevó a cabo un modelo murino no discriminativo de sepsis peritoneal. En este

modelo letal, frente a cepas sensible y resistentes a ciprofloxacino, encontramos dosis efectiva 50 (DE_{50}) con UB-8902 a dosis mucho menores que las dosis tóxicas de la molécula. En otros trabajos han encontrado bajas DE_{50} con quinolonas de nueva generación [454, 455], pero estos autores usaron cepas sensibles a ciprofloxacino y administraron el tratamiento al mismo tiempo que la infección, o bien administraron varias dosis, al contrario que en el diseño de nuestro experimento, donde se administra una única dosis del fármaco 4 horas después de la inoculación, una vez que la infección está establecida. Además, cuando otros autores usaron cepas resistentes, el tratamiento comenzó a la vez que la infección y fueron administradas varias dosis [456]. Esta eficacia reduciendo la mortalidad en el modelo no discriminativo, nos permitía seguir evaluando la efectividad en un modelo discriminativo de neumonía.

Previamente al modelo de neumonía, era necesario determinar el comportamiento farmacocinético de la molécula. Estos estudios farmacocinéticos mostraron similares valores de AUC y C_{max} para moxifloxacino y UB-8902, siendo ambos menores que los obtenidos con ciprofloxacino. Sin embargo, respecto a los parámetros farmacodinámicos, UB-8902 y moxifloxacino toman ventaja respecto a ciprofloxacino debido a sus menores CMI frente a las cepas de *A. baumannii* usadas, prediciendo un mayor éxito *in vivo* si se sigue el mismo régimen de dosis, ya que el AUC/CMI es el parámetro que mejor predice el éxito terapéutico en las quinolonas [457, 458].

En el modelo de neumonía frente a la cepa sensible a ciprofloxacino, las tres quinolonas mostraron eficacia con respecto a la reducción de la concentración bacteriana en pulmón, sin diferencias significativas entre ellas. Esta eficacia también se demostró en la esterilización de hemocultivos. Sin embargo, cuando se midió la mortalidad, la nueva quinolona mostró una disminución de la tasa de mortalidad que no fue estadísticamente significativa. Estos resultados similares *in vivo* de ciprofloxacino comparado con moxifloxacino, están en consonancia con el AUC_{0-24h}/CMI iguales o mayores de 100 con los tres fármacos. Por otro lado, cuando utilizamos la cepa resistente a ciprofloxacino, el tratamiento con ciprofloxacino no disminuyó la concentración bacteriana en pulmón, siendo UB-8902 y moxifloxacino los tratamientos más eficaces. Es de reseñar que la eficacia alcanzada para esta cepa fue con valores de $AUC_{0-24\text{ hrs}}/CMI$ para UB-8902 y moxifloxacino de 19,65 y 14,19 respectivamente, mucho menores que el valor recomendado de 100, como ya habíamos demostrado

previamente en nuestro grupo [459]. La mayor eficacia de la UB-8902 con esta cepa en el modelo de neumonía podría ser atribuida a su buena actividad bactericida *in vitro*, pero realmente puede ser explicada por su perfil farmacocinético junto a sus menores valores de CMI, conduciendo a unos parámetros farmacodinámicos excelentes. Resultados similares han sido mostrados con otras quinolonas de nueva generación en modelos de neumonía por neumococos, aunque algunas moléculas necesitaron dosis mucho más altas para ser eficaces [460].

Resumiendo, el presente trabajo muestra a UB-8902, una nueva quinolona con actividad *in vitro* frente a cepas de *A. baumannii* sensibles y resistentes a ciprofloxacino, y tan bactericida como ciprofloxacino y moxifloxacino. Además, UB-8902 es eficaz en modelos murinos experimentales de sepsis peritoneal y neumonía, incluyendo los producidos por cepas resistentes a ciprofloxacino. Estos resultados apoyan el futuro desarrollo de esta molécula, para evaluar si puede representar una nueva alternativa terapéutica frente a infecciones por cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

3. Actividad *in vitro* y eficacia *in vivo* del ácido clavulánico frente a *Acinetobacter baumannii*.

De entre los inhibidores de betalactamasas, el sulbactam ha demostrado una buena eficacia tratando infecciones producidas por *A. baumannii*, tanto en neumonía experimental murina como en infecciones clínicas [125, 126, 298], pero se conoce relativamente poco sobre la actividad de otros inhibidores de betalactamasas como el tazobactam o el ácido clavulánico. Este último, posee actividad bactericida frente a *Neisseria* spp., *Chlamydia* spp., *Legionella pneumophila* y enterobacterias [461]. En un estudio *in vitro* con 68 aislados de *Acinetobacter* spp., el ácido clavulánico fue más activo que otros betalactámicos como ceftriaxona, cefotaxima y piperacilina, con CMI₅₀ y CMI₉₀ de 15,4 y 28,4 mg/l, respectivamente [402]. En dos estudios con 100 y 115 cepas de *Acinetobacter* spp., el 29% y el 40,9% de las cepas mostraron valores de CMI de clavulánico ≤ 8 mg/l, respectivamente, con CMI₅₀ de 32 y 16 mg/l [400, 401].

Con estos precedentes, en este trabajo hemos mostrado por primera vez que el ácido clavulánico es eficaz en el tratamiento de la neumonía experimental murina

producida por *A. baumannii*. Esta eficacia se produjo en términos de reducción de la concentración bacteriana en pulmón, esterilización de hemocultivos y mortalidad, siendo estos dos últimos efectos cepa-dependientes. Los resultados del tratamiento con ácido clavulánico fueron similares a los de imipenem, tratamiento estándar oro de las infecciones clínicas por *A. baumannii* susceptibles a carbapenems, el cual ha mostrado también eficacia en el tratamiento de la neumonía experimental murina por esta bacteria [142], aunque el ácido clavulánico fue ligeramente menos eficaz en términos de esterilización de los hemocultivos que imipenem con una de las cepas estudiadas.

En los experimentos de curvas de letalidad, se observó actividad bactericida con una de las cepas (Ab11) a concentración de 4xCMI, pero no con la otra cepa estudiada (Ab51). Para intentar explicar este resultado inesperado, medimos la concentración de ácido clavulánico en el medio de cultivo, donde se produjo una disminución significativa con la cepa Ab51, desde la concentración de 16 mg/l a 2,5 mg/l tras 24 horas de incubación a 4xCMI, disminución que no se observó con la Ab11. Este efecto puede ser debido a la hidrólisis o el secuestro producido por la AmpC, que conduce a una disminución del ácido clavulánico en el medio. De hecho, ha sido demostrado previamente que el clavulánico puede inhibir la AmpC de *A. baumannii*, lo que subraya la interacción de este inhibidor con la enzima AmpC naturalmente presente en este microorganismo [462].

Como ocurre con otros betalactámicos en bacilos gramnegativos, excepto en el caso del imipenem [463], hemos encontrado con el ácido clavulánico frente a las cepas estudiadas un mínimo o ausencia de efecto post-antibiótico. Estudios previos habían mostrado que la adición de ácido clavulánico a la amoxicilina producía un efecto post-antibiótico prolongado en cepas de *S. aureus* no productoras de betalactamasas, *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *E. coli* [464]. Sin embargo, otros autores no observaron ese aumento del efecto post-antibiótico de la amoxicilina con la adición de clavulánico [465], relacionando los resultados encontrados en el trabajo previo [464] con las altas concentraciones de ácido clavulánico usados, que posee actividad bactericida por sí mismo. No hemos encontrado efecto post-antibiótico con imipenem en las cepas de nuestro estudio a pesar de los resultados de otros autores [463].

Diferentes estudios *in vitro* con patógenos como *S. pneumoniae* [466, 467], *L. pneumophila* [468], *E. coli* [469] y *Acinetobacter* spp. [39] sugieren que el ácido clavulánico presenta afinidad por proteínas de unión a penicilinas (PBPs), aunque la actividad puede variar de manera importante dependiendo del microorganismo. Parece ser que un factor importante a tener en cuenta en la actividad del ácido clavulánico, especialmente cuando se combina con otros betalactámicos como amoxicilina o ticarcilina, es la interacción con el sistema inmune. En dos estudios de infección por *K. pneumoniae* en pacientes de trasplante renal [470] y en pacientes con hemodiálisis crónica [471], añadiendo 0,5x CMI de amoxicilina/clavulánico se restauró la actividad de los linfocitos polimorfonucleares (PMNs) hasta niveles similares a los de sujetos sanos. En concordancia con estos resultados, la asociación de amoxicilina/clavulánico dio lugar a una potenciación sinérgica de la actividad de los PMS frente a *S. pneumoniae*, de manera que la bacteria se volvió más sensible a la actividad microbicida de los fagocitos [466]. El uso de concentraciones subinhibitorias de amoxicilina/clavulánico puede incrementar la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-8 y la IL-1 β [472]. La interacción entre la amoxicilina/clavulánico y las células del sistema inmune parece clara, pero son necesarios estudios adicionales para determinar el papel del clavulánico en esta interacción.

