

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**DIVISIÓ DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**CAMPUS DE BELLVITGE**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS**

**PROBLEMÁTICA CLÍNICA DE LAS INFECCIONES POR**  
*Acinetobacter baumannii* **MULTIRRESISTENTE:**  
**APLICACIÓN DE UN MODELO DE NEUMONÍA**  
**EXPERIMENTAL EN EL RATÓN.**

**Memoria presentada por**  
**ABELARDO MONTERO SÁEZ**  
**para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía**

**Barcelona, Octubre de 2006**



**JAVIER ARIZA CARDENAL**, profesor titular de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona,

y

**XAVIER CORBELLA i VIRÓS**, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat de Barcelona,

hacemos constar que la tesis doctoral titulada:

**PROBLEMÁTICA CLÍNICA DE LAS INFECCIONES POR  
*Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE:  
APLICACIÓN DE UN MODELO DE NEUMONÍA EXPERIMENTAL  
EN EL RATÓN**

que presenta el licenciado **ABELARDO MONTERO SÁEZ**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Bellvitge. La consideramos finalizada y autorizamos su presentación con el objetivo que pueda ser juzgada por el tribunal que corresponda.

Para que así conste, firmamos la presente certificación en Barcelona, a 15 de Julio de 2006.

Dr. Javier Ariza Cardenal

Dr. Xavier Corbella i Virós



## **DEDICATORIAS**

A mis profesores. Por haberme enseñado a disfrutar con la ciencia.

A mi familia. Por todo.



Escribir un libro es como traer al mundo un nuevo ser.

## NO TE DETENGAS

No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,  
sin haber sido feliz,  
sin haber aumentado tus sueños.  
No te dejes vencer por el desaliento.  
No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte,  
que es casi un deber.  
No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.  
No dejes de creer que las palabras y las poesías sí pueden cambiar el mundo.  
Pase lo que pase nuestra esencia está intacta.  
Somos seres llenos de pasión.  
La vida es desierto y oasis.  
Nos derriba, nos lastima, nos enseña,  
Nos convierte en protagonistas de nuestra propia historia.  
Aunque el viento sople en contra,  
La poderosa obra continúa:  
Tú puedes aportar una estrofa.  
No dejes nunca de soñar,  
Porque en sueños es libre el hombre.

Walt Whitman  
Poeta estadounidense (1819-1892)

Si uno comienza con certezas,  
acabará con dudas,  
pero si se conforma en comenzar con dudas,  
conseguirá acabar con certezas.

Francis Bacon (1561-1626).





## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ariza, por sus enseñanzas, por su paciencia, por haberme hecho disfrutar del trabajo y del estudio, por hacerme entender que es más grande lo que desconocemos que lo conocido, y por haberme inculcado la importancia de la clínica en la Medicina y el respeto a los pacientes.

Al Dr. Corbella, por haberme introducido en el campo de la Medicina Interna y en las enfermedades infecciosas, por enseñarme a disfrutar con el ejercicio de la Medicina, y por su amistad y su apoyo siempre.

A los Dres. Jerónimo Pachón, María Jesús Rodríguez Hernández y Cristina Pichardo, del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, por su asistencia y colaboración en el desarrollo del modelo experimental.

A las Dras. Josefina Ayats, Fe Tubau y Carmen Borraz, del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge, L'Hospitalet (Barcelona) por su estrecha colaboración en todos los procedimientos microbiológicos.

A los Dres. Alejandro Doménech, Sandra Ribes y Carmen Cabellos, del Laboratorio de Infección Experimental del Hospital Universitario de Bellvitge, por su colaboración y asesoramiento en los procedimientos experimentales, por su compañerismo y su apoyo en los momentos difíciles.

A la Dra. María Ángeles Domínguez, del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge, L'Hospitalet (Barcelona) y la Dra. Beatriz Miralis del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, por su contribución a la caracterización de las carbapenemasas.

Al Dr. Isidre Casals y Sra. Maria Riera, de la Unidad de Cromatografía de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona, por su asistencia técnica en la metodología de cromatografía (HPLC).

Al Dr. Roger Bernat, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge, L'Hospitalet (Barcelona), por los estudios histológicos pulmonares.

Al Dr. Josep Maria Ramon, del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Bellvitge, L'Hospitalet (Barcelona), por su asistencia en el análisis estadístico de los resultados.

A Mike Maudsley, de la Universitat de Barcelona, por sus correcciones gramaticales de los artículos publicados en inglés.

Al Dr. Joan Gavaldà, del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Barcelona, por la revisión del artículo publicado en el JAC.

A los más de 1500 ratones que dieron su vida por la ciencia en este estudio. Porque, así lo espero profundamente, no haya sido en vano.





La realización de esta tesis doctoral no hubiera sido posible  
sin el apoyo de la beca de investigación  
de la Fundació August Pi i Sunyer  
del Hospital Universitari de Bellvitge,  
durante los años 1999 y 2000.

Los estudios realizados han sido financiados por el  
FONDO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS,  
Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid:  
Proyectos FIS N° 96/0674 y 98/0525.

El estudio experimental recibió en el año 2000  
el “PREMIO AVENTIS  
AL MEJOR PROYECTO DE TESIS DOCTORAL  
EN EL CAMPO DE LAS INFECCIONES O SU TRATAMIENTO”,  
dotado con 6000 €.



## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### 1. PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS:

Corbella X, **Montero A**, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F (2000). Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*; 38 (11): 4086-4095.

**Montero A**, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Ardanuy C, Gudiol F (2002). 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*; 46 (6): 1946-52.

**Montero A**, Corbella X, Ariza J (2003). Clinical relevance of *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (editorial). *Crit Care Med*; 31 (10): 2557-8.

**Montero A**, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Borraz C, Gudiol F (2004). Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother*; 54 (6): 1085-1091.

Saballs M, Pujol M, Tubau F, Peña C, **Montero A**, Domínguez MA, Gudiol F, Ariza J (2006). Rifampin-imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother*; 58 (3): 697-700.

### 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS:

Corbella X, **Montero A**, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Ariza J, Gudiol F (1998). Epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: Impact of a carbapenem restriction program. 38<sup>th</sup> Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Diego, California (Estados Unidos).

**Montero A**, Cabellos C, Doménech A, Corbella X, Ayats J, Tubau F, Gudiol F, Ariza J (2000). Estudio de la eficacia antibiótica en un modelo experimental de neumonía en el ratón por *Acinetobacter baumannii* multirresistente. IX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Santiago de Compostela.

**Montero A**, Corbella X, Cabellos C, Doménech A, Ayats J, Tubau F, Gudiol F, Ariza J (2000). Antibiotic activity in a mouse model of multiresistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. 5<sup>th</sup> International Symposium on the biology of *Acinetobacter*, Noordwijkerhout (Holanda).

Corbella X, **Montero A**, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Ariza J, Gudiol F (2000). Emergence and spread of carbapenem resistance during sustained hospital endemics by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. 5<sup>th</sup> International Symposium on the biology of *Acinetobacter*, Noordwijkerhout (Holanda).

**Montero A**, Corbella X, Cabellos C, Doménech A, Ayats J, Tubau F, Ardanuy C, Gudiol F, Ariza J (2001). Successful treatment of high-carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an immunocompetent mice pneumonia model. 41<sup>st</sup> Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago (Estados Unidos).

Borraz C, **Montero A**, Ayats J, Tubau F, Doménech A, Ribes S, Gudiol F, Ariza J (2002). Análisis *in vitro* de la actividad bactericida y sinérgica de varios antibióticos respecto a la colistina frente a una cepa de *Acinetobacter baumannii* con alta resistencia a carbapenémicos. X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla.

**Montero A**, Corbella X, Cabellos C, Doménech A, Ayats J, Tubau F, Borraz C, Gudiol F, Ariza J (2002). Tratamiento simple y combinado frente a la infección por *Acinetobacter baumannii* con moderada y alta resistencia a imipenem en un modelo de



neumonía experimental en ratón. X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla.

**Montero A**, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Ribes S, Ayats J, Tubau F, Gudiol F (2004). Beta-lactams and aminoglycosides in combination for pneumonia by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mice model. 14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Praga (República Checa).







# ÍNDICE



## ÍNDICE:

<b>I. INTRODUCCIÓN (BASES RACIONALES)</b> .....	31
1. Problemática actual de las infecciones nosocomiales y de la resistencia antibiótica: La era postantibiótica. ....	33
2. <i>A. baumannii</i> : El paradigma de las bacterias multirresistentes.....	34
2.1. Aspectos generales del microorganismo.....	34
2.1.1. Microbiología.....	34
2.1.2. Epidemiología.....	35
2.1.3. Patogenia.....	36
2.2. Principales mecanismos de resistencia antibiótica.....	37
2.2.1. Mecanismos de resistencia a betalactámicos.....	39
2.2.2. Mecanismos de resistencia a aminoglicósidos.....	41
2.2.3. Mecanismos de resistencia a quinolonas.....	41
2.3. Repercusiones clínicas de <i>A. baumannii</i> .....	42
2.4. Opciones antibióticas disponibles para el tratamiento de las cepas de <i>A. baumannii</i> multirresistentes.....	44
2.4.1. Antibióticos en monoterapia.....	44
2.4.1.1. Sulbactam.....	44
2.4.1.2. Imipenem.....	45
2.4.1.3. Tobramicina (aminoglicósidos).....	46
2.4.1.4. Rifampicina.....	47
2.4.1.5. Colistina.....	47
2.4.2. Combinaciones de antibióticos: Estudios de eficacia <i>in vitro</i> .....	49
2.4.2.1. Combinaciones con inhibidores de betalactamasas.....	50
2.4.2.2. Combinaciones con aminoglicósidos.....	51
2.4.2.3. Combinaciones con rifampicina.....	51
2.4.2.4. Combinaciones con polimixinas.....	51
3. Estudios experimentales en animales.....	52
3.1. Aportación de los modelos experimentales en animales.....	52
3.2. Modelos animales de infección experimental por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	55
3.3. Investigación con colistina en modelos experimentales animales.....	57
4. La endemia de <i>A. baumannii</i> en el Hospital de Bellvitge (1992-1996).....	57
<b>II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO E HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	63
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	69
1. Estudio clínico-epidemiológico preliminar (años 1997-1998).....	71
2. Modelo experimental (años 1998-2000).....	72
3. Repercusiones clínicas derivadas de la aplicación del modelo (años 2000-2001).....	72
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	75
1. Material y métodos del objetivo 1: Estudio clínico - epidemiológico preliminar (1997-1998).....	77
1.1. Factores de riesgo de colonización / infección por <i>A. baumannii</i> resistente a	

carbapenémicos.....	77
1.2. Caracterización molecular de los clones de la endemia y estudio de carbapenemasas.....	78
1.3. Intervención epidemiológica.....	79
1.4. Repercusiones clínicas de la endemia.....	80
1.5. Estudio preliminar de la actividad bactericida <i>in vitro</i> frente a los clones de <i>Acinetobacter baumannii</i> carbapenem-resistentes.....	80
2. Material y métodos del objetivo 2: Modelo experimental (1998-2000).....	81
2.0. Bases del modelo experimental.....	81
2.0.1. Instalaciones.....	81
2.0.2. Personal disponible y medios económicos.....	81
2.0.3. Estancia de preparación en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.....	82
2.1. Desarrollo y estandarización del modelo.....	82
2.1.1. Procedimientos microbiológicos.....	82
2.1.1.1. Selección de las cepas.....	82
2.1.1.2. Curvas de letalidad.....	83
2.1.1.3. Preparación del inóculo bacteriano.....	84
2.1.2. Procedimientos farmacocinéticos.....	84
2.1.2.1. Metodología para la obtención de las muestras.....	84
2.1.2.2. Determinación de los niveles en suero de los antibióticos.....	85
2.1.2.3. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos utilizados.....	85
2.1.2.4. Dosis de antibióticos utilizadas y tiempos de administración.....	86
2.1.3. Estandarización del modelo experimental de neumonía por <i>A. baumannii</i> en el ratón.....	87
2.1.3.a. Experimentos preliminares para la estandarización del modelo de neumonía.....	87
2.1.3.b. Animales utilizados.....	96
2.1.4. Descripción del modelo de neumonía.....	97
2.1.5. Análisis estadístico en el modelo animal.....	98
2.2. Análisis de la eficacia antibiótica: Monoterapias.....	99
2.3. Análisis de la eficacia antibiótica: Combinaciones.....	100
3. Material y métodos del objetivo 3: Repercusiones clínicas obtenidas del modelo (2000-2001).....	100
3.1. Estudio de la eficacia clínica y microbiológica de la combinación más activa obtenida en el modelo animal en el tratamiento de la neumonía y otras infecciones graves por <i>A. baumannii</i> multirresistente.....	101
3.2. Evaluar la mortalidad atribuible real de la neumonía asociada a ventilación mecánica por <i>A. baumannii</i> y la necesidad de introducir la colistina en la antibioterapia empírica de rutina en las UCIs con endemias o brotes epidémicos por estos microorganismos.....	102
<b>V. RESULTADOS POR OBJETIVOS.....</b>	<b>105</b>
1. Resultados del objetivo 1: Estudio clínico-epidemiológico preliminar de las infecciones por <i>A. baumannii</i> resistente a carbapenémicos en el Hospital de Bellvitge (1997-1998).....	107
1.1. Factores de riesgo de colonización / infección por <i>A. baumannii</i> resistente a carbapenémicos.....	107
1.2. Caracterización molecular de los clones de la endemia y estudio de carbapenemasas.....	108



1.3. Intervención epidemiológica.....	109
1.4. Repercusiones clínicas de la epidemia.....	110
1.5. Estudio preliminar de la actividad bactericida <i>in vitro</i> frente a los clones de <i>Acinetobacter baumannii</i> carbapenem-resistentes.....	111
2. Resultados del objetivo 2: Análisis de la eficacia antibiótica en un modelo de neumonía experimental por <i>A. baumannii</i> en el ratón (1998-2000).....	112
2.1. Desarrollo y estandarización del modelo.....	112
2.1.1. Farmacocinética.....	112
2.1.2. Estandarización del modelo experimental.....	112
2.2. Análisis de la eficacia antibiótica: Monoterapias.....	115
2.2.1. Actividad <i>in vitro</i> de los diferentes antibióticos.....	115
2.2.2. Actividad <i>in vivo</i> : Modelo de neumonía experimental en el ratón.....	116
2.3. Análisis de la eficacia antibiótica: Combinaciones.....	117
2.3.1. Actividad <i>in vitro</i> de las diferentes combinaciones de antibióticos.....	117
2.3.2. Actividad <i>in vivo</i> : Modelo de neumonía experimental en el ratón.....	119
3. Resultados del objetivo 3: Repercusiones clínicas derivadas de la aplicación del modelo (2000-2001).....	121
3.1. Estudio de la eficacia clínica y microbiológica de la combinación más activa obtenida en el modelo animal en el tratamiento de la neumonía y otras infecciones graves por <i>A. baumannii</i> multirresistente.....	121
3.2. Evaluar la mortalidad atribuible real de la NVM por <i>A. baumannii</i> y la necesidad de introducir la colistina en la antibioterapia empírica de rutina en las UCIs con epidemias o brotes epidémicos por estos microorganismos.....	122
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>127</b>
1. Objetivo 1: Estudio clínico-epidemiológico preliminar.....	129
2. Objetivo 2: Modelo de neumonía experimental en ratones.....	132
2.1. Modelo de neumonía.....	134
2.2. Análisis de la eficacia antibiótica: Monoterapias.....	136
2.3. Análisis de la eficacia antibiótica: Combinaciones.....	138
3. Objetivo 3: Repercusiones clínicas derivadas de la aplicación del modelo.....	142
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>VIII. TABLAS.....</b>	<b>155</b>
<b>IX. FIGURAS.....</b>	<b>173</b>
<b>X. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>187</b>
<b>XI. REFERENCIAS.....</b>	<b>223</b>



**I.**

**INTRODUCCIÓN  
(BASES RACIONALES)**



## **I. INTRODUCCIÓN (BASES RACIONALES).**

### 1. PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES Y DE LA RESISTENCIA ANTIBIOTICA: LA ERA POSTANTIBIÓTICA.

Durante la década de los 90 se ha producido un importante aumento a escala mundial de la incidencia de las infecciones nosocomiales por microorganismos multirresistentes, incluyendo *S. aureus* meticilin-resistente (MRSA), enterococos vancomicin-resistentes (VRE) [Weinstein RA, 1998; Rahal JJ, 2002] y diversos BGN, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Xantomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* [Levy SB, 1998; Yates RR, 1999; Fluit AC, 2000; Rahal JJ, 2002].

La envergadura del problema ha comportado que la situación fuera catalogada recientemente por los CDC de Estados Unidos como de “enfermedad infecciosa emergente” [Rahal JJ, 2002] en lo que se ha denominado la “era post-antibiótica” [Chastre J, 2003; Alanis AJ, 2005]. La contribución de la resistencia antibiótica al incremento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes hospitalizados ha sido repetidamente enfatizada [Peña C, 1996; Weinstein RA, 1998; Yates RR, 1999; Jones RN, 2001; Niederman MS, 2001].

Entre las bacterias gram negativas, el desarrollo de la resistencia antibiótica múltiple es debida a la resistencia innata de algunas especies y la facilidad de adquirir resistencia de otras [Waterer GW, 2001]. La prevalencia de una especie resistente en una institución viene determinada por: 1. El número de admisiones hospitalarias de pacientes colonizados/ infectados por las cepas resistentes; 2. El grado de transmisión cruzada intrahospitalario de paciente a paciente; y 3. La selección de resistencia producida por la antibioterapia [Wenzel RP, 1999]. Lo más importante para su control es la puesta en marcha de los programas de control de infección hospitalaria [Go ES, 1994; Levy SB, 1998; Weinstein RA, 1998; Burke JP, 1998; Yates RR, 1999; Bou G, 2001; Jones RN, 2001; Waterer GW, 2001; Rahal JJ, 2002]. El problema sobrepasa el ámbito de un paciente u hospital determinado y se considera de carácter ecológico-medioambiental a escala mundial [Landman D, 2002].

Desde el punto de vista epidemiológico, cuatro de estas especies bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter baumannii* tienen en común varias características [Quinn JP, 1998]: son bacterias gram negativas no fermentadoras, patógenos oportunistas, presentan resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, son aisladas de forma rutinaria en el ambiente, causan infecciones relacionadas con instrumentaciones, se muestran resistentes a los desinfectantes con frecuencia, son fácilmente transmisibles de forma cruzada entre pacientes por medio del personal sanitario y tienen sus implicaciones clínicas más importantes en el ámbito de las UCIs. Su trascendencia clínica viene marcada por su capacidad de resistencia antibiótica y la dificultad que plantea su tratamiento. *P. aeruginosa* es la especie más frecuente y de mayor virulencia, seguida por *Acinetobacter* [Acar JF, 1998].

## 2. ACINETOBACTER BAUMANNII: EL PARADIGMA DE LAS BACTERIAS MULTIRRESISTENTES.

### 2.1. ASPECTOS GENERALES DEL MICROORGANISMO:

#### 2.1.1. **Microbiología:**

El género *Acinetobacter* incluye varias especies de bacterias de morfología cocobacilar, Gram negativas, aerobias estrictas, no fermentadoras, oxidasa negativas, inmóviles, de amplia distribución en el ambiente y que se aíslan normalmente de forma ubicua en la naturaleza, en la tierra, aguas residuales y alimentos. La clasificación taxonómica ha cambiado a lo largo de los años, habiendo recibido diferentes denominaciones. Se han reconocido y denominado 7 especies diferentes: *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii* (anteriormente denominada *A. calcoaceticus* variedad *anitratus*), *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii* y *A. radioresistens* y quedan otros “serogrupos” clasificados [Bergogne-Bérézín E, 1996]. En la actualidad se reconocen 19 especies genómicas [Ariza J, 2001] de las cuales 3 son las aisladas habitualmente en los pacientes hospitalizados: Especie nº 2 (que corresponde a *A. baumannii*), 3 y 13TU. Estas 3 especies junto con *A. calcoaceticus* (genoespecie 1) se han mostrado muy relacionadas

genéticamente y difíciles de separar por su fenotipo [Ribera A, 2004] y son las que se incluyen en el grupo llamado *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex, que establece la diferencia entre las especies de *Acinetobacter* ubicuas en la naturaleza y las responsables de las infecciones clínicas. En las series más recientes, *A. baumannii* ha sido la especie más frecuentemente reconocida [Quinn JP, 1998]. Para la diferenciación de *A. baumannii* de las demás genoespecies del complejo se requiere la utilización de métodos genotípicos [Fernández Cuenca F, 2004].

### 2.1.2. **Epidemiología:**

La gran adhesividad y notable resistencia a la desecación y a las diferentes condiciones del medio confieren a *A. baumannii* gran facilidad para sobrevivir en los medios inanimados, bajo condiciones de sequedad o de humedad, y durante periodos de tiempo más prolongados que otras BGN, ya que requieren muy pocos recursos para su supervivencia. Además pueden sobrevivir en la piel humana y colonizarla [Bergogne-Bérézin E, 1996; Seifert H, 1997]. Así, además de aislarse en medios inanimados, especies como *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii* se pueden aislar en la piel del hombre. Algunas especies de *Acinetobacter* son tolerantes al jabón, y estas bacterias son los organismos gram negativos más frecuentemente aislados de las manos del personal médico [Quinn JP, 1998]. Se ha estimado que hasta un 25 % de la población normal pueden tener colonización cutánea y un 7 % están colonizados a nivel faríngeo [Quinn JP, 1998]. Todo ello determina su fácil diseminación en el medio hospitalario [Landman D, 2002]. Desde estos reservorios de colonización puede originar infecciones, las cuales han constituido un gran problema en los hospitales en los últimos años. Prácticamente la totalidad de las infecciones humanas son nosocomiales y producidas por *A. baumannii* y en un pequeño número de casos, por *A. lwoffii* [Bergogne-Bérézin E, 1996]. El resto de especies distintas a *A. baumannii* son menos frecuentes como causa de infecciones nosocomiales y son más sensibles a los antibióticos [Gales AC, 2001-1].

Las primeras descripciones de brotes endémicos o epidémicos datan de los años 70 [Gerner-Smidt P, 1987]. En la actualidad, *A. baumannii* es responsable de un número creciente de infecciones nosocomiales, superior a otros BGN en muchos hospitales de todo el mundo. Estas infecciones pueden ser en forma de brotes epidémicos, circunscritos a una sola unidad de UCI y normalmente asociados a un equipo

hospitalario que actúa como reservorio ambiental, (aparatos de ventilación mecánica, humidificadores, etc.) o bien endemias mantenidas en el tiempo, que no pueden relacionarse con un reservorio específico. Aunque se han descrito brotes epidémicos controlados tras su detección y la puesta en marcha de las diversas medidas de control [Tankovic J, 1994; Levin ASS, 1996; Fierobe L, 2001], e incluso la reversión de la resistencia a imipenem [Go ES, 1994], en la mayoría de ocasiones su erradicación resulta muy difícil y se establece de forma endémica [Acar JF, 1998; Landman D, 2002].

### 2.1.3. **Patogenia:**

La infección se inicia tras la colonización de los pacientes susceptibles [Urban C, 2003]. Desde los reservorios ambientales (reservorio inanimado) y desde otros pacientes ya colonizados (reservorio animado), y mediante el personal sanitario que se comporta como portador transitorio, *A. baumannii* coloniza los pacientes de forma generalizada, siendo los principales reservorios la piel, la orofaringe y el intestino. El papel de la transmisión vía aérea parece poco significativo [Landman D, 2002]. Desde estas localizaciones, se produce la infección en las localizaciones susceptibles como son las mucosas respiratoria o urinaria y las heridas quirúrgicas, o se produce la invasión del torrente vascular a través de los puntos de inserción de los catéteres. La “carga” de pacientes colonizados es muy importante en la adquisición de cepas resistentes [Fierobe L, 2001].

Sus factores de virulencia son poco conocidos. *A. baumannii* se considera una bacteria de baja patogenicidad [Bergogne-Bérézin E, 1996; Joly-Guillou ML, 2002]. El lípido A del lipopolisacárido (LPS) de la membrana tiene actividad endotóxica como en otros BGN, aunque en menor grado, y el 15 % de las cepas producen “slime”, que aumenta la virulencia bacteriana de otros BGN en el curso de la infección [Joly-Guillou ML, 2002]. Si bien en los estudios experimentales la inoculación intraperitoneal en ratones y el análisis de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) mostró resultados cercanos a los de otras enterobacterias o incluso *Pseudomonas* [Obana Y, 1985; Obana Y, 1986; Joly-Guillou ML, 2002], su virulencia en la práctica clínica es notablemente inferior. De esta manera, el aislamiento de esta bacteria en los cultivos de muestras biológicas no debe interpretarse sistemáticamente como sinónimo de infección, ya que a menudo traduce



una simple colonización. La diferenciación entre “colonización” e “infección” [Vincent JL, 1997] comporta implicaciones pronósticas y terapéuticas de gran trascendencia clínica, teniendo en cuenta la multirresistencia de estos microorganismos y la escasez de alternativas terapéuticas para estas infecciones. Esta diferenciación entraña una gran dificultad, en el entorno de vulnerabilidad de los pacientes de UCI en los que suele incidir, por sus enfermedades subyacentes, por estar sometidos a un gran número de manipulaciones e instrumentaciones y por los tratamientos antibióticos de amplio espectro que suelen recibir, y requiere una valoración clínica juiciosa. Ello es particularmente importante en el caso de la colonización respiratoria [Rahal JJ, 2001]. El hallazgo frecuente de cultivos polimicrobianos hace, si cabe, más difícil la evaluación. Los pacientes colonizados en las UCIs desarrollan muestras clínicas positivas en alrededor del 50 % de los casos, pero solo el 10-35 % tienen criterios significativos de infección [Bergogne-Bérézin E, 1996; Landman D, 2002].

## 2.2. PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA:

Al margen de la problemática epidemiológica que el microorganismo comporta al originar brotes epidémicos y grandes endemias sostenidas y a menudo refractarias a las medidas de control de la infección nosocomial, el aspecto más preocupante de las infecciones por *A. baumannii* es la extraordinaria capacidad de la bacteria para captar resistencia de otras bacterias y así desarrollar resistencia a todos los grupos de antibióticos, incluidos los carbapenémicos, y que le permite prevalecer bajo la presión ambiental ejercida por los antibióticos. Así *Acinetobacter baumannii* se comporta como un “almacén” de resistencia antibiótica. El desarrollo de resistencias en el género *Acinetobacter* es extremadamente rápido tras su exposición a los antibióticos, quizás como consecuencia de su habitual y mantenido contacto con otros microorganismos productores de antibióticos que se encuentren en su nicho ecológico, ya sea en el medio inanimado o en el reservorio humano intestinal. Ello contrasta con el comportamiento de otras bacterias clínicas más “tradicionales”, que requieren más tiempo para adquirir mecanismos de resistencia altamente efectivos en respuesta a la introducción de un determinado antibiótico [Bergogne-Bérézin E, 1996].

Los mecanismos involucrados en la resistencia antibiótica de *A. baumannii* son diversos:

1. Muestra resistencia intrínseca primaria a varios grupos de antibióticos, la cual le viene conferida por una membrana externa con escaso número de porinas de pequeño tamaño que la hace relativamente impermeable [Sato K, 1991; Vila J, 1998]. Además podría existir un mecanismo de “down regulation”, al igual que en otros BGN, que disminuye el número de porinas en presencia de los antibióticos [Bou G, 2000-1; Quale J, 2003].
2. Presenta resistencia elevada a la desecación, y ello le confiere una gran capacidad de supervivencia en el ambiente durante varios días [Gales AC, 2001-1];
3. Su capacidad de supervivencia en el ambiente le permite adquirir material genético de otras bacterias con las que puede coincidir. Adquiere fácilmente plásmidos u otros elementos genéticos de resistencia de otras bacterias (transposones, integrones) mediante conjugación. El papel de los integrones y de las bombas de expulsión es probablemente de gran importancia para el desarrollo de su multiresistencia [Vila J, 1998].
4. Tiene una alta tasa de mutación, lo que facilita la selección con la antibioterapia de cepas con resistencia progresiva [Bou G, 2001].

El grado de expresión de estos mecanismos de resistencia en una cepa determinada muestra una notable variabilidad de carácter local, según países e incluso según hospitales [Pfaller MA, 2001]. En Estados Unidos, la exhibición de un patrón de multiresistencia es poco frecuente y se considera menos preocupante con relación a la de otros microorganismos como MRSA, enterococos vancomycin-resistentes, *Klebsiella* *blee*, *Pseudomonas*, *M. tuberculosis*... [Weinstein RA, 1998; Jones RN, 2001; Pfaller MA, 2001]. Dentro de Europa el grado de multiresistencia es muy variado. Incluso en nuestro país las cepas resistentes varían por comunidades o incluso entre hospitales de una misma ciudad [Cisneros JM, 2005]. Las diferencias probablemente reflejan diferentes pautas de tratamiento antibiótico, y distintas circunstancias epidemiológicas [Manikal VM, 2000].

La situación actual en nuestro medio es que, con el transcurso de los años, y debido en gran parte a la presión antibiótica ejercida en el ámbito hospitalario, *A. baumannii* ha ido adquiriendo resistencia de forma progresiva a los distintos antibióticos, incluyendo los modernos betalactámicos, las fluoroquinolonas [Pascual A, 1997], los aminoglucósidos e incluso recientemente los carbapenémicos. Se ha llegado así a la

situación actual de resistencia a casi todos los antibacterianos disponibles [Rahal JJ, 2001; Hsueh PR, 2002; Fernández Cuenca F, 2004]. Es importante remarcar que el concepto de multirresistencia que se obtiene a partir de los análisis *in vitro* no comporta forzosamente mayor virulencia en la infección *in vivo*. De forma similar, muchas bacterias con carácter saprofito, que por ejemplo colonizan la piel y mucosas son resistentes a múltiples antibióticos (pe SCN...). La problemática práctica generada como consecuencia de la dificultad terapéutica de las infecciones graves producidas por estas cepas multirresistentes supone un auténtico reto para el clínico.

### 2.2.1. Mecanismos de resistencia a betalactámicos:

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones coinciden en la misma bacteria y se acumulan [Gómez-Lus R, 1997; Vila J, 1998; Fernández Cuenca F, 2003]:

- alteraciones en la permeabilidad de la membrana,
- modificaciones de las dianas (PBPs),
- inactivación enzimática por betalactamasas, y
- mecanismos de expulsión.