Como ya hemos comentado, los modelos animales de infecciones son una herramienta útil para estudiar nuevos usos potenciales de antimicrobianos ya establecidos en la práctica clínica, y el ácido clavulánico no es una excepción. Por ejemplo, se observó una alta actividad *in vitro* del ácido clavulánico frente a *Chlamydia trachomatis* [473]. Posteriormente, se demostró que era eficaz en el tratamiento de la neumonía experimental murina causada por *C. trachomatis*, donde el ácido clavulánico tuvo efecto protector en el 75% de los animales, amoxicilina en un 90%, y la combinación de los dos en un 100% de los ratones [474]. En el tratamiento de la infección por *L. pneumophila* en ratas neutropénicas, el ácido clavulánico mostró gran eficacia, comparable a la del tratamiento estándar, eritromicina. La combinación amoxicilina/clavulánico no fue más efectiva, y la amoxicilina sólo fue inefectiva [475]; los resultados de este trabajo se correlacionan con los obtenidos *in vitro*, donde las CMIs de clavulánico fueron de 0,1 a 0,25 mg/l [468].

En nuestro modelo de neumonía murina, tanto el tratamiento con clavulánico como con imipenem fueron eficaces con respecto a la reducción bacteriana pulmonar,

en comparación con el grupo control no tratado, a la vez que incrementaron los hemocultivos estériles. No existieron diferencias significativas entre los dos tratamientos para estos parámetros, aunque en imipenem el porcentaje de hemocultivos negativos fue mayor y estadísticamente significativo con respecto al control que con clavulánico. El modelo no se diseñó más allá de las 24 h debido al alto número de dosis administradas en el animal necesarias para alcanzar una concentración sérica por encima de la CMI durante el 40% del intervalo entre dosis. A pesar de esto, el ácido clavulánico disminuyó la mortalidad en el modelo cuando se usó la cepa Ab51, cepa que produjo una tasa de mortalidad del 93,3% en el grupo control.

Existen pocos datos sobre la farmacocinética del ácido clavulánico en humanos. En el presente trabajo, la dosis de clavulánico se ajustó para obtener en el animal una C_{max} y una curva farmacocinética similar a la encontrada en humanos. Así, la C_{max} de ácido clavulánico después de una dosis de 200 mg en humanos es de 11,4 mg/l [476], y el valor alcanzado en ratones en nuestro trabajo fue de 13,38 mg/l. Por otro lado, la vida media en humanos es de 0,8 a 1 h [476], mucho mayor que la obtenida en nuestros experimentos, de 0,24 h, lo que es lo usual en animales pequeños. Además de esto, se ha demostrado que en la mucosa bronquial humana los niveles de ácido clavulánico son el 118% de los obtenidos en suero [477]. Estos datos sugieren que el ácido clavulánico puede ser usado en el tratamiento de infecciones pulmonares con cepas de *A. baumannii* con CMIs de clavulánico de 8 mg/l, como las usadas en nuestro trabajo, teniendo en cuenta que se obtuvo una C_{max} similar a la obtenida en humanos con la dosis de 200 mg, y que el tiempo del intervalo entre dosis puede ser el mismo que cuando el ácido clavulánico se usa como inhibidor de betalactamasas, ya que la vida media en humanos es mucho mayor que en ratones.

En resumen, en este estudio se sugiere que el ácido clavulánico es eficaz en el tratamiento de la neumonía experimental murina causada por *A. baumannii*, autorizando así futuros experimentos para evaluar su eficacia en cepas que muestren mayores CMIs para clavulánico. Estudios en humanos, como los llevados a cabo con sulbactam, serán necesarios para confirmar estos resultados.

VII. CONCLUSIONES

1. Los péptidos híbridos de cecropina A-melitina presentan una baja tolerancia, con dosis mínimas letales en ratones C57BL/6 de 16 mg/kg para el CA(1-7)M(5-9), y de 32 mg/kg para el resto.
2. Los péptidos híbridos de cecropina A-melitina no alcanzaron DE₅₀ con las dosis administradas por debajo de las dosis tóxicas, por lo que no se observó eficacia en un modelo no discriminativo de sepsis peritoneal murina producida por una cepa de *Acinetobacter baumannii* panresistente.
3. En un modelo discriminativo de sepsis peritoneal producida por una cepa panresistente de *Acinetobacter baumannii*, los péptidos híbridos de cecropina A-melitina mostraron actividad bactericida de corta duración a nivel local.
4. Los péptidos híbridos de cecropina A-melitina fueron incapaces de amortiguar el incremento de TNF- α tras la administración del tratamiento, contrariamente al efecto protector que se les ha demostrado poseer en cultivos celulares.
5. Es necesario introducir modificaciones estructurales en estas moléculas para mejorar su índice terapéutico, tanto disminuyendo su toxicidad como aumentando su estabilidad sistémica reduciendo su susceptibilidad a las proteasas séricas.
6. La nueva quinolona UB-8902 presenta similar actividad *in vitro* que moxifloxacino, y mejor que ciprofloxacino, frente a cepas sensibles y cepas resistentes a ciprofloxacino de *A. baumannii* que presentan una mutación en *gyrA*.
7. La actividad bactericida de UB-8902, en estudios de letalidad, fue similar a la de ciprofloxacino y moxifloxacino, siendo mejor que la de moxifloxacino para la cepa sensible a ciprofloxacino.
8. UB-8902 muestra una alta tolerancia en ratones C57BL/6, presentando unos parámetros de toxicidad mejores que los de moxifloxacino.
9. UB-8902 mostró eficacia en un modelo no discriminativo de sepsis peritoneal en ratón, alcanzando dosis efectiva 50 muy por debajo de la dosis tóxica, tanto frente a cepas sensibles como a cepas resistentes a ciprofloxacino.
10. Los parámetros farmacocinéticos de UB-8902 en ratón C57BL/6 fueron similares a los de moxifloxacino y menores que los de ciprofloxacino, si bien los parámetros farmacodinámicos de UB-8902 fueron óptimos, similares a los de moxifloxacino y mejorando notablemente los de ciprofloxacino.
11. En un modelo de neumonía murina producido por una cepa de *A. baumannii* sensible a ciprofloxacino, UB-8902 presentó eficacia en la reducción de la

- concentración bacteriana pulmonar y el porcentaje de hemocultivos positivos. Aun así, no mejoró los resultados obtenidos con las otras quinolonas, siendo incluso menos activa en la reducción de la mortalidad.
12. En un modelo de neumonía murina producido por una cepa de *A. baumannii* resistente a ciprofloxacino, UB-8902 presentó eficacia en la reducción de la concentración bacteriana pulmonar, el porcentaje de hemocultivos positivos y la mortalidad, mejorando los resultados obtenidos con el tratamiento con moxifloxacino, también eficaz, y con el tratamiento con ciprofloxacino, que no presentó eficacia.
 13. Los resultados obtenidos por la UB-8902 en las curvas de letalidad *in vitro*, así como la eficacia mostrada en modelos de sepsis peritoneal y neumonía murinas producidas por cepas sensibles y resistentes a ciprofloxacino, autorizan a continuar el desarrollo de esta molécula para evaluar si puede representar una nueva alternativa terapéutica frente a infecciones por *A. baumannii* multirresistentes.
 14. El ácido clavulánico presenta actividad bactericida en curvas de letalidad frente a una de las cepas estudiadas, mientras que en la otra cepa se produce una disminución del ácido clavulánico en el medio debido a la alta afinidad de la AmpC por el ácido clavulánico, por lo que no se obtuvo actividad bactericida.
 15. En los estudios farmacocinéticos el ácido clavulánico presentó una buena distribución sistémica, alcanzando en ratón C57BL/6, con una dosis de 13 mg/kg, *C_{max}* y AUC similares a los alcanzados en humanos con la dosis de 200 mg, además de presentar una vida media en el animal similar a la del imipenem.
 16. El tratamiento con ácido clavulánico para la neumonía experimental murina causada por *A. baumannii* fue eficaz, disminuyendo la mortalidad, los hemocultivos positivos y la concentración bacteriana en pulmón, presentando una eficacia similar al tratamiento con imipenem.
 17. Son necesarios futuros experimentos para evaluar su eficacia en cepas que muestren mayores CMIs para clavulánico, así como estudios en humanos para probar si los resultados son similares a los obtenidos con otro inhibidor de betalactamasas, como el sulbactam.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* Species. En: Mandell, GL, Bennett JE, Dolin R editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000, p 2339-2344.
2. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, et al. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. Nucleic Acids Res 2004;32:5766-79
3. Bord Gd. Description of *Mimaeae* Trib. Npv. with three genera and three species and two new species of *Neisseria* from conjunctivitis and vaginitis. Iowa State College J Sci 1942;16:471-480
4. Cowan S. Unusual infections following cerebral operations: With a description of *Diplococcus mucosus* (von Lingelsheim). Lancet 1938;2:1052-1054
5. J Brisou A-RP. Etudes de systématique bactérienne: Revision des espèces réuines dans le genre *Achromobacter*. Ann Inst Pasteur 1954;86:722-728
6. Juni E. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. J Bacteriol 1972;112:917-31
7. Henriksen SD. *Moraxella*, *neisseria*, *branhamella*, and *acinetobacter*. Annu Rev Microbiol 1976;30:63-83
8. Jantzen E, Bryn K, Bergan T and Bovre K. Gas chromatography of bacterial whole cell methanolysates. VII. Fatty acid composition of *Acinetobacter* in relation to the taxonomy of Neisseriaceae. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl 1975;83:569-80
9. Hansen W, Schoutens E and Yourassowsky E. Taxonomy of *Acinetobacter*: the usefulness of beta-D-xyloside xylohydrolase for strain differentiation. J Clin Pathol 1977;30:838-41
10. Rho EM, Evans WC. The aerobic metabolism of cyclohexanecarboxylic acid by *Acinetobacter anitratum*. Biochem J 1975;148:11-5
11. Pagel JE, Seyfried PL. Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. J Gen Microbiol 1976;96:220-32
12. Das BC, Ayliffe G. Serotyping of *Acinetobacter calcoaceticus*. J Clin Pathol 1984;37:1388-91
13. Traub WH. *Acinetobacter baumannii* serotyping for delineation of outbreaks of nosocomial cross-infection. J Clin Microbiol 1989;27:2713-6
14. Alexander M, Ismail F, Jackman PJ and Noble WC. Fingerprinting *Acinetobacter* strains from clinical sources by numerical analysis of electrophoretic protein patterns. J Med Microbiol 1984;18:55-64