El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias.

1. Resistencia por impermeabilidad: Se da fundamentalmente en BGN por alteraciones de las proteínas de la membrana externa (porinas), que dificultan la penetración de sustancias hidrofílicas (betalactámicos).
2. Resistencia por modificación de las dianas: Los cambios, adquisición o hiperproducción de las PBP implican una pérdida de afinidad de los betalactámicos y por tanto una disminución de su actividad. Este mecanismo es el más importante en las bacterias gram positivas.
3. Resistencia por betalactamasas: Constituyen el principal mecanismo de resistencia a penicilina y cefalosporinas, sobretodo en las bacterias gram negativas. En estos microorganismos, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y las betalactamasas cromosómicas pueden ser constitutivas o inducibles.

Las betalactamasas constitutivas, mediadas por plásmidos R, se encuentran ampliamente distribuidas en los bacilos gram negativos (TEM, OXA, SHV y PSE). Las betalactamasas inducibles, cromosómicas, son sobretodo cefalosporinasas, se producen a un nivel bajo, y se encuentran igualmente en varias especies de BGN. La desrepresión de estas betalactamasas da lugar a un descenso de la sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación y monobactams (aztreonam), conservándose la actividad de imipenem. Las betalactamasas plasmídicas clásicas (TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-2, OXA-3) no son activas frente a las cefalosporinas de 3ª generación, por lo que no existía el riesgo de la diseminación interbacteriana de este tipo de resistencia. Pero en 1983 aparece la resistencia transferible frente a tales cefalosporinas (betalactamasa SHV-2), y posteriormente aparecen nuevas cefalosporinasas con análogas características, hecho especialmente grave porque algunos de los plásmidos portaban también genes de resistencia para los aminoglicósidos.

4. Resistencia por expulsión: Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de ATP, que bombean el antimicrobiano al exterior. Este mecanismo se ha demostrado en algunas cepas de *P. aeruginosa* y parece existir también en *A. baumannii* [Vila J, 1998].

La aparición en *Acinetobacter baumannii* de la resistencia a carbapenémicos a finales de los 90 comportó una revisión del papel de estos mecanismos y la búsqueda de otros nuevos para clarificar el fenómeno y desarrollar estrategias para combatirlo. Los estudios microbiológicos han sugerido que la escasa penetrabilidad de su pared por la pérdida de porinas, la alteración en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y la producción de diferentes betalactamasas de clase molecular B y D (betalactamasas tipo OXA de localización cromosómica que hidrolizan los carbapenémicos y otros betalactámicos, y tipo IMP- y VIM-, de localización plasmídica) serían los principales responsables de la carbapenem-resistencia [Afzal-Shah M, 1998; Bou G, 2001; Levin AS, 2003; Urban C, 2003].

La producción de carbapenemasas se ha descrito en múltiples países, entre ellos España. De hecho, en estos años se han ido describiendo en diferentes cepas resistentes a carbapenémicos, diversos tipos de estas betalactamasas (carbapenemasas) [Afzal-Shah M, 1998]: OXA-23, 24 [Bou G, 2000-2], 25, 26, 27 [Afzal-Shah M, 2001; Chu YW, 2001]). Algunas son metalobetalactamasas de la clase IMP- o VIM- (clase B), pero la

mayoría corresponden a moléculas de clase D zinc-independientes [Lopez-Otsoa F, 2002], que se han englobado en 2 grandes familias relacionadas: La primera de ellas constituida por las enzimas OXA-23 (inicialmente denominada ARI-1, aislada en Escocia en 1985 [Paton RH, 1993] y de distribución mundial); y la OXA-27, descubierta en cepas procedentes de Singapur, que presenta un 99 % de homología en la secuencia de aminoácidos. La segunda familia comprendería las enzimas OXA-24 y 25 (presentes en cepas procedentes de España) y OXA-26 (presente por ejemplo en Bélgica), que presentan una homología en la secuencia superior al 98 %. Además existen otras enzimas que no ha podido demostrarse su relación con estas 2 familias descritas [Vila J, 1997; Afzal-Shah M, 2001].

La actividad de las carbapenemasas no parece explicar satisfactoriamente la resistencia de alto nivel a estos antibióticos, que requeriría de la presencia concomitante de otros mecanismos y/o enzimas implicados; el problema debe entenderse, más bien, como multifactorial y por tanto no tributario de solventarse al asociar inhibidores de betalactamasas [Bou G, 2001].

### 2.2.2. **Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos:**

Se han descrito 3 mecanismos por los que una bacteria expresa resistencia a los aminoglucósidos: Alteraciones de la permeabilidad de la membrana, resistencia debida a mutaciones ribosómicas y modificación enzimática, siendo este último el de mayor importancia [Gómez-Lus R, 1997].

*Acinetobacter* spp. es productor de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que inactivan dichos antibióticos [Vila J, 1993], codificados genéticamente en plásmidos, transposones e integrones [Bergogne-Bérézín E, 1996]. Entre las cepas clínicas, se han identificado enzimas de los 3 tipos: Acetiladoras, adeniladoras y fosforiladoras, aunque con importantes variaciones geográficas. Además se ha observado que algunas cepas contienen más de un gen de resistencia a aminoglucósidos.

### 2.2.3. **Mecanismos de resistencia a quinolonas:**

A diferencia de lo que ocurre en otras BGN, *Acinetobacter* spp. desarrolla resistencia a las quinolonas con notable rapidez [Bergogne-Bérézin E, 1996]. En este caso, la resistencia viene mediada por alteraciones en la estructura de la DNA girasa [Ribera A, 2004], que es la principal diana de las quinolonas, pero no por cambios en la segunda diana, la topoisomerasa IV. Además, los cambios en la membrana externa que resultan en una captación menor y las bombas de expulsión [Ribera A, 2004] también contribuyen a esta resistencia, y pueden condicionar una resistencia cruzada con los betalactámicos [Bergogne-Bérézin E, 1996].

### 2.3. REPERCUSIONES CLÍNICAS DE *A. baumannii*:

En la experiencia de la epidemia sostenida de *A. baumannii* de nuestro hospital, las infecciones más frecuentes fueron: Respiratorias (en forma de traqueobronquitis y menos frecuente, neumonía) (35 %); infecciones de herida quirúrgica (26 %); bacteriemias originadas en catéteres (20 %), e infecciones del tracto urinario (7 %) en relación con la colocación de sondas urinarias [Corbella X, 1996-2]. Entre las infecciones respiratorias, la neumonía se da menos a menudo que la traqueobronquitis, pero por su potencial gravedad constituye una de las infecciones por *A. baumannii* con mayor significación clínica.

Globalmente, la neumonía nosocomial supone el 10-20 % del conjunto de las infecciones nosocomiales y es la primera causa de infección en las UCIs [Leal R, 1998]. Esta incidencia llega a ser del 28 % en los pacientes sometidos a ventilación mecánica (NVM) [Leal R, 1998; Chastre J, 2002]. La aparición de esta complicación prolonga los días de intubación y de estancia en la UCI y en el hospital [Fagon JY, 1993; Rello J, 2002]. Además aumenta el riesgo de muerte en los pacientes con enfermedades críticas hasta el 50-76 %, especialmente cuando la infección se debe a un patógeno multirresistente [Chastre J, 2002; Garnacho-Montero J, 2003]. Durante la última década se ha acumulado una notable evidencia sobre la importancia de proporcionar un tratamiento antibiótico adecuado precoz como factor pronóstico para lograr una reducción de la mortalidad en las infecciones graves de los pacientes de UCI y en especial de la NVM [Trouillet JL, 1998; Chastre J, 2002; Kollef MH, 2003]. Se requiere un diagnóstico rápido y la inmediata instauración de una antibioterapia empírica que

ofrezca garantías frente al espectro microbiológico de los microorganismos responsables. La falta de acierto en esta terapéutica empírica comporta una mayor mortalidad, aunque se adecúe la pauta antibiótica posteriormente basándose en los resultados de los cultivos.

*A. baumannii* es uno de los 5 patógenos más frecuentes causantes de NVM: *S. aureus*, *Acinetobacter* spp, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *Enterobacter* spp. Los factores de riesgo implicados en la neumonía por *A. baumannii* son similares a los definidos para la neumonía por *P. aeruginosa* [Waterer GW, 2001]. Según datos del estudio de vigilancia epidemiológica ENVIN-UCI del año 2000, la neumonía por *A. baumannii* significó el 6.7 % de los episodios de neumonía nosocomial en las UCIs españolas, registrándose una cierta tendencia a la baja en los últimos años, tras presentar unos picos de incidencia en 1994 y 1996 del 18 y 13 % respectivamente [Alvarez-Lerma F, 2002]. Estos episodios representaron cerca del 10 % de la neumonía tardía en esta población [Leal R, 1998]. Según el estudio EPIC (European Prevalence of Infections in Intensive Care) en 1995 *A. baumannii* fue el 7º patógeno más frecuente en los pacientes de las UCIs, significando el 8 y 10 % de bacteriemias y neumonías respectivamente [Gales AC, 2001-1]. De forma similar, en un estudio en pacientes hospitalizados con neumonía, realizado en Latinoamérica dentro del programa de vigilancia SENTRY (1997-2000) *Acinetobacter* spp. fue el 4º patógeno más frecuentemente aislado, suponiendo el 9.6 % de los casos [Gales AC, 2002].

La mortalidad cruda de la neumonía por *A. baumannii* es muy elevada (70 % aproximadamente), con tasas similares a las de la neumonía por *P. aeruginosa* [Waterer GW, 2001]. Sin embargo, la mayoría de estudios realizados tienen la limitación de haber analizado la mortalidad atribuible de la NVM causada por bacterias multirresistentes en su conjunto, incluyendo *P. aeruginosa*, *X. maltophilia* y *A. baumannii* [Fagon JY, 1993; Kollef MH, 1995] obteniendo una mortalidad atribuible superior al 20 %. Esta aproximación resulta cuestionable dadas las particulares características microbiológicas, patogénicas y clínicas de *A. baumannii*.

En otro estudio realizado en nuestro país que analizaba la contribución de *Acinetobacter baumannii* sobre la mortalidad y el alargamiento de la estancia de los pacientes en UCI, se obtuvo una mortalidad atribuible del 53 % en los pacientes con infección respiratoria

demostrada, y un exceso de estancia en UCI de 13 días [García Garmendia JL, 1999]. La evaluación de la mortalidad directamente atribuible a esta infección es muy complicada en este tipo de pacientes de UCIs, con ingresos prolongados y pluricomPLICADOS, posible distrés respiratorio añadido y diagnóstico de seguridad a veces cuestionable [Chastre J, 2002]. La dificultad que supone la multirresistencia de *A. baumannii* para establecer una recomendación de antibioterapia empírica ante la sospecha clínica de neumonía por este microorganismo en el contexto de un brote epidémico, resulta fácil de intuir.

#### 2.4. OPCIONES ANTIBIÓTICAS DISPONIBLES PARA EL TRATAMIENTO DE LAS CEPAS DE *A. baumannii* MULTIRRESISTENTES:

Tras el indispensable juicio clínico, que establece el criterio de infección y la necesidad de instaurar una antibioterapia, se plantean las opciones terapéuticas posibles. En este contexto, la presencia de una multirresistencia comporta problemas importantes en el tratamiento. Como la sensibilidad antibiótica *in vitro* puede ser muy variable, esta antibioterapia debe individualizarse en función de los resultados de los cultivos y antibiogramas. Si el microorganismo es sensible, la respuesta clínica suele ser satisfactoria con cualquiera de los antibióticos utilizados en monoterapia ( $\beta$ -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos u otros); no se requiere así el uso de combinaciones de antibióticos y la búsqueda de efectos sinérgicos. Con el nivel de resistencia desarrollado hasta principios de los 90 y hasta la aparición de las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, el imipenem era mayormente considerado el tratamiento de elección para las infecciones graves, con buenos resultados terapéuticos. La aparición de cepas con sensibilidad disminuida a carbapenémicos, a partir de 1996, planteó un grave problema terapéutico. La búsqueda de alternativas ha sido una constante preocupación desde entonces, siendo necesario plantear el posible beneficio sinérgico de diversas combinaciones de antibióticos. No obstante, la falta de estudios randomizados no ha permitido que se hayan podido establecer estas pautas alternativas.

##### 2.4.1. **Antibióticos en monoterapia:**

###### 2.4.1.1. Sulbactam:



Varios estudios han confirmado la actividad intrínseca y la eficacia clínica de este betalactámico, que ha sido comprobada de forma repetida en las cepas que mantienen la sensibilidad *in vitro*. La mayoría de los estudios han analizado la eficacia de la combinación ampicilina-sulbactam (en proporción 1:2), que es la formulación comercializada de forma generalizada [Urban C, 1993; Cisneros JM, 1996; Jiménez-Mejías ME, 1997; Corbella X, 1998; Levin AS, 2003]. Se había sugerido que la combinación de los 2 antibióticos actuaba de forma sinérgica *in vitro* [Corbella X, 1998]. Sin embargo, con posterioridad se ha demostrado en estudios *in vitro* y clínicos que la eficacia de la combinación ampicilina-sulbactam se debe por completo al efecto del sulbactam [Urban C, 1993; Corbella X, 1998], el cual muestra actividad antibacteriana per se frente a las neisseriáceas y *Acinetobacter* spp. por su capacidad de fijación a las PBP. Sulbactam se une a PBP1a en el caso de *Acinetobacter* (en el caso de *E. coli*, se trata de una PBP2), comportándose de forma diferente al ácido clavulánico y tazobactam [Acar JF, 1998]. Sulbactam ha sido eficaz en infecciones leves o moderadamente severas a la dosis de 3 gramos/día, pero existen dudas sobre su eficacia real utilizado en dosis elevadas (2 g/6-8 h) en situaciones de mayor gravedad [Rahal JJ, 2001]. Así se ha publicado su fracaso terapéutico en 2 casos de meningitis tratados con la combinación [Levin AS, 2003].

La utilización clínica de este inhibidor de manera aislada está comprometida en diferentes países en los que no está comercializado en esta formulación, entre los que se incluye Estados Unidos. Con todo, el aspecto más preocupante es la disminución progresiva de su actividad *in vitro* observada en los últimos años [Manikal VM, 2000].

#### 2.4.1.2. Imipenem:

En general, los carbapenémicos continúan siendo los antibióticos betalactámicos más activos contra las cepas de *Acinetobacter* multirresistentes [Rahal JJ, 2001]. En contraste con lo que se observa frente a *P. aeruginosa*, imipenem tiene mayor grado de actividad que meropenem [Rahal JJ, 2001]. El tratamiento con imipenem es considerado en la actualidad el “gold standard” para la neumonía por *A. baumannii* [Bergogne-Bérézin E, 1996; Joly-Guillou ML, 1997; Rodríguez-Hernández MJ, 2000; Rahal JJ, 2001; Garnacho-Montero J, 2003].

El problema se plantea cuando aparece la resistencia a carbapenémicos. Habitualmente, esta resistencia lleva asociada multiresistencia al resto de grupos de antibióticos, dificultando enormemente el tratamiento antibiótico. La primera descripción de una cepa de *A. baumannii* con actividad carbapenemasa se produjo en 1985 en Escocia [Afzal-Shah M, 2001]. Posteriormente aparecieron casos esporádicos, pero en los últimos años se han publicado diversos artículos que constatan la generalización del problema por todo el mundo: En Europa [Tankovic J, 1994; Lyytikäinen O, 1995; Afzal-Shah M, 1998; Da Silva GJ, 1999; Gunseren F, 1999; Ruiz J, 1999; Bou G, 2000-1, Afzal-Shah M, 2001; Fierobe L, 2001; Gales AC, 2001-1; Turner PJ, 2003], Asia [Afzal-Shah M, 1998; Takahashi A, 2000; Afzal-Shah M, 2001; Chu YW, 2001; Gales AC, 2001-1; Hsueh PR, 2002], Sudamérica [Levin ASS, 1996; Afzal-Shah M, 1998; Afzal-Shah M, 2001; Gales AC, 2001-1; Levin AS, 2003], Estados Unidos [Go ES, 1994; Jones ME, 1999; Manikal VM, 2000; Gales AC, 2001-1; Karlowski JA, 2003], Sudáfrica [De Jong G, 2004] y Polinesia [Naas T, 2005]. La incidencia promedio de infección /colonización por *A. baumannii* resistente a imipenem en España es bastante alta (1,36 casos / 1000 admisiones hospitalarias), pero muy variable entre centros [Cisneros JM, 2005]. Fuera de nuestro país, las cifras de resistencia a imipenem en *Acinetobacter* spp. varían entre 6-8 % en Estados Unidos y Canadá, 10 % en Latinoamérica y 16 % en Europa [Gales AC, 2001-1; Karlowski JA, 2003; Turner PJ, 2003].

El porcentaje de resistencia a carbapenémicos entre las neumonías por *A. baumannii* de las UCIs españolas según datos del ENVIN-UCI fue de 31,2 % en 1998, 57,5 % en 1999 y 38,1 % en 2000 [Alvarez-Lerma F, 2002]. En el estudio multicéntrico más reciente publicado en nuestro país (2004) efectuado por el GEIH-SEIMC entre pacientes hospitalizados en UCIs y salas convencionales en 25 hospitales españoles se identificaron 221 aislamientos clínicos, pertenecientes a 79 clones diferentes. Los porcentajes de resistencia a imipenem, meropenem y sulbactam fueron 41,2, 49,8 y 33,3 % respectivamente [Fernández Cuenca F, 2004]. En el Hospital de Bellvitge este porcentaje llegó a ser del 80 % en el año 2000, de forma similar a otros hospitales españoles [Ruiz J, 1999].

#### 2.4.1.3. Tobramicina (aminoglucósidos):

Como ocurre frente a otras BGN, el papel de los aminoglucósidos en el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* es como alternativa a los betalactámicos y por la posibilidad de su uso en combinación con otros antibióticos. Se ha demostrado sinergia *in vitro* frente BGN en la combinación betalactámico con amikacina, que se traduce en una mejor evolución de los pacientes con infecciones severas [Klastersky J, 1977]. Imipenem con amikacina o tobramicina tuvo mejor actividad bactericida contra cepas resistentes que imipenem con sulbactam [Marques MB, 1997].

Las ventajas reconocidas a los aminoglucósidos para el tratamiento de las infecciones pulmonares son su penetración en las secreciones respiratorias, un lento aclaramiento pulmonar y el efecto postantibiótico [Leggett JE, 1989; Lorian V, 1996; Rodríguez-Hernández MJ, 2000].

#### 2.4.1.4. Rifampicina:

Es bien sabido que la rifampicina no puede ser utilizada en monoterapia para el tratamiento de infecciones por bacterias gram positivas debido al desarrollo precoz de resistencias [Kucers A, 1997-1] y probablemente ello pueda extrapolarse también para el caso de las bacterias gram negativas.

El espectro de actividad *in vitro* de este antibiótico incluye diversas bacterias gram negativas, aunque ésta parece ser menor en el caso de la enterobacterias [Kucers A, 1997-1]. Las recomendaciones de la NCCLS no incluyen la concentración de rifampicina que debería utilizarse como punto de corte en la determinación de la resistencia de las BGN y por ello muchos estudios han utilizado el mismo criterio empleado frente a *Staphylococcus aureus* (resistencia: CMI  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ). En una evaluación reciente de la sensibilidad de 30 cepas de *A. baumannii* procedentes de varios centros frente a rifampicina, la CMI media fue 3  $\mu\text{g/mL}$ , considerándose por tanto sensibles; esta susceptibilidad fue independiente de la resistencia a betalactámicos. Sin embargo, y como era previsible, se observó aparición de resistencia a rifampicina en los cultivos tras 24 horas [Wolff M, 1999]. Estas circunstancias parecen ofrecer una base prometedora para el uso de pautas de combinación antibiótica que incluyan rifampicina.

#### 2.4.1.5. Colistina:

Las polimixinas, entre las que se incluye la polimixina E, también denominada colistina o colimicina, son antibióticos polipeptídicos con potentes propiedades antiendotoxina y actividad antibacteriana [Evans ME, 1999]. Mantienen un espectro antibacteriano muy favorable, especialmente para *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp. [Gunderson BW, 2003]. Hasta la fecha son una excepción al fenómeno general de desarrollo de resistencia de *A. baumannii* a todos los grupos de antibióticos [Rahal JJ, 2001]. Ello puede deberse en parte, a su forma de actuación antibacteriana como “detergente”, destruyendo la membrana bacteriana de las BGN, al sustituir cationes necesarios para estabilizar la membrana bacteriana [Gunderson BW, 2003]. Utilizadas en los años 60, cayeron en desuso posteriormente tras la aparición de los aminoglicósidos, con los que se superponía el espectro bacteriano, y debido a su potencial toxicidad renal y neuromuscular (bloqueo neuromuscular y neurotoxicidad) [Evans ME, 1999]. Estos efectos secundarios se han reducido en la actualidad tras mejorar el grado de pureza del compuesto. En la actualidad no se incluyen de forma rutinaria en los estudios de sensibilidad antibiótica *in vitro* en muchos laboratorios [Rahal JJ, 2001] e incluso la NCCLS no dispone oficialmente de los puntos de corte de sensibilidad antibiótica; se ha sugerido como tal la concentración  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  [Catchpole CR, 1997; Evans ME, 1999; Gales AC, 2001-2]. Los datos farmacocinéticos realizados en humanos proceden de estudios realizados en la década de los 60 [MacKay DN, 1964; Goodwin NJ, 1968; Kucers A, 1997-2].

La colistina está sulfometilada, lo que neutraliza su naturaleza catiónica y la transforma en inefectiva como antibiótico; debe ser por tanto hidrolizada para liberar la base libre o forma activa. Esta forma del antibiótico se denomina colistimetato sódico o colistin metano sulfonato, que es la única forma que puede usarse en humanos [Levin AS, 1999; Li J, 2001]. Su gran peso molecular dificulta la penetración tisular y las concentraciones alcanzadas en las localizaciones de la infección pueden ser insuficientes [Kucers A, 1997-2; Rodríguez-Hernández MJ, 2004]. Penetra escasamente en el LCR y la presencia de inflamación meníngea no incrementa sensiblemente los niveles [Jiménez-Mejías ME, 2000]; no obstante, en un estudio reciente, los niveles en el LCR fueron el 25 % de los séricos, tras una dosis única ev de 5 mg/kg/día [Jiménez-Mejías ME, 2000; Jiménez-Mejías ME, 2002]. Se une escasamente a las membranas tisulares y se acumula en tejidos cuando es administrada en infusión continua [Craig WA, 1976]. La unión proteica no parece interferir su efecto bactericida [Kunin CM, 1971]. Sus parámetros

farmacodinámicos de eficacia parecen ser más bien del tipo concentración-dependiente, como es el caso de los aminoglucósidos [Li J, 2001; Gunderson BW, 2003]. Sin embargo, su actividad bactericida es baja comparativamente con la de otros grupos de antibióticos [Kucers A, 1997-2]. Clásicamente, se ha considerado menos efectivo que los otros grupos de antibióticos, como betalactámicos, aminoglicósidos o quinolonas, pero su eficacia terapéutica en la era moderna no está bien determinada [Afzal-Shah M, 2001].

Con todas las limitaciones expuestas, la urgencia terapéutica de infecciones por cepas de *A. baumannii* resistentes a todos los antibióticos, incluidos carbapenémicos, con la excepción de colistina, ha justificado su utilización en una miscelánea de infecciones, con buenos resultados y una aceptable tolerancia. Su uso principal ha sido mediante administración tópica, como nebulizaciones para las infecciones bronquiales, intratecal para las infecciones meníngeas, pomadas para el tratamiento de úlceras cutáneas o heridas, o incluso vía oral para descontaminación intestinal. La experiencia acumulada en el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* es todavía limitada [Catchpole CR, 1997], pero se ha mostrado útil para el aclaramiento de bacteriemias, en el tratamiento de infecciones del SNC (ventriculitis y meningitis) tras la administración directa intratecal mediante un catéter [Fernández-Viladrich P, 1999; Levin AS, 1999; Vasen W, 2000; Rahal JJ, 2001; Jiménez-Mejías ME, 2002], en otras infecciones nosocomiales [Jiménez-Mejías ME, 2000] y frente a otras bacterias como *P. aeruginosa* (por ejemplo, infecciones en pacientes con fibrosis quística [Conway SP, 1997, Linden PK, 2003]) y *K. pneumoniae* [Karabinis A, 2004] multirresistentes. Sin embargo, su eficacia terapéutica en el caso de la neumonía ha sido cuestionada debido a la inadecuada penetración en el parénquima pulmonar [Rahal JJ, 2001] y también se han descrito otros casos con mala respuesta al tratamiento [Kunin CM, 1971; Linden PK, 2003].

La cuestión planteada es si existen otras posibilidades terapéuticas mejores que este antibiótico cuya eficacia antibacteriana se pone en entredicho. Además, es previsible que un uso extendido de la colistina lleve consigo la aparición de cepas resistentes al antibiótico, lo cual se ha referido ya en casos esporádicos [Catchpole CR, 1997; Manikal V, 2000].

#### 2.4.2. Combinaciones de antibióticos: Estudios de eficacia *in vitro*:

El análisis de la eficacia antibiótica *in vitro* de las combinaciones de varios antibióticos puede realizarse mediante los estudios en “tablero de ajedrez” o las curvas de letalidad-tiempo. Otras formas de valoración incluyen parámetros farmacodinámicos, obtenidos en estudios con animales. Por ejemplo, el cociente 24-h AUC/CMI de una combinación ha sido calculado mediante la suma de la magnitud de los cocientes para cada antibiótico individual [Thomas JK, 1998], pero esta metodología no ha sido probada, e incluso se ha sugerido que tiene escasa capacidad predictora de la actividad antimicrobiana *in vivo* [Craig WA, 2001]. Otro intento ha sido utilizar un modelo de infección en muslo en ratones por *Pseudomonas aeruginosa*, en donde se observó que los índices farmacodinámicos de un antibiótico que eran predictivos de su eficacia, eran también predictivos de eficacia de la combinación. De esta manera, la suma de los 2 índices farmacodinámicos que eran los mejores para cada fármaco por separado era el mejor parámetro para predecir la actividad *in vivo* de la combinación [Mouton JW, 1999]. Incluso sus autores sugieren que este método podría ser otra herramienta para determinar la presencia de actividad sinérgica entre antibióticos de un modo gráfico mediante la discordancia entre los valores predichos matemáticamente y los observados, y que incluso se podría cuantificar. Sin embargo reconocen que este método es más laborioso que los otros usados descritos con anterioridad.

En el caso de *Acinetobacter baumannii*, la problemática de la multirresistencia y las escasas opciones antibióticas disponibles en forma de monoterapia, plantean la necesidad de buscar el posible efecto sinérgico de diferentes combinaciones de antibióticos. La experiencia clínica contrastada con pautas de antibioterapia en combinación es prácticamente inexistente. La información disponible consiste únicamente en estudios *in vitro* diversos, que pueden servir de punto de partida para una hipotética utilización clínica posterior.

##### 2.4.2.1. Combinaciones con inhibidores de betalactamasas:

El grupo del Dr. Claude Carbon fue el primero en demostrar el aumento de la letalidad *in vitro* de *A. baumannii* por inhibidores de betalactamasas combinados con betalactámicos, en particular ticarcilina-clavulanato y sulbactam [Joly-Guillou ML, 1995].

#### 2.4.2.2. Combinaciones con aminoglucósidos:

Se han analizado múltiples combinaciones de un betalactámico con un aminoglucósido, que han mostrado una mayor letalidad *in vitro* frente a BGN. La concentración del betalactámico debe mantenerse por encima de la CMI para prevenir el recrecimiento que sigue al PAE de los aminoglucósidos y mantener el sinergismo [Fantin B, 1992].

#### 2.4.2.3. Combinaciones con rifampicina:

Se han ensayado múltiples combinaciones de rifampicina con otros antibióticos que han mostrado un efecto sinérgico frente a un gran número de bacterias. En el caso de *A. baumannii*, estudios *in vitro* han demostrado sinergia entre colistina y rifampicina [Hogg GM, 1998; Giamarellos-Bourboulis EJ, 2001], y ampicilina-sulbactam y rifampicina [Rahal JJ, 2001].

#### 2.4.2.4. Combinaciones con polimixinas:

Las limitaciones de la colistina o polimixina E comentadas previamente y la necesidad de su utilización inducen a la búsqueda de posibles combinaciones de mayor eficacia. De forma similar, se han realizado múltiples estudios *in vitro* que han demostrado sinergia entre polimixina B y varios antibióticos, como imipenem [Rahal JJ, 2001], meropenem, azitromicina, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol o ampicilina-sulbactam [Urban C, 2003].

La sinergia *in vitro* de polimixina B y rifampicina se observó también frente a especies de *Proteus* y *Serratia marcescens*, intrínsecamente resistentes a la polimixina B [Urban C, 2003]. Incluso, esta combinación y también la asociación de trimetoprim-sulfametoxazol y colistina, fueron evaluadas con éxito en clínica humana para el tratamiento de infecciones por cepas multirresistentes de *Serratia marcescens* [Urban C, 2003], a pesar de que mostraban resistencia *in vitro* a estos antibióticos.

Recientemente se ha publicado un estudio *in vitro* que analizaba la eficacia microbiológica de las combinaciones de la polimixina B, imipenem y rifampicina frente a 8 cepas de *A. baumannii* multirresistentes (CMI a imipenem  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , polimixina B 1 - 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y rifampicina 2 -  $> 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se obtuvo sinergia con las combinaciones polimixina B-imipenem, polimixina B-rifampicina y la triple combinación de polimixina B-imipenem-rifampicina. Las combinaciones dobles alcanzaron el rango de

bactericidas en 7 de las 8 cepas, y la combinación triple fue bactericida en todas ellas [Yoon J, 2004].

El probable papel de las polimixinas en la sinergia es la permeabilización rápida de la membrana externa, que permitiría aumentar la penetración y la actividad de otros antibióticos, como imipenem o rifampicina [Yoon J, 2004]. La sinergia entre polimixinas y carbapenémicos debería esperarse cuando la resistencia a los carbapenémicos se debe a alteraciones de las porinas, pero no si existe actividad carbapenemasa significativa debido a betalactamasas clase B [Yoon J, 2004].