15. Thorne KJ, Thornley MJ, Naisbitt P and Glauert AM. The nature of the attachment of a regularly arranged surface protein to the outer membrane of an *Acinetobacter* sp. *Biochim Biophys Acta* 1975;389:97-116
16. Dijkshoorn L, Michel MF and Degener JE. Cell envelope protein profiles of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated in hospitals. *J Med Microbiol* 1987;23:313-9
17. Bouvet PJ, Jeanjean S, Vieu JF and Dijkshoorn L. Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J Clin Microbiol* 1990;28:170-6
18. Ackermann HW, Brochu G and Emadi Konjin HP. Classification of *Acinetobacter* phages. *Arch Virol* 1994;135:345-54
19. Garcia DC, Nociari MM, Sordelli DO, Di Martino A and Catalano M. The use of plasmid profile analysis and ribotyping for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Hosp Infect* 1996;34:139-44
20. Sire JM, Gras-Rouzet S, Pouedras P, et al. Biotyping, ribotyping and esterase electrophoresis as epidemiological tools for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 1994;145:27-35
21. Vila J, Marcos A, Llovet T, Coll P and Jimenez de Anta T. A comparative study of ribotyping and arbitrarily primed polymerase chain reaction for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii* infection. *J Med Microbiol* 1994;41:244-9
22. Biendo M, Laurans G, Lefebvre JF, Daoudi F and Eb F. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using a combination of antibiotyping and ribotyping. *J Clin Microbiol* 1999;37:2170-5
23. Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH and Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2522-9
24. Enright MC, Carter PE, MacLean IA and McKenzie H. Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:387-91

25. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996;34:1519-25
26. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, et al. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1179-87
27. Sheehan C, Boissel L, Lynch M, Cryan B and Fanning S. DNA amplification fingerprinting (DAF) applied to the investigation of *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *Ir J Med Sci* 1996;165:44-8
28. Sheehan C, Lynch M, Cullen C, Cryan B, Greer P and Fanning S. Genomic fingerprinting *Acinetobacter baumannii*: amplification of multiple inter-repetitive extragenic palindromic sequences. *J Hosp Infect* 1995;31:33-40
29. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989;97:595-605
30. Bouvet PJ GP. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter hemolyticus* sp. Nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:228-240
31. Peleg AY, Seifert H and Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538-82
32. Nemeč A, Musilek M, Sedo O, et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:896-903
33. Nemeč A, Musilek M, Maixnerova M, et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:118-24
34. Bacterial Nomenclature Up-to-Date. Available at http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=ACINETOBACTER. Accessed 25 August, 2010.
35. Carr EL, Kampfer P, Patel BK, Gurtler V and Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:953-63
36. Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1563-7

37. Y Nishimura TI, and H. Iizuka. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil Int. J. Syst. Bacteriol. 1988;38:209-211
38. Nemeč A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ and Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:1891-9
39. Kim D, Baik KS, Kim MS, et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. J Microbiol 2008;46:396-401
40. Vaneechoutte M, Tjernberg I, Baldi F, et al. Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as '*Acinetobacter venetianus* sp. nov.' belong to the same genomic species. Res Microbiol 1999;150:69-73
41. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol 1989;140:291-9
42. Gerner-Smidt P, Tjernberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. APMIS 1993;101:826-32
43. Ibrahim A, Gerner-Smidt P and Liesack W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1997;47:837-41
44. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol 1987;138:569-78
45. Gerner-Smidt P, Tjernberg I and Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 1991;29:277-82
46. Schreckenberger, P., M. Daneshvar, R. Weyant, and D. Hollis. 2003. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods., p. 749-779. In P. Murray, E. Baron, J. Jorgensen, M. Pfaller, and R. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, DC.
47. Richet H, Fournier PE. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:645-6
48. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis 2006;42:692-9
49. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996;9:148-65
50. Castellanos Martinez E, Telenti Asensio M, Rodriguez Blanco VM, Rodriguez Suarez ML, Morena Torrico A and Cortina Llosa A. Infective endocarditis of an interventricular patch caused by *Acinetobacter haemolyticus*. Infection 1995;23:243-5

51. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G and Schelotto F. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. J Clin Microbiol 2006;44:3838-41
52. Boo TW, Walsh F and Crowley B. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. J Med Microbiol 2009;58:209-16
53. Horrevorts A, Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I and Dijkshoorn L. Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 1995;33:1567-72
54. Idzenga D, Schouten MA and van Zanten AR. Outbreak of *Acinetobacter* genomic species 3 in a Dutch intensive care unit. J Hosp Infect 2006;63:485-7
55. Bernards AT, de Beaufort AJ, Dijkshoorn L and van Boven CP. Outbreak of septicaemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. J Hosp Infect 1997;35:129-40
56. de Beaufort AJ, Bernards AT, Dijkshoorn L and van Boven CP. *Acinetobacter junii* causes life-threatening sepsis in preterm infants. Acta Paediatr 1999;88:772-5
57. Kappstein I, Grundmann H, Hauer T and Niemeyer C. Aerators as a reservoir of *Acinetobacter junii*: an outbreak of bacteraemia in paediatric oncology patients. J Hosp Infect 2000;44:27-30
58. Borrás M, Moreno S, García M, Martín ML, Manonelle A and Fernández E. *Acinetobacter junii* causes refractory peritonitis in a patient on automated peritoneal dialysis. Perit Dial Int 2007;27:101-2
59. Seifert H, Strate A, Schulze A and Pulverer G. Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): report of 13 cases. Clin Infect Dis 1993;17:632-6
60. Dijkshoorn L, van Dalen R, van Ooyen A, et al. Endemic *Acinetobacter* in intensive care units: epidemiology and clinical impact. J Clin Pathol 1993;46:533-6
61. Gerner-Smidt P, Frederiksen W. *Acinetobacter* in Denmark: I. Taxonomy, antibiotic susceptibility, and pathogenicity of 112 clinical strains. APMIS 1993;101:815-25
62. van Dessel H, Kamp-Hopmans TE, Fluit AC, et al. Outbreak of a susceptible strain of *Acinetobacter* species 13 (sensu Tjernberg and Ursing) in an adult neurosurgical intensive care unit. J Hosp Infect 2002;51:89-95

63. McDonald A, Amyes SG and Paton R. The persistence and clonal spread of a single strain of *Acinetobacter* 13TU in a large Scottish teaching hospital. *J Chemother* 1999;11:338-44
64. Crawford PM, Jr., Conway MD and Peyman GA. Trauma-induced *Acinetobacter lwoffii* endophthalmitis with multi-organism recurrence: strategies with intravitreal treatment. *Eye (Lond)* 1997;11 (Pt 6):863-4
65. Said R, Krumlovsky FA and del Greco F. Symptomatic *Acinetobacter calcoaceticus* peritonitis. "A complication of peritoneal dialysis". *J Dial* 1980;4:101-7
66. Serrano MI, Solera J, Martinez E and Saez L. [Community-acquired meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii* in a healthy host]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11:396-7
67. Valero C, Farinas MC, Garcia Palomo D, Mazarrasa JC and Gonzalez Macias J. Endocarditis due to *Acinetobacter lwoffii* on native mitral valve. *Int J Cardiol* 1999;69:97-9
68. Starakis I, Blikas A, Siagris D, Marangos M, Karatza C and Bassaris H. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter lwoffii*: a case report and review. *Cardiol Rev* 2006;14:45-9
69. Turton JF, Shah J, Ozongwu C and Pike R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol* 2010;48:1445-9
70. Towner K. The genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes* 2006;6:746-758
71. Weaver RE, Actis LA. Identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1994;32:1833
72. Holton J. A note on the preparation and use of a selective differential medium for the isolation of *Acinetobacter* spp. from clinical sources. *J Appl Bacteriol* 1983;54:141-2
73. Guardabassi L, Dalsgaard A and Olsen JE. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J Appl Microbiol* 1999;87:659-67
74. Gennari M, Lombardi P. Comparative characterization of *Acinetobacter* strains isolated from different foods and clinical sources. *Zentralbl Bakteriol* 1993;279:553-64
75. Bernards AT, van der Toorn J, van Boven CP and Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:303-8

76. Shakespeare AP, Megson GM, Jones PA, Drucker DB, Keaney MG and Ganguli LA. Evaluation of Mast-ID 15 system for identification of fresh clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter*. *J Clin Pathol* 1992;45:168-70
77. Dijkshoorn L, Aucken HM, Gerner-Smidt P, Kaufmann ME, Ursing J and Pitt TL. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* 1993;31:702-5
78. Traub WH, Spohr M. Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter* species (*A. baumannii*, *A. haemolyticus*, genospecies 3, and genospecies 6). *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1617-9
79. Kampfer P, Tjernberg I and Ursing J. Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J Appl Bacteriol* 1993;75:259-68
80. Pantophlet R, Brade L, Dijkshoorn L and Brade H. Specificity of rabbit antisera against lipopolysaccharide of *Acinetobacter*. *J Clin Microbiol* 1998;36:1245-50
81. Pantophlet R, Brade L and Brade H. Identification of *Acinetobacter baumannii* strains with monoclonal antibodies against the O antigens of their lipopolysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:323-9
82. Bouvet PJ, Jeanjean S. Differentiation of *Acinetobacter calcoaceticus* sensu stricto from related *Acinetobacter* species by electrophoretic polymorphism of malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and catalase. *Res Microbiol* 1995;146:773-85
83. Picard B, Gouillet P. Epidemiological typing of *Acinetobacter* strains by esterase electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 1990;60:229-34
84. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, Wood CA and Hamill RJ. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1994;32:2635-40
85. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 1992;30:2680-5
86. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1402-7
87. Garcia-Arata MI, Gerner-Smidt P, Baquero F and Ibrahim A. PCR-amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res Microbiol* 1997;148:777-84

88. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995;33:11-5
89. Dijkshoorn L, Van Harselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ and Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol* 1998;21:33-9
90. Janssen P, Coopman R, Huys G, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 1996;142 (Pt 7):1881-93
91. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R and Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1992;30:1588-91
92. Graser Y, Klare I, Halle E, et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1993;31:2417-20
93. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, Serruys E, Quint WG and van Belkum A. Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J Hosp Infect* 1993;25:15-32
94. Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C and Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* 1994;32:2677-81
95. Wiedmann-al-Ahmad M, Tichy HV and Schon G. Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:4066-71
96. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I and Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 1997;35:2819-25
97. Lin YC, Sheng WH, Chang SC, et al. Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter* spp. with distinct antimicrobial susceptibilities. *J Clin Microbiol* 2008;46:612-7
98. Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol Rev* 1973;37:522-61

-
99. Andersson AM, Weiss N, Rainey F and Salkinoja-Salonen MS. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J Appl Microbiol* 1999;86:622-34
100. Thornley MJ. A taxonomic study of *Acinetobacter* and related genera. *J Gen Microbiol* 1967;49:211-57
101. Allen KD, Green HT. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect* 1987;9:110-9
102. Getchell-White SI, Donowitz LG and Groschel DH. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989;10:402-7
103. Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 1991;19:191-200
104. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM and Hawkey PM. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996;34:2881-7
105. Musa EK, Desai N and Casewell MW. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J Hosp Infect* 1990;15:219-27
106. Wendt C, Dietze B, Dietz E and Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997;35:1394-7
107. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann Pharmacother* 2004;38:1449-59
108. Obana Y, Nishino T and Tanino T. In-vitro and in-vivo activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1985;15:441-8
109. Larson E. A decade of nosocomial *Acinetobacter*. *Am J Infect Control* 1984;12:14-8
110. Garcia I, Fainstein V, LeBlanc B and Bodey GP. *In vitro* activities of new beta-lactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;24:297-9
111. Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML. An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1985;16:535-8
112. French GL, Casewell MW, Roncoroni AJ, Knight S and Phillips I. A hospital outbreak of antibiotic-resistant *Acinetobacter anitratus*: epidemiology and control. *J Hosp Infect* 1980;1:125-31

113. Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E and Vieu JF. A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *J Hosp Infect* 1990;16:49-58
114. Goldstein FW, Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Carlier C, Collatz E and Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid* 1983;10:138-47
115. Devaud M, Kayser FH and Bachi B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:323-9
116. Carlquist JF, Conti M and Burke JP. Progressive resistance in a single strain of *Acinetobacter calcoaceticus* recovered during a nosocomial outbreak. *Am J Infect Control* 1982;10:43-8
117. Buisson Y, Tran Van Nhieu G, Ginot L, et al. Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation with amikacin usage. *J Hosp Infect* 1990;15:83-93
118. Da Silva GJ, Leitao GJ and Peixe L. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:2109-10
119. Echeverria MJ, Lopez de Goicoechea MJ, Ayarza R, et al. *In vitro* activity of 9 antibiotics and 3 beta-lactamase inhibitors against 107 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15:319-22
120. Go ES, Urban C, Burns J, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* 1994;344:1329-32
121. Lopez-Hernandez S, Alarcon T and Lopez-Brea M. Carbapenem resistance mediated by beta-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:282-5
122. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB and Waites KB. Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:881-5
123. Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunoda M and Iyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* 2000;38:526-9

124. Vila J, Ruiz J, Navia M, et al. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999;37:758-61
125. Corbella X, Ariza J, Ardanuy C, et al. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:793-802
126. Jimenez-Mejias ME, Pachon J, Becerril B, Palomino-Nicas J, Rodriguez-Cobacho A and Revuelta M. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin Infect Dis* 1997;24:932-5
127. Pandey A, Kapil A, Sood S, Goel V, Das B and Seth P. *In vitro* activities of ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3415-6
128. Bello H, Dominguez M, Gonzalez G, et al. *In vitro* activities of ampicillin, sulbactam and a combination of ampicillin and sulbactam against isolates of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated in Chile between 1990 and 1998. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:712-3
129. Levin AS, Barone AA, Penco J, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999;28:1008-11
130. Fernandez-Viladrich P, Corbella X, Corral L, Tubau F and Mateu A. Successful treatment of ventriculitis due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with intraventricular colistin sulfomethate sodium. *Clin Infect Dis* 1999;28:916-7
131. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H and Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000;31:101-6
132. Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002;8:827-32
133. Naas T, Namdari F, Reglier-Poupet H, Poyart C and Nordmann P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1174-6

134. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:257-63
135. Xiao SC, Zhu SH, Xia ZF, Ma B and Cheng DS. Successful treatment of a critical burn patient with obstinate hyperglycemia and septic shock from pan-drug-resistant strains. *Med Sci Monit* 2009;15:CS163-5
136. Lin GM, Lin JC, Chen PJ, Siu LK, Huang LY and Chang FY. Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia following endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Am J Gastroenterol* 2008;103:498-9
137. Cisneros JM, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: a nosocomial pathogen difficult to control. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:221-3
138. Dijkshoorn L, Nemec A and Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:939-51
139. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:219-26
140. Pedersen MM, Marso E and Pickett MJ. Nonfermentative bacilli associated with man. 3. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am J Clin Pathol* 1970;54:178-92
141. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:868-73
142. Rodriguez-Hernandez MJ, Pachon J, Pichardo C, et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:493-501
143. Avril JL, Mesnard R. Factors influencing the virulence of *Acinetobacter*. En Towner KJ, Bergogne-Bérézin, Fewson CA editores. *The biology of Acinetobacter*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1991, p 77-82.
144. Poh CL, Loh GK. Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Med Microbiol Immunol* 1985;174:29-33
145. Kaplan N, Rosenberg E, Jann B and Jann K. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Eur J Biochem* 1985;152:453-8
146. Rosenberg E, Kaplan N, Pines M, Rosenberg M, Gutnick D. Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol Lett* 1983; 17:157-160.
147. Rosenberg M, et al. Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *A. calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:929-37

148. Pines O, Gutnick D. Alternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. FEMS Microbiol Lett 1984; 22:307-311.
149. Simoes LC, Simoes M and Vieira MJ. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol 2007;73:6192-200
150. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8:881-90
151. Y. Smani, F. Fernández-Cuenca, F. Docobo-Pérez, M.C. Gómez-Sánchez, J. Domínguez-Herrera, F. Caballero, J. Pachón, A. Pascual. Attenuated virulence of a pan-drug resistant clone of *Acinetobacter baumannii* (PDRAb) is associated with decreased expression of the outer membrane proteins (OMPs) CarO and OprD-like. In: 8th International Symposium on the Biology of Acinetobacter. Rome, Italy, 2010
152. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. Cell Microbiol 2008;10:309-19
153. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI and Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC Microbiol 2008;8:216
154. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. J Hosp Infect 2006;64:7-15
155. Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Monterrubio-Villar J and Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. Crit Care Med 1999;27:1794-9
156. Martinez-Pellus A, Ruiz Gomez J, Jaime Sanchez F, Simarro Cordoba E and Fernandez Lozano JA. Incidence of colonization and infection by *Acinetobacter baumannii* in an endemic setting (ICU). Analysis of risk factors by means of a surveillance study. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20:194-9
157. Cunha BA, Klimek JJ, Gracewski J, McLaughlin JC and Quintiliani R. A common source outbreak of *Acinetobacter* pulmonary infections traced to Wright respirometers. Postgrad Med J 1980;56:169-72
158. Reyes MP, Ganguly S, Fowler M, et al. Pyrogenic reactions after inadvertent infusion of endotoxin during cardiac catheterizations. Ann Intern Med 1980;93:32-5
159. Alfa MJ, Sitter DL. In-hospital evaluation of contamination of duodenoscopes: a quantitative assessment of the effect of drying. J Hosp Infect 1991;19:89-98