### 3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.

#### 3.1. APORTACIÓN DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES:

Los modelos experimentales han sido históricamente de gran importancia en el conocimiento y desarrollo del tratamiento antibiótico de las enfermedades infecciosas. Los estudios microbiológicos *in vitro* ofrecen una primera aproximación a la posible eficacia clínica de los tratamientos, cuantificando la actividad de un antibacteriano mediante los parámetros de la CMI, la CMB y las curvas de letalidad. Esta información resulta indispensable, pero tiene limitaciones importantes para predecir la eficacia terapéutica, ya que no contempla la variable de la actividad antimicrobiana en el curso del tiempo y los múltiples factores que se añaden en el modelo *in vivo* [Pennington JE, 1985]. De aquí se deduce la importancia que se concede a los estudios experimentales en animales, que permiten reproducir las infecciones que se dan en humanos y sus respuestas inmunitarias y representan un paso esencial entre las pruebas de sensibilidad antibiótica y los estudios clínicos [Joly-Guillou ML, 1997].

Durante la década de los 90 se ha definido con gran evidencia la importancia de los llamados parámetros farmacocinéticos/ farmacodinámicos (PK/PD) de los antibióticos como determinantes principales de su eficacia clínica y microbiológica *in vivo*. Estas medidas relacionan 2 aspectos: 1) los parámetros farmacocinéticos de los antibióticos, como una medida de la exposición al antibiótico, que incluyen la concentración pico en suero, el área bajo la curva (AUC), o el tiempo que los niveles séricos exceden ciertas



concentraciones; y 2) la actividad *in vitro* del antibiótico frente a la bacteria causante de la infección, como la CMI o CMB. Esta relación proporciona los parámetros farmacodinámicos de mayor significación: El cociente pico/CMI y el cociente 24-h AUC/CMI (para aminoglucósidos y quinolonas) y la duración del tiempo que la concentración excede la CMI expresado como porcentaje del intervalo de dosificación (para betalactámicos, macrólidos, clindamicina y linezolid) [Vogelman B 1988]. Estos parámetros PK/PD tienen un importante valor potencial como instrumentos para establecer regímenes de dosificación de los nuevos y conocidos antibióticos, para los nuevos patógenos y cepas resistentes, para el establecimiento de los cortes de sensibilidad, y para reducir el coste del desarrollo de un fármaco [Craig WA, 1998]. El papel de los modelos animales en la definición de estos parámetros ha sido decisivo.

Los estudios en modelos de infección animal y ensayos clínicos humanos han sugerido que los parámetros PK/PD de eficacia clínica y bacteriológica son relativamente similares en diferentes especies animales y el hombre [Craig WA, 2001]. Más problemática resulta la definición de estos parámetros para el uso de combinaciones de antibióticos o la evaluación del riesgo de aparición de resistencias. En algunas circunstancias, como es el caso de la utilización clínica de colistina, la dificultad estriba en la falta de estudios que hayan determinado sus parámetros PK/PD.

Los modelos de infección experimental en animales simulan las infecciones en humanos y permiten establecer “end-points” para las comparaciones estadísticas (UFC/gramo, porcentaje de hemocultivos positivos, mortalidad versus supervivencia, aparición de cepas resistentes, porcentaje de recaídas... [Fantin B, 1992]). Se han utilizado múltiples modelos experimentales para análisis farmacodinámico: Neumonía, meningitis, infección de partes blandas (muslo), bacteriemias, endocarditis, infecciones asociadas a cuerpo extraño, intraabdominales (peritonitis), osteomielitis, tuberculosis, queratitis, infecciones fúngicas... [Fuentes Martínez F, 2000].

Los animales utilizados con más frecuencia han sido ratones, ratas, conejos y cobayas. La elección de una especie u otra dependerá de que sean animales manejables (pequeños y poco agresivos), la susceptibilidad al agente infeccioso a estudiar, que debe ocasionar una infección reproducible y eventualmente fatal, según los objetivos del estudio, así como de la farmacocinética de los antibióticos a utilizar, la facilidad del modelo, el coste de

producción y mantenimiento, biología de los animales bien conocida, así como una respuesta biológica homogénea [Fuentes Martínez F, 2000; Ruiz A, 2001]. El uso de ratones como animales de experimentación tiene varias ventajas, como son su facilidad de utilización y reproducibilidad en el modelo de neumonía y el no requerir instalaciones muy complejas ni grandes espacios. De una forma u otra, todos los antibióticos han sido probados en algún modelo animal: Betalactámicos, quinolonas, macrólidos, aminoglicósidos, glicopéptidos, sulfonamidas, rifampicina, tuberculostáticos, viricidas, antifúngicos, etc.

Para establecer el perfil farmacocinético y del régimen de dosis en los modelos animales es fundamental tener en cuenta que el metabolismo de los fármacos es muy diferente en las diversas especies animales entre sí y respecto al hombre. No es correcto, por tanto, utilizar sistemáticamente en los animales las dosis e intervalos entre dosis empleados en humanos [Leggett JE, 1989], sino que se requieren aquéllas que proporcionan unos parámetros PK/PD que reproducen en la mayor medida posible lo que ocurre en los humanos y permiten una extrapolación razonable de los resultados. Todo ello es especialmente importante en el modelo experimental de neumonía en el ratón, ya que los roedores en general, y los ratones especialmente, tienen un metabolismo mucho más acelerado que el hombre, aproximadamente unas 12 veces [Giráldez A, 2001], lo que incide en una rápida desaparición de los niveles séricos; este metabolismo sigue una proporción inversa al tamaño del animal. La metodología empleada para ajustar al máximo la farmacocinética de los antibióticos de los animales a los humanos se basa en: 1. los modelos de farmacocinética humanizados, más caros y complejos, sólo utilizables en animales de grandes dimensiones (típicamente conejos) [Gavaldà J, 2000]; y 2. el uso de dosis mayores que las utilizadas en humanos y/o disminuir el intervalo de tiempo entre dosis en la mayoría de las moléculas.

Estas diferencias limitan en cierto modo la fiabilidad del modelo y la extrapolación de los resultados al hombre debe hacerse con precaución. En general se considera que de un resultado negativo en un modelo animal se puede inferir un resultado similar en humanos, y un resultado positivo en animales requiere mayor comprobación. Pese a todo, los estudios en animales son hoy en día imprescindibles para el análisis de la eficacia de un tratamiento antibacteriano y permiten sacar importantes conclusiones.

### 3.2. MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *ACINETOBACTER BAUMANNII*:

Globalmente existen muy pocos modelos animales de infección experimental por *Acinetobacter baumannii*. Se describió un modelo de infección sistémica o urinaria en el ratón en los años 80, que analizaba la eficacia terapéutica de tetraciclina y aminoglicósido + sulbactam [Obana Y, 1990; Joly-Guillou ML, 2002]. Este modelo cobra en la actualidad más importancia a raíz de la aparición de cepas de *A. baumannii* multirresistentes y la necesidad de investigar con nuevos antibióticos o combinaciones.

Recientemente ha sido puesto en marcha por dos grupos de investigadores diferentes un modelo de neumonía experimental por *A. baumannii* en ratones, que han aportado interesantes conclusiones sobre su tratamiento. Uno de los grupos, el del Dr. Claude Carbon, del hospital Claude Bernard de París utiliza ratones inmunodeprimidos y el otro, el grupo del Dr. Jerónimo Pachón del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, del que solicitamos su colaboración, puso en marcha el modelo en ratones inmunocompetentes. El uso de animales neutropénicos en los modelos experimentales se justifica porque los efectos farmacodinámicos son más evidentes en ausencia de los neutrófilos, y porque las infecciones por BGN suelen ser refractarias a los tratamientos [Leggett JE, 1989]. Sin embargo, se considera más apropiado el uso de modelos con animales inmunocompetentes, en los que el efecto postantibiótico es más evidente [Rodríguez-Hernández MJ, 2000], por su mayor similitud a los pacientes de las UCIs con neumonía asociada a ventilación mecánica por *A. baumannii* [Gavalda J, 1997]. La inoculación intratraqueal es una técnica que reproduce la microaspiración, simulando la patogénesis habitual de la neumonía por *A. baumannii*, y la técnica es simple y reproducible [Esposito AL, 1984]. Hasta la fecha no existen modelos experimentales animales de farmacocinética humanizada en las infecciones por *Acinetobacter*, que son los más recomendables y aconsejables siempre que sea posible [Gavaldà J, 2000].

El grupo francés fue el primero en aplicar los resultados de sinergia de ticarcilina-clavulánico y sulbactam obtenidos *in vitro* [Joly-Guillou ML, 1995] en un modelo experimental de neumonía. Utilizaron los antibióticos imipenem, sulbactam, ticarcilina, ticarcilina-clavulánico, y rifampicina, y varias de sus combinaciones. Inocularon a

ratones inmunodeprimidos 2 cepas de *A. baumannii* con diferente grado de sensibilidad a imipenem. Aplicaron un modelo de eficacia *in vivo* con administración de antibióticos cada 3 horas y sacrificios en cada tiempo, hasta 12 horas de tratamiento, y un modelo de supervivencia que analizaba la mortalidad en 5 días tras administrar 5 dosis de antibióticos a intervalos de 3 horas. Imipenem, sulbactam, imipenem con rifampicina, y ticarcilina-clavulanato-sulbactam produjeron un efecto bactericida en los ratones inmunodeprimidos infectados por una cepa sensible a imipenem (CMI y CMB = 0.5). La mejor supervivencia (93 %) se obtuvo con la combinación ticarcilina-clavulanato-sulbactam. Las combinaciones que incluían rifampicina obtuvieron una supervivencia  $\geq$  65 %. Frente a la cepa con sensibilidad disminuida a imipenem (CMI = 8, CMB = 32), sólo las combinaciones que incluían rifampicina y la combinación imipenem-sulbactam alcanzaron el rango de bactericidas. Las mejores tasas de supervivencia ( $\geq$  80 %) se obtuvieron con las combinaciones que incluían rifampicina y sulbactam. La conclusión final fue que combinaciones no clásicas de betalactámicos, inhibidores de betalactamasas y rifampicina deberían ser consideradas para el tratamiento de la neumonía por *A. baumannii* [Wolff M, 1999]. No observaron aparición de mutantes resistentes *in vivo*.

Posteriormente en el mismo modelo, estos autores analizaron la actividad *in vivo* de levofloxacino aislado o en combinación con imipenem o amikacina [Joly-Guillou ML, 2000]: Las combinaciones no mejoraron la eficacia de levofloxacino aislado, y el parámetro AUC/CMI fue el mejor predictor de eficacia, al igual que se había demostrado en otros patógenos con las fluoroquinolonas. A pesar de su buena actividad *in vitro*, la amikacina presentó escasa actividad *in vivo* y no mostró sinergia con los otros 2 antibióticos.

El otro grupo experimental del Dr. Pachón con experiencia en el tratamiento de la neumonía por *A. baumannii* en ratones utilizó ratones inmunocompetentes y un diseño que analizaba en paralelo la supervivencia y el aclaramiento bacteriano en sangre y pulmones. Compararon la eficacia de imipenem, doxiciclina y amikacina y las combinaciones de imipenem-amikacina y doxiciclina-amikacina. Utilizaron una cepa de *A. baumannii* sensible a los 3 antibióticos (CMI de imipenem = 0,12). Observaron que la combinación imipenem-amikacina no mejoró los resultados obtenidos por imipenem en monoterapia, lo que reflejaba la falta de sinergia hallada *in vitro* en las curvas de letalidad

para esta combinación. La combinación doxiciclina-amikacina mostró sinergia en las curvas de letalidad y en el modelo *in vivo* mejoró los resultados de cada antibiótico por separado, aunque no fue más efectiva que el imipenem aislado, concluyendo que podría ser una alternativa a dicho tratamiento [Rodríguez-Hernández MJ, 2000].

Con posterioridad compararon la eficacia de sulbactam e imipenem en el mismo modelo en ratones y además en un modelo de endocarditis en conejos. Utilizaron la misma cepa de *A. baumannii* sensible a imipenem y sulbactam (CMI = 4). Observaron que el sulbactam fue tan eficaz como imipenem en términos de supervivencia, y aclaramiento bacteriano de sangre y pulmones [Rodríguez-Hernández MJ, 2001].

Sin embargo, la información existente es todavía muy escasa en lo que respecta al tratamiento de las infecciones por cepas multirresistentes, la eficacia comparativa de los diversos antibióticos y sus combinaciones frente a cepas con alta resistencia al imipenem y la actividad de la colistina, una de las mayores esperanzas para la terapia alternativa de las infecciones por cepas multirresistentes.

### 3.3. INVESTIGACIÓN CON COLISTINA EN MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES:

En lo que se refiere al estudio de la colistina en modelos de infección experimental, ya se ha comentado la falta de datos al respecto. Los únicos datos se refieren a su utilización en ratones, en modelos de protección utilizando *Pseudomonas aeruginosa* [Davis SD, 1975; Obana Y, 1985], y determinación de dosis letal (DL<sub>50</sub>) en peritonitis experimental [Smith IM, 1970], poco útiles para la práctica clínica. Recientemente se ha analizado su actividad en un modelo experimental de endocarditis por *A. baumannii* en conejos, obteniendo que fue tan efectiva como imipenem en el aclaramiento de la bacteriemia, pero menos efectiva en las vegetaciones frente a las cepas con resistencia moderada [Rodríguez-Hernández MJ, 2004].

## 4. LA ENDEMIA DE *A. BAUMANNII* EN EL HOSPITAL DE BELLVITGE (1992-1996).

Hasta finales del año 1996 se detectaron 1126 pacientes con colonización o infección por cepas de *A. baumannii* multirresistente (Figura 1), constituyendo la primera causa de infección nosocomial en nuestras unidades de cuidados intensivos. Esta situación se produjo de forma similar en otros hospitales. El manejo clínico-epidemiológico de este problema en nuestro hospital se acompañó de diversos estudios destinados a clarificar su epidemiología, algunos aspectos de su patogenia e idoneidad del tratamiento.

El brote epidémico como tal se identificó en Octubre de 1992, cuando se detectó un repentino aumento en el número de pacientes con muestras clínicas positivas para *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Los pacientes predominaban en las UCIs, pero también en Reanimación de Urgencias y en el Servicio de Traumatología. De hecho, ya durante 1991 se habían detectado algunos casos aislados, con menor grado de multirresistencia.

En la segunda mitad de 1993 apareció concomitantemente en nuestro hospital un brote epidémico nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido (*blee*), que se desarrolló fundamentalmente en las UCIs. En la investigación de este brote epidémico se realizó un estudio de incidencia de portadores rectales de *K. pneumoniae blee* [Peña C, 1997]. Sorprendentemente, pudimos observar como un número considerable de estos pacientes era portador rectal concomitante de *A. baumannii*. De esta forma, nos concienciamos de la importancia de la colonización digestiva en la epidemiología de las infecciones por *A. baumannii*, circunstancia que hasta ese momento no estaba bien reflejada en la literatura médica. Basados en esta experiencia se pusieron en marcha varios estudios prospectivos de identificación de portadores y su relación con las infecciones clínicas en los pacientes ingresados en las UCIs, que nos proporcionaron diversas conclusiones:

-Los pacientes actúan como reservorio en la cadena epidemiológica de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. De forma muy llamativa la colonización rectal era muy precoz, produciéndose en el 70 % de los casos en el curso de la primera semana de estancia en la UCI [Corbella X, 1996-1].

-La probabilidad de permanecer libre de colonización por *A. baumannii* a las tres semanas de estancia en la UCI fue del 30 % [Corbella X, 1996-1].

-El factor de riesgo más significativo para colonizarse por *A. baumannii* fue la cantidad de manipulaciones requeridas en el proceso asistencial de los pacientes [Corbella X, 1996-1].

-La colonización puede detectarse a nivel rectal, faríngeo o cutáneo, en un 75 % de los casos con la práctica de un frotis de cualquiera de las localizaciones, en un 90 % con 2 y en un 100 % con la práctica de los tres frotis [Ayats J, 1997].

- El personal sanitario desempeña un papel decisivo en la extensión y mantenimiento del brote epidémico, actuando como portador transitorio y colonizando nuevos pacientes mediante transmisión cruzada en relación con el incorrecto lavado de manos y uso de los guantes de protección. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en el caso de otros microorganismos nosocomiales de características epidémicas como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), el personal no representa un reservorio permanente en los brotes por *A. baumannii* [Ayats J, 1997].

-Aproximadamente un 50 % de los pacientes desarrollan muestras clínicas positivas y la mitad de ellos infecciones, en los cuales puede detectarse previamente colonización rectal, cutánea o faríngea [Ayats J, 1997].

Durante el período 1993-1995 las infecciones por *A. baumannii* fueron las más frecuentes en nuestro hospital entre las infecciones nosocomiales en las UCIs (Tabla 1). Entre las diversas localizaciones, *A. baumannii* fue el primer agente etiológico causante de infección respiratoria, la segunda causa de infección de catéter vascular y la primera causa de infección de herida quirúrgica (Tabla 2).

Entre los aislamientos, se pudieron establecer tres patrones de antibiograma, que se correspondieron fundamentalmente con tres clones específicos (A, B y C) en los estudios realizados de epidemiología molecular. El denominado clon A fue muy predominante y altamente resistente a los antibióticos (aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas, cotrimoxazol y la mayoría de betalactámicos), con la excepción de sulbactam, imipenem y colistina.

En este período se estableció una notable restricción de cefalosporinas en las UCIs para combatir el brote debido a *Klebsiella pneumoniae-blee*, lo que determinó un consumo muy importante de imipenem, el antibiótico más eficaz también para las infecciones producidas por *A. baumannii*. Uno de los aspectos a destacar, tras los estudios de sensibilidad *in vitro*

desarrollados en el laboratorio y la experiencia clínica acumulada, es que el sulbactam podía significar una alternativa terapéutica razonable para las infecciones de gravedad discreta o moderada y permitía así racionalizar el uso de imipenem [Corbella X, 1998].

Estas observaciones llevaron a la aplicación de una serie de medidas para el control del brote epidémico. Básicamente consistieron en: Identificación de los aislamientos en el Laboratorio de Microbiología, aislamiento precoz de los pacientes, puesta en marcha de un sistema organizado de aislamiento en todo el hospital para microorganismos multirresistentes, implementación de las medidas de barrera, incluyendo un correcto lavado de manos, una política restrictiva y ordenada de los guantes y uso de las batas, así como la formación continuada del personal sanitario por servicios, con especial énfasis en el personal de los Servicios de Cuidados Críticos. Derivado de todo ello, se produjo un descenso moderado en el número de nuevos casos de *Acinetobacter baumannii*.

En 1996 desarrollamos en nuestro hospital una nueva técnica para el estudio de la contaminación ambiental. El nuevo sistema de recogida de las muestras consistía en el uso de gasas estériles humedecidas en caldo BHI (brain heart infusión) en lugar de los escobillones habituales, con la hipótesis de que con este sistema podría conseguirse un mayor arrastre y, por tanto, una muestra más representativa y una mejor detección. Hicimos un estudio comparativo utilizando simultáneamente escobillones y gasas para comprobar las posibles diferencias entre ambos sistemas de recogida de muestras. El análisis de los resultados demostró que el grado de positividad fue muy superior con la utilización de las gasas con caldo [Corbella X, 1999]. La constatación de este elevado grado de contaminación ambiental, previamente desconocido para nosotros, nos concienció de la relevancia epidemiológica de dicha contaminación en la evolución de nuestro brote epidémico y de la necesidad de intervenir urgentemente sobre el proceso de limpieza e higiene de los procedimientos de nuestras UCIs.

Así en brotes de pequeña magnitud producidos por la contaminación puntual de un objeto concreto (respirador, colchones, sueros, etc.), el grado de colonización ambiental suele ser notablemente inferior al detectado en una UCI con una situación de endemia establecida de años de evolución. En general, todos aquellos objetos circundantes de un paciente colonizado, sometido a continuas manipulaciones por parte del personal



sanitario, tienen un riesgo elevado de estar contaminados (p.e. monitores, manguitos de presión, paneles de bombas de infusión o de respiradores, etc.).

La implementación de los protocolos de limpieza e higiene hospitalaria para los diversos procedimientos no logró hacer desaparecer la amplia contaminación ambiental repetidamente objetivada. Las circunstancias estructurales y funcionales de nuestras UCIs, sometidas a una elevada presión asistencial (cifras medias de ocupación del 98 %) y la dificultad para mantener el cumplimiento de dichos protocolos en un máximo nivel de exigencia de forma prolongada, fueron elementos determinantes en la persistencia de nuestra endemia.



**II.**

**JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO  
E HIPÓTESIS DE TRABAJO**



## II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La gran frecuencia de las infecciones por *A. baumannii*, la dificultad en la evaluación clínica de su morbi-mortalidad, y las escasas terapéuticas disponibles a causa de la multirresistencia del microorganismo comportan un problema de salud pública y de manejo clínico de primera magnitud, que impulsó la elaboración del presente proyecto.

En el contexto de la gran y sostenida epidemia de *A. baumannii* que afectaba el Hospital de Bellvitge desde 1992, la aparición en enero de 1997 de cepas con resistencia a carbapenémicos y su rápida diseminación en los meses siguientes, constituyó un motivo de extraordinaria preocupación.

El conocimiento con detalle de la epidemiología y factores de riesgo específicos asociados a los estados de colonización clínica o infección por estas cepas carbapenem resistentes (CR) podría proporcionar los fundamentos para un programa más efectivo de control de la epidemia. La comparación entre esta epidemiología de las cepas carbapenem sensibles (CS) y CR se presentaba como el método más idóneo para profundizar en este conocimiento. La puesta en marcha de un programa específico de control en base a estos resultados, y una política acompañante de restricción del consumo de carbapenémicos, podrían ser eficaces en el control de la epidemia y en la reversión del fenómeno del predominio de las cepas CR. Un estudio pormenorizado de la epidemiología molecular de las cepas de *Acinetobacter baumannii* con resistencia a carbapenémicos favorecería la comprensión de su aparición y en consecuencia sus posibles soluciones; estas cepas CR podían corresponder a los mismos clones de las cepas previamente detectadas CS o pertenecer a otros clones de nueva incorporación en el hospital.

El conocimiento clínico detallado de estas infecciones producidas por cepas CR contribuiría sin duda a la mejor definición de su morbi-mortalidad y a dimensionar la magnitud del problema terapéutico. En el máximo exponente de dificultad se situaba la neumonía asociada a ventilación mecánica producida por cepas CR, cuya única opción de tratamiento era la colistina sistémica basándose en los resultados del antibiograma *in vitro*. La información disponible al respecto confería dudas muy consistentes sobre el

grado de eficacia y seguridad de este tratamiento frente a una infección acompañada de tan elevada mortalidad. La búsqueda de alternativas terapéuticas mediante estudios de combinaciones de antibióticos *in vitro* y la puesta en marcha de un modelo experimental para analizar su eficacia se perfilaban como la sistemática más adecuada para abordar la situación.

El modelo de neumonía experimental en el ratón podría proporcionar una información fiable y una base racional para ofrecer nuevas alternativas terapéuticas en la infección humana. Esta información resultaría de mayor solidez que la aportada por la investigación *in vitro* aislada. La neumonía se escogía como modelo por corresponder a la infección humana de mayor gravedad y por estar el modelo bien desarrollado previamente por otros grupos de investigadores. El modelo de neumonía en el ratón inmunocompetente parecía el más adecuado por simular mejor las circunstancias de nuestros pacientes de las UCIs con NVM; en este sentido parecía adecuado utilizar las cepas más significativas de nuestra epidemia para el estudio del modelo, incluyendo grados diversos de sensibilidad o resistencia a carbapenémicos. Este modelo proporcionaba resultados muy homogéneos y repetibles y el uso de ratones como animales de experimentación comportaba ciertas ventajas, como son su facilidad de utilización y el no requerir instalaciones ni grandes espacios. En cuanto a los antibióticos a investigar, parecía que lo más apropiado sería aplicar en el modelo los antibióticos utilizados en la práctica clínica habitual según antibiograma (imipenem, sulbactam, tobramicina, rifampicina y colistina), bien en monoterapia o bien en combinaciones diversas. La comparación entre sí de los antibióticos en monoterapia en la infección producida por cada una de las cepas, así como la distinta actividad antibacteriana de cada antibiótico entre las cepas con diferentes grados de sensibilidad, permitiría adquirir una sólida información sobre la aportación de cada uno de los antibióticos. El análisis de la eficacia de la colistina en comparación con los otros antibióticos frente a la cepa sensible a todos ellos resultaría de particular interés para delimitar el papel de la colistina frente a las infecciones ocasionadas por cepas CR. El papel de imipenem frente a las infecciones por cepas con sensibilidad intermedia al antibiótico también debería ser evaluado. Finalmente, las combinaciones diversas podían ofrecer un efecto sinérgico y en particular, según los estudios previos *in vitro*, las que incluían rifampicina se presentaban como muy prometedoras en el tratamiento de las cepas CR y a lo mejor suponían mejores alternativas que la monoterapia con

colistina. Se presumía que esta eficacia prevendría del fenómeno de desarrollo de resistencia a la rifampicina. En última instancia, pensábamos que los resultados obtenidos del modelo podrían ser trasladados al tratamiento de la infección humana.

En concreto, las hipótesis de trabajo que se plantearon inicialmente en el presente proyecto fueron las siguientes:

1. La epidemiología de las cepas de *Acinetobacter baumannii* sensibles o resistentes a carbapenémicos podría ser diferente, y por lo tanto las medidas de control nosocomial deberían adecuarse a cada caso. De forma similar a otras bacterias gram negativas multirresistentes, podría ser posible que una política de antibióticos que restringiera el uso de carbapenémicos ayudase a controlar el brote.
2. La aparición de cepas resistentes a carbapenémicos podría ser resultado de la introducción de cepas externas al hospital o fruto de mutaciones de las cepas preexistentes.
3. Las repercusiones clínicas (morbimortalidad) de las cepas sensibles o resistentes a carbapenémicos podrían ser diferentes, por diferente grado de virulencia o porque para el tratamiento de las cepas multirresistentes, incluyendo resistencia de alto nivel a carbapenémicos, la única posibilidad terapéutica era la colistina, con la que no existía experiencia clínica reciente.
4. El modelo experimental de neumonía en ratones podría ser útil para analizar la eficacia de distintos antibióticos o combinaciones, y permitir su comparación. Podría permitir comparar la eficacia antibacteriana de los diferentes antibióticos disponibles según antibiograma frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* con diferentes grados de resistencia, así como analizar la eficacia antibacteriana real de la colistina.
5. El modelo experimental animal podría dar a conocer algún antibiótico o combinación que fueran efectivos en el tratamiento de las cepas de *Acinetobacter baumannii* con alto nivel de resistencia a carbapenémicos. La intención última del presente proyecto era aplicar en humanos la combinación antibiótica más activa en estos casos y conocer su eficacia real.





**III.**

**OBJETIVOS**



### III. OBJETIVOS.

#### 1. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO PRELIMINAR (AÑOS 1997-1998).

El objetivo inicial fue conocer y analizar exhaustivamente la situación epidemiológica y las repercusiones clínicas de la endemia por *A. baumannii* en nuestro hospital, a partir de la aparición en Enero de 1997 y la posterior diseminación hasta hacerse prevalentes, de cepas con resistencia a carbapenémicos. Asimismo se quería analizar los resultados de la puesta en marcha de un programa de control y un protocolo de seguimiento específicos.

Los objetivos concretos de este estudio clínico-epidemiológico fueron:

- 1.1 Analizar la epidemiología clínica de los pacientes infectados o colonizados por los diferentes clones de *A. baumannii* sensibles y resistentes a carbapenémicos y los factores de riesgo para su adquisición.
- 1.2. Caracterizar, desde el punto de vista microbiológico mediante técnicas de tipificación molecular, los clones con resistencia a carbapenémicos involucrados en la endemia y su posible relación con los clones sensibles prevalentes en el período previo 1992-1996, e investigar en ellos la presencia de carbapenemasas.
- 1.3. De acuerdo con los factores de riesgo obtenidos en el análisis epidemiológico, investigar la eficacia clínica de la aplicación de un programa de control de infección con varios componentes para intentar controlar la endemia.
- 1.4. Dimensionar las repercusiones clínicas, mortalidad asociada y dificultades terapéuticas de las infecciones y particularmente de la neumonía por *A. baumannii* con resistencia a carbapenémicos.
- 1.5. Estudiar la actividad antibiótica bactericida *in vitro* frente a estos clones mediante curvas de letalidad, en la búsqueda de posibles alternativas terapéuticas.

## 2. MODELO EXPERIMENTAL (AÑOS 1998-2000).

Basándose en las hipótesis de trabajo planteadas, el objetivo principal del modelo experimental fue analizar comparativamente la eficacia antibacteriana *in vivo* de los diferentes antibióticos implicados en el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii*, ya sea administrados de forma aislada o en combinación, en búsqueda de las posibles alternativas terapéuticas para la infección humana por cepas multirresistentes.

Los objetivos concretos del modelo experimental fueron:

- 2.1. Desarrollo y estandarización del modelo de neumonía por *A. baumannii* en el ratón, utilizando cepas sensibles y con grado variable de resistencia a carbapenémicos, correspondientes a los clones de mayor relevancia en la epidemia de nuestro hospital (A, D y E).
- 2.2. Análisis comparativo de la eficacia antibiótica en monoterapia frente a la neumonía por cepas sensibles y resistentes de los antimicrobianos de mayor interés clínico: Betalactámicos (imipenem y sulbactam), aminoglucósidos (tobramicina), rifampicina y colistina.
- 2.3. Análisis comparativo de la eficacia antibiótica de diferentes combinaciones de estos antibióticos frente a la neumonía por cepas de *Acinetobacter baumannii* sensibles y resistentes.

## 3. REPERCUSIONES CLÍNICAS DERIVADAS DE LA APLICACIÓN DEL MODELO (AÑOS 2000-2001).

En este apartado el objetivo era replantear las pautas de tratamiento en los pacientes con infecciones graves por *A. baumannii*-multirresistente, sobre la base de las conclusiones obtenidas del análisis de los resultados del modelo experimental. Si se demostraba mayor eficacia en el modelo experimental de las combinaciones, se propondría la utilización de la o las combinaciones más activas en lugar de colistina frente a estas infecciones causadas por cepas resistentes a todos los antibióticos, incluidos carbapenémicos, y con sensibilidad *in vitro* exclusiva a la colistina.

Además, según la experiencia clínica obtenida se plantearía si se debería revalorar la patogenicidad de estas infecciones y la alta tasa de mortalidad atribuible a la neumonía por *Acinetobacter baumannii*, y finalmente discutir la necesidad de un tratamiento empírico precoz en las UCIs dirigido también contra estas cepas multirresistentes.