160. Abrutyn E, Goodhart GL, Roos K, Anderson R and Buxton A. *Acinetobacter calcoaceticus* outbreak associated with peritoneal dialysis. Am J Epidemiol 1978;107:328-35
161. Patterson JE, Vecchio J, Pantelick EL, et al. Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit. Am J Med 1991;91:479-83
162. Lowes JA, Smith J, Tabaqchali S and Shaw EJ. Outbreak of infection in a urological ward. Br Med J 1980;280:722
163. Kelkar R, Gordon SM, Giri N, et al. Epidemic iatrogenic *Acinetobacter* spp. meningitis following administration of intrathecal methotrexate. J Hosp Infect 1989;14:233-43
164. Harvey K, Schuck S. *Acinetobacter* septicaemia following prolonged intravenous therapy. Med J Aust 1977;2:121-4
165. Weernink A, Severin WP, Tjernberg I and Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. J Hosp Infect 1995;29:189-99
166. Snyderman DR, Maloy MF, Brock SM, Lyons RW and Rubin SJ. Pseudobacteremia: false-positive blood cultures from mist tent contamination. Am J Epidemiol 1977;106:154-9
167. Billing E. Studies on a soap tolerant organism: a new variety of *Bacterium anitratum*. J Gen Microbiol 1955;13:252-60
168. Rosenthal SL. Sources of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species found in human culture materials. Am J Clin Pathol 1974;62:807-11
169. Somerville DA, Noble WC. A note on the gram negative bacilli of human skin. Rev Eur Etud Clin Biol 1970;15:669-71
170. Al-Khoja MS, Darrell JH. The skin as the source of *Acinetobacter* and *Moraxella* species occurring in blood cultures. J Clin Pathol 1979;32:497-9
171. Berlau J, Aucken H, Malnick H and Pitt T. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:179-83
172. Glew RH, Moellering RC, Jr. and Kunz LJ. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): clinical and laboratory studies. Medicine (Baltimore) 1977;56:79-97
173. Rosenthal S, Tager IB. Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. Ann Intern Med 1975;83:355-7

174. Baltimore RS, Duncan RL, Shapiro ED and Edberg SC. Epidemiology of pharyngeal colonization of infants with aerobic gram-negative rod bacteria. *J Clin Microbiol* 1989;27:91-5
175. Gerner-Smidt P. Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 1987;10:265-72
176. Peacock JE, Jr., Sorrell L, Sottile FD, Price LE and Rutala WA. Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988;9:302-8
177. Grehn M, von Graevenitz A. Search for *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus*: enrichment of fecal samples. *J Clin Microbiol* 1978;8:342-3
178. Rodriguez-Bano J, Pascual A, Galvez J, et al. *Acinetobacter baumannii* bacteremia: clinical and prognostic features. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:242-7
179. Wise KA, Tosolini FA. Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *J Hosp Infect* 1990;16:319-29
180. Sakata H, Fujita K, Maruyama S, Kakehashi H, Mori Y and Yoshioka H. *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. *J Hosp Infect* 1989;14:15-22
181. Smith PW, Massanari RM. Room humidifiers as the source of *Acinetobacter* infections. *JAMA* 1977;237:795-7
182. Vandembroucke-Grauls CM, Kerver AJ, Rommes JH, Jansen R, den Dekker C and Verhoef J. Endemic *Acinetobacter anitratus* in a surgical intensive care unit: mechanical ventilators as reservoir. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:485-9
183. Stone JW, Das BC. Investigation of an outbreak of infection with *Acinetobacter calcoaceticus* in a special care baby unit. *J Hosp Infect* 1986;7:42-8
184. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:837-43
185. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004;155:105-12

186. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. Clin Microbiol Infect 2002;8:687-93
187. Urban C, Segal-Maurer S and Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 2003;36:1268-74
188. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I and Kelesidis T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007;26:857-68
189. Ho PL, Cheng VC and Chu CM. Antibiotic resistance in community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. Chest 2009;136:1119-27
190. Ong CW, Lye DC, Khoo KL, et al. Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: an emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. Respirology 2009;14:1200-5
191. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF and Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest 2006;129:102-9
192. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2004;25:819-24
193. Martone WJ, Gaynes RP, Horan TC, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) semiannual report, May 1995. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Am J Infect Control 1995;23:377-85
194. Craven DE, Barber TW, Steger KA and Montecalvo MA. Nosocomial pneumonia in the 1990s: update of epidemiology and risk factors. Semin Respir Infect 1990;5:157-72
195. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005;41:848-54
196. Gomez J, Simarro E, Banos V, et al. Six-year prospective study of risk and prognostic factors in patients with nosocomial sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:358-61

197. Wu CL, Yang D, Wang NY, Kuo HT and Chen PZ. Quantitative culture of endotracheal aspirates in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia in patients with treatment failure. *Chest* 2002;122:662-8
198. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E and Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med* 2003;31:2478-82
199. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL and Gibert C. Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. *Clin Infect Dis* 1996;23:538-42
200. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:877-84
201. Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care* 2007;11:134
202. Falagas ME, Kopterides P and Siempos, II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. *Clin Infect Dis* 2006;43:389; author reply 389-90
203. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin Infect Dis* 1996;22:1026-32
204. Wisplinghoff H, Perbix W and Seifert H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clin Infect Dis* 1999;28:59-66
205. Tilley PA, Roberts FJ. Bacteremia with *Acinetobacter* species: risk factors and prognosis in different clinical settings. *Clin Infect Dis* 1994;18:896-900
206. Martin-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, et al. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2002;40:4571-5
207. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP and Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17

208. Hoffmann S, Mabeck CE and Vejlsgaard R. Bacteriuria caused by *Acinetobacter calcoaceticus* biovars in a normal population and in general practice. *J Clin Microbiol* 1982;16:443-51
209. Pedraza F, Andreu A, Saune M, Moreno A, Ramirez L and Garcia L. A urinary outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a spinal cord injury unit. *An Med Interna* 1993;10:55-8
210. Briggs S, Ellis-Pegler R, Raymond N, Thomas M and Wilkinson L. Gram-negative bacillary meningitis after cranial surgery or trauma in adults. *Scand J Infect Dis* 2004;36:165-73
211. Lu CH, Chang WN, Chuang YC and Chang HW. Gram-negative bacillary meningitis in adult post-neurosurgical patients. *Surg Neurol* 1999;52:438-43; discussion 443-4
212. Nguyen MH, Harris SP, Muder RR and Pasculle AW. Antibiotic-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients. *Neurosurgery* 1994;35:851-5; discussion 855
213. Palabiyikoglu I, Tekeli E, Cokca F, et al. Nosocomial meningitis in a university hospital between 1993 and 2002. *J Hosp Infect* 2006;62:94-7
214. Reindersma P, Nohlmans L and Korten JJ. *Acinetobacter*, an infrequent cause of community acquired bacterial meningitis. *Clin Neurol Neurosurg* 1993;95:71-3
215. Rodriguez Guardado A, Maradona JA, Asensi V, et al. Postsurgical meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*: study of 22 cases and review of the literature. *Rev Clin Esp* 2001;201:497-500
216. Gospodarek E, Krasnicki K, Ziolkowski G, Kasprzak H and Beuth W. Cerebrospinal meningitis with the presence of *Acinetobacter* spp. *Med Sci Monit* 2000;6:50-4
217. Metan G, Alp E, Aygen B and Sumerkan B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:197-9
218. Metan G, Alp E, Aygen B and Sumerkan B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:112-3
219. O'Neill E, Humphreys H, Phillips J and Smyth EG. Third-generation cephalosporin resistance among Gram-negative bacilli causing meningitis in neurosurgical patients:

- significant challenges in ensuring effective antibiotic therapy. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:356-9
220. Olut AI, Erkek E. Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand J Infect Dis* 2005;37:919-21
221. Rizos I, Tsiodras S, Papathanasiou S, Rigopoulos A, Barbetseas J and Stefanadis C. Prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter* spp: a rare case and literature review. *Am J Med Sci* 2007;333:197-9
222. Gradon JD, Chapnick EK and Lutwick LI. Infective endocarditis of a native valve due to *Acinetobacter*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:1145-8
223. Malik AS. *Acinetobacter* endocarditis in children: a case report and review of the literature. *Infection* 1995;23:306-8
224. Mallon PW, Millar BC, Moore JE, et al. Molecular identification of *Acinetobacter* sp. in a patient with culture-negative endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:277-8
225. Lye WC, Lee EJ and Ang KK. *Acinetobacter* peritonitis in patients on CAPD: characteristics and outcome. *Adv Perit Dial* 1991;7:176-9
226. Galvao C, Swartz R, Rocher L, Reynolds J, Starmann B and Wilson D. *Acinetobacter* peritonitis during chronic peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1989;14:101-4
227. Valdez JM, Asperilla MO and Smego RA, Jr. *Acinetobacter* peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *South Med J* 1991;84:607-10
228. Sarria JC, Angulo-Pernett F, Kimbrough RC, McVay CS and Vidal AM. Use of intravenous polymyxin B during continuous venovenous hemodialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:340-1
229. Tong MJ. Septic complications of war wounds. *JAMA* 1972;219:1044-7
230. Amsel MB, Horrilleno E. Synergistic necrotizing fasciitis: a case of polymicrobial infection with *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr Surg* 1985;42:370-2
231. Merayo E, Miguez E, de la Iglesia F, Llinares P and Echaniz A. Cellulitis from *Acinetobacter*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17:101-2
232. Keen EF, 3rd, Robinson BJ, Hospenthal DR, et al. Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns* 2010;36:819-25
233. Bang RL, Gang RK, Sanyal SC, Mokaddas E and Ebrahim MK. Burn septicaemia: an analysis of 79 patients. *Burns* 1998;24:354-61

234. Koller J, Boca R and Langsadt L. Changing pattern of infection in the Bratislava Burn Center. *Acta Chir Plast* 1999;41:112-6
235. Frame JD, Kangesu L and Malik WM. Changing flora in burn and trauma units: experience in the United Kingdom. *J Burn Care Rehabil* 1992;13:281-6
236. Revathi G, Puri J and Jain BK. Bacteriology of burns. *Burns* 1998;24:347-9
237. Scott P, Deye G, Srinivasan A, et al. 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* 2007;44:1577-84
238. Petersen K, Riddle MS, Danko JR, et al. Trauma-related infections in battlefield casualties from Iraq. *Ann Surg* 2007;245:803-11
239. Yun HC, Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Gouridine E and Dooley DP. Bacteria recovered from patients admitted to a deployed U.S. military hospital in Baghdad, Iraq. *Mil Med* 2006;171:821-5
240. Stuart TL, Mulvey M, Simor AE, et al. *Acinetobacter baumannii* in casualties returning from Afghanistan. *Can J Infect Control* 2007;22:152-4
241. Calhoun JH, Murray CK and Manring MM. Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:1356-62
242. Sacks-Berg A, Calubiran OV, Epstein HY and Cunha BA. Sepsis associated with transhepatic cholangiography. *J Hosp Infect* 1992;20:43-50
243. Nagler A, Pavel L, Naparstek E, Muggia-Sullam M and Slavin S. Typhlitis occurring in autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;9:63-4
244. Martin RW, Martin DL and Levy CS. *Acinetobacter* osteomyelitis from a hamster bite. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:364-5
245. Denis F, Chaumeil C, Goldschmidt P, et al. Microbiological efficacy of 3-day treatment with azithromycin 1.5% eye-drops for purulent bacterial conjunctivitis. *Eur J Ophthalmol* 2008;18:858-68
246. Corrigan KM, Harmis NY and Willcox MD. Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea* 2001;20:463-6
247. Chen KJ, Hou CH, Sun MH, Lai CC, Sun CC and Hsiao CH. Endophthalmitis caused by *Acinetobacter baumannii*: report of two cases. *J Clin Microbiol* 2008;46:1148-50
248. Mark DB, Gaynon MW. Trauma-induced endophthalmitis caused by *Acinetobacter anitratus*. *Br J Ophthalmol* 1983;67:124-6

249. Melki TS, Sramek SJ. Trauma-induced *Acinetobacter lwoffii* endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1992;113:598-9
250. Smego RA, Jr. Endemic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* bacteremia. Clinical significance, treatment, and prognosis. *Arch Intern Med* 1985;145:2174-9
251. Joly-Guillo ML, Vallee E, Bergogne-Berezin E and Philippon A. Distribution of beta-lactamases and phenotype analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:597-604
252. Seifert H, Baginski R, Schulze A and Pulverer G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:750-3
253. Urban C, Go E, Mariano N, et al. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratu*s. *J Infect Dis* 1993;167:448-51
254. Okpara AU, Maswoswe JJ. Emergence of multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Am J Hosp Pharm* 1994;51:2671-5
255. Seifert H, Strate A and Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 1995;74:340-9
256. Bou G, Oliver A and Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1556-61
257. Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ and Kislak JW. The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:565-7
258. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, et al. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 2003;53:97-102
259. Lee CM, Lim HK, Liu CP and Tseng HK. Treatment of pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scand J Infect Dis* 2005;37:195-9
260. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ* 1998;317:657-60
261. Ribera A, Vila J, Fernandez-Cuenca F, et al. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:364-5

262. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I and Vila J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:477-80
263. Vila J, Marti S and Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1210-5
264. Vila J, Pachon J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:587-99
265. McGowan JE, Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 2006;34:S29-37; discussion S64-73
266. Quale J, Bratu S, Landman D and Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003;37:214-20
267. Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G and Katcoff DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2003;47:434-43
268. Walzer G, Rosenberg E and Ron EZ. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environ Microbiol* 2006;8:1026-32
269. del Mar Tomas M, Beceiro A, Perez A, et al. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5172-5
270. Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:245-51
271. Mussi MA, Limansky AS and Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1432-40
272. Dupont M, Pages JM, Lafitte D, Siroy A and Bollet C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 2005;4:2386-90
273. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:219-26

274. Roca I, Marti S, Espinal P, Martinez P, Gibert I and Vila J. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4013-4
275. Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T and Courvalin P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:557-62
276. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P and Perichon B. Overexpression of Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeFGH confers Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4389-93
277. Srinivasan VB, Rajamohan G and Gebreyes WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5312-6
278. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN and Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471-84
279. Fluit AC, Visser MR and Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:836-71, table of contents
280. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:826-36
281. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:725-74
282. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:684-704
283. Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S and Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991;37:405-12
284. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ and Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:565-74
285. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P and Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2949-53

286. Galimand M, Lambert T and Courvalin P. Emergence and dissemination of a new mechanism of resistance to aminoglycosides in Gram-negative bacteria: 16S rRNA methylation. *Euro Surveill* 2005;10:E050127 2
287. Kim JW, Heo ST, Jin JS, et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying bla(OXA-23), bla(PER-1) and armA in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:716-8
288. Yu YS, Zhou H, Yang Q, Chen YG and Li LJ. Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to ArmA methylase in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:454-5
289. Karthikeyan K, Thirunarayan MA and Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2253-4
290. Ribera A, Ruiz J and Vila J. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2310-2
291. Vila J, Ruiz J, Goni P, Marcos A and Jimenez de Anta T. Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1201-3
292. Vila J, Ruiz J, Goni P and Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:757-62
293. Madurga S, Sanchez-Céspedes J, Belda I, Vila J and Giralt E. Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. *Chembiochem* 2008;9:2081-6
294. Wood GC, Hanes SD, Croce MA, Fabian TC and Boucher BA. Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002;34:1425-30
295. Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA and Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:58-62
296. Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, et al. [Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:267-71

297. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A and Georgiadis G. High-dose ampicillin-sulbactam as an alternative treatment of late-onset VAP from multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Scand J Infect Dis 2007;39:38-43
298. Rodriguez-Hernandez MJ, Cuberos L, Pichardo C, et al. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. J Antimicrob Chemother 2001;47:479-82
299. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A and Douzinas EE. Efficacy and safety of high-dose ampicillin/sulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. J Infect 2008;56:432-6
300. Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti R and Carbon C. *In vivo* efficacies of combinations of beta-lactams, beta-lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1406-11
301. Montero A, Ariza J, Corbella X, et al. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. J Antimicrob Chemother 2004;54:1085-91
302. Pachon-Ibanez ME, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, et al. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:1165-72
303. Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M, et al. Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. Int J Antimicrob Agents 2007;29:51-5
304. Pachon-Ibanez ME, Fernandez-Cuenca F, Docobo-Perez F, Pachon J and Pascual A. Prevention of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. J Antimicrob Chemother 2006;58:689-92
305. Saballs M, Pujol M, Tubau F, et al. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. J Antimicrob Chemother 2006;58:697-700

306. Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect* 2006;53:274-8
307. Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D and Franklin C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin Infect Dis* 2007;45:594-8
308. Bassetti M, Repetto E, Righi E, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:417-20
309. Petrosillo N, Chinello P, Proietti MF, et al. Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:682-3
310. Plachouras D, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kentepozidis N, Baziaka F, Karagianni V and Giamarellou H. *In vitro* postantibiotic effect of colistin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:419-22
311. Owen RJ, Li J, Nation RL and Spelman D. *In vitro* pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:473-7
312. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, et al. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis* 2003;36:1111-8
313. Kallel H, Hergafi L, Bahloul M, et al. Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. *Intensive Care Med* 2007;33:1162-7
314. Jimenez-Mejias ME, Pichardo-Guerrero C, Marquez-Rivas FJ, Martin-Lozano D, Prados T and Pachon J. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:212-4
315. Ng J, Gosbell IB, Kelly JA, Boyle MJ and Ferguson JK. Cure of multiresistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with intraventricular or intrathecal colistin: case series and literature review. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1078-81

316. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A and Mundy LM. Intrathecal colistin for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infection: a case series and systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:888-94
317. Cascio A, Conti A, Sinardi L, et al. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. *Int J Infect Dis* 2010;14:e572-9
318. De Pascale G, Pompucci A, Maviglia R, et al. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis with intrathecal and intravenous colistin. *Minerva Anesthesiol* 2010;76:957-60
319. Lin CC, Liu TC, Kuo CF, Liu CP and Lee CM. Aerosolized colistin for the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia: experience in a tertiary care hospital in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43:323-31
320. Falagas ME, Siempos II, Rafailidis PI, Korbila IP, Ioannidou E and Michalopoulos A. Inhaled colistin as monotherapy for multidrug-resistant gram (-) nosocomial pneumonia: a case series. *Respir Med* 2009;103:707-13
321. Rodriguez-Hernandez MJ, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Cuberos L, Garcia-Curiel A and Pachon J. Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:581-4
322. Montero A, Ariza J, Corbella X, et al. Efficacy of colistin versus beta-lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1946-52
323. Linden PK, Paterson DL. Parenteral and inhaled colistin for treatment of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2006;43 Suppl 2:S89-94
324. Santamaria C, Mykietiuk A, Temporiti E, Stryjewski ME, Herrera F and Bonvehi P. Nephrotoxicity associated with the use of intravenous colistin. *Scand J Infect Dis* 2009;41:767-9
325. Wahby K, Chopra T and Chandrasekar P. Intravenous and inhalational colistin-induced respiratory failure. *Clin Infect Dis* 2010;50:e38-40
326. Pachon-Ibanez ME, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC and Pachon J. Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4479-81