Los objetivos clínicos concretos tras la aplicación del modelo fueron:

- 3.1. Confirmar la eficacia clínica y microbiológica de la combinación más activa obtenida en el modelo animal en el tratamiento de la neumonía y otras infecciones graves por *A. baumannii*- multirresistente.
- 3.2. Evaluar la mortalidad atribuible real de la neumonía asociada a ventilación mecánica por *A. baumannii* y la necesidad de introducir la colistina en la antibioterapia empírica de rutina en las UCIs con endemias o brotes epidémicos por estos microorganismos.



**IV.**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**





#### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS.**

##### 1. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1: ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICO PRELIMINAR (1997-1998).

###### 1.1. FACTORES DE RIESGO DE COLONIZACIÓN / INFECCIÓN POR *A. BAUMANNII* RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS:

El estudio epidemiológico y de intervención sobre control de infección se realizó en el Hospital de Bellvitge, un hospital terciario de 850 camas, que atiende de forma exclusiva a población adulta, y con un área de influencia aproximada de 1,5 millones de personas. Durante el periodo de estudio disponía de 4 unidades de cuidados intensivos (UCIs) con un total de 1200 pacientes/año.

El equipo de Control de Infección Nosocomial de nuestro hospital se componía de 2 médicos clínicos y 4 enfermeras epidemiólogas, con la colaboración de un facultativo del Laboratorio de Microbiología. En una reunión diaria, el laboratorio de Microbiología proporcionaba un informe de los pacientes con aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en algún frotis rutinario o muestra clínica, detectándose así los nuevos casos. Tras la correspondiente valoración clínica, se catalogaba cada caso de colonización o infección, se recogían los datos clínico-epidemiológicos, se aplicaban las medidas de aislamiento y se aconsejaba un tratamiento antibiótico si el caso lo requería. Con posterioridad se realizaba un seguimiento clínico, con frotis de control rutinarios, ajuste de la pauta antibiótica al antibiograma y comprobación de una correcta evolución clínica.

La instauración inicial de las medidas de barrera y de los protocolos de aislamiento no habían logrado detener la progresión del brote epidémico. La información derivada de los diversos estudios realizados en nuestro hospital, como la importancia del enfermo y de la contaminación ambiental como reservorios, el papel de la transmisión cruzada entre enfermos a través del personal sanitario y la importancia de las diferentes técnicas de cultivo ambiental, se habían ido incorporando al programa de control. De esta manera se determinaba el refuerzo de unas u otras medidas epidemiológicas: Se habían

añadido la decontaminación ambiental, la reordenación estructural y funcional de las UCI incluyendo su cierre secuencial, la educación del personal sanitario de las UCIs y modificaciones en la política de antibióticos (con restricciones de antibióticos puntuales).

El curso de la epidemia mostraba fluctuaciones, disminuyendo cuando se intensificaban las medidas, pero el efecto invariablemente se agotaba en un cierto tiempo. En estas circunstancias, en enero de 1997 aparecieron en el hospital cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos, lo cual nos llevó a replantear toda la política de control de infección, integrando todas las intervenciones en un solo programa de estudio e intervención clínico-epidemiológico.

El programa consistió en un estudio prospectivo, longitudinal, e intervencional realizado durante 3 periodos consecutivos de 6 meses cada uno en las UCIs del Hospital de Bellvitge. De forma prospectiva, durante los primeros 6 meses del estudio, a partir de enero de 1997, se identificaron en las UCIs los pacientes portadores de *A. baumannii* sensible o resistente a imipenem mediante frotis rectal. Se registraron diversas variables clínicas, analíticas, epidemiológicas y microbiológicas para identificar los potenciales factores de riesgo para el desarrollo de muestras clínicas positivas en los 2 grupos de pacientes con *A. baumannii* sensible y resistente a carbapenémicos.

Se utilizaron diferentes técnicas de análisis estadístico para comparar los potenciales factores de riesgo entre los grupos de *A. baumannii* sensible y resistente a carbapenémicos expuestas con detalle en el artículo publicado [Corbella X, 2000].

## 1.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CLONES DE LA ENDEMIA Y ESTUDIO DE CARBAPENEMASAS:

En el capítulo microbiológico, se determinó inicialmente la sensibilidad antibiótica (CMI y CMB) de las diferentes cepas mediante el método de macrodilución estándar en caldo de Mueller-Hinton por diluciones seriadas a la mitad [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000]. Posteriormente se realizó el estudio clonal mediante tipificación molecular de las diferentes cepas con espectros de sensibilidad

antibiótica diferentes (antibiotipos) en el laboratorio de Microbiología de nuestro hospital, a través del polimorfismo del ADN cromosómico, aplicando electroforesis en gel por campos pulsátiles. Estas técnicas están descritas con detalle en la sección de “Material y métodos” del artículo publicado [Corbella X, 2000].

Por último, se intentó identificar la presencia de carbapenemasas y su secuenciación, en los clones D y E que mostraban resistencia a carbapenémicos. Se investigaron la presencia de genes codificantes de carbapenemasas ya conocidas de las clases B (metalo-betalactamasas tipo VIM- y IMP-) y D (zinc-independientes tipo OXA) mediante técnicas de hibridación molecular utilizando “primers” específicos y amplificación con reacción en cadena de la polimerasa [Dalla-Costa LM, 2003].

### 1.3. INTERVENCIÓN EPIDEMIOLÓGICA:

Dentro del programa de estudio e intervención clínico-epidemiológico instaurado en nuestro hospital, a partir del 2º periodo (Julio-Diciembre 1997), y según los factores de riesgo identificados en el primer periodo, se implementó el programa de control y se pusieron en marcha una serie de medidas adicionales:

- vigilancia rigurosa del adecuado cumplimiento de las medidas de barrera, los protocolos de limpieza e higiene para los diversos procedimientos hospitalarios.
- programas intensivos de formación continuada al personal de las UCIs.
- rediseño estructural parcial de las unidades hospitalarias, con mayor facilidad para el lavado de manos en el interior de las habitaciones.
- cierre secuencial de todas las UCIs para lograr su máxima decontaminación.
- restricción del uso de carbapenémicos. En su lugar, como tratamiento antibiótico de amplio espectro, se recomendó el uso de una cefalosporina de 4ª generación (cefepime) o una penicilina antipseudomónica con un inhibidor de betalactamasa (piperacilina-tazobactam), preferiblemente con un aminoglicósido.

Para identificar las diferencias en la evolución de la endemia antes y después de las intervenciones de control durante los 3 periodos se utilizaron diferentes técnicas de análisis estadístico, detalladas en el artículo publicado [Corbella X, 2000].

#### 1.4. REPERCUSIONES CLÍNICAS DE LA ENDEMIAS:

En el contexto del estudio epidemiológico y de identificación de los factores de riesgo para la colonización/infección por cepas de *Acinetobacter baumannii* CR (ver punto 1.1 de esta sección), se analizaron el espectro clínico de dichas infecciones y su morbimortalidad. Se analizaron las diferentes localizaciones de infección por los 2 tipos de cepas, y las repercusiones de la carbapenem-resistencia de *A. baumannii* sobre el alargamiento de la estancia y la mortalidad.

#### 1.5. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA *IN VITRO* FRENTE A LOS CLONES DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* CARBAPENEM-RESISTENTES:

Para profundizar en el conocimiento de la sensibilidad *in vitro* de las cepas multirresistentes y proporcionar la base de nuevas alternativas terapéuticas de estas infecciones, se pusieron en marcha en el Laboratorio de Microbiología de nuestro hospital diversos estudios de actividad antibacteriana.

En el estudio inicial, se investigó la actividad bactericida *in vitro* de varios antibióticos y su posible sinergia en combinación frente a cepas de los clones D y E (CMI imipenem 8 y 512 µg/mL respectivamente). Se utilizó el método de curvas de letalidad, empleando los antibióticos a concentraciones diversas y alcanzables en suero en humanos a las dosis habituales. Se estudiaron ticarcilina (a dosis de 64 µg/mL), cefepime (a dosis de 8 µg/mL), imipenem (a dosis de 4 µg/mL), sulbactam (a dosis de 16 µg/mL), tobramicina (a dosis de 8 µg/mL), amikacina (a dosis de 16 µg/mL), y colistina (a dosis de 4 µg/mL).

En la segunda serie de experimentos *in vitro* utilizando de nuevo el método de curvas de letalidad, se investigó la actividad de colistina a varias concentraciones y la de distintas combinaciones de 2 antibióticos frente al clon E. La colistina se investigó a dosis de 4, 8, 16 y 32 x CMI. Además se investigaron las combinaciones de imipenem con

sulbactam, tobramicina y rifampicina, de sulbactam con tobramicina y rifampicina, de tobramicina con rifampicina y de colistina con rifampicina a concentraciones de 1/2 x y 1/4 x CMI de cada antibiótico.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2: MODELO EXPERIMENTAL (1998-2000).

El diseño de los experimentos está detalladamente descrito en los artículos publicados. A continuación se pormenorizan algunos aspectos.

### 2.0. BASES DEL MODELO EXPERIMENTAL:

#### 2.0.1. Instalaciones:

Para la puesta en marcha y posterior desarrollo del modelo experimental se ha contado con la infraestructura del Laboratorio de Infección Experimental del Hospital Universitari de Bellvitge, en el Campus de Bellvitge de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, dotado con todo el utillaje necesario para la experimentación con animales y microbiológica y reconocido por la Generalitat de Catalunya como “Grup de Recerca en Patologia Infecciosa i Sensibilitat Antibiòtica”.

Además se ha dispuesto de las instalaciones del Estabulario del Campus de Bellvitge de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, y del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge, tanto para la logística como para las tareas en que ha sido necesario.

Finalmente se ha obtenido la colaboración de la Sección de Cromatografía de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona para la determinación de los niveles en sangre de aquellos antibióticos en que ha sido necesaria la técnica de HPLC (cromatografía líquida de alta precisión).

#### 2.0.2. Personal disponible y medios económicos:

Para la puesta en marcha del modelo experimental se ha dispuesto económicamente de una beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 98/0525) dotada con 6.705.000 pts., de un becario con dedicación exclusiva al proyecto y del personal que forma parte del Laboratorio de Infección Experimental del Campus de Bellvitge de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona (2 licenciados y 1 técnico).

Se realizó el “Curso de Formación para personal investigador usuario de animales para experimentación y otras finalidades científicas” en la Universitat Autònoma de Bellaterra (80 horas).

### 2.0.3. **Estancia de preparación en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla:**

Gracias a la amabilidad del Dr. Jerónimo Pachón y sus colaboradores del Laboratorio de modelos experimentales, del Servicio de Enfermedades Infecciosas, pudimos realizar una corta estancia en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla para aprender las técnicas involucradas en el proyecto referentes a la manipulación de los ratones.

## 2.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO:

### 2.1.1. **Procedimientos microbiológicos:**

#### 2.1.1.1. Selección de las cepas:

Para producir la neumonía en el modelo experimental se seleccionaron 3 cepas de *A. baumannii* correspondientes a los 3 clones (A, D y E) mayoritarios en los aislamientos de la epidemia de nuestro hospital, con diferente espectro de sensibilidad antibiótica a los carbapenémicos: Cepa sensible (clon A), cepa con sensibilidad intermedia (clon D) y cepa con alta resistencia y únicamente sensible a colistina (clon E). Esta selección suponía un fiel reflejo del diferente grado de dificultad experimentado en la práctica clínica en el tratamiento de los pacientes y permitía la posibilidad de analizar comparativamente la eficacia de los diversos antibióticos.

La cepa del clon A fue aislada de una úlcera de decúbito de un paciente en julio de 1997, la del clon D se obtuvo de un cepillado bronquial en un paciente con neumonía en

enero de 1997 y la del clon E correspondía a una muestra de LCR de un paciente con ventriculitis atendido en julio de 1997.

La información referente a las CMI y CMB de cada clon se detalla en la sección de Resultados.

#### 2.1.1.2. Curvas de letalidad:

Frente a las cepas utilizadas en el modelo, y tal como se especifica en los artículos publicados, se estudió mediante curvas de letalidad la actividad bactericida *in vitro* de los antibióticos utilizados de forma aislada [Montero A, 2002] y en diferentes combinaciones [Montero A, 2004].

Se utilizó un inóculo aproximado de  $10^5$  UFC/mL. Para los antibióticos aislados, se utilizaron concentraciones de 1/4x CMI, 1/2x CMI, 1x CMI y 2x CMI según lo recomendado de forma habitual. Además, en el caso de la colistina, y dada la baja actividad bactericida observada a estas concentraciones, se utilizaron concentraciones superiores de 4x, 8x, 16x y 32x CMI. Se realizaron cultivos cuantitativos a las 0, 6 y 24 horas de incubación. Se determinó la actividad bactericida de un antibiótico, definida como letalidad del 99,9 % del inóculo final, como una disminución en el número de colonias (UFC/mL)  $\geq 3 \log_{10}$  a las 6 y 24 horas respecto al inóculo inicial [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992].

Para analizar la posible sinergia de la combinación de 2 antibióticos, seleccionamos varias concentraciones subinhibitorias de cada uno de ellos, de forma que las concentraciones utilizadas en este estudio *in vitro* fueran “alcanzables” en suero en humanos. Así las concentraciones variaron entre 1/2x a 1/32x CMI dependiendo de las CMI de las cepas y las concentraciones posibles en suero de cada antibiótico. Los resultados de las combinaciones de antibióticos se interpretaron comparándolos con el antibiótico en solitario más activo. Se definió efecto sinérgico o sinergia como el aumento  $\geq 2 \log$ s en la letalidad de la combinación respecto al antibiótico en solitario más activo, indiferencia como un cambio menor de 1 log (aumento o descenso) y antagonismo como un descenso en la letalidad de la combinación  $\geq 2 \log$ s [Lorian V, 1996]. El límite de detección de la técnica fue de  $1 \log_{10}$ UFC/mL.

### 2.1.1.3. Preparación del inóculo bacteriano:

A partir de alicuotas congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se procedió a su incubación en placas de agar-sangre y a las 24 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  se tomaron 3 ó 4 colonias y se resuspendieron en medio líquido TSB (caldo de soja-tripticosa). Se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un baño de agitación continua. Tras 4 horas de incubación se procedió a su centrifugación y posterior reconstitución con suero fisiológico estéril hasta conseguir una turbidez de 1 McFarland, medida por espectrofotometría, que correspondía a una concentración aproximada de bacterias de  $5 \times 10^8$  UFC/mL.

### 2.1.2. Procedimientos farmacocinéticos:

Antes de iniciar la investigación microbiológica con los diferentes antibióticos, se procedió al ensayo de diferentes dosis de antibióticos y al análisis de su concentración medida en suero de los ratones, tomando como referencia otros estudios experimentales publicados anteriormente. Debido a las diferencias en el metabolismo entre ratones y humanos fue necesario determinar las dosis adecuadas de cada uno de los antibióticos en el modelo animal, cuya farmacocinética fuera lo más similar posible a la obtenida en humanos con las dosis habituales.

De esta manera fue necesario determinar la farmacocinética de los antibióticos imipenem, sulbactam, tobramicina, rifampicina y colistina mediante la investigación de sus niveles en sangre. Se utilizaron diferentes técnicas microbiológicas, bioquímicas y de cromatografía según cada fármaco.

A continuación se enumeran los diversos procedimientos farmacocinéticos, que se describen con detalle en el artículo de las monoterapias [Montero A, 2002]:

#### 2.1.2.1. Metodología para la obtención de las muestras a analizar:

Se utilizaron grupos de 21 ratones sanos, a los cuales se administró la dosis del antibiótico a estudio por vía intraperitoneal. Se agruparon los animales en grupos de 3 a diferentes tiempos tras la administración del antibiótico, dependiendo de su vida media prevista y para intentar abarcar toda la curva farmacocinética. A la hora prevista, se anestesiaron los animales y a través de una incisión en el plexo periorbitario se obtuvo



sangre, que se centrifugó y se separó el suero. Debido a la inestabilidad conocida de las muestras con imipenem [Gravallese DA, 1984] y por el desconocimiento que existía en este punto sobre la colistina, los sueros para la determinación de estos 2 antibióticos se analizaron inmediatamente tras su obtención. Para la determinación del resto de antibióticos, las muestras fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 2.1.2.2. Determinación de los niveles en suero de los antibióticos:

Cada muestra obtenida de los ratones en los diferentes tiempos se dividió en 2 alícuotas, que fueron analizadas por duplicado. Se utilizaron diferentes métodos para el estudio de cada antibiótico:

- ✓ Imipenem: La concentración se determinó mediante el método microbiológico de bioensayo, utilizando la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como el estándar de referencia.
- ✓ Sulbactam: Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en las instalaciones de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona, y utilizando una variación de la técnica ya publicada [Haginaka J, 1985] tras su validación en el laboratorio.
- ✓ Tobramicina: Se empleó el inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA).
- ✓ Rifampicina: Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), igualmente en las instalaciones de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona, y utilizando una variación de la técnica ya publicada [Swart KJ, 1992 ] tras su validación en el laboratorio.
- ✓ Colistina: Se determinó mediante la técnica microbiológica de microdilución utilizando la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como el estándar de referencia (no se dispone de una referencia reciente sobre el método más idóneo de realización).

Todos los reactivos y materiales necesarios para las determinaciones farmacocinéticas están detallados en el artículo referido anteriormente.

#### 2.1.2.3. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos utilizados:

Con los resultados obtenidos se determinaron los diferentes parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos mediante un programa informático (PK functions

for Microsoft Excel) para cada uno de los antibióticos y las diferentes cepas. Estos parámetros determinados fueron:

- ◆ La concentración “pico” en suero ( $C_{max}$ )
- ◆ El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ )
- ◆ El área bajo la curva de la concentración en función del tiempo (AUC)
- ◆ El cociente inhibitorio ( $CI = C_{max}/CMI$ )
- ◆ El tiempo en el que la concentración en suero se mantenía por encima de la CMI de la bacteria ( $\Delta t > CMI$ ) y cálculo del porcentaje de tiempo interdosis en el que se da esta circunstancia.
- ◆ El cociente AUC/CMI.

#### 2.1.2.4. Dosis de antibióticos utilizadas y tiempos de administración:

Los antibióticos ensayados y sus proveedores fueron: Imipenem (Merck Sharp & Dohme, Madrid), sulbactam (Pfizer, Madrid), tobramicina (Braun, Barcelona), rifampicina (Aventis, Barcelona) y colistina-metanosulfonato (Pharmax Limited, Bexley, Reino Unido).

Utilizando como punto de partida estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos previos, se determinaron las pautas de administración más idóneas para cada antibiótico. En el caso de colistina, ante la ausencia de referencias previas orientadoras, intentamos conseguir unos niveles en suero de ratón que fueran similares a los obtenidos en humanos utilizando la dosis recomendada para el tratamiento de infecciones graves, que es de 50.000 unidades/kg/día [Kucers A, 1997-2].

Todos los antibióticos se administraron cada 6 horas, con doble dosis nocturna, excepto en el caso de la rifampicina, que se administró en una única dosis diaria dado su perfil farmacocinético. Las dosis finalmente administradas de cada antibiótico fueron:

- Imipenem: 50 mg/kg (equivalente a una dosis total diaria de 200 mg/kg)
- Sulbactam: 30 mg/kg (equivalente a una dosis total diaria de 120 mg/kg)
- Tobramicina: 15 mg/kg (equivalente a una dosis total diaria de 60 mg/kg)
- Rifampicina: 25 mg/kg (equivalente a una dosis total diaria de 25 mg/kg)

- Colistina: 125.000 unidades/kg (equivalente a una dosis total diaria de 500.000 unidades/kg).

Las dosis de antibiótico se individualizaron para cada ratón según su peso y fueron ajustadas cada 24 horas dadas las importantes variaciones de peso objetivadas en el modelo, incluso en este corto intervalo de tiempo. Se prepararon diluciones de los antibióticos diariamente de forma que el volumen administrado de forma intraperitoneal a los ratones variase entre 15 y 75 microL.

### **2.1.3. Estandarización del modelo experimental de neumonía por *A. baumannii* en el ratón:**

El modelo experimental utilizado se basó en el modelo descrito por Esposito y Pennington [Esposito AL, 1983] y modificado por M. J. Rodríguez-Hernández, C. Pichardo y J. Pachón [Rodríguez-Hernández MJ, 2000]. Todos los procedimientos involucrados fueron analizados y aprobados por el Comité ético para experimentación animal de la Universitat de Barcelona.

En una fase inicial se analizaron las diferentes variables a considerar en la interpretación de los resultados. Se trataba de garantizar mediante unos experimentos preliminares la reproducibilidad del método y en consecuencia la validez de los resultados obtenidos y sus conclusiones.

#### **a. Experimentos preliminares para la estandarización del modelo de neumonía.**

En esta primera fase se validó el modelo experimental, ya utilizado por otros grupos de investigadores, y se adecuó a las condiciones de nuestro laboratorio y al inóculo bacteriano proporcionado por nuestro laboratorio de Microbiología. Específicamente se analizaron:

1. La administración del mejor anestésico a los ratones, que no interfiriera con el resto de procedimientos.
2. La correcta inoculación a nivel pulmonar mediante la instilación de un colorante como azul de metileno.

3. La necesidad o no de un paso previo por un hospedador experimental, para reforzar las propiedades de virulencia seleccionando *in vivo* los microorganismos más virulentos [Ruiz A, 2001], realizando pases intraperitoneales *in vivo* de la cepa congelada previos a la preparación del inóculo pulmonar.
4. El tiempo de incubación necesario para que el inóculo bacteriano alcanzara la fase de crecimiento exponencial en un baño con agitación continua.
5. El efecto de la mucina añadida al inóculo bacteriano para aumentar la “virulencia” de la cepa.
6. La inoculación pulmonar con suero fisiológico y con mucina, sin y con inóculo bacteriano, para descartar posibles interferencias bacteriológicas.
7. Los efectos histológicos tras la inoculación con suero fisiológico, mucina aislada y el inóculo con mucina para provocar la neumonía.
8. La virulencia en el modelo experimental de diferentes cepas de *Acinetobacter baumannii*.
9. El tiempo más adecuado para iniciar el tratamiento antibiótico tras la provocación de la neumonía.
10. La posible utilización de ratones no consanguíneos en el modelo.
11. La duración de la neumonía en los ratones, hasta las 48, 72 ó 96 horas postinoculación.

#### a1. EXPERIMENTO 1:

I. Propósito: Obtener el mejor anestésico y la vía de administración más idónea, sin interferir con los resultados microbiológicos y con rápida recuperación de los animales.

II. Métodos: Se valoró si la anestesia con ketamina/xilazina era mejor que con tiopental sódico, fármaco utilizado previamente en los modelos descritos, y si la vía intraperitoneal era mejor que la subcutánea. Tras la administración de la anestesia, se dejaron recuperar los animales, y posteriormente se procedió al sacrificio mediante luxación cervical a diferentes horas post-administración de la anestesia (4 y 24 horas). Se realizaron cultivos cuantitativos de pulmón y se obtuvo sangre por punción cardiaca para la realización de hemocultivos.

Analizamos varios grupos de animales:

- 1) anestesia con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) subcutánea, y sacrificio de los animales a las 4 y 24 horas;
- 2) anestesia con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal, y sacrificio de los animales a las 4 y 24 horas;
- 3) anestesia con dosis letal de ketamina (1000 mg/kg) y xilazina (100 mg/kg) intraperitoneal y sacrificio inmediato;
- 4) anestesia con tiopental sódico al 5 % (0,1 mL) intraperitoneal y sacrificio a las 4 y 24 horas;
- 5) anestesia con tiopental sódico al 5 % (0,1 mL) subcutáneo y sacrificio a las 4 y 24 horas.

III. Resultados: La administración de los 2 anestésicos no interfirió con los resultados microbiológicos: Todos los cultivos realizados de sangre y pulmón fueron negativos.

La anestesia con la combinación de ketamina y xilazina consiguió mejores resultados que con el tiopental sódico en los siguientes aspectos: El efecto fue más precoz, los animales se mantuvieron bien relajados, permitió dar dosis muy altas sin riesgo de mortalidad y la recuperación fue rápida (en menos de 30 minutos).

En cuanto a la forma de administración, la vía intraperitoneal fue más fácil, más rápida para conseguir el efecto y menos traumática para los animales que la vía subcutánea.

#### a2. EXPERIMENTO 2:

I. Propósito: Evaluar la correcta inoculación a nivel pulmonar en los animales mediante la utilización de colorante.

II. Método: Para asegurar el procedimiento correcto de la inoculación intratraqueal, y familiarizarnos con la técnica, utilizamos un grupo de 6 ratones que fueron inoculados vía intratraqueal con azul de metileno. Inmediatamente fueron sacrificados, y procedimos a la disección de los pulmones, visualizando de forma macroscópica el colorante a nivel pulmonar o gástrico.

III. Resultados: Utilizando como guía la palpación de la epiglotis con la punta de la cánula roma, pudimos comprobar cómo, si la inoculación se realizaba de forma correcta, los pulmones aparecían teñidos de azul en gran proporción, sin visualizar colorante en otros órganos. Si la técnica no era correcta, el colorante aparecía también a nivel gástrico. Este sistema nos sirvió de guía para aprender el manejo correcto de la cánula de inoculación y asegurarnos que la instilación del inóculo bacteriano se realizaba en la localización correcta intrapulmonar.

### a3. EXPERIMENTO 3:

I. Propósito: Dada la posible pérdida de virulencia de la cepa utilizada para el inóculo tras una congelación prolongada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se comprobó la virulencia de la misma tras varios pases *in vivo* a nivel intraperitoneal previamente a la inoculación intrapulmonar.

II. Métodos: Para ello realizamos varias inoculaciones intraperitoneales seriadas en los ratones, con el objetivo teórico de aumentar la virulencia de la cepa. Se utilizó una cepa del clon A y se realizaron 4 pases sucesivos. Dado que la mucina supuestamente aumenta la virulencia de la infección, procedimos a hacer en paralelo la inoculación intraperitoneal del inóculo aislado y del inóculo con mucina. A las 24 horas, todos los ratones estaban muertos. Procedimos a la disección de los ratones para la extracción del hígado y el bazo por un lado, y de los pulmones por otro lado, realizándose el procesamiento y cultivos por separado. Tras obtener los cultivos, todos ellos casi puros con gran número de colonias de *A. baumannii*, se aislaron unas colonias de los animales inoculados sin mucina y con mucina. A partir de estas colonias se volvió a repetir la preparación del inóculo, añadiendo de nuevo mucina a la cepa originalmente preparada con mucina y añadiendo suero fisiológico a la otra cepa. Con este inóculo preparado, se repitió la inoculación a nivel intraperitoneal del modo descrito anteriormente, y se obtuvieron los cultivos correspondientes a la cepa con 2 pases intraperitoneales (sin y con mucina). De la misma forma se procedió para realizar los pases tercero y cuarto, obteniendo al final de este experimento cultivos de *A. baumannii* que habían sufrido 1, 2, 3 y 4 pases intraperitoneales. Con estos inóculos congelados, y en experimentos sucesivos, se procedió a la inoculación intratraqueal con cada inóculo, comparando los recuentos obtenidos a nivel pulmonar con cada pase.

III. Resultados: La mortalidad en los ratones inoculados vía intraperitoneal disminuyó al aumentar los pases intraperitoneales. Los resultados de los cultivos cuantitativos microbiológicos de los pulmones de los ratones inoculados, comparando la cepa inicial o congelada respecto las cepas de 1, 2 y 4 pases, mostraron que la cepa inicial congelada era la que producía los recuentos pulmonares más elevados, aparte de que los animales perdían más peso a las 72 horas y que el porcentaje de bacteriemias era mayor.

#### a4. EXPERIMENTO 4:

I. Propósito: Determinar el momento a partir del cual el inóculo bacteriano de *A. baumannii* alcanza la fase de crecimiento exponencial.

II. Método: Tras descongelar la cepa se procedió a la incubación en medio de cultivo líquido TSB en un baño con agitación continua. Se procedió a la extracción de una muestra cada hora y su determinación cuantitativa mediante diluciones seriadas.

III. Resultados: Tras determinar cada hora los recuentos cuantitativos del inóculo en agitación continua, observamos que el número máximo de colonias por mL se alcanzó a las 4 horas de la incubación, seguida de una fase estable y un descenso progresivo a continuación.

#### a5. EXPERIMENTO 5:

I. Propósito: Evaluar si la mucina gástrica porcina añadida al inóculo bacteriano aumentaba la virulencia de la bacteria, con el fin de lograr un modelo de neumonía experimental mortal [Nungester WJ, 1936; Gómez-Lus R, 1997].

II. Métodos: Para comparar la virulencia del inóculo sin y con mucina añadida, procedimos a la inoculación pulmonar con las diferentes cepas del clon A de *A. baumannii* (cepas congelada, con 1 pase, 2 pases y 4 pases intraperitoneales) de varios grupos de ratones, añadiendo mucina al 50 % al inóculo en la mitad de los ratones.

III. Resultados: Con todas las cepas se obtuvieron recuentos bacterianos superiores con los inóculos que se habían mezclado al 50 % con mucina porcina respecto a los inóculos

sin mucina. Del mismo modo, las bacteriemias y la mortalidad fueron superiores en el grupo de ratones a los que se había añadido mucina gástrica porcina al inóculo.

#### a6. EXPERIMENTO 6:

I. Propósito: Análisis microbiológico de la inoculación con suero fisiológico, mucina e inóculo bacteriano, para descartar posibles contaminaciones durante el procedimiento de la inoculación.

II. Métodos: Se realizaron distintos experimentos, mediante la misma técnica de inoculación intratraqueal, con suero fisiológico, mucina sola e inóculo con mucina al 50 %, a diferentes grupos de ratones. Se trataba de descartar una contaminación por flora polimicrobiana de origen orofaríngeo añadido a la bacteria del inóculo, al realizar el procedimiento de administración del inóculo a través de la vía traqueal (supuesto similar a una broncoaspiración).

III. Resultados: A las 4 horas de la administración de suero fisiológico o mucina aislada los cultivos a nivel pulmonar mostraron escasas colonias de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y algunas bacterias Gram negativas, pero a las 24 horas fueron negativos. El aspecto de estos ratones era de ausencia de enfermedad, sin pérdida de peso valorable desde la inoculación. La instilación intratraqueal del inóculo bacteriano con mucina dio cultivos puros de *A. baumannii* a las 4 y 24 horas de la inoculación.