327. Halstead DC, Abid J and Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex and *Enterobacteriaceae* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *J Infect* 2007;55:49-57
328. Scheetz MH, Qi C, Warren JR, et al. *In vitro* activities of various antimicrobials alone and in combination with tigecycline against carbapenem-intermediate or -resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1621-6
329. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C and Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1018-29
330. Rodloff AC, Leclercq R, Debbia EA, Canton R, Oppenheim BA and Dowzicky MJ. Comparative analysis of antimicrobial susceptibility among organisms from France, Germany, Italy, Spain and the UK as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:307-14
331. Betriu C, Rodriguez-Avial I, Gomez M, et al. Antimicrobial activity of tigecycline against clinical isolates from Spanish medical centers. Second multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:437-44
332. Moland ES, Craft DW, Hong SG, et al. *In vitro* activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and selection of tigecycline-amikacin synergy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2940-2
333. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:128-31
334. Reid GE, Grim SA, Aldeza CA, Janda WM and Clark NM. Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy* 2007;27:1198-201
335. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:775-80
336. Schafer JJ, Goff DA, Stevenson KB and Mangino JE. Early experience with tigecycline for ventilator-associated pneumonia and bacteremia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pharmacotherapy* 2007;27:980-7
337. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I and Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:45-55

338. Vasilev K, Reshedko G, Orasan R, et al. A Phase 3, open-label, non-comparative study of tigecycline in the treatment of patients with selected serious infections due to resistant Gram-negative organisms including *Enterobacter* species, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2008;62 Suppl 1:i29-40
339. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. Clin Infect Dis 2010;51:79-84
340. Bernabeu-Wittel M, Pichardo C, Garcia-Curiel A, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the in-vivo efficacy of imipenem alone or in combination with amikacin for the treatment of experimental multiresistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. Clin Microbiol Infect 2005;11:319-25
341. Kuo LC, Lai CC, Liao CH, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. Clin Microbiol Infect 2007;13:196-8
342. Pachon-Ibanez ME, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, et al. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:1165-72
343. A. Gutiérrez-Pizarra, A. Martín-Peña, E. Jiménez-Mejías, P. Irarurgi Alcarazo, M.V. Gil Navarro, J. Pachón, J.M. Cisneros y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI). Efectividad y seguridad de nuevas asociaciones antibióticas con rifampicina en el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemes. XIV Congreso SEIMC. Póster 522. 19-22 mayo. Barcelona 2010
344. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, et al. Synergy Testing by Etest(R), Microdilution Checkerboard, and Time-kill Methods for Pan Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4678-83
345. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH and Bradford PA. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis. J Antimicrob Chemother 2006;57:573-6
346. Candel FJ, Calvo N, Head J, et al. A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. Rev Esp Quimioter 2010;23:103-108

347. Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, et al. Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:807-10
348. Ge Y, MacDonald DL, Holroyd KJ, Thornsberry C, Wexler H and Zasloff M. *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:782-8
349. Urban C, Mariano N, Rahal JJ, et al. Polymyxin B-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate Susceptible to Recombinant BPI and Cecropin P1. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:994-5
350. Saugar JM, Alarcon T, Lopez-Hernandez S, Lopez-Brea M, Andreu D and Rivas L. Activities of polymyxin B and cecropin A-melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:875-8
351. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, et al. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2003;24:1315-8
352. Saugar JM, Rodriguez-Hernandez MJ, de la Torre BG, et al. Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1251-6
353. Rodriguez-Hernandez MJ, Saugar J, Docobo-Perez F, et al. Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:95-100
354. Mangoni ML, Maisetta G, Di Luca M, et al. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:85-91
355. Maisetta G, Batoni G, Esin S, et al. *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:806-9
356. Conlon JM, Ahmed E, Pal T and Sonnevend A. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2010;31:1806-10

357. Braunstein A, Papo N and Shai Y. *In vitro* activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3127-9
358. Dijkshoorn L, Brouwer CP, Bogaards SJ, Nemec A, van den Broek PJ and Nibbering PH. The synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin, hLF(1-11), is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4919-21
359. Giacometti A, Ghiselli R, Cirioni O, et al. Therapeutic efficacy of the magainin analogue MSI-78 in different intra-abdominal sepsis rat models. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:654-60
360. Schafer JJ, Goff DA. Establishing the role of tigecycline in an era of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6:557-67
361. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D and Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:821-3
362. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006;71:910-8
363. Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT and Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:697-8
364. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:970-4
365. Stavri M, Piddock LJ and Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1247-60
366. Katz AH, Caufield CE. Structure-based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors. *Curr Pharm Des* 2003;9:857-66
367. Zawadzke LE, Norcia M, Desbonnet CR, Wang H, Freeman-Cook K and Dougherty TJ. Identification of an inhibitor of the MurC enzyme, which catalyzes an essential step in the peptidoglycan precursor synthesis pathway. *Assay Drug Dev Technol* 2008;6:95-103
368. Pachon J, Vila J. Treatment of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:150-6

369. Rivas L, Andreu D. [Eukaryotic antibiotic peptides: a new alternative in clinical practice?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:358-65
370. Jenssen H, Hamill P and Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:491-511
371. Kawasaki K. Outer membrane remodeling of *Salmonella typhimurium* and host innate immunity. *Yakugaku Zasshi* 2006;126:1227-34
372. Ernst RK, Guina T and Miller SI. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* 2001;3:1327-34
373. Sun S, Negrea A, Rhen M and Andersson DI. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2298-305
374. Moskowitz SM, Ernst RK and Miller SI. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol* 2004;186:575-9
375. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H and Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981;292:246-8
376. DeGrado WF, Musso GF, Lieber M, Kaiser ET and Kezdy FJ. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophys J* 1982;37:329-38
377. Blondelle SE, Simpkins LR, Perez-Paya E and Houghten RA. Influence of tryptophan residues on melittin's hemolytic activity. *Biochim Biophys Acta* 1993;1202:331-6
378. Boman HG, Wade D, Boman IA, Wahlin B and Merrifield RB. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett* 1989;259:103-6
379. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, et al. *In vitro* activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH(2) on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49:197-200
380. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 2000;46 Suppl T1:17-24
381. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 2003;51 Suppl 1:13-20

382. Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 1997;24 Suppl 1:S67-73
383. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:530-8
384. Wigley DB. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1995;24:185-208
385. Piddock LJ, Jin YF, Ricci V and Asuquo AE. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:61-70
386. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1109-17
387. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M and Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1271-2
388. Vila, J., J. Ruiz, and M. M. Navia. 1999. Molecular basis of quinolone resistance acquisition in Gram-negative bacteria. In *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3rd edn (Pandalai, S. G., Ed.), pp. 323–44. Trivandrum, India.
389. Ruiz J, Marco F, Goni P, et al. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:737-8
390. Vila J, Ruiz J, Marco F, et al. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2477-9
391. Ruiz J, Gomez J, Navia MM, et al. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:257-61
392. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM and Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1647-50
393. Ruiz J, Casellas S, Jimenez de Anta MT and Vila J. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:839-40

394. Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY, et al. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:175-9
395. Sorlozano A, Gutierrez J, Jimenez A, de Dios Luna J and Martinez JL. Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:2740-2
396. Jones ME, Sahm DF, Martin N, et al. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:462-6
397. Vila J, Sanchez-Cespedes J, Sierra JM, et al. Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:19-24
398. Ballesta S, Garcia I, Sanchez-Cespedez J, Vila J and Pascual A. Intracellular penetration and activity of UB-8902 in human polymorphonuclear leukocytes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:612-4
399. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:160-201
400. Beceiro A, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, et al. False extended-spectrum beta-lactamase detection in *Acinetobacter* spp. due to intrinsic susceptibility to clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:301-8
401. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D and Seifert H. *In vitro* activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1586-92
402. Suh B, Shapiro T, Jones R, Satishchandran V and Truant AL. *In vitro* activity of beta-lactamase inhibitors against clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:111-4
403. Beam TR, Jr., Gilbert DN and Kunin CM. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. *Clin Infect Dis* 1992;15 Suppl 1:S5-32

404. Zak O, Sande M, O'Reilly T. Introduction: The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. En Zak O, Sande MA editores. Handbook of Animal Models of Infection. London: Academic Press; 1999, p 21-23.
405. Miller AK. *In vivo* evaluation of antibacterial chemotherapeutic substances. Adv Appl Microbiol 1971;14:151-83
406. Barza M. A critique of animal models in antibiotic research. Scand J Infect Dis Suppl 1978:109-17
407. Zak O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. Experientia 1980;36:479-83
408. Frimodt-Moller N, Knudsen JD, Espersen F. The mouse peritonitis/sepsis model. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. London: Academic Press; 1986, p 127-137.
409. O'Reilly T, Cleeland R, Squires E. Evaluation of antimicrobials in experimental animal infection. En Lorian V, editor. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996, p 599-759.
410. Batson HC, Landy M and Brown M. Determination of differences in virulence of strains of *Salmonella typhosa*; a comparison of methods. J Exp Med 1950;91:219-29
411. Nungester WJ, Jourdonais LF. Mucin as an Aid in the Experimental Production of Lobar Pneumonia. J Infect Dis 1936; 59:258-265.
412. Pennington JE. Use of animals models to evaluate antimicrobial therapy for bacterial pneumonia. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. London: Academic Press; 1986, p 237-256.
413. Nishi T, Tsuchiya K. Therapeutic effects of cefotiam and cefazolin on experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice. Antimicrob Agents Chemother 1980;18:549-56
414. Fraser DW, Wachsmuth I, Bopp C, Feeley JC and Tsai TF. Antibiotic treatment of guinea-pigs infected with agent of Legionnaires' disease. Lancet 1978;1:175-8
415. Esposito AL, Pennington JE. Experimental pneumonia due to *Haemophilus influenzae*: observations on pathogenesis and treatment. J Infect Dis 1984;149:728-34
416. Esposito AL, Pennington JE. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. Am Rev Respir Dis 1983;128:662-7
417. Laurenzi GA, Berman L, First M and Kass EH. A Quantitative Study of the Deposition and Clearance of Bacteria in the Murine Lung. J Clin Invest 1964;43:759-68