#### a7. EXPERIMENTO 7:

I. Propósito: Comprobar histológicamente la provocación de la neumonía y el efecto de la mucina y suero fisiológico.

II. Métodos: En varios grupos de ratones se procedió a la administración intratraqueal de suero fisiológico, mucina e inóculo con mucina. Se procedió al sacrificio de los animales a diferentes tiempos (4 y 24 horas). Se obtuvieron los pulmones y se guardaron en formol hasta su análisis. El estudio histológico fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge por el Dr. Roger Bernat.



III. Resultados: Tras la administración de suero fisiológico y mucina aislada no se produjeron alteraciones significativas a nivel pulmonar. Con el inóculo bacteriano con mucina añadida se objetivó infiltración por polimorfonucleares a las 4 horas de la administración, y bronconeumonía severa y difusa a las 24 y 48 horas.

a8. EXPERIMENTO 8:

I. Propósito: Analizar si diferentes cepas de *A. baumannii* de los clones A, D y E tenían la misma virulencia en el modelo experimental.

II. Métodos: Se inocularon diferentes grupos de ratones con cepas aisladas recientemente en el Servicio de Microbiología (con poco tiempo de congelación): Dos cepas pertenecientes al clon A, una perteneciente al clon D y otra al clon E. Posteriormente, se procedió a los sacrificios seriados cada 24 horas, y la obtención de los pulmones para hacer recuentos cuantitativos y de sangre para la realización de hemocultivos. Se analizó para cada grupo de ratones la supervivencia, los recuentos y el porcentaje de bacteriemias; los resultados se compararon también con los obtenidos previamente con la cepa congelada utilizada.

III. Resultados: La supervivencia, los recuentos de colonias a nivel pulmonar y las bacteriemias fueron similares entre todas las cepas pertenecientes a los 3 clones.

a9. EXPERIMENTO 9:

I. Propósito: Seleccionar el momento más apropiado para iniciar el tratamiento antibiótico tras la inoculación intratraqueal.

II. Métodos: Para ello, realizamos sacrificios seriados de varios grupos de animales cada 2 horas tras la provocación de la neumonía, hasta la hora 8. Con los recuentos microbiológicos seriados a nivel pulmonar, se confirmó si el inicio del tratamiento a las 4 horas postinoculación era el más aconsejable, como estaba descrito previamente.

III. Resultados: Inmediatamente tras la inoculación se constataban recuentos muy altos, ya a partir de la segunda hora, que se mantenían estables hasta la hora 8

postinoculación. Así, a las 4 horas, momento del inicio previsto del tratamiento antibiótico, se había alcanzado ya un crecimiento bacteriano muy elevado a nivel pulmonar, apenas modificado en las siguientes horas.

#### a10. EXPERIMENTO 10:

I. Propósito: Evaluar la posible utilidad de ratones no consanguíneos, dado el elevado precio de los ratones consanguíneos o inbred C57/BL6.

II. Métodos: Se hizo una prueba con ratones no consanguíneos de la cepa ICR o Swiss, cuya variabilidad genética parecía más comparable a lo que ocurre con las infecciones en humanos. Al igual que en los experimentos previos, se procedió a la inoculación intratraqueal del inóculo con mucina y a los sacrificios seriados cada 24 horas hasta la hora 72. Se realizó la extracción de los pulmones para su procesamiento, y a la obtención de sangre mediante punción cardiaca para la toma de hemocultivo. Se objetivó la mortalidad durante el procedimiento y la pérdida de peso de los animales. Se analizó la variabilidad de los resultados obtenidos mediante representación gráfica y análisis estadístico.

III. Resultados: Utilizamos 28 ratones para este experimento. Los resultados fueron notablemente diferentes a los obtenidos con los ratones C57/BL6. La mortalidad espontánea fue 11,11 % a las 24 horas postinoculación y 0 % a las 48 y 72 horas. Los recuentos pulmonares fueron menores que en el caso de los ratones consanguíneos y la variabilidad fue mucho mayor: A las 24 horas,  $8,41 \pm 1,42 \log_{10}\text{UFC/gramo}$ ; a las 48 horas,  $8,03 \pm 2,00 \log_{10}\text{UFC/gramo}$ ; y a las 72 horas,  $3,54 \pm 1,47 \log_{10}\text{UFC/gramo}$ . Además observamos que, a partir de la hora 24 postinoculación, los recuentos pulmonares fueron disminuyendo de forma progresiva espontáneamente, como si los ratones se defendieran de la infección de forma innata, lo que evidentemente contraindicaba su uso en el modelo experimental.

#### a11. EXPERIMENTO 11:

I. Propósito: Analizar la duración adecuada del modelo de neumonía en los ratones: Determinar un tiempo suficiente para obtener resultados concluyentes, pero lo más corto posible para evitar sufrimiento innecesario de los animales [Zak O, 1993].

II. Métodos: Se procedió a la inoculación de un grupo de 20 ratones según el protocolo previamente determinado. A las 24, 48, 72 y 96 horas de la inoculación se procedió al sacrificio de 5 ratones en cada punto horario. Se obtuvieron sangre para cultivo cualitativo y los pulmones para realizar cultivos cuantitativos. Se registró la mortalidad espontánea en cada punto horario.

III. Resultados: Los recuentos pulmonares fueron similares y constantes a las 24 y 48 horas, con bacteremia en el 100 % de los ratones y mortalidad del 40-60 %. A partir de las 72 horas postinoculación, se observó un estancamiento en la supervivencia y un descenso espontáneo en los recuentos pulmonares en algunos ratones supervivientes, con una clara tendencia a eliminar la infección a las 96 horas. Otras bacterias gram negativas han mostrado este aclaramiento bacteriano espontáneo en modelos experimentales animales, y por ello para el desarrollo de neumonía crónica con *P. aeruginosa* y *B. cepacia* se han utilizado esferas de agar para limitar la fagocitosis [Pachón J, 2000]. También se observaron claros signos externos de sufrimiento (autolesiones, mutilaciones, respiración dificultosa, frialdad corporal, disminución de la movilidad...) en los animales infectados a partir de las 24 horas. Por todo ello, se eliminaron los puntos horarios de sacrificio a las 72 y 96 horas.

#### a12. CONCLUSIONES DE LOS EXPERIMENTOS PRELIMINARES:

Tras la realización de estos experimentos preliminares, el modelo se consideró adecuado para valorar la eficacia terapéutica de distintos antibióticos:

1. Se utilizó como anestésico la combinación de ketamina y xilazina por vía intraperitoneal.
2. La inoculación intratraqueal fue correcta y reproducible fácilmente.
3. Se decidió utilizar para la preparación del inóculo la cepa inicial congelada, ya que las cepas sometidas a pases intraperitoneales *in vivo* perdían virulencia.

4. A las 4 horas de incubación del inóculo descongelado en un baño con agitación continua se alcanzó la fase de crecimiento bacteriano exponencial.
5. La adición de mucina al inóculo bacteriano aumentó su virulencia, al producir aumento en los recuentos pulmonares, de las bacteriemias y mortalidad respecto a la inoculación sin mucina.
6. La inoculación intratraqueal no interfirió microbiológicamente la inducción de la neumonía.
7. Se comprobó histológicamente la inducción de la neumonía a las 4 horas de la inoculación, momento establecido para el inicio del tratamiento antibiótico, así como la ausencia de interferencia microbiológica de la mucina o del suero fisiológico.
8. Los resultados entre diferentes cepas pertenecientes a los 3 clones de *A. baumannii* (A, D y E) no mostraron diferencias de virulencia en el modelo.
9. El inicio del tratamiento antibiótico tras 4 horas desde la inoculación se consideró adecuado, ya que en las primeras horas se alcanzaba una fase estable, con escasas variaciones posteriores de los recuentos a nivel pulmonar.
10. Los estudios con animales no consanguíneos (ratones de la cepa ICR o Swiss) no fueron satisfactorios: La mortalidad fue menor, los recuentos pulmonares inferiores y poco homogéneos y por tanto más difícil, la obtención de conclusiones. Por ello se continuó el modelo con los ratones consanguíneos de la especie C57/BL6.
11. El modelo de neumonía se prolongó durante 48 horas tras la inoculación, realizándose los sacrificios seriados a las 20 y 44 horas después del inicio del tratamiento.

b. Animales utilizados.

Tras los resultados preliminares, utilizamos ratones consanguíneos C57BL/6N hembra, jóvenes, entre 14 y 16 gramos de peso, inmunocompetentes y libres de patógenos específicos, procedentes de un centro proveedor autorizado (Harlan, Gannat, Francia). Los animales se mantuvieron en cámaras biológicas con filtros de aislamiento HEPA y ciclos de día-noche controlados cada 12 horas. Las condiciones de cuarentena y mantenimiento de los animales están concretadas en el primer artículo de neumonía experimental [Montero A, 2002].

#### 2.1.4. Descripción del modelo de neumonía:

Tras finalizar el periodo de cuarentena, se procedió inicialmente a la anestesia de los animales con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) administrada en una dosis única intraperitoneal. Se registró el peso de cada animal al inicio del procedimiento. Con el animal en posición vertical y el cuello en hiperextensión, se procedió a canular la tráquea mediante una aguja metálica finalizada en una oliva y conectada a una jeringa de precisión Hamilton. Se comprobó la localización intratraqueal de la cánula por palpación de la punta y se instiló un inóculo de 50 microL de suspensión mixta constituida al 50 % por inóculo bacteriano y mucina porcina diluida al 10 % en suero fisiológico estéril. Tras la inoculación, se dejó el animal en posición vertical durante 3 minutos y posteriormente en decúbito a 45° hasta despertar.

Los animales se dividieron al azar en 2 grupos: Control y tratamiento. A las 4 horas de la inoculación, se inició la administración del antibiótico al grupo tratamiento y de un volumen idéntico de suero fisiológico al grupo control como placebo. La administración de las dosis de antibióticos y de suero fisiológico se realizó por vía intraperitoneal. La dosis diaria de antibiótico se repartió en 4 dosis, administradas cada 6 horas al grupo tratamiento (a las 14.00 horas, 20.00 horas -doble dosis nocturna- y 8.00 horas) hasta las 48 horas postinoculación. De la misma forma, se administró el placebo al grupo de ratones control durante todo el periodo. Se registró diariamente de forma individualizada el peso de cada animal antes de la administración del antibiótico, para que la dosis de antibiótico se ajustara al máximo al peso de los animales de forma diaria. Se registró la mortalidad observada en los animales durante todo el procedimiento en los grupos tratamiento y control. Aparte de los animales muertos espontáneamente, a las 24 y 48 horas de la inoculación, con los animales supervivientes, se procedió al sacrificio a las 20 y 44 horas postinicio del tratamiento de un grupo de animales pertenecientes al grupo tratamiento (hasta sumar 4 ratones en total, entre muertos espontáneamente y sacrificados) y al grupo control (3 ratones en total). Para el sacrificio se administró una dosis letal de ketamina (1000 mg/kg) y xilazina (100 mg/kg) vía intraperitoneal, se registró el peso del animal y se procedió a su disección: Se abrió la cavidad torácica mediante técnica quirúrgica estéril y se procedió a la extracción por completo de los pulmones así como la determinación de su peso. Además, se obtuvo sangre mediante punción cardíaca para la realización de

hemocultivos cualitativos. Inmediatamente tras su extracción, los pulmones fueron homogeneizados de forma manual con 1 mL de suero fisiológico estéril y se realizaron diluciones seriadas que se cultivaron posteriormente en placas de agar-sangre TSA. Además se realizó el cultivo directo en placas de agar-sangre de los homogeneizados pulmonares sin diluir en todos los animales para descartar contaminaciones y un posible “efecto carry over” de los antibióticos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, y finalmente se procedió al recuento de colonias en cada una de las diluciones para obtener los recuentos cuantitativos por gramo de tejido pulmonar. Los resultados se expresaron en  $\log_{10}$ UFC/gramo de tejido pulmonar para cada ratón, y se calcularon las medias y desviación estándar correspondientes a los grupos tratamiento y control, así como la diferencia entre los 2 grupos ( $\Delta\log_{10} = \text{media}_{\text{grupo tratamiento}} - \text{media}_{\text{grupo control}}$ ) para analizar la eficacia de cada antibiótico. La sangre se incubó en medio de cultivo líquido TSB durante 24 horas y posteriormente se incubaron 100 microL en placa de agar-sangre TSA a 37 °C durante 24 horas para su identificación.

Con el fin de eliminar el posible efecto antibiótico “carry-over”, el sacrificio de los animales tratados se realizó después de 3 horas de la administración de la última dosis del antibiótico.

Para investigar la aparición de resistencia a rifampicina, determinamos la CMI por Etest al final del tratamiento en los homogeneizados pulmonares de un grupo de ratones tratados con este antibiótico.

#### 2.1.5. **Análisis estadístico en el modelo animal:**

El análisis de la eficacia antibacteriana de los distintos tratamientos se realizó basándose en 3 variables obtenidas en cada grupo de tratamiento en cada punto horario de las 24 y 48 horas, comparando los resultados con los del grupo control correspondiente a la misma cepa y mismo punto horario. Estas 3 variables fueron:

- Determinación cuantitativa de los recuentos pulmonares, obtenida a partir de los homogeneizados pulmonares (expresados en UFC/gramo de tejido pulmonar) a las 24 y 48 horas.

- Bacteriemia a las 24 y 48 horas.
- Supervivencia en el grupo de ratones de las 48 horas postinoculación.

Los recuentos pulmonares bacterianos y los resultados farmacocinéticos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar de los valores. Se analizó de forma preliminar la distribución normal de los valores de los recuentos pulmonares en el grupo de ratones control y tratamiento mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Tras comprobar la normalidad de la variable, a continuación se utilizó la prueba de  $t$  de Student para comparar las medias entre 2 grupos (pe. entre grupo control y tratamiento) y la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección de Scheffé para comparar las medias entre varios grupos (pe. para comparar varios tratamientos o entre las 3 cepas). Para comparar las cifras de mortalidad y supervivencia entre los diferentes grupos, se utilizó la prueba F exacta de Fisher.

Para el análisis estadístico se utilizaron los paquetes informáticos SPSS 10.0 y Epi Info 6. En todas las pruebas estadísticas, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . Para la comparación estadística en las bacteriemias, este valor lo obtuvimos mediante la suma de los ratones con hemocultivos positivos respecto al total de animales utilizados en el grupo de ratones a las 24 y a las 48 horas, tanto en el grupo control como tratamiento (bacteriemias =  $\sum$  bacteriemias a 24 h + bacteriemias a 48 h, expresado como  $n \text{ ratones}_{\text{hemocultivos}} \oplus / n \text{ ratones}_{\text{total}}$  y porcentaje).

## 2.2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA: MONOTERAPIAS:

Para el análisis de la eficacia antibacteriana se analizaron por separado los tratamientos en monoterapia y en combinación para cada una de las 3 cepas. Se compararon los resultados obtenidos *in vitro* del grado de actividad bactericida mediante las curvas de letalidad con los resultados del modelo experimental *in vivo*. Los antibióticos estudiados fueron imipenem, sulbactam, tobramicina, rifampicina y colistina. Se prestó una particular atención al análisis de la eficacia comparativa de la colistina respecto al resto de antibióticos.

### 2.3. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA: COMBINACIONES:

Para el análisis de la eficacia de las combinaciones, tanto *in vitro* como en el modelo animal se tuvo en cuenta además de la actividad bactericida, el posible efecto sinérgico de las mismas.

Las combinaciones antibióticas investigadas fueron diferentes para cada cepa según sus patrones de sensibilidad y su posible aplicabilidad clínica en humanos. En concreto se evaluó la posible sinergia de las siguientes combinaciones:

- a. Dos antibióticos betalactámicos (imipenem y sulbactam) para el tratamiento de las cepas con algún grado de sensibilidad a dichos antibióticos (clones A y D).
- b. Antibiótico betalactámico (imipenem, sulbactam) y un aminoglicósido (tobramicina) para el tratamiento de las infecciones por las 3 cepas.
- c. Rifampicina con imipenem (considerado el antibiótico de referencia) para el tratamiento de las infecciones por las 3 cepas.
- d. Rifampicina con sulbactam para el tratamiento de las infecciones por el clon E (alto grado de resistencia a imipenem).
- e. Rifampicina con colistina para el tratamiento de las infecciones por el clon E.

La combinación tobramicina y colistina no fue investigada, al tratarse de 2 antibióticos nefrotóxicos y considerarse contraindicado su uso en humanos.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 3: REPERCUSIONES CLÍNICAS OBTENIDAS DEL MODELO (2000-2001).

En la siguiente sección “Resultados del Objetivo 1” se describe con detalle que el descenso observado en el número de casos en relación con el estudio clínico-epidemiológico y de intervención expuesto (Enero 97-Junio 98) resultó transitorio, y ya a finales de 1998 y principios de 1999 se registraron nuevamente unas tasas similares a las objetivadas previamente al mismo. La endemia se mantuvo con tasas mensuales muy elevadas durante el período siguiente 1998-2001 y un predominio máximo de las cepas



CR, a pesar de las sucesivas maniobras de implementación de las diversas medidas de control efectuadas.

En este contexto, se planteó aplicar la información proporcionada por los resultados y conclusiones obtenidos en el modelo experimental en el tratamiento de la infección humana grave por *A. baumannii* multirresistente. Para estas infecciones, en las que la única oferta terapéutica quedaba reducida a la colistina, según los datos *in vitro*, y de cuyo grado de eficacia y toxicidad no se disponía de suficiente fiabilidad, se proponía el uso de combinaciones de rifampicina e imipenem, con efecto sinérgico y mayor actividad.

### 3.1. ESTUDIO DE LA EFICACIA CLÍNICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA COMBINACIÓN MÁS ACTIVA OBTENIDA EN EL MODELO ANIMAL EN EL TRATAMIENTO DE LA NEUMONÍA Y OTRAS INFECCIONES GRAVES POR *A. BAUMANNII* MULTIRRESISTENTE:

Durante el período Julio 2000- Septiembre 2001, los pacientes con infecciones graves por *A. baumannii* carbapenem-resistente (CR) fueron incluidos en un “Estudio piloto prospectivo, no comparativo” para confirmar la eficacia clínica y microbiológica de la combinación de imipenem y rifampicina, que fue la más activa en el modelo animal, tal como se detalla a continuación en la Sección “Resultados del Objetivo 2”. Los pacientes que recibieron menos de 48 horas de tratamiento o fueron tratados con otros antibióticos con potencial actividad frente *A. baumannii*-CR fueron excluidos. Además del cultivo de la muestra inicial, se repitieron éstos durante y después del tratamiento siempre que fue posible y/o persistieron los datos clínicos de infección. La actividad *in vitro* de la rifampicina se monitorizó en los aislamientos de *A. baumannii* obtenidos en los sucesivos cultivos. El registro de datos de los pacientes incluyó: Características demográficas, enfermedades subyacentes, severidad de la enfermedad aguda a su ingreso en UCI, procedimientos médicos (catéteres intravasculares, sonda urinaria, intubación endotraqueal, sonda nasogástrica), foco de infección, antibioterapia, procedimientos quirúrgicos y evolución.

El protocolo terapéutico fue el siguiente: La dosis de imipenem fue de 500mg/6 horas ev y la de rifampicina de 600 mg/12 h en infusión intravenosa con una ligera reducción en los pacientes con deterioro de la función hepática (400-500 mg/12h). Se registraron otros procedimientos terapéuticos como cirugía o drenaje no quirúrgico y retirada del catéter intravascular, aplicados en adición a la antibioterapia.

Las diversas definiciones utilizadas están pormenorizadas en el artículo publicado [Saballs M, 2006]. La mortalidad global incluyó el éxitus por cualquier causa durante la hospitalización. La mortalidad se consideró relacionada cuando persistieron los signos o síntomas de la infección hasta el éxitus o cuando éste ocurrió en el curso de la primera semana, sin otra causa clara concomitante. El fallo terapéutico se definió como el empeoramiento clínico tras 72 horas de tratamiento o la falta de mejoría durante el período de tratamiento. La curación requirió la desaparición de los síntomas y signos de la infección, pero no la erradicación microbiológica en el lugar del foco de infección.

Los métodos microbiológicos se muestran en detalle en el apartado correspondiente del trabajo.

### 3.2. EVALUAR LA MORTALIDAD ATRIBUIBLE REAL DE LA NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA POR *A. BAUMANNII* Y LA NECESIDAD DE INTRODUCIR LA COLISTINA EN LA ANTIBIOTERAPIA EMPÍRICA DE RUTINA EN LAS UCIs CON ENDEMIAS O BROTES EPIDÉMICOS POR ESTOS MICROORGANISMOS:

La amplia experiencia acumulada de infecciones por *A. baumannii* multirresistente, el fracaso de las medidas epidemiológicas para lograr el control de la endemia, el relativo fracaso en la búsqueda de alternativas terapéuticas (ver Sección de “Resultados del Objetivo 3”) y la aparición puntual de alguna cepa con resistencia a colistina fueron la base de esta reflexión. Además pudimos matizar estas consideraciones sobre la base de informaciones contradictorias que en estos años se han publicado sobre la repercusión clínica de la neumonía por *Acinetobacter baumannii*, con datos discordantes entre una alta mortalidad atribuible similar a la neumonía por *Pseudomonas aeruginosa* o una

escasa morbi-mortalidad. Finalmente pudimos reflexionar sobre la necesidad o no de introducir en las pautas de tratamiento empírico de la neumonía asociada a ventilación mecánica un antibiótico eficaz frente *A. baumannii* de forma precoz.



**V.**

## **RESULTADOS POR OBJETIVOS**



## V. RESULTADOS POR OBJETIVOS.

### 1. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1: ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO PRELIMINAR DE LAS INFECCIONES POR *A. BAUMANNII* RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS EN EL HOSPITAL DE BELLVITGE (1997-1998).

En el contexto de una elevada y progresiva endemia de *A. baumannii* en el Hospital de Bellvitge, a primeros de Enero de 1997, tras la aparición de las primeras cepas con sensibilidad disminuida a carbapenémicos y su ulterior diseminación a gran escala, se puso en marcha un programa específico de implementación de las medidas de control de la infección. Como se ha comentado en la Sección “Material y métodos del Objetivo 1”, durante el período comprendido entre Enero 1997- Junio 1998 (18 meses) se realizó en las UCIs un estudio prospectivo longitudinal, con intervención, para evaluar las circunstancias de la aparición y diseminación de las cepas resistentes a carbapenémicos y sus factores de riesgo, así como su epidemiología clínica y molecular [Corbella X, 2000].

#### 1.1. FACTORES DE RIESGO DE COLONIZACIÓN / INFECCIÓN POR *A. BAUMANNII* RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS:

En el primer periodo de 6 meses (Enero-Junio 1997) se identificaron los factores de riesgo potenciales para la aparición de muestras clínicas positivas (colonización / infección) con cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos (CR) en los pacientes de las UCIs, mediante su comparación con pacientes colonizados/infectados por cepas sensibles a carbapenémicos (CS). El análisis de regresión multivariado mostró que el estado de portador de cepas de *A. baumannii*-CR, el tratamiento previo con imipenem y la estancia en una unidad con elevada densidad de pacientes colonizados/infectados por *A. baumannii*-CR, eran los principales factores de riesgo para desarrollar colonización clínica o infección por cepas de *A. baumannii*-CR.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CLONES DE LA ENDEMIA Y ESTUDIO DE CARBAPENEMASAS:

Según el estudio de los antibiogramas y del polimorfismo de ADN cromosómico [Domínguez MA, 1998], las cepas protagonistas de la endemia en su origen desde 1992 hasta 1996 fueron sensibles al imipenem, identificándose 3 clones: El clon A, el más importante en el número de pacientes colonizados/infectados, y menos frecuentes los clones B y C. El clon A mostraba resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos, pero sensibilidad a imipenem y sulbactam (CMI/CMB de imipenem de 1/1  $\mu\text{g/mL}$ , de sulbactam de 2/64  $\mu\text{g/mL}$  y de tobramicina 128/256  $\mu\text{g/mL}$ ).

Durante los primeros meses de 1997, las cepas aisladas con sensibilidad disminuida a carbapenémicos (sensibilidad intermedia a imipenem y sensible a sulbactam, CMI/CMB: 4-8/16  $\mu\text{g/mL}$  y 4/64  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente) se tipificaron como pertenecientes a un nuevo clon (clon D), introducido en nuestro hospital por un paciente procedente de otro centro, y que no estaba relacionado epidemiológicamente con los clones prevalentes de la endemia hasta 1996.

En el curso del año 1997 apareció un nuevo clon (tipificado como clon E), no relacionado con todos los anteriores, y con alta resistencia a imipenem (CMI/CMB: 512/512  $\mu\text{g/mL}$ ) y a sulbactam (128/>128  $\mu\text{g/mL}$ ), además de resistencia a los otros grupos de antibióticos. Este clon se diseminó rápidamente y llegó a ser muy prevalente a finales del período de estudio (Figura 2). Las cepas de los clones D y E mostraban sensibilidad disminuida a la tobramicina (CMI/CMB = 8/32  $\mu\text{g/mL}$ ).

A lo largo del período de estudio la gran mayoría de infecciones se debieron a los clones A, D o E. Los 3 clones presentaban resistencia moderada a rifampicina (CMI = CMB = 8  $\mu\text{g/mL}$ ); el punto de corte considerado fue  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ , como frente a *S. aureus*, al no disponerse de una definición del mismo frente a los BGN [Kucers A, 1997-1; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000]. Por último, los 3 clones presentaban sensibilidad a la colistina o polimixina E (CMI = 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; CMB = 0,5, 1 y 2  $\mu\text{g/mL}$  en los 3 clones respectivamente) (punto de corte de MENSURA  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ) [Catchpole CR, 1997]. La sensibilidad *in vitro* de las cepas de estos 3 clones se muestra en la tabla de CMI/CMB (Tabla 3).



En cuanto a la investigación de la presencia de carbapenemasas, los estudios con PCR mostraron la presencia de un gen codificante de una carbapenemasa tipo OXA-24 en el clon E, de forma similar a otros autores de nuestro país [Bou G, 2000-2; Lopez-Otsoa F, 2002], pero no en el clon D. No se demostró la presencia de genes codificantes de enzimas tipo OXA-23 y de metalobetalactamasas tipo IMP- o VIM-.

### 1.3. INTERVENCIÓN EPIDEMIOLÓGICA:

A continuación, a partir de los factores de riesgo obtenidos, durante los 12 meses siguientes (Julio 1997-Junio 1998) se aplicó un programa implementado de control de la infección y una política de restricción de carbapenémicos, cuya eficacia fue posteriormente evaluada en 2 periodos sucesivos de 6 meses, comparando las tasas de incidencia de nuevos casos de *A. baumannii* en los periodos pre- y postintervención. Las medidas de control de infección se han detallado en la sección de “Material y métodos del Objetivo 1”.

Tras la intervención, se pudo observar una reducción en las tasas de colonización/infección por *A. baumannii*, tanto por cepas sensibles como resistentes a carbapenémicos. La reducción fue muy significativa en los primeros 6 meses de la intervención, estabilizándose durante el segundo periodo. El consumo de imipenem se restringió en un 85 % al compararse el período Enero-Junio 97 (11,6 DDD/100 estancias) con el de Julio-Diciembre 97 (1.8 DDD/100 estancias) (Figura 3). El seguimiento de vigilancia ambiental desde Enero 97 a Junio 98 mostró una reducción en la contaminación del 70 % al 30 % de las muestras procesadas. Sin embargo, a pesar de la disminución notable de estas tasas y la importante reducción observada en el consumo de carbapenémicos, se constató una prevalencia casi absoluta de las cepas carbapenem-resistentes al final del período de estudio (70 %). Y fue especialmente preocupante que las cepas del clon D con sensibilidad intermedia a imipenem fueran progresivamente sustituidas por el clon E con alta resistencia (Figuras 4 y 5). El patrón microbiológico de las cepas aisladas en el ambiente guardó una correlación muy estricta con la de los pacientes, en cuanto a los porcentajes de resistencias a carbapenémicos y al protagonismo de los clones D y E.

#### 1.4. REPERCUSIONES CLÍNICAS DE LA ENDEMIA:

El espectro clínico de las infecciones por *Acinetobacter baumannii* resultó muy similar en el caso de las infecciones producidas por cepas sensibles y por cepas resistentes a carbapenémicos (diferencias no significativas): La traqueobronquitis fue la localización más frecuente (55 y 58 % respectivamente), seguida de la bacteriemia (33 y 30 % respectivamente) fundamentalmente primaria, las infecciones de herida quirúrgica (21 y 26 % respectivamente) y la neumonía (10 y 13 % respectivamente). Así de una forma global, predominaron de forma muy notable las infecciones respiratorias (traqueobronquitis /neumonía) (65 y 71 % para las cepas sensibles y resistentes a carbapenémicos respectivamente).

Uno de los aspectos importantes en lo que se refiere a estas infecciones es la dificultad para establecer un diagnóstico de seguridad, ya que la diferenciación entre la colonización de muestras clínicas y una verdadera infección resulta a menudo poco clara. Las características epidemiológicas del microorganismo y su gran capacidad para contaminar y sobrevivir en el ambiente, las circunstancias de los pacientes de las UCIs, sometidos a múltiples manipulaciones y en el caso de la localización respiratoria, en relación con una ventilación mecánica, la frecuente presencia de otros microorganismos acompañantes en los cultivos con aislamientos de *A. baumannii* exigen un juicio clínico muy cuidadoso en esa evaluación. La trascendencia de este ejercicio es importante, ya que determina la necesidad de un tipo u otro de tratamiento y tanto más teniendo en cuenta las escasas alternativas terapéuticas disponibles.

A lo largo de este período de endemia por cepas CR, se utilizó con frecuencia colistina nebulizada, y en muy pocas ocasiones colistina por vía sistémica. Con todo, nos llamó la atención que la circunstancia de la aparición de la resistencia a carbapenémicos no se acompañó de un empeoramiento sensible en el pronóstico de estas infecciones. Así, los resultados de comparar su repercusión en el caso de las cepas sensibles y resistentes fueron: Prolongación de estancia en UCI ( $31,7 \pm 26$  y  $32,7 \pm 21$  días respectivamente), estancia total hospitalaria ( $50,7 \pm 30$  y  $54,9 \pm 35$  días respectivamente), mortalidad cruda (51 y 42 % respectivamente) y mortalidad relacionada (en los primeros 5 días de

la infección) (21 y 20 % respectivamente) (diferencias no significativas entre las 2 cepas).

En la literatura médica se ha hecho énfasis repetidamente en la elevada mortalidad de la neumonía por *A. baumannii*, que podría llegar a ser del 75 % [Chastre J, 2003], y en la importancia de iniciar muy precozmente una terapia empírica adecuada en los pacientes de UCI con infecciones graves, por su repercusión en la mortalidad. Nuestro contexto de unas UCIs con una alta endemia de infecciones por *A. baumannii* CR, con una mortalidad media de un 50 % y la posibilidad de tener que considerar la indicación de una pauta de terapéutica antibiótica empírica precoz que incluyera colistina para los pacientes con sospecha de infección grave, expresa de manera evidente la importancia de las repercusiones clínicas derivadas de nuestro entorno epidemiológico.

#### 1.5. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA *IN VITRO* FRENTE A LOS CLONES DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* CARBAPENEM-RESISTENTES:

En el estudio de la actividad bactericida *in vitro* de diversos antibióticos y sus combinaciones mediante curvas de letalidad frente a cepas de los clones D y E, en monoterapia sólo tobramicina presentó actividad frente a los 2 clones, con una reducción de 1,5 y 1,8 logs respectivamente respecto al inóculo inicial. Frente al clon D, las combinaciones de tobramicina con ticarcilina o sulbactam fueron las únicas que alcanzaron el grado de bactericida; el resto de asociaciones con tobramicina y las asociaciones de amikacina y sulbactam mejoraron la actividad de los antibióticos en solitario. Frente al clon E, ningún antibiótico o asociación presentaron actividad bactericida; sólo la tobramicina en solitario o en combinación mostraron cierto grado de actividad, pero sin alcanzar sinergia [Ardanuy C, 1998].

En la segunda serie de experimentos *in vitro*, realizada de forma previa al estudio experimental animal, obtuvimos que la actividad *in vitro* de colistina sobre las cepas del clon E fue únicamente discreta, siendo necesarias concentraciones  $\geq 16$  x CMI para lograr un efecto bactericida. Las combinaciones de imipenem con el resto de antibióticos presentaron efecto sinérgico a concentraciones de imipenem de 256  $\mu\text{g/mL}$ ,

superiores a los niveles alcanzables en humanos. Las combinaciones de sulbactam con el resto de antibióticos, mostraron efecto aditivo o sinérgico a concentraciones de sulbactam de 64 µg/mL, superiores a los niveles alcanzables en humanos. La combinación de rifampicina con tobramicina fue la única combinación que mostró efecto sinérgico a concentraciones alcanzables en humanos [Borraz C, 2002].

De estos trabajos *in vitro* así como de otros similares publicados, podría plantearse que el uso de ciertos antibióticos en combinación podría ser más eficaz que el tratamiento aislado con colistina.

## 2. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2: ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA EN UN MODELO DE NEUMONÍA EXPERIMENTAL POR *A. BAUMANNII* EN EL RATÓN (1998-2000).

### 2.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO:

#### 2.1.1. **Farmacocinética:**

Como ha sido comentado previamente, nuestro modelo no permitió el uso de la farmacocinética humanizada, por lo que al igual que en otros modelos similares publicados, la administración de los antibióticos imipenem, sulbactam, tobramicina y colistina se hizo cada 6 horas, y la de rifampicina cada 24 horas. Las dosis utilizadas fueron: Imipenem 200 mg/kg/día, sulbactam 120 mg/kg/día, tobramicina 60 mg/kg/día, colistina 500.000 U/kg/día (todas ellas repartidas en 4 dosis al día) y rifampicina 25 mg/kg/día (en una única dosis diaria).

Los resultados del análisis farmacocinético y farmacodinámico de los antibióticos estudiados están reflejados en la sección de “Resultados” del artículo dedicado a las monoterapias [Montero A, 2002] (Tabla 4).

#### 2.1.2. **Estandarización del modelo experimental:**

Los resultados de la estandarización de cada uno de los experimentos preliminares en los ratones y sus respectivas conclusiones, en base a lo cual se estableció el modelo finalmente utilizado, se han expuesto punto por punto en la sección “Material y métodos del Objetivo 2”.

Los experimentos se realizaron en 2 fases, que investigaron las monoterapias y las combinaciones por separado. Tras aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov en cada grupo de animales control de las 2 fases (monoterapias y combinaciones), demostramos que la variable recuentos pulmonares seguía una distribución normal. Con la prueba de *t* de Student de comparación de medias comprobamos que los 2 grupos control de las 2 fases no presentaban diferencias significativas y por lo tanto eran comparables entre sí, y de la misma manera también podían compararse entre sí los grupos de tratamiento de las diferentes fases de experimentos, es decir, los resultados de una combinación respecto las monoterapias (prueba de ANOVA). En las gráficas de diferencias en logaritmos en los recuentos pulmonares de los animales tratados versus los animales control, se ha utilizado el grupo control correspondiente a la misma fase de los experimentos, es decir monoterapias o combinaciones por separado.

De forma similar, no encontramos diferencias significativas en los resultados de bacteriemias o mortalidad entre los 2 grupos control de cada fase de experimentos, lo que nos permitió realizar las comparaciones oportunas.

El modelo se mostró adecuado por la facilidad de inoculación y de administración de los diferentes fármacos. En los animales control se obtuvieron cifras de recuentos pulmonares a las 24 y 48 horas de la inoculación del orden de 10-11 logs, todas ellas muy homogéneas y con escasa desviación estándar (Figuras 6-8). En los experimentos con cepas del clon A se utilizaron 30 ratones como controles (15 en los experimentos con monoterapias y 15 en las combinaciones), que mostraron unos recuentos pulmonares de  $10,49 \pm 0,45$  a las 24 horas y  $10,65 \pm 0,37$  a las 48 horas. En el clon D se utilizaron igualmente 30 ratones como controles (15 en los experimentos con monoterapias y 15 en las combinaciones), y los recuentos pulmonares obtenidos fueron de  $10,57 \pm 0,39$  a las 24 horas y  $10,83 \pm 0,32$  a las 48 horas. En el clon E se utilizaron 33 ratones como controles (igualmente, 15 en los experimentos con monoterapias y 18

en las combinaciones), que mostraron unos recuentos pulmonares de  $10,60 \pm 0,61$  a las 24 horas y  $10,8 \pm 0,4$  a las 48 horas (Tabla 5). No se encontraron diferencias significativas en los ratones control entre los 2 puntos horarios (24 y 48 horas) (*t* de Student) ni entre los diferentes clones (ANOVA), por lo que, como se ha comentado previamente, fue factible su comparación.

Se utilizaron 8 ratones como tratamiento en cada terapia en total, 4 para el punto de 24 horas y otros 4 para el punto de 48 horas. Los animales control presentaron bacteriemia en el 100 % de los casos a las 24 y 48 horas (Tabla 6) y cifras de mortalidad del 0 % a las 24 horas y variables según cepas (46,66 % en el clon A, 60 % en el clon D y 51,51 % en el clon E) a las 48 horas (Tabla 7) (cifras cercanas al 50 %, que es lo recomendado en los modelos experimentales animales [Ruiz A, 2001]). Todo ello da idea de la agresividad de este modelo de neumonía. En los animales control de las 48 horas no encontramos diferencias significativas en los recuentos pulmonares (*t* de Student) ni en las bacteriemias (prueba F de Fisher) entre los animales supervivientes y muertos, ni entre los diferentes clones; los animales supervivientes fueron 14, 18 y 17 para los clones A, D y E respectivamente. Las diferencias halladas en los recuentos pulmonares a las 48 horas no fueron significativas, aunque fueron discretamente inferiores en los animales supervivientes que en los muertos:  $10,47 \pm 0,37$  vs  $10,73 \pm 0,34$  respectivamente en el clon A (*n* = 30);  $10,76 \pm 0,34$  vs  $10,85 \pm 0,32$  respectivamente en el clon D (*n* = 30); y  $10,74 \pm 0,32$  vs  $10,84 \pm 0,30$  en el clon E (*n* = 33).

Se apreció una correlación excelente entre los resultados de las 3 variables de eficacia utilizadas: Recuentos pulmonares y bacteriemias a las 24 y 48 horas y supervivencia a las 48 horas. Sin embargo, el parámetro más útil para analizar la eficacia antibacteriana fue el de “recuentos pulmonares” a las 48 horas (44 horas post-inicio de tratamiento), ya que permitió obtener diferencias significativas respecto al grupo control en la mayoría de terapias. Esta fue la variable utilizada para los cálculos iniciales del tamaño muestral necesario en los experimentos y la que definimos como de mayor interés (la mayoría de resultados corresponden a este punto horario de las 48 horas, si no se especifica lo contrario). Para las otras 2 variables, fue más difícil obtener la significación estadística en las diferencias obtenidas, debido al número pequeño de ratones utilizados.

El posible efecto antibiótico “carry-over” fue soslayado con el sacrificio de los animales de los “grupos tratamiento” después de 3 horas de la administración de la última dosis del antibiótico. Mediante el cultivo directo de los homogeneizados pulmonares objetivamos que no se produjo este efecto, lo que hubiera artefactado los resultados.

No se detectó ningún cambio en las CMI de rifampicina por E-test en los aislamientos de las muestras pulmonares al final del tratamiento con este antibiótico en el grupo de animales investigados.

## 2.2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA: MONOTERAPIAS:

Los resultados obtenidos con los diferentes antibióticos *in vivo* se contrastaron con los obtenidos *in vitro* mediante curvas de letalidad [Montero A, 2002].

### 2.2.1. **Actividad *in vitro* de los diferentes antibióticos:**

- Imipenem: A la concentración de 2 x CMI, imipenem obtuvo un descenso de 2,44, 3,36 y 2,8 logs a las 6 horas para las cepas A, D y E respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron 2, 8 y 1024 µg/mL respectivamente.
- Sulbactam: Utilizado a la mayor dosis de 2 x CMI no superó un descenso de 1 log en los 3 clones.
- Tobramicina: Con tobramicina a dosis de 2 x CMI (= 256 µg/mL) se obtuvo una disminución en el clon A de 4,9 logs a las 6 horas, superando ampliamente el rango de bactericida. No se alcanzó dicho rango en el resto de clones.
- Rifampicina: Utilizada a dosis de 2 x CMI (= 16 µg/mL) su actividad alcanzó el rango de bactericida a las 24 horas en los 3 clones. A la concentración de 1 x CMI éste fue el único antibiótico que alcanzó actividad bactericida, y únicamente para los clones D y E.
- Colistina: A las concentraciones estándar utilizadas de 1/4, 1/2, 1 y 2 x CMI no se obtuvo efecto antibacteriano destacable. Por ello utilizamos concentraciones superiores de 4, 8, 16 y 32 x CMI. Se alcanzó actividad bactericida con las concentraciones de 16 y 32 x CMI sólo en los clones A y E.

Hay que destacar que en casi todas las determinaciones se produjeron recrecimientos a las 24 horas, exceptuando rifampicina a concentración 2 x CMI en todos los clones e imipenem a concentración 2 x CMI en el clon D.

### 2.2.2. **Actividad *in vivo*: Modelo de neumonía experimental en el ratón:**

Se muestran separadamente los resultados más relevantes obtenidos con cada una de las cepas pertenecientes a los clones A, D y E respectivamente.

- Clon A:

Frente a esta cepa sensible a imipenem y sulbactam, estos 2 antibióticos fueron los más activos, alcanzándose un descenso de 5,38 y 4,64 logs en los recuentos pulmonares respecto a los controles a las 48 horas respectivamente (Figura 9). Es de destacar que el tratamiento con imipenem a las 20 horas de iniciado el tratamiento consiguió un descenso de más de 4 logs en los recuentos pulmonares respecto al grupo control. También rifampicina mostró una intensa actividad antibacteriana, con un descenso de 3,81 logs a las 48 horas. Colistina mostró menor actividad que estos antibióticos ( $\Delta$ logs = -2.06 respecto a los controles). La tobramicina no mostró actividad, en consonancia con la alta CMI constatada en los estudios *in vitro*. Todos los ratones tratados con imipenem, sulbactam o colistina sobrevivieron ( $p$  con tendencia a la significación estadística, 0,06 versus controles).

- Clon D:

En el caso de esta cepa con sensibilidad a sulbactam (CMI = 4  $\mu$ g/mL) pero resistencia intermedia a imipenem (CMI = 8  $\mu$ g/mL) y tobramicina (CMI = 8  $\mu$ g/mL), tanto imipenem, sulbactam, tobramicina como rifampicina mostraron significativos descensos de UFC/gramo respecto a los controles (Figura 10). De nuevo imipenem fue el más activo. La eficacia de imipenem y sulbactam fue inferior a la obtenida en el clon A, de acuerdo con los parámetros farmacodinámicos, aunque las diferencias no fueron significativas. La supervivencia fue del 100 % en el caso de imipenem y rifampicina y del 75 % en los grupos de sulbactam y tobramicina ( $p < 0,05$  versus controles). Colistina mostró escasa actividad *in vivo* de forma comparable a los estudios de



letalidad *in vitro*: -0,4 logs en los recuentos pulmonares, sin diferencias significativas respecto los controles, disminución de las bacteriemias no significativa respecto los controles y ligera disminución de la mortalidad que tampoco fue significativa.

- Clon E:

Para esta cepa con alta resistencia a imipenem (CMI = 512 µg/mL) y sulbactam (CMI = 128 µg/mL), ninguno de estos 2 tratamientos mostró actividad en el modelo experimental, y sus resultados fueron comparables respecto al grupo control en cuanto a recuentos pulmonares, bacteriemias (100 y 87,5 % respectivamente) y supervivencia (25 % a las 48 horas en los 2 casos). Los tratamientos con rifampicina y tobramicina fueron los más eficaces (Figura 11) ( $\Delta$ logs = -5,15 y -4,16 respectivamente a las 48 horas,  $p = 0,06$ ) y más activos que el tratamiento con colistina ( $\Delta$ logs = -2,39,  $p < 0,05$ ), tanto respecto a recuentos pulmonares como bacteriemia y supervivencia (100 % de ratones vivos a las 48 horas con tobramicina o rifampicina,  $p < 0,05$  versus controles, y del 85,5 % en el caso de la colistina [ $p = 0,06$ ]). Aunque la actividad de la tobramicina en el clon E fue ligeramente superior a la obtenida en el clon D, las diferencias no alcanzaron significación estadística.

### 2.3. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA: COMBINACIONES:

Al igual que en el caso de las monoterapias, los resultados obtenidos con las diferentes combinaciones de antibióticos *in vivo* se contrastaron con los obtenidos *in vitro* mediante curvas de letalidad. Los correspondientes a la neumonía por los clones D y E se muestran en detalle en el 2º artículo de neumonía experimental [Montero A, 2004].

#### 2.3.1. **Actividad *in vitro* de las diferentes combinaciones de antibióticos:**

Mediante las curvas de letalidad (Tablas 8-10) se analizó la posible sinergia *in vitro* entre los antibióticos de cada combinación. En ninguna de las combinaciones estudiadas se apreció un efecto antagonista. Los resultados por clones fueron los siguientes:

- Clon A:

- La combinación de sulbactam con imipenem alcanzó el grado de sinergia con las dosis mayores de imipenem.
  - Por su alta resistencia a tobramicina, en las curvas de letalidad de las combinaciones con este antibiótico, se utilizaron concentraciones inferiores a las estándar, más parecidas a las concentraciones potencialmente alcanzables en humanos. Así utilizamos las diluciones de  $1/4 \times \text{CMI}$  (equivalente a  $32 \mu\text{g/mL}$ ) y  $1/8 \times \text{CMI}$  ( $16 \mu\text{g/mL}$ ). En estas condiciones, las combinaciones de tobramicina con imipenem mostraron sinergia con varias concentraciones, llegando incluso a ser bactericidas. En el caso de la combinación de tobramicina con sulbactam, sólo el uso de la concentración de  $1/4 + 1/2 \times \text{CMI}$  respectivamente logró efecto sinérgico.
  - Las combinaciones de rifampicina con imipenem y tobramicina mostraron sinergia con varias de las concentraciones utilizadas. En el caso de la combinación rifampicina-imipenem, ésta alcanzó el rango de bactericida.
- Clon D:
    - La combinación de sulbactam a  $1/4 \times \text{CMI}$  con imipenem a  $1/4 \times \text{CMI}$  logró efecto sinérgico.
    - Las combinaciones de tobramicina a  $1/2 \times \text{CMI}$  con imipenem a  $1/4$  y  $1/8 \times \text{CMI}$  ( $2$  y  $1 \mu\text{g/mL}$  respectivamente) mostraron sinergia. Las combinaciones de sulbactam  $1/2 \times \text{CMI}$  con tobramicina a  $1/2$  y  $1/4 \times \text{CMI}$  también mostraron efecto sinérgico. La única combinación de tobramicina que alcanzó el rango de bactericida fue tobramicina  $1/4 + \text{sulbactam } 1/2 \times \text{CMI}$ .
    - Dentro de las combinaciones con rifampicina, sólo la combinación de rifampicina a  $1/2 \times \text{CMI}$  con imipenem a  $1/4 \times \text{CMI}$  ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) mostró sinergia; el resto de combinaciones con imipenem y con tobramicina mostraron efecto indiferente.
  - Clon E:
    - Las combinaciones de sulbactam con imipenem mostraron únicamente indiferencia a todas las concentraciones estudiadas.

- De forma similar, todas las combinaciones estudiadas de tobramicina con imipenem mostraron indiferencia, mientras que todas las combinaciones con sulbactam mostraron efecto sinérgico, sin alcanzar efecto bactericida.
- Las combinaciones de rifampicina a 1/4 x CMI con imipenem a 1/16 x CMI (32 µg/mL) o sulbactam a 1/4 y 1/8 x CMI (16 y 8 µg/mL respectivamente) mostraron efecto sinérgico. Rifampicina 1/2 x CMI combinada con tobramicina 1/2 x CMI también mostró sinergia. Sólo las combinaciones sinérgicas de rifampicina con sulbactam o tobramicina alcanzaron el rango de bactericidas. Las combinaciones de rifampicina con colistina sólo mostraron indiferencia.

### 2.3.2. **Actividad *in vivo*: Modelo de neumonía experimental en el ratón:**

A continuación se muestran los resultados obtenidos con las diversas combinaciones frente a las cepas de los clones A, D y E (Tablas 5-7 y Figuras 9-11). Mientras que los recuentos pulmonares y el porcentaje de bacteriemias fueron variables según las pautas de antibiótico, debe destacarse que todas las combinaciones estudiadas proporcionaron una supervivencia del 100 % en los ratones tratados. Los resultados del modelo animal nos permitieron analizar la existencia de discrepancias respecto a los resultados aportados por los estudios microbiológicos *in vitro* (Tabla 11).

- Clon A:
  - La combinación de sulbactam con imipenem no mejoró el efecto de los 2 betalactámicos por separado respecto al aclaramiento pulmonar. Incluso se obtuvieron resultados menores que imipenem con la combinación, aunque sin significación estadística. Respecto a las bacteriemias, la combinación sí redujo el porcentaje de bacteriemias respecto a las monoterapias, aunque sólo de forma muy ligera y no significativa.
  - Las combinaciones de tobramicina con imipenem o sulbactam no mejoraron la actividad de estos antibióticos por separado, siendo incluso inferiores a las monoterapias (diferencias no significativas).
  - La combinación de rifampicina con imipenem mejoró ligera pero significativamente la actividad del imipenem aislado ( $\Delta \log_{10} = -5,75$  vs  $-5,38$ ,  $p < 0,05$ ). Esta

combinación fue la terapia más activa ( $p < 0,05$ , ANOVA) de todas las estudiadas en esta cepa de *A. baumannii*. De forma similar la combinación de rifampicina con tobramicina fue superior a la rifampicina aislada ( $\Delta\text{logs} = -4,17$  vs  $-3,81$ ,  $p < 0,05$ ).

- Clon D:

- Del mismo modo que en el clon A o sensible, la combinación de imipenem con sulbactam no mejoró la actividad de los 2 antibióticos por separado, tanto en lo que se refiere a recuentos pulmonares como bacteriemias. Sin embargo, la actividad de la combinación en el clon D fue significativamente inferior a la mostrada en el clon A, reflejando la menor sensibilidad *in vitro* de esta cepa.
- Las combinaciones de tobramicina con imipenem ( $\Delta\text{logs} = -5,40$ ) o sulbactam ( $\Delta\text{logs} = -4,65$ ) mejoraron la actividad de los antibióticos por separado ( $\Delta\text{logs} = -3,45$ ,  $-4,48$  y  $-3,67$  respectivamente,  $p < 0,05$ ).
- La combinación de rifampicina con imipenem no fue superior al imipenem aislado (diferencias no significativas), aunque fue inferior al efecto obtenido por la misma combinación en el clon A ( $p < 0,05$ ). La adición de rifampicina a la tobramicina mejoró ligeramente la actividad de cada antibiótico por separado, aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas.

- Clon E:

- La combinación de imipenem con sulbactam no fue estudiada en este clon altamente resistente a los 2 antibióticos, dado que ninguno de ellos mostró actividad por separado y que el estudio *in vitro* no mostró sinergia de la combinación.
- De forma similar al clon D, las combinaciones de tobramicina con imipenem ( $\Delta\text{logs} = -5,64$ ) o sulbactam ( $\Delta\text{logs} = -5,0$ ) mejoraron el efecto antibacteriano de tobramicina en monoterapia ( $\Delta\text{logs} = -4,16$ ) de forma significativa. No hubo diferencias significativas en la actividad de las combinaciones entre los clones D y E.
- Dadas su multirresistencia y las dificultades que entraña su tratamiento en la práctica clínica, se analizaron todas las combinaciones posibles de rifampicina con el resto de antibióticos. Las combinaciones de rifampicina con imipenem o tobramicina fueron superiores a los tratamientos por separado, así como las más activas ( $\Delta\text{logs} = -7,03$  y  $-6,86$ ,  $p < 0,05$  respecto al resto de tratamientos, ANOVA; y  $p$  no significativa entre

los 2 tratamientos). Las combinaciones con sulbactam o colistina no mejoraron la actividad de la rifampicina aislada ( $p$  no significativa).

### 3. RESULTADOS DEL OBJETIVO 3: REPERCUSIONES CLÍNICAS DERIVADAS DE LA APLICACIÓN DEL MODELO (2000-2001).

Como ya ha sido comentado en la sección de “Material y métodos”, durante el período 1998-2001, posterior al estudio clínico-epidemiológico de intervención expuesto (Enero 97-Junio 98), la endemia por *A. baumannii* de nuestro Hospital de Bellvitge persistió muy elevada y con una gran prevalencia de cepas carbapenem-resistentes (Figura 12).

En este contexto clínico-epidemiológico decidimos realizar un ensayo clínico preliminar utilizando la combinación más activa obtenida del modelo experimental animal para el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter baumannii* con alta resistencia a carbapenémicos, que fue imipenem y rifampicina. A raíz de estos resultados y de la amplia experiencia obtenida con el manejo diario de estos pacientes, nos cuestionamos diversos aspectos de esta infección, como la mortalidad atribuible, las indicaciones de tratamiento antibiótico y la obligatoriedad de introducir la colistina en las pautas de tratamiento empíricas en las UCIs.

#### 3.1. ESTUDIO DE LA EFICACIA CLÍNICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA COMBINACIÓN MÁS ACTIVA OBTENIDA EN EL MODELO ANIMAL EN EL TRATAMIENTO DE LA NEUMONÍA Y OTRAS INFECCIONES GRAVES POR *A. BAUMANNII* MULTIRRESISTENTE:

Durante el período Septiembre 2000-Octubre 2001 se incluyeron 14 pacientes en este estudio piloto, de los cuales 10 se consideraron evaluables (8 hombres y 2 mujeres) con una edad media de  $55,2 \pm 16,9$  años; 4 casos fueron excluidos por recibir tratamiento sólo durante 24 horas (1 paciente) o recibir concomitantemente colistina (3 pacientes con infecciones neuroquirúrgicas). Nueve pacientes estaban ingresados en la UCI (SAPS II al ingreso:  $34,25 \pm 6,2$ ) y el resto en una sala de traumatología. El tiempo medio de la antibioterapia fue 12.1 días (6 - 24 días). La fuente de infección fue:

Neumonía asociada a ventilación mecánica (NVM) en 4 casos, bacteriemia relacionada con catéter vascular en 1 caso, e infecciones postquirúrgicas en 5 casos (3 con abscesos abdominales, 1 con empiema pleural y 1 con infección de una artroplastia de cadera). Todos los aislamientos de *A. baumannii* pertenecieron a los clones multirresistentes A (en este período los aislamientos pertenecientes al clon A, que en los años anteriores eran sensibles a carbapenémicos, se hicieron resistentes a ellos) y E. Los 2 clones presentaban sensibilidad *in vitro* exclusiva a la colistina, con CMI de imipenem  $\geq 64$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a rifampicina 4-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 12) [Saballs M, 2006].

Tres pacientes fueron éxitos 9, 14 y 15 días después del inicio del tratamiento (casos 2, 4 y 6). Dos de ellos, uno con NVM y otro con absceso intraabdominal secundario a cirugía pancreática se consideraron fallos terapéuticos, con persistencia clínica de la infección y cultivos positivos con cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a rifampicina en los días 6 y 13 de tratamiento (casos 4 y 6); el tercer paciente (caso 2) con NVM se curó tras 9 días de tratamiento, pero desarrolló una bacteriemia primaria por *A. baumannii* resistente a rifampicina una semana más tarde y fue éxitos. Los 7 pacientes restantes se curaron: 2 con NVM sólo con antibioterapia (casos 1 y 3); uno con bacteriemia de catéter, asociado a la retirada del mismo (caso 5); y 4 pacientes con infecciones quirúrgicas, con desbridamiento o drenaje quirúrgico concomitante (casos 7-10).

Se demostró desarrollo de resistencia *in vitro* a rifampicina (aumento de la CMI de 4-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en aislamientos sucesivos de *A. baumannii* en 7 de los 10 pacientes tratados (70 %). En 4 casos estos aislamientos fueron del mismo foco inicial; 2 de estos pacientes evolucionaron favorablemente a pesar del hallazgo de estos cultivos (casos 7 y 8). En 3 de los 7 casos con aislamientos resistentes, se detectaron posteriormente otros aislamientos sensibles. Los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* iniciales y los sucesivos, resistentes y sensibles, pertenecieron al mismo clon según los estudios de electroforesis en gel por campos pulsátiles.

### 3.2. EVALUAR LA MORTALIDAD ATRIBUIBLE REAL DE LA NVM POR *A. BAUMANNII* Y LA NECESIDAD DE INTRODUCIR LA COLISTINA EN LA

## ANTIBIOTERAPIA EMPÍRICA DE RUTINA EN LAS UCIs CON ENDEMIAS O BROTES EPIDÉMICOS POR ESTOS MICROORGANISMOS:

La endemia de nuestro hospital se mantuvo muy elevada hasta finales de 2001, a pesar de las repetidas maniobras de intervención realizadas a lo largo de todos estos años. A menudo la implementación de las medidas de control se siguió de un descenso transitorio de las tasas mensuales, pero una y otra vez ese efecto tendía a agotarse en los meses siguientes, restableciéndose e incluso sobrepasándose los niveles de partida.

El predominio de los clones CR se estableció de manera permanente, aunque se llevó a cabo una restricción muy notable durante más de 2 años del consumo de carbapenémicos en las UCIs.

Las principales conclusiones de los resultados obtenidos en el modelo experimental cuestionaban el grado de eficacia de la colistina para la NVM en comparación con el resto de los modernos antibióticos (betalactámicos, aminoglucósidos y rifampicina). Por otra parte, estos estudios abogaban por la conveniencia de utilizar combinaciones de rifampicina y en particular, la de imipenem con rifampicina.

Sin embargo, el uso clínico de la combinación imipenem-rifampicina en las infecciones graves, y en particular en la neumonía, por *A. baumannii* multirresistente se mostró eficaz, pero el desarrollo de resistencia a la rifampicina en una gran mayoría de casos, dio al traste con la posibilidad de recomendar la utilización de esta combinación de manera rutinaria en el tratamiento de estas infecciones.

Nos vimos abocados, por tanto, al seguimiento de muchos pacientes en las UCIs con colonización/infección de las vías respiratorias y un cierto porcentaje, difícil de determinar, con neumonía por *A. baumannii* multirresistente, con la única alternativa terapéutica de la colistina. Ello comportó un uso extendido de colistina tópica en aerosol para las colonizaciones y traqueobronquitis y un empleo restringido de colistina sistémica para los pacientes con auténtica neumonía.

Un aspecto fundamental que debíamos dilucidar era la conveniencia o no de introducir la colistina sistémica en las pautas de antibioterapia empírica de los pacientes de

nuestras UCIs con alta sospecha de NVM u otras infecciones graves. Ello tenía relación con el fuerte grado de evidencia acumulado en la literatura reciente respecto a la necesidad de tratar adecuadamente y con la máxima precocidad las infecciones graves por BGN en las UCIs dada su influencia en la tasa de mortalidad. Esta práctica generalizada comportaba el riesgo de condicionar el desarrollo de una resistencia significativa del microorganismo a la colistina y la pérdida de esta última opción terapéutica.

La publicación de una serie nacional de pacientes con NVM por *A. baumannii* [Garnacho-Montero J, 2003], en la que se reportaba que la colistina proporcionaba resultados similares al imipenem, inclusive al utilizarse tardíamente tras el conocimiento de los resultados de los cultivos, contrastaba fuertemente con los resultados de nuestro modelo experimental y la evidencia referida de la repercusión sobre la mortalidad de una antibioterapia empírica adecuada precoz. Esta publicación y un estudio caso-control publicado por los mismos autores [Garnacho J, 2003] en el que se relativizaba la tasa de mortalidad atribuible a la NVM por *A. baumannii* motivaron nuestra reflexión que se publicó como un editorial [Montero A, 2003].