418. Davis GS, Winn WC, Jr., Gump DW and Beaty HN. The kinetics of early inflammatory events during experimental pneumonia due to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. *J Infect Dis* 1983;148:823-35
419. Pennington JE, Stone RM. Comparison of antibiotic regimens for treatment of experimental pneumonia due to *Pseudomonas*. *J Infect Dis* 1979;140:881-9
420. Pennington JE, Johnson CE. Comparative activities of N-formimidoyl thienamycin, ticarcillin, and tobramycin against experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:406-8
421. Pennington JE, Johnson CE and Platt R. Third-generation cephalosporins in the treatment of pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in guinea pigs. *J Infect Dis* 1982;146:567
422. Obana Y. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. *Microbiol Immunol* 1986;30:645-57
423. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol* 1992;37:258-61
424. Harabe E, Kawai Y, Kanazawa K, Otsuki M and Nishino T. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of meropenem, a new carbapenem antibiotic. *Drugs Exp Clin Res* 1992;18:37-46
425. Tanaka M, Otsuki M and Nishino T. *In vitro* and *in vivo* activities of DQ-2556 and its mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2595-601
426. Obana Y, Nishino T. In-vitro and in-vivo activities of sulbactam and YTR830H against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:677-82
427. Joly-Guillou ML, Wolff M, Pocidalo JJ, Walker F and Carbon C. Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:345-51
428. Cuberos L, Rodríguez MJ, Pichardo C, Caballero FJ, Moreno I, Becerril B, *et al.* Efficacy of imipenem, sulbactam, colistin, and amikacin in experimental endocarditis caused by *Acinetobacter baumannii* with intermediate susceptibility to imipenem. 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, 1999.
429. Joly-Guillou ML, Wolff M, Farinotti R, Bryskier A and Carbon C. *In vivo* activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:827-30
430. Fetiye K, Karadenizli A, Okay E, *et al.* Comparison in a rat thigh abscess model of imipenem, meropenem and cefoperazone-sulbactam against *Acinetobacter baumannii*

- strains in terms of bactericidal efficacy and resistance selection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3:2
431. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:393-5
432. Song JY, Cheong HJ, Lee J, Sung AK and Kim WJ. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:33-9
433. Eveillard M, Soltner C, Kempf M, et al. The virulence variability of different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. *J Infect* 2010;60:154-61
434. Crane DP, Gromov K, Li D, et al. Efficacy of colistin-impregnated beads to prevent multidrug-resistant *A. baumannii* implant-associated osteomyelitis. *J Orthop Res* 2009;27:1008-15
435. Cirioni O, Silvestri C, Ghiselli R, et al. Therapeutic efficacy of buforin II and rifampin in a rat model of *Acinetobacter baumannii* sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:1403-7
436. Chiang SR, Chuang YC, Tang HJ, et al. Intratracheal colistin sulfate for BALB/c mice with early pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Crit Care Med* 2009;37:2590-5
437. Pichardo C, Pachon-Ibanez ME, Docobo-Perez F, et al. Efficacy of tigecycline vs. imipenem in the treatment of experimental *Acinetobacter baumannii* murine pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:527-31
438. Andrea Giuliani GP, Silvia Fabiole Nicoletto. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2007;2:33
439. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238-50
440. Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, et al. Therapeutic efficacy of the polymyxin-like peptide ranalexin in an experimental model of endotoxemia. *J Surg Res* 2001;100:183-8
441. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. *Peptides* 2005;26:207-16
442. Levy O. Therapeutic potential of the bactericidal/permeability-increasing protein. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:159-67

443. van't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ and Amerongen AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 2001;382:597-619
444. Rivas L, Andreu D. Cecropin-melittin hybrid peptides as versatile templates in the development of membrane active antibiotics agents. In Menestrina G, Dalla Serra M, eds. Pore-forming peptides and protein toxins. Reading, Berkshire, United Kingdom: Harwood Academic Publishers, 2003:215–259.
445. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin induced mortality in bile duct ligated rats. *Gut* 2003;52:874-8
446. Lipsky BA, Holroyd KJ and Zasloff M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis* 2008;47:1537-45
447. Zhang L, Falla T, Wu M, et al. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:674-80
448. Avrahami D, Shai Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry* 2003;42:14946-56
449. Seebach D, Beck AK and Bierbaum DJ. The world of beta- and gamma-peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. *Chem Biodivers* 2004;1:1111-239
450. Fernandez-Reyes M, Diaz D, de la Torre BG, et al. Lysine N(epsilon)-trimethylation, a tool for improving the selectivity of antimicrobial peptides. *J Med Chem* 2010;53:5587-96
451. Higgins PG, Coleman K and Amyes SG. Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter* spp. *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2000;45 Suppl 1:71-7
452. McGee DH, Holt WF, Kastner PR and Rice RL. Safety of moxifloxacin as shown in animal and *in vitro* studies. *Surv Ophthalmol* 2005;50 Suppl 1:S46-54
453. von Keutz E, Schluter G. Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother* 1999;43 Suppl B:91-100
454. Huband MD, Cohen MA, Zurack M, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of PD 0305970 and PD 0326448, new bacterial gyrase/topoisomerase inhibitors with potent antibacterial activities versus multidrug-resistant gram-positive and fastidious organism groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1191-201

455. Otsu Y, Yanagihara K, Fukuda Y, et al. *In vivo* efficacy of a new quinolone, DQ-113, against *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3699-703
456. Otani T, Tanaka M, Ito E, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of DK-507k, a novel fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3750-9
457. Bedos JP, Azoulay-Dupuis E, Moine P, et al. Pharmacodynamic activities of ciprofloxacin and sparfloxacin in a murine pneumococcal pneumonia model: relevance for drug efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:29-35
458. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-10; quiz 11-2
459. Rodriguez-Martinez JM, Pichardo C, Garcia I, et al. Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:691-7
460. Hoshino K, Inoue K, Murakami Y, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of DC-159a, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:65-76
461. Finlay J, Miller L and Poupard JA. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:18-23
462. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:428-32
463. Spivey JM. The postantibiotic effect. *Clin Pharm* 1992;11:865-75
464. Gould IM, Milne K, Jason C. Post antibiotic effect of coamoxyclav [abstract 1360]. In Program and abstracts of the 5th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Oslo, Norway). 1991.
465. Thorburn CE, Molesworth SJ, Sutherland R and Rittenhouse S. Postantibiotic and post-beta-lactamase inhibitor effects of amoxicillin plus clavulanate. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2796-801
466. Cuffini AM, Tullio V, Ianni Palarchio A, Bonino A, Paizis G and Carlone NA. Enhanced effects of amoxycillin/clavulanic acid compared with amoxycillin and clavulanic acid alone on the susceptibility to immunodefenses of a penicillin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Drugs Exp Clin Res* 1998;24:173-84

467. Severin A, Severina E and Tomasz A. Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:504-10
468. Stokes DH, Slocombe B and Sutherland R. Bactericidal effects of amoxicillin/clavulanic acid against *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 1989;23:43-51
469. Greenwood D, O'Grady F and Baker P. An *in vitro* evaluation of clavulanic acid, a potent, broad-spectrum beta-lactamase inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 1979;5:539-47
470. Cuffini AM, Tullio V, Giacchino F, et al. Improved phagocyte response by co-amoxiclav in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001;71:575-7
471. Cuffini AM, Tullio V, Giacchino F, et al. Impact of co-amoxiclav on polymorphonuclear granulocytes from chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001;37:1253-9
472. Reato G, Cuffini AM, Tullio V, et al. Co-amoxiclav affects cytokine production by human polymorphonuclear cells. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:715-8
473. Bowie WR. *In vitro* activity of clavulanic acid, amoxicillin, and ticarcillin against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:713-5
474. Beale AS, Faulds E, Hurn SE, Tyler J and Slocombe B. Comparative activities of amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* in cell culture and in an experimental mouse pneumonitis. *J Antimicrob Chemother* 1991;27:627-38
475. Smith GM, Abbott KH and Sutherland R. Bactericidal effects of co-amoxiclav (amoxicillin clavulanic acid) against a *Legionella pneumophila* pneumonia in the immunocompromised weanling rat. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:525-34
476. Bamberger DM, Foxworth JW, Bridwell DL, Shain CS, Gerdin DN. Extravascular antimicrobial distribution and the respective blood and urine concentrations in humans. *In V. Lorian eds. Antibiotics in laboratory medicine*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 719–814
477. Gould IM, Harvey G, Golder D, et al. Penetration of amoxicillin/clavulanic acid into bronchial mucosa with different dosing regimens. *Thorax* 1994;49:999-1001