Los puntos fundamentales de esta reflexión se exponen a continuación:

1. El microorganismo tiene una virulencia escasa y un alto porcentaje de pacientes sufre únicamente una colonización, sin relevancia clínica.
2. La diferenciación entre colonización respiratoria, la más frecuente, traqueobronquitis y una verdadera neumonía es particularmente difícil en el caso de *A. baumannii*.
3. El punto de corte de  $10^3$  UFC/mL para el cepillado bronquial y de  $10^4$  UFC/mL para el lavado broncoalveolar utilizados para el diagnóstico de neumonía por otros BGN, podría no ser adecuado para el diagnóstico de la neumonía por *A. baumannii* y debería verificarse. El requisito de un recuento mayor ha sido aceptado en el caso de otras infecciones por microorganismos poco virulentos como *Candida* spp.
4. Basándose en lo expresado en el punto anterior, un cierto número de pacientes podría diagnosticarse erróneamente de neumonía.
5. El papel patógeno del microorganismo en el contexto de un cultivo polimicrobiano con otros microorganismos concomitantes resulta muy dudoso y difícil de establecer.
6. El pronóstico de la NVM por *A. baumannii*, en sí misma, no parece tan grave como el de otras neumonías por BGN, a juzgar por la eficacia demostrada por la colistina, a



pesar de su perfil farmacodinámico poco favorable y la escasa influencia de la precocidad de una antibioterapia adecuada en la respuesta terapéutica y la tasa de mortalidad.

7. La elevada mortalidad cruda asociada a la NVM por *A. baumannii* y el contexto de los pacientes en los que ésta incide, hacen muy dificultosa una evaluación rigurosa de su mortalidad atribuible. Los datos referidos y nuestra experiencia acumulada a lo largo de estos años sugieren que en muchas ocasiones los pacientes fallecen “con” neumonía por *A. baumannii* más que “por” neumonía por *A. baumannii*.

8. Sobre la base de todas estas consideraciones, a nuestro entender, no parece recomendable utilizar de forma generalizada colistina sistémica en la antibioterapia empírica de las infecciones graves en las UCIs sometidas a endemias o brotes epidémicos por *A. baumannii*. Por el contrario, se aconseja su uso más juicioso y ponderado en un grupo definido de pacientes.

9. Estas consideraciones suponen un cierto alivio para los hospitales como el nuestro, que deben enfrentarse a endemias elevadas y cronificadas por *A. baumannii* multirresistente, con mínimas alternativas terapéuticas. Con todo, ello no debe entenderse como una banalización de las posibles consecuencias de la NVM por *A. baumannii* en un paciente concreto en estado crítico.



**VI.**

## **DISCUSIÓN**



## VI. DISCUSIÓN.

Las infecciones nosocomiales tienen una gran trascendencia clínica, pues empeoran el pronóstico de los pacientes, alargan la estancia hospitalaria y aumentan los gastos sanitarios. Además, presentan el problema añadido de que las bacterias causales suelen mostrar mayor resistencia a los antibióticos habituales [Yates RR, 1999]. Este aumento de las tasas de resistencia antibiótica entre las bacterias patógenas ha resultado en un aumento de la morbilidad y mortalidad de las infecciones nosocomiales [Yates RR, 1999].

Desde hace ya más de una década, *A. baumannii* tiene una implicación importante en el conjunto de las infecciones nosocomiales. Afecta en la mayor parte de los casos a pacientes de las unidades de cuidados intensivos, sometidos a múltiples manipulaciones, y que presentan elevado riesgo de colonización por este tipo de bacterias multirresistentes. Un porcentaje elevado de los episodios de neumonía asociada a ventilación mecánica, en algunos casos superior al 15 %, podrían ser causados por *A. baumannii* [Joly-Guillou ML, 1997].

En nuestro hospital, identificamos el inicio del brote epidémico por *Acinetobacter baumannii* multirresistente como tal en Octubre de 1992. Desde entonces el número de casos fue progresivamente creciente hasta que, en Enero de 1997, aparecieron los primeros casos de infecciones por cepas con resistencia a carbapenémicos. Este hecho determinó una revisión e implementación con el máximo nivel de exigencia de nuestro programa de control de la infección nosocomial. Se realizó un estricto seguimiento de los pacientes colonizados por *Acinetobacter baumannii* y se analizaron las características clínico-epidemiológicas de estos pacientes. Los resultados de este primer estudio clínico-epidemiológico fueron publicados en el primer artículo de esta tesis doctoral [Corbella X, 2000].

### 1. OBJETIVO 1: ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICO PRELIMINAR.

Los factores de riesgo habituales para la adquisición de la mayoría de infecciones nosocomiales también se dan en el caso de *A. baumannii*: Severidad de la enfermedad

de base, uso previo de antibióticos y días previos con mecanismos invasivos [Ariza J, 2001]. Sin embargo, las circunstancias específicas que favorecen las infecciones por *A. baumannii* son menos conocidas. De los estudios realizados por nuestro grupo entre 1996 y 1998, se concluyó que la condición previa de portador y la presión ambiental ejercida por el medio inanimado y otros pacientes colonizados o infectados que conviven en la misma unidad hospitalaria, son importantes factores de riesgo para la adquisición de *A. baumannii* [Corbella X, 1996-1; Ayats J, 1997; Corbella X, 1999]. También intentamos analizar en concreto las posibles diferencias epidemiológicas entre las cepas sensibles y resistentes a carbapenémicos. El uso previo de carbapenémicos fue un factor de riesgo significativo para la infección por *Acinetobacter baumannii*-CR (riesgo relativo 4,58). El estado previo de portador de cepas *Acinetobacter baumannii*-CR fue una condición mayor para el posterior desarrollo de infecciones por estas cepas (riesgo relativo 35,30) y también la concentración de pacientes en la misma unidad de hospitalización con *Acinetobacter baumannii*-CR (riesgo relativo 1,73) [Corbella X, 2000].

En el curso del estudio clínico-epidemiológico en nuestro hospital se establecieron una serie de medidas para intentar evitar la diseminación hospitalaria del brote, que incluyeron diversos procedimientos de intervención habituales en los programas de control de la infección nosocomial, junto con la restricción en el uso de carbapenémicos. Entre esas medidas, además de una vigilancia rigurosa del cumplimiento de las medidas de barrera y los protocolos de limpieza y la puesta en marcha de un programa de educación continuada para el personal de las UCIs, se realizó un rediseño estructural parcial de las unidades hospitalarias para facilitar el lavado de manos en el interior de las habitaciones, así como un cierre secuencial de las diversas UCIs para intentar una máxima descontaminación. Con este programa se logró una sensible disminución en las tasas de infección durante la segunda fase del período (2º semestre del estudio) que se estabilizaron durante la tercera fase (3º semestre). En este programa no incluimos la implantación de la descontaminación intestinal selectiva de los pacientes de las UCIs, por la relevancia de la colonización extraintestinal y ambiental en la epidemiología de estas infecciones y el riesgo de favorecer el desarrollo de resistencia a la colistina [Agustí C, 2002].

La aparición de la resistencia a carbapenémicos en el curso de la epidemia de nuestro hospital coincidió con una importante presión antibiótica selectiva (importante uso de imipenem, superior a 30 DDD/100 UCI hospitalizaciones-día). Sin embargo, por técnicas de tipado molecular observamos que la aparición de la carbapenem-resistencia no se debió a la adquisición de mecanismos de resistencia por los clones previamente existentes desde 1992 (A, B y C), sino a la introducción secuencial de 2 nuevos clones (D y E). Y lo más preocupante fue que tras la irrupción del clon E o altamente resistente a imipenem, éste se volvió progresivamente dominante sobre los otros clones más sensibles, suponiendo alrededor del 50 % de los aislamientos de *A. baumannii*. A partir de 1999 se desarrolló también resistencia a carbapenémicos en los clones A y B, de tal forma que el conjunto de la tasa de *Acinetobacter baumannii*-CR alcanzó el 87 % en el año 2000.

A raíz de la aparición de las cepas resistentes a carbapenémicos en 1997, se planteó un gran problema clínico a la hora de iniciar un tratamiento en los pacientes que así lo requerían. La presencia del clon D, con sensibilidad intermedia a imipenem pero que mantenía la sensibilidad *in vitro* al sulbactam abrió la posibilidad alternativa de esta antibioterapia durante un cierto período, y demostró buenos resultados [Corbella X, 1998]. La efectividad de los carbapenémicos frente a infecciones por estas cepas con sensibilidad disminuida quedaba por determinar. Dos artículos aparecidos posteriormente en la literatura han venido a corroborar la similar eficacia de la ampicilina-sulbactam y el imipenem en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica [Wood GC, 2002] y con bacteriemia [Jellison TK, 2001].

Con la llegada del clon E, con alta resistencia a imipenem y sulbactam y sensibilidad *in vitro* exclusiva a colistina se planteó un problema terapéutico de máximo nivel. La colistina se presentaba como la única alternativa terapéutica a considerar, pero la experiencia clínica con este antibiótico en monoterapia en las últimas décadas era prácticamente inexistente y era considerado altamente tóxico (nefrotoxicidad, toxicidad neuromuscular y, por vía inhalatoria, apneas, debilidad de la musculatura respiratoria y broncoconstricción) [Maddison J, 1994]. Por estas razones, este antibiótico había caído en desuso desde los años 60 coincidiendo con la introducción de los aminoglicósidos, con los que se superponía el espectro antibacteriano. En estas circunstancias, nos planteamos cuál sería su eficacia comparada con los antibióticos más modernos, sobre

todo en los casos con infecciones por clones con sensibilidad reducida, pero no altamente resistentes a los betalactámicos.

Este contexto asistencial tan preocupante fue el que determinó plantear el objetivo 2: La puesta en marcha de un modelo experimental de neumonía, la infección con mayor gravedad clínica, que investigara la actividad antibacteriana de los diferentes antibióticos disponibles y que utilizara varias cepas protagonistas de nuestra endemia, con diferente espectro de sensibilidad antibiótica, desde las cepas iniciales sensibles a imipenem hasta las cepas multirresistentes, incluido el clon E con alto grado de resistencia a carbapenémicos. Se planteó que de esta manera se podría conocer mejor la eficacia comparativa de la colistina frente a las demás familias de antibióticos más modernos y que además debía investigarse el papel de las combinaciones antibióticas como nuevas alternativas terapéuticas.

## 2. OBJETIVO 2: MODELO DE NEUMONÍA EXPERIMENTAL EN RATONES.

El primer paso en nuestro estudio experimental fue la investigación *in vitro*. El antibiograma convencional y los resultados de las CMI y CMB constituían una información básica indispensable, pero insuficiente para la problemática que teníamos planteada. Se han diseñado estudios *in vitro* más sofisticados como el uso de “tableros de ajedrez” y/o las curvas de letalidad-tiempo para predecir mejor la eficacia *in vivo* de un antibiótico. Con todo, estos métodos están limitados por el hecho de medir el efecto únicamente a concentraciones estáticas, que es una circunstancia diferente a la que se produce *in vivo*, donde las concentraciones son fluctuantes. La actividad bactericida evaluada por las curvas de letalidad-tiempo es el parámetro que mejor correlaciona con la actividad *in vivo* [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992; Rodríguez-Hernández MJ, 2000].

El estudio *in vitro* de las combinaciones de antibióticos y la interpretación de sus resultados presenta todavía más dificultad; en estos estudios se suelen utilizar concentraciones subinhibitorias por lo menos de un antibiótico, a diferencia de los modelos *in vivo* en los que los antibióticos se administran a concentraciones clínicamente relevantes [Fantin B, 1992]. Además, el aspecto de la variación continua



de cada antibiótico es muy importante en los tratamientos en combinación [Mouton JW, 1999].

El uso más frecuente de combinaciones de antibióticos en la práctica clínica se realiza normalmente para aumentar el espectro antibacteriano en pacientes críticos en los tratamientos empíricos o en pacientes con infecciones polimicrobianas [Fantin B, 1992]. Sin embargo, en algunos casos estas combinaciones pueden obtener un efecto sinérgico y aumentar la actividad bactericida y/o la velocidad de “killing” *in vivo*, hecho que puede ser decisivo en algunas infecciones graves que comprometen al paciente o infecciones con inóculos muy altos. También en ocasiones, una combinación antibiótica puede prevenir la aparición de resistencias a alguno de los antibióticos de la combinación; ello ocurriría porque se necesitarían 2 mutaciones consecutivas para que se produjera el crecimiento de los mutantes cuando se utilizan 2 antibióticos de diferentes clases, sin resistencia cruzada entre ellos, y manteniendo niveles por encima de sus respectivas CMI's [Zhao X, 2001]. Las combinaciones de 3 antibióticos podrían aportar más flexibilidad [Zhao X, 2001].

Dentro de nuestro modelo experimental, en los estudios *in vitro*, analizamos las CMI y CMB y el efecto bactericida en las curvas de letalidad de los diferentes antibióticos y sus combinaciones, como un paso previo al modelo experimental y para confrontar finalmente ambos resultados *in vitro* e *in vivo* y extraer unas conclusiones más consistentes.

En el estudio de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos, se demostró una carbapenemasa tipo OXA-24 en el clon E, al igual que otros autores de nuestro país, pero no en el clon D. Para explicar la resistencia a carbapenémicos de alto nivel observada se ha sugerido una combinación de diversos mecanismos, incluyendo la actividad betalactamasa, la pérdida de proteínas de membrana y la alteración de las PBP [Fernández Cuenca F, 2003; Ribera A, 2004].

El modelo *in vivo* escogido de neumonía en el ratón fue el que utilizaba animales inmunocompetentes, porque como ya se ha comentado es el que mejor reproduce la infección humana de los pacientes de las UCIs y en el que además el efecto postantibiótico de los tratamientos es más evidente [Gavalda J, 1997; Rodríguez-

Hernández MJ, 2000]. La opción ideal de utilizar un modelo humanizado [Gavalda J, 2000] no se contempló, ya que hasta la fecha no se han desarrollado modelos experimentales animales de farmacocinética humanizada en las infecciones por *Acinetobacter*.

## 2.1. MODELO DE NEUMONÍA:

Nuestro modelo de neumonía por *Acinetobacter baumannii* en el ratón no inmunodeprimido fue fiable y reproducible y nos permitió el análisis de la eficacia de los diferentes antibióticos y su comparación. La inoculación intratraqueal es una técnica de inoculación que reproduce la microaspiración, patogenia habitual de la neumonía asociada a ventilación mecánica por *A. baumannii*, y la técnica es simple y reproducible [Esposito AL, 1984]. La inoculación intratraqueal junto con mucina provocó sistemáticamente neumonía en los ratones, comprobable mediante técnicas histológicas. Se obtuvieron recuentos pulmonares del orden de 10-11  $\log_{10}$ UFC/gramo de tejido pulmonar, con muy escasas variaciones y gran homogeneidad en los resultados, además del 100 % de bacteriemia y supervivencia entre 40 y 53,33 % según las cepas. No obtuvimos diferencias significativas en los animales control entre los 3 clones en los recuentos pulmonares, bacteriemia o supervivencia, por lo que el modelo nos permitió comparar la eficacia de los diferentes tratamientos entre las cepas con diferentes sensibilidades.

Una limitación del estudio fue que el número de ratones utilizados en cada terapia en el grupo tratamiento (n = 4) era pequeño; sin embargo, fue suficiente para que las diferencias alcanzaran significación estadística en la mayoría de comparaciones sobre los recuentos pulmonares, entre los grupos tratamiento y control, entre diferentes tratamientos y entre diferentes cepas. No obstante, este número no siempre permitió obtener diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento en cuanto a los resultados de bacteriemias o mortalidad. El modelo fue diseñado con la priorización de la variable “recuentos pulmonares”, porque si se hubieran priorizado las variables “porcentaje de bacteriemias” o “porcentaje de supervivencia”, el número de ratones necesario para alcanzar diferencias significativas habría sido muy superior, y en los

estudios experimentales con animales es mandatorio utilizar el menor número de animales imprescindible para obtener las conclusiones pertinentes [Zak O, 1993].

De la comparación de los resultados farmacocinéticos obtenidos en el modelo animal con los niveles habituales en humanos, se pueden deducir varias conclusiones:

-En el caso de los betalactámicos imipenem y sulbactam, las  $C_{max}$  fueron algo superiores a las obtenidas en humanos, pero a pesar de ello y debido al metabolismo más acelerado en los ratones, la vida media y el  $\Delta t > CMI$  fueron menores en el modelo.

-En el caso de la tobramicina, la concentración pico máxima fue superior a la obtenida en humanos con las dosis habituales. La idea inicial fue utilizar una dosis similar a la de monodosis en humanos, pero al repetir en nuestro modelo la dosis cada 6 horas basándose en resultados preliminares que utilizaron una dosis más baja de 15 mg/kg/día, la farmacocinética final fue superior a la teóricamente esperada. Dado que este antibiótico muestra un efecto bactericida dependiente de la concentración pico, es probable que su efecto antibacteriano haya sido sobrevalorado en nuestro modelo.

-Los niveles de rifampicina fueron muy similares a los obtenidos en humanos, en los que una dosis de 600 mg alcanza unos niveles pico en suero de 10  $\mu\text{g/mL}$  y una vida media de 3 horas [Kucers A, 1997-1]. Las dosis superiores resultan en niveles mayores de lo proporcional: por ejemplo, una dosis de 1200 mg (20 mg/kg/día) alcanza en humanos un pico  $> 30 \mu\text{g/mL}$ . Además los niveles pico en suero, la vida media y el área bajo la curva son mayores cuando el fármaco se administra en forma de una dosis única diaria en lugar de dosis divididas. Por lo tanto, el comportamiento farmacocinético obtenido en nuestro modelo podría ser similar al obtenido en humanos cuando se utilizan dosis elevadas aproximadas a 20 mg/kg/día, como es el caso de lo recomendado para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*.

-Finalmente, en el caso de la colistina no existen referencias recientes en la literatura médica que analicen su farmacocinética, y es obligado remitirse a las referencias de los años 60 y 70, coincidiendo con el inicio de su aplicación en clínica. Además a la hora de preparar nuestro modelo, no encontramos ningún otro que hubiera utilizado este antibiótico de forma similar. Por ello, nos vimos en la obligación de ensayar varias

dosis en los ratones hasta conseguir la que más se ajustara al perfil farmacocinético en los humanos. La dosis finalmente utilizada en el modelo de 500.000 unidades/kg/día proporcionó al igual que en el caso de los betalactámicos, niveles pico discretamente superiores a los obtenidos en humanos, con vida media más corta.

Globalmente, los resultados de eficacia *in vivo* de los diferentes antibióticos utilizados estuvieron acordes con los datos de farmacocinética y farmacodinámica, con la excepción de la colistina. Sin embargo, como ya se ha comentado, el modelo animal mostró ciertas discrepancias con los resultados obtenidos de los estudios microbiológicos *in vitro* (CMI/CMB y curvas de letalidad) (Tabla 11). Con imipenem y sulbactam se alcanzó un  $\Delta t > \text{CMI}$ s por debajo del 20 % del tiempo interdosis en el caso de la cepa más sensible (clon A). Tobramicina alcanzó un cociente  $C_{\text{max}}/\text{CMI}$  (cociente inhibitorio) de  $> 4$  para las cepas más sensibles D y E, que mostraban CMI de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Rifampicina y colistina mostraron un  $\Delta t > \text{CMI}$ s superior al 40-50 % respectivamente para todas las cepas.

La extrapolación de los resultados obtenidos en un modelo de infección animal a los humanos debe realizarse siempre con mucha cautela por las diferencias en la farmacocinética y otras variables que pudieran influir. Sin embargo, la homogeneidad de los datos de nuestro modelo, los resultados farmacocinéticos obtenidos y la buena correlación entre los resultados de eficacia y de farmacocinética y farmacodinámica, le confieren una notable fiabilidad a la hora de aplicar sus conclusiones a la enfermedad humana.

## 2.2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA: MONOTERAPIAS:

En la primera fase del modelo analizamos la eficacia de cada antibiótico administrado de forma aislada, frente las 3 cepas de *A. baumannii* con sensibilidad variable a imipenem, para calibrar la eficacia real de la colistina frente a los otros antibióticos. Imipenem y sulbactam fueron los tratamientos más eficaces para las cepas sensibles (clon A, CMI = 1 y 2 para imipenem y sulbactam respectivamente) o con sensibilidad intermedia a carbapenémicos (clon D, CMI = 8 y 4 para imipenem y sulbactam respectivamente). Mostraron un gran efecto bactericida, lo cual estaba de acuerdo con otros estudios previos

[Joly-Guillou ML, 1997; Wolff M, 1999; Rodríguez-Hernández MJ, 2001]. Incluso su efecto pudo haber sido infraestimado, teniendo en cuenta el bajo  $\Delta t > \text{CMI}$  conseguido en el modelo en los ratones debido a la corta vida media. La farmacocinética de los 2 antibióticos fue similar, equivalente a la obtenida en humanos usando elevadas dosis diarias (imipenem 50 mg/kg y sulbactam 100-150 mg/kg). Sin embargo, y de forma sorprendente, la  $C_{\text{max}}$  de sulbactam fue muy superior, lo cual ha sido observado también en otros estudios experimentales [Wolff M, 1999]. En general, imipenem demostró mayor eficacia antibacteriana, incluso contra cepas con resistencia intermedia a imipenem y sensibles al sulbactam (clon D), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (disminución de 5,38 y 4,48 logs a las 48 horas respecto al grupo control para los clones A y D respectivamente), quizás en relación con sus mejores características farmacocinéticas / farmacodinámicas: Un buen  $\Delta t > \text{CMI}$  en las cepas sensibles y su efecto postantibiótico que prolonga su acción antibacteriana más allá de su presencia en suero [Joly-Guillou ML, 1997; Rodríguez-Hernández MJ, 2000].

Los resultados obtenidos con tobramicina podrían estar sobrestimados, aunque podrían tomarse como datos orientativos. No mostró ninguna actividad en el tratamiento de la infección por el clon A, que mostraba resistencia a este antibiótico (CMI = 128). Sin embargo, para las cepas D y E, las más problemáticas a la hora de planificar un tratamiento en la práctica clínica y que mostraban sensibilidad intermedia (CMI = 8), fue bastante eficaz, con un descenso de -3,45 y -4,16 logs respectivamente a las 48 horas ( $p$  no significativa entre las 2 cepas).

El tratamiento con rifampicina aislada obtuvo buenos resultados en la infección producida por los 3 clones (CMI = 8), sobretodo en el clon E (disminución de 3,62 logs) ( $p < 0.05$  versus clones A y D), y a pesar de que dicha CMI estuvo por encima del punto de corte de sensibilidad para las bacterias gram positivas como *S. aureus* ( $\leq 4$ ) (ya se ha comentado que no se ha establecido un punto de corte para el uso de rifampicina en bacterias gram negativas [Kucers A, 1997-1]). Estos resultados fueron prometedores y previsibles por los datos farmacodinámicos previos, con un alto índice IQ y área bajo la curva, y por los resultados de las curvas de letalidad. De la misma manera, otros autores han obtenido resultados similares [Wolff M, 1999]. La mayor eficacia observada en el caso del clon E no se correspondió con los datos *in vitro* (CMI y curvas de letalidad). Pese a todo, es bien conocido el riesgo de aparición de resistencia durante el tratamiento

con este antibiótico en las infecciones por bacterias gram positivas, lo que desaconseja su uso en monoterapia. Existen menos datos sobre la posible emergencia de resistencia frente a bacilos gram negativos, pero datos experimentales indicarían un fenómeno similar en el caso de *E. coli* [Zhao X, 2002].

Un aspecto interesante es la mayor actividad de rifampicina sobre el clon E multirresistente que sobre los clones A y D, a pesar de que presentan las mismas CMI y CMB. Es como si este clon E fuera más vulnerable a la rifampicina que los otros 2 con menor grado de multirresistencia.

La colistina mostró resultados discretos sobre aclaramiento pulmonar y disminución de bacteriemias en las cepas A y E, de forma paralela a los resultados ofrecidos *in vitro* por las curvas de letalidad, y claramente inferiores a los betalactámicos y otros tratamientos. Sorprendente e inexplicablemente de acuerdo a los datos de CMI y curvas de letalidad, en el caso del clon D, los resultados de la colistina fueron muy negativos, similares al placebo ( $\Delta \log_{10} = 0,4$  a las 48 horas [ $p$  no significativa entre ratones control y tratados] y 100 % de bacteriemias). En conclusión, los resultados globales de la colistina fueron los peores entre todos los antibióticos ensayados, y no correlacionaron con el buen perfil farmacocinético obtenido. Ello podría ser debido a que el antibiótico mostró una baja actividad bactericida y también a que los datos farmacodinámicos en suero podrían ser un mal indicador de sus niveles pulmonares, ya que su gran tamaño molecular dificulta su distribución tisular [Kucers A, 1997-2]. A la vista de nuestros resultados, la colistina no aparecía como una buena opción de tratamiento frente la neumonía por cepas de *A. baumannii* sensibles a carbapenémicos o con sensibilidad disminuida (clones A y D), dado que los betalactámicos ofrecían mejores resultados.

### 2.3. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA: COMBINACIONES:

El estudio de la eficacia de las combinaciones de antibióticos en el modelo de neumonía en el ratón mostró que todas ellas tuvieron algún grado de eficacia antibacteriana, reduciendo los recuentos pulmonares y las bacteriemias de forma significativa respecto los controles ( $p < 0,05$ ). Además la supervivencia fue del 100 % en los ratones tratados

con cualquier combinación ( $p < 0,05$  vs controles). Los resultados obtenidos pueden sintetizarse de la siguiente manera:

- Clon A:

En las curvas de letalidad *in vitro*, observamos que las combinaciones de tobramicina (a dosis de 1/4 o 1/8 x CMI, equivalente a 32 y 64  $\mu\text{g/mL}$ ) con imipenem, sulbactam o rifampicina mostraron sinergia. Estas concentraciones utilizadas de tobramicina fueron superiores a las alcanzables habitualmente en humanos en suero con las dosis habituales. Sin embargo, en el modelo *in vivo* de neumonía la combinación de tobramicina con cada uno de los 3 antibióticos no mejoró los resultados obtenidos por cada antibiótico aislado, de acuerdo a la resistencia de alto nivel de esta cepa a la tobramicina (la concentración pico no alcanzó la CMI de la bacteria) y a la falta de eficacia mostrada como monoterapia (comentado previamente). El uso de una combinación de un betalactámico con un aminoglicósido es recomendable para aumentar la eficacia en el caso de la neumonía por *Pseudomonas*, y probablemente en el caso de otros BGN si se mantiene la sensibilidad [Trouillet JL, 1998; Rahal JJ, 2001], pero no hay datos referentes a *Acinetobacter*. En un estudio experimental realizado con un diseño similar al nuestro en ratones inmunocompetentes y usando una cepa sensible a imipenem y amikacina (CMI = 0,12 y 2  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente), la combinación de imipenem con el aminoglicósido (amikacina) no mejoró los resultados obtenidos por el imipenem en monoterapia [Rodríguez-Hernández MJ, 2000] y tampoco se observó sinergia en las curvas de letalidad para dicha combinación. En vista a estos resultados los autores de aquel estudio recomendaban tratar la neumonía por cepas de *A. baumannii* sensibles a imipenem y que no mostraban sinergia *in vitro* con amikacina, únicamente con imipenem. En nuestro modelo, la combinación imipenem + tobramicina mostró peores resultados que imipenem aislado ( $\Delta\text{logs} = -4,54$  versus  $-5,38$  logs respectivamente), aunque las diferencias no fueron significativas.

La combinación imipenem + rifampicina mostró sinergia en las curvas de letalidad, y también en el modelo de neumonía el descenso de recuentos pulmonares obtenido con la combinación fue superior a los antibióticos por separado y el mayor entre todas las combinaciones estudiadas. Fue la terapéutica más activa entre todas las estudiadas en este clon. De forma similar, en un modelo de neumonía similar al nuestro con ratones neutropénicos [Wolff M, 1999] se investigaron las combinaciones de betalactámicos

(imipenem, sulbactam y ticarcilina), inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico) y rifampicina. Las cepas de *A. baumannii* utilizadas por estos otros autores mostraban CMI's de 0,5 µg/mL para imipenem y sulbactam. Concluían que los regímenes que contenían rifampicina eran los más activos y que el mejor efecto *in vivo* se obtuvo con la triple combinación de sulbactam-ticarcilina-clavulánico.

Finalmente es de destacar la disociación observada con la combinación imipenem + sulbactam que mostró efecto sinérgico en las curvas de letalidad y sin embargo fue menos activa que el imipenem aislado.

- Clon D:

En infecciones causadas por esta cepa con resistencia moderada a imipenem y sensible a sulbactam, estos 2 antibióticos por separado mantuvieron una buena eficacia antibacteriana. De acuerdo con los resultados de las curvas de letalidad, se debería esperar efecto sinérgico entre la tobramicina e imipenem o sulbactam, y en este caso así se confirmó en el modelo animal. Podría decirse que el aminoglicósido mantiene cierta actividad frente este clon, y por ello la combinación es más efectiva que los antibióticos por separado. La combinación imipenem + tobramicina fue la más activa de todos los tratamientos ensayados, seguida en eficacia por la combinación sulbactam + tobramicina.

La combinación tobramicina + rifampicina no mostró sinergia en las curvas de letalidad, pero sí que obtuvo mejores resultados que los antibióticos aislados en el modelo animal. De forma contraria, la combinación imipenem + rifampicina mostró sinergia *in vitro*, pero no mejoró en el modelo de neumonía la actividad de cada antibiótico por separado. Similar conclusión puede obtenerse de la combinación imipenem + sulbactam, que, al igual que en el clon A, mostró sinergia *in vitro* pero no en el modelo de neumonía, obteniendo incluso peores resultados que con imipenem o sulbactam aislados. Este resultado contrastó con los obtenidos previamente por Wolff et al. en su modelo de neumonía con ratones inmunodeprimidos [Wolff M, 1999].

- Clon E:

Al igual que en el caso del clon D, la combinación de tobramicina con imipenem o sulbactam mostró un mayor efecto antibacteriano que la tobramicina en esta cepa con



alto grado de resistencia a imipenem, a pesar de que los tratamientos aislados con los betalactámicos fueron totalmente ineficaces. La tobramicina mantuvo cierta actividad *in vitro* frente este clon (CMI = 8 µg/mL), y posiblemente por ello la combinación de tobramicina con sulbactam o rifampicina mostró sinergia en los estudios *in vitro*, y un mayor efecto antibacteriano en el modelo. A las dosis utilizadas, las combinaciones de imipenem y tobramicina, no mostraron sinergia en los estudios *in vitro*. Sin embargo, en el modelo animal, el superior efecto antibacteriano de la combinación imipenem-tobramicina versus sulbactam-tobramicina probablemente fue debido a la mayor actividad bactericida observada *in vitro* de imipenem respecto a sulbactam en las curvas de letalidad y al efecto postantibiótico mostrado por imipenem en el tratamiento de *A. baumannii* [Craig WA, 1998; Wolff M, 1999]. Globalmente, podría decirse que no existe una información disponible que avale el uso sistemático de la combinación betalactámico-aminoglicósido para el tratamiento de las infecciones graves por *A. baumannii*. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, el efecto aditivo de la combinación de tobramicina con imipenem o sulbactam podría ser importante en el tratamiento de la neumonía por *A. baumannii* con resistencia moderada a estos betalactámicos.

Entre las combinaciones que incluían rifampicina, las combinaciones imipenem-rifampicina y tobramicina-rifampicina fueron particularmente efectivas contra la neumonía provocada por el clon E, proporcionando un significativo mejor efecto antibacteriano que la rifampicina aislada y significando las terapias con mayor aclaramiento bacteriano pulmonar. Este resultado se correlacionó con los resultados microbiológicos obtenidos en las curvas de letalidad.

Por el contrario, la adición de rifampicina a sulbactam, cuya combinación mostró sinergia *in vitro*, no tuvo efecto en el modelo *in vivo*, y los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados con la rifampicina aislada, que fue el antibiótico más activo de la combinación. De modo semejante, y al contrario que otros estudios previos [Hogg GM, 1998; Giamarellos-Bourboulis EJ, 2001; Yoon J, 2004], la colistina combinada con rifampicina no mostró sinergia *in vitro* y tampoco presentó mejor efecto que la rifampicina en el modelo de neumonía.

El uso de rifampicina en pautas de combinación es obligado por el rápido desarrollo de resistencias si se administra en monoterapia. En el presente modelo de neumonía, no detectamos la aparición de resistencia tras 48 horas de tratamiento, pero nuestro estudio no se diseñó específicamente para abordar este problema. En el estudio de Wolff et al. [Wolff M, 1999] tampoco observaron este fenómeno en su modelo *in vivo*, pero sí apareció resistencia *in vitro* después de 24 horas de incubación.

Un hecho que debe destacarse es que los tratamientos con combinaciones de tobramicina o rifampicina fueron más activos que la colistina aislada para las cepas de *A. baumannii* sensibles o incluso resistentes a carbapenémicos, a pesar de que mostraban sensibilidad *in vitro* a la colistina y cierto grado de resistencia a los antibióticos que participaban en la combinación. Estos resultados sugerían que estas combinaciones podían ser alternativas terapéuticas más eficaces que la colistina para la neumonía por cepas de *Acinetobacter baumannii* carbapenem-resistentes. Entre ellas la pauta imipenem-rifampicina fue la más activa frente el clon con alta resistencia a imipenem, y fue la seleccionada para su aplicación en un estudio piloto en pacientes.

### 3. OBJETIVO 3: REPERCUSIONES CLÍNICAS DERIVADAS DE LA APLICACIÓN DEL MODELO.

En este estudio clínico piloto se incluyeron 10 pacientes evaluables con infecciones graves, de diversas localizaciones, todas ellas por cepas con alta resistencia a carbapenémicos. La eficacia clínica fue bastante satisfactoria, de acuerdo a los resultados del modelo experimental, si bien en un importante número de estos casos, se realizaron otras maniobras terapéuticas que pudieron influir decisivamente en la evolución. Sin embargo, inesperadamente se observó desarrollo de resistencia a la rifampicina en el 70 % de los casos, demostrando claramente que imipenem había sido ineficaz para prevenir este fenómeno. A posteriori, este hallazgo podía considerarse previsible. Nuestra selección de la pauta imipenem-rifampicina, como la más eficaz del modelo, contempló exclusivamente el concepto de eficacia antibacteriana y ya se ha comentado que nuestro modelo, corto en el tiempo, no fue diseñado para el estudio del desarrollo de resistencia a la rifampicina. Por otra parte, está bien descrito que la prevención del desarrollo de resistencias en las pautas de combinación requiere de la

actividad mantenida de ambos antibióticos durante todo el tiempo de tratamiento, y obviamente, el imipenem por sí mismo, era totalmente inactivo (CMI 512 µg/mL). Esta aparición de resistencia se consideró una limitación mayor para recomendar esta combinación como tratamiento habitual de estas infecciones. Sin embargo, queda abierta la posibilidad de que otras combinaciones de rifampicina, bien con tobramicina o bien con la propia colistina, que mantienen su sensibilidad *in vitro*, pudieran prevenir el fenómeno de la aparición de resistencia a rifampicina.

Los resultados de nuestro estudio clínico-epidemiológico inicial, la información acumulada sobre eficacia antibacteriana de los estudios *in vitro* y del modelo experimental animal utilizando tratamientos simples o combinaciones de antibióticos, y en última instancia del ensayo piloto en un número reducido de pacientes con la pauta de tratamiento de imipenem y rifampicina frente a las cepas con resistencia a imipenem, nos ha permitido tener un amplio conocimiento de la patogenia y las repercusiones clínicas de esta infección y nos han supuesto una ayuda imprescindible en el manejo de los pacientes infectados por cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes.

En general, las infecciones por *A. baumannii* son difíciles de tratar debido a su creciente resistencia a los antibióticos y su extensa difusión en los hospitales. A ello se añade el hecho de que *A. baumannii* es poco virulento y que resulta difícil determinar en cada caso clínico concreto la contribución real a la infección del aislamiento de *A. baumannii* en las muestras clínicas. Esto es así particularmente en los pacientes sometidos a ventilación mecánica, por la poca especificidad de los criterios clínicos, radiológicos o microbiológicos. La elevada frecuencia de cultivos polimicrobianos que acompañan los aislamientos de *A. baumannii* (56 % en nuestro estudio) [Corbella X, 2000] es un elemento más de confusión, ya que el papel de cada uno de los microorganismos aislados es difícil de establecer. La necesidad de que la antibioterapia se dirija frente a todos ellos puede ser cuestionable. Las simples colonizaciones plantean un problema epidemiológico, pero no el del tratamiento de un microorganismo multirresistente con escasas alternativas terapéuticas. No obstante, en el contexto de una elevada endemia, con gran contaminación ambiental y de los pacientes, aumenta secundariamente el número de infecciones relacionadas con las manipulaciones y los catéteres (bacteriemia de catéter, traqueobronquitis, neumonía asociada a ventilación mecánica e infecciones de herida quirúrgica), se añade una complicación funcional importante al tratamiento

basal de los pacientes críticos, ya de por sí complejo, y se produce una sobrecarga notable en el Laboratorio de Microbiología. Por último, alrededor de un 10 % de los aislamientos en las UCIs podrían corresponder finalmente a infecciones graves, aunque ello puede variar según las circunstancias epidemiológicas locales. En cualquier caso, el problema que se plantea es qué hacer con la terapéutica empírica de aquellos pacientes críticos con sospecha de infección en un entorno de alta endemia de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, hasta que los cultivos permitan un desescalamiento terapéutico.

Las recomendaciones actuales abogan por la importancia de instaurar una terapéutica empírica adecuada lo más precoz posible para el conjunto de las infecciones graves de estos pacientes críticos para disminuir la mortalidad atribuible. Hay que sopesar la necesidad de administrar un adecuado tratamiento antimicrobiano desde el inicio con la exigencia de limitar la aparición de resistencia antibiótica [Kollef MH, 2003]. En el caso de nuestra endemia, ello supondría la utilización rutinaria de colistina o de alguna de las combinaciones alternativas de rifampicina, mencionadas previamente. Esta práctica requiere obviamente un análisis cuidadoso de los pros y contras, balanceando su auténtica necesidad y sus posibles consecuencias negativas, como sería el desarrollo de resistencia a estos antibióticos que quedan como únicas alternativas para los pacientes con infección demostrada y grave.

En lo referente a la necesidad de utilización de colistina, ésta debería tener en cuenta la mortalidad atribuible real de estas infecciones. Si bien la literatura publicada hace pocos años, le asignaba a la NVM por *A. baumannii* una mortalidad muy elevada, similar a la producida por *P. aeruginosa* (mortalidad cruda 70 %, mortalidad atribuible > 30 %), los datos más recientes cuestionan seriamente este supuesto. Los resultados obtenidos por la colistina en NVM por *Acinetobacter baumannii*-CR han sido superponibles a los obtenidos por imipenem en un estudio clínico en pacientes infectados por cepas de *Acinetobacter baumannii*-CS y ello a pesar de que en el grupo de colistina los pacientes no recibieron una terapéutica empírica adecuada desde el comienzo, y el tratamiento con colistina se inició únicamente cuando se conocieron los resultados de los cultivos [Garnacho-Montero J, 2003]. Esta experiencia contrasta con la idea general de la importancia del tratamiento precoz para disminuir la mortalidad en estos pacientes y podría sugerir que la NVM por *A. baumannii* no tiene un pronóstico tan grave como la

debida a otros BGN. En el mismo sentido, en otra serie de los mismos autores se le asignó a la NVM por *A. baumannii* una mortalidad atribuible bastante baja [Garnacho J 2003]. Este mensaje estaría en consonancia con el concepto bien establecido de la menor virulencia del microorganismo respecto a otros BGN. Ciertamente, la mortalidad cruda de los pacientes de UCIs con infecciones por *A. baumannii* es muy elevada, en nuestra experiencia alrededor del 50 %, y resulta muy difícil en esta población delimitar la auténtica mortalidad atribuible. Nuestra percepción y también la de otros autores es que muchos de estos pacientes fallecen “con” la infección por *A. baumannii* más que “por” la infección por *A. baumannii*.

En cuanto a las posibles consecuencias negativas de un uso generalizado de colistina, es probable que ello desembocara en el desarrollo de resistencia y a la pérdida de esta arma terapéutica. De hecho, nosotros tuvimos experiencias anecdóticas de la aparición de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a colistina en pacientes tratados con colistina nebulizada y en otros sometidos a decontaminación intestinal [Agustí C, 2002].

Por estas razones nosotros consideramos más prudente no introducir rutinariamente la colistina sistémica en las pautas de antibioterapia empírica para los pacientes de nuestras UCIs con sospecha clínica de infección. Reservamos esta administración para pacientes seleccionados con una infección grave por cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos o con alta sospecha de la misma. Por el contrario, la administración de colistina en forma nebulizada puede considerarse en los pacientes con infección respiratoria por estas cepas resistentes.

Respecto al tratamiento del paciente grave con NVM demostrada por *Acinetobacter baumannii*-CR, pocas alternativas quedan a la colistina tras el fracaso observado en nuestro estudio piloto con la combinación de imipenem-rifampicina. A la hora de hacer una recomendación sobre el tratamiento con combinaciones con rifampicina para las infecciones por *A. baumannii* con alta resistencia a carbapenémicos, es importante establecer: a) qué combinaciones tienen la mayor eficacia bactericida; y b) cuáles previenen mejor la posible aparición de resistencia a la rifampicina. Aunque las combinaciones imipenem-rifampicina o tobramicina-rifampicina fueron las 2 más efectivas en el modelo animal en el tratamiento de las infecciones por el clon E altamente resistente a carbapenémicos, es difícil hacer recomendaciones generales

debido a que el más favorable perfil farmacocinético de los antibióticos en combinación para prevenir la aparición de resistencia requiere la eficacia antibacteriana simultánea e individual de cada antibiótico [Zhao X, 2002]. Por ello, queda por determinar la posibilidad de que alguna otra combinación de rifampicina, bien con tobramicina o con la propia colistina, o incluso una combinación de más de dos antibióticos, pudiera ser más efectiva y prevenir mejor la aparición de resistencias.

El hecho de que los patrones de sensibilidad de las infecciones por *A. baumannii* multiresistente varíen ampliamente entre países e incluso entre hospitales del mismo país, hace difícil la recomendación de una terapia única u determinada. Sin embargo, nuestros datos indicarían que el imipenem es ineficaz contra las infecciones por cepas que muestren resistencia de alto nivel a carbapenémicos, pero continúa siendo la mejor alternativa para las infecciones por cepas con resistencia moderada a carbapenémicos, similares al clon D utilizado en nuestro modelo, y preferiblemente en combinación con aminoglicósidos. En el caso del clon A o sensible a carbapenémicos, en nuestro modelo obtuvimos que el imipenem fue la terapia más activa de todas las disponibles, incluidas las combinaciones, aunque el efecto antibacteriano era superior (casi 0,5 logs de descenso más, *p* estadísticamente significativa) al combinarse con rifampicina. La duda que puede plantearse es si esta combinación puede ser útil en la práctica clínica a la hora de tratar estas cepas sensibles, ya sea para conseguir el efecto sinérgico o para disminuir la aparición de resistencias. Para finalizar, el tratamiento con colistina en monoterapia quizás no es la mejor opción para las infecciones causadas por aquellas cepas con alto grado de resistencia a carbapenémicos que sólo son sensibles a este antibiótico. Como se ha comentado, podrían ser más aconsejables las combinaciones aminoglicósido-rifampicina o incluso colistina-rifampicina, siempre y cuando la resistencia a rifampicina sea sólo moderada.

Tras la realización de los estudios presentes, con una endemia elevada y sostenida a pesar de las medidas de intervención realizadas y con la experiencia acumulada desde la perspectiva clínica y terapéutica, el futuro parece apuntar al tratamiento dirigido de los pacientes con infecciones graves por *Acinetobacter baumannii*-CR con colistina sistémica con o sin rifampicina, o colistina nebulizada o bien alguna otra combinación con rifampicina. La solución no parece estar tanto en el hallazgo de nuevas pautas antibióticas más activas, como en soluciones de carácter epidemiológico de mayor

envergadura, que contemplaran importantes modificaciones estructurales y funcionales de nuestras UCIs.





**VII.**

**CONCLUSIONES**



## VII. CONCLUSIONES.

### 1. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO PRELIMINAR:

1.1. Los principales factores de riesgo para desarrollar colonización clínica o infección por cepas de *A. baumannii* carbapenem-resistentes en nuestras UCIs fueron el estado de portador de cepas de *A. baumannii*-CR, el tratamiento previo con imipenem y la estancia en una unidad de hospitalización con una elevada densidad de pacientes colonizados/infectados por *A. baumannii*-CR.

1.2. Tras la aplicación de un programa de intervención epidemiológica en nuestras UCIs, incluyendo diversas medidas de control de la infección nosocomial y una restricción en el uso de carbapenémicos, se logró una sensible disminución en las tasas de colonización/infección en el período inmediato de 6 meses y una estabilización posterior en los 6 meses siguientes.

1.3. El estudio microbiológico de las cepas aisladas durante el período de estudio (Enero 97- Junio 98) demostró que pertenecían mayoritariamente a 3 clones de *Acinetobacter baumannii*: Clon A o sensible a imipenem y sulbactam (ya presente en la fase previa de la endemia) y dos nuevos clones resistentes a carbapenémicos, con una prevalencia del 70 % al final del periodo de estudio: El clon D sensible a sulbactam pero con sensibilidad disminuida a imipenem, y el clon E con resistencia de alto nivel a imipenem y sulbactam, que de forma progresiva sustituyó al clon D. Todos los clones mantenían la sensibilidad *in vitro* a colistina.

1.4. Las localizaciones más frecuentes de infección fueron similares en los casos producidos por cepas sensibles y resistentes a carbapenémicos: Traqueobronquitis, bacteriemia, infecciones de herida quirúrgica y neumonía. No hubo diferencias significativas entre las infecciones producidas por cepas sensibles o resistentes a carbapenémicos en lo que se refiere a los días de estancia en UCI (31,7 y 32,7 respectivamente) y las cifras de mortalidad cruda (50,7% y 54,9%) o relacionada en los primeros 5 días de la infección (21% y 20%).

## 2. CONCLUSIONES DEL MODELO EXPERIMENTAL:

2.1. El modelo animal utilizado en el ratón inmunocompetente fue fiable y reproducible. La principal variable utilizada en las comparaciones entre antibióticos fue los recuentos pulmonares, que mostraron una gran homogeneidad en los resultados (media 10-11  $\log_{10}$ UFC/gramo). Además el modelo mostró un 100 % de bacteriemia en los animales control y una supervivencia cercana al 50 %.

2.2. El modelo *in vivo* permitió detectar ciertas discrepancias en el análisis de eficacia antibiótica respecto a los resultados *in vitro* (CMI, curvas de letalidad...). Se concedió mayor credibilidad a los resultados del modelo animal, pero su extrapolación a la enfermedad humana debe realizarse con mucha cautela.

2.3. Los resultados farmacocinéticos de imipenem, sulbactam, rifampicina y colistina en el modelo animal a las dosis utilizadas fueron comparables en general a los obtenidos habitualmente en humanos. En el caso de la tobramicina, los niveles pico fueron más elevados de lo deseado, por lo que sus datos de eficacia antibacteriana podrían haber sido sobrevalorados.

2.4. Globalmente, los resultados de eficacia *in vivo* de los diferentes antibióticos utilizados en el modelo estuvieron de acorde con los datos de farmacocinética y farmacodinámica obtenidos en los ratones, con la excepción de la colistina.

2.5. Imipenem y sulbactam fueron los antibióticos más eficaces en monoterapia frente a la cepa sensible (clon A) o con sensibilidad intermedia a carbapenémicos (clon D, imipenem: CMI = 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Imipenem demostró mayor eficacia antibacteriana que sulbactam, incluso contra cepas con resistencia intermedia a imipenem y sensibles al sulbactam (clon D), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

2.6. Tobramicina no fue eficaz frente al clon A (resistente a este antibiótico, CMI = 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pero sí frente a los clones D y E, con sensibilidad intermedia (CMI = 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Su eficacia fue similar a la de imipenem o sulbactam frente al clon D y superior a la de colistina frente al clon E.

2.7. Rifampicina mostró buena actividad antibacteriana frente a los 3 clones a pesar de tener una actividad disminuida *in vitro* (CMI = 8 µg/mL). Su eficacia frente al clon E fue llamativamente superior que frente a los clones A y D. No se observó el desarrollo de resistencia a la rifampicina en ninguno de los grupos de tratamiento, aunque el modelo no fue diseñado para el estudio de este problema.

2.8. Globalmente, colistina fue el antibiótico que mostró una eficacia menor, resultado que no se correspondió con el buen perfil farmacocinético-farmacodinámico obtenido. Su eficacia fue claramente inferior a la de los betalactámicos, tobramicina y rifampicina, inclusive en los casos en los que la sensibilidad *in vitro* a estos antibióticos estaba disminuida.

2.9. Respecto a las combinaciones de antibióticos, en el caso de las infecciones por el clon A, la combinación imipenem-rifampicina fue la pauta de tratamiento más activa de todas las ensayadas y alcanzó el rango de bactericida.

2.10. En el tratamiento de las infecciones por el clon D, las combinaciones de imipenem o sulbactam con tobramicina aumentaron la eficacia de los antibióticos por separado y fueron las pautas que proporcionaron los mejores resultados.

2.11. En el caso de las infecciones por el clon E, las combinaciones de rifampicina-imipenem y rifampicina-tobramicina fueron pautas particularmente efectivas, proporcionando un efecto antibacteriano significativamente mejor que la rifampicina aislada. Por el contrario la adición de colistina a rifampicina no mejoró los resultados obtenidos con la rifampicina en solitario.

### 3. CONCLUSIONES SOBRE LAS REPERCUSIONES CLÍNICAS DE LA APLICACIÓN DEL MODELO:

3.1. A lo largo del periodo de estudio, las cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos predominaron claramente, llegando a una tasa del 87 % en el año 2000. Ante las dificultades de tratamiento que ello planteaba en la práctica clínica, decidimos realizar un ensayo clínico piloto de tratamiento de pacientes con infecciones

graves por cepas de *Acinetobacter baumannii* con alta resistencia a carbapenémicos. Para ello, seleccionamos la pauta imipenem-rifampicina, que fue la más eficaz frente al clon E en el modelo experimental animal.

3.2. La pauta imipenem-rifampicina mostró una eficacia antibacteriana aceptable en los pacientes, pero en el 70 % de los casos se desarrolló resistencia a rifampicina. Imipenem fracasó absolutamente en la prevención de este fenómeno y ello se consideró una limitación mayor para recomendar el uso rutinario de esta combinación.

3.3. A pesar de la elevada mortalidad cruda que acompaña a las infecciones por *Acinetobacter baumannii*, en base a la experiencia acumulada y la literatura más reciente se cuestionó su verdadera mortalidad atribuible, más de acuerdo con su escasa virulencia. Nuestra opinión es que en una gran mayoría de casos los pacientes fallecen “con” una infección por *Acinetobacter baumannii* más que “por” la infección por *Acinetobacter baumannii*.

3.4. No se consideró apropiado la inclusión de la colistina sistemáticamente en la terapéutica antibiótica empírica de los pacientes graves de las UCIs con sospecha de infección. Por el contrario, se consideró adecuado el uso de colistina sistémica acompañada o no de colistina tópica para un grupo seleccionado de pacientes con una infección demostrada por *Acinetobacter baumannii* multirresistente, tras un análisis clínico juicioso de la situación.

3.5. Esta amplia experiencia nos hace creer que la solución a la terapéutica de estos pacientes no llegará tanto por la aportación de nuevas alternativas antibióticas como por la aplicación de unas medidas drásticas de intervención epidemiológica.

**VIII.**

**TABLAS**





TABLA 1: Microorganismos responsables de las infecciones en UCI. Hospital de Bellvitge 1993-1995.

	Nº aislamientos (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	53 (18,4 %)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 (13,2 %)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37 (12,8 %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	28 (9,7 %)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27 (9,3 %)
<i>Escherichia coli</i>	25 (8,7 %)
<i>Enterococcus</i> sp.	18 (6,2 %)
<i>Enterobacter</i> sp.	14 (4,9 %)
<i>Candida</i> sp.	14 (4,9 %)
Otros	34 (11,8 %)

TABLA 2: Infecciones en las UCIs: Microorganismos responsables en relación al foco de infección. Hospital de Bellvitge 1993-1995. Importancia relativa de *A. baumannii* en las diversas localizaciones.

<b>Microorganismo</b>	<b>Respiratorio</b>	<b>Quirúrgico</b>	<b>Catéter</b>	<b>Urinario</b>	<b>Bacteriemia primaria</b>
<i>A. baumannii</i>	40 (25 %)	17 (17,3%)	16 (15,4%)	11 (12,5%)	6 (9,5 %)
<i>K. pneumoniae</i>	24 (15 %)	12 (12,2%)	14 (13,5%)	20 (22,7%)	10 (15,9%)
<i>P. aeruginosa</i>	23 (14,4%)	10 (10,2%)	11 (10,6%)	10 (11,4%)	5 (7,9%)
<i>S. aureus</i>	21 (13,1 %)	9 (9,2 %)	11 (10,6 %)	5 (5,7 %)	7 (11,1 %)
<i>E. coli</i>	11 (6,9 %)	7 (7,1 %)	10 (9,6 %)	13 (14,7 %)	4 (6,3 %)
<i>S. epidermidis</i>	9 (5,6 %)	8 (8,2 %)	19 (18,3 %)	7 (7,9 %)	4 (6,3 %)

TABLA 3: Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) / concentraciones mínimas bactericidas (CMB) en µg/mL de las cepas de *Acinetobacter baumannii* más prevalentes en el Hospital de Bellvitge.

ANTIBIÓTICO	<i>Cepa sensible a carbapenémicos</i>	<i>Cepas resistentes a carbapenémicos</i>	
	CLON A (Imipenem-S)	CLON D (Imipenem-I)	CLON E (Imipenem-R)
Imipenem	1 / 1	8 / 16	512 / 512
Sulbactam	2 / 64	4 / 64	128 / > 128
Tobramicina	128 / 256	8 / 32	8 / 32
Rifampicina	8 / 8	8 / 8	8 / 8
Colistina	0,5 / 0,5	0,5 / 1	0,5 / 2

**Leyenda:** S = sensible; I = resistencia intermedia; R = resistente.

**Nota:** Ticarcilina, piperacilina, gentamicina y amikacina mostraron CMIs > 256 µg/ml en todos los clones. Ceftazidima, cefepime y ciprofloxacino mostraron CMIs > 32 µg/ml. En el caso de tetraciclina, CMIs fueron > 8 µg/ml en todos los clones.

Los puntos de corte estándar de CMI para determinar resistencia (µg/mL) obtenidos de la NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001] fueron los siguientes: piperacilina ≥ 128, ticarcilina ≥ 128, sulbactam ≥ 16 (en combinación con ampicilina), ceftazidima ≥ 32, cefepime ≥ 32, imipenem ≥ 16, gentamicina ≥ 16, amikacina ≥ 64, tobramicina ≥ 16, tetraciclina ≥ 16, ciprofloxacina ≥ 4. No existen datos sobre el criterio de resistencia para bacterias Gram negativas, por lo que utilizamos el mismo estándar que para *Staphylococcus aureus*, es decir ≥ 4. En el caso de las polimixinas, la NCCLS no proporciona datos de sensibilidad [Evans ME, 1999], por lo que utilizamos la concentración ≥ 4 µg/ml para definir resistencia [Catchpole CR, 1997].

TABLA 4. Resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antibióticos usados en el modelo experimental.

ANTIBIÓTICO	IMPENEM	SULBACTAM	TOBRAMICINA	RIFAMPICINA	COLISTINA
<b>DOSIS</b>	50 mg/kg	30 mg/kg	15 mg/kg	25 mg/kg	125,000 U/kg
<b>C<sub>max</sub> (mg/L)</b>	37,49 ± 1,37	91,03 ± 0,04	32,87 ± 5,45	24,29 ± 10,26	13,33 ± 4,61
<b>t<sub>1/2</sub> (horas)</b>	0,19	0,18	0,37	5,44	0,52
<b>AUC<sup>@</sup> (mg*h/L)</b>	11,99	24,57	11,54	196,22	11,96
<b>CI<sup>#</sup> = C<sub>max</sub>/CMI</b>	Clon A	37,49	45,51	3,03	26,66
	Clon D	4,69	22,76	4,11	3,03
	Clon E	0,07	0,71	4,11	3,03
<b>T &gt; CMI<sup>&amp;</sup> (horas)</b>	Clon A	1,15	1,1	0	9,71
	Clon D	0,58	0,91	0,69	9,71
	Clon E	0	0	0,69	9,71
<b>AUC/CMI</b>	Clon A	11,99	12,28	0,09	24,53
	Clon D	1,50	6,14	1,44	24,53
	Clon E	0,02	0,19	1,44	24,53

**Leyenda:** <sup>@</sup>AUC = Área bajo la curva (Area Under Curve).

<sup>#</sup>CI= Cociente inhibitorio.

<sup>&</sup>T > CMI = Tiempo por encima de la CMI

TABLA 5: Resultados de los recuentos bacterianos pulmonares<sup>a</sup> según clones de *Acinetobacter baumannii*, tiempos de sacrificio y grupos de tratamiento (entre paréntesis, número de ratones por grupo).

GRUPO TERAPÉUTICO	CLON A		CLON D		CLONE		
	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	
<b>MONOTERAPIAS</b>	<b>CONTROL<sup>b</sup></b>	10,55 ± 0,46 (15)	10,70 ± 0,37 (15)	10,58 ± 0,26 (15)	10,80 ± 0,38 (15)	10,51 ± 0,43 (15)	10,78 ± 0,30 (15)
	<b>IMPENEM</b>	6,49 ± 0,39 <sup>c</sup> (4)	5,32 ± 0,11 <sup>c,d</sup> (4)	8,72 ± 1,32 <sup>c</sup> (4)	6,32 ± 0,59 <sup>c,d</sup> (4)	10,3 ± 0,98 (4)	11,02 ± 0,2 (4)
	<b>SULBACTAM</b>	7,89 ± 1,08 <sup>c</sup> (4)	6,06 ± 0,58 <sup>c,d</sup> (4)	8,73 ± 1,07 <sup>c</sup> (4)	7,13 ± 1,95 <sup>c</sup> (4)	10,31 ± 0,2 (4)	10,74 ± 0,20 (4)
	<b>TOBRAMICINA</b>	10,69 ± 0,3 (4)	10,72 ± 0,71 (4)	10,37 ± 0,26 (4)	7,35 ± 0,94 <sup>c</sup> (4)	7,88 ± 0,73 <sup>c</sup> (4)	6,62 ± 1,16 <sup>c</sup> (4)
	<b>RIFAMPICINA</b>	7,77 ± 0,26 <sup>c</sup> (4)	6,89 ± 0,28 <sup>c,e</sup> (4)	8,8 ± 0,5 <sup>c</sup> (4)	7,18 ± 0,29 <sup>c</sup> (4)	7,64 ± 0,45 <sup>c</sup> (4)	5,63 ± 0,26 <sup>c,e</sup> (4)
	<b>COLISTINA</b>	9,68 ± 0,99 <sup>c</sup> (4)	8,64 ± 0,66 <sup>c</sup> (4)	10,61 ± 0,26 (4)	10,4 ± 1,09 (4)	10,41 ± 0,41 (4)	8,39 ± 1,22 <sup>c</sup> (4)
<b>COMBINACIONES</b>	<b>CONTROL<sup>b</sup></b>	10,43 ± 0,19 (15)	10,60 ± 0,35 (15)	10,57 ± 0,43 (15)	10,86 ± 0,25 (15)	10,70 ± 0,34 (18)	10,82 ± 0,33 (18)
	<b>IMP + SUL</b>	6,61 ± 0,39 <sup>c</sup> (4)	5,86 ± 0,23 <sup>c</sup> (4)	8,15 ± 0,28 <sup>c</sup> (4)	7,49 ± 0,29 <sup>c</sup> (4)	--	--
	<b>IMP + TOB</b>	6,57 ± 0,37 <sup>c</sup> (4)	6,12 ± 0,38 <sup>c</sup> (4)	6,72 ± 0,44 <sup>c,f</sup> (4)	5,46 ± 0,62 <sup>c,f</sup> (4)	7,64 ± 0,32 <sup>c,f</sup> (4)	5,18 ± 0,64 <sup>c,f</sup> (4)
	<b>IMP + RIF</b>	6,56 ± 0,26 <sup>c</sup> (4)	4,85 ± 0,15 <sup>c,f</sup> (4)	8,01 ± 0,69 <sup>c</sup> (4)	7,01 ± 1,01 <sup>c</sup> (4)	6,79 ± 0,24 <sup>c,f</sup> (4)	3,79 ± 0,99 <sup>c,f</sup> (4)
	<b>SUL + TOB</b>	8,05 ± 0,73 <sup>c</sup> (4)	6,83 ± 0,83 <sup>c</sup> (4)	8,17 ± 0,87 <sup>c</sup> (4)	6,21 ± 0,44 <sup>c,f</sup> (4)	6,95 ± 0,31 <sup>c,f</sup> (4)	5,82 ± 1,14 <sup>c,f</sup> (4)
	<b>SUL + RIF</b>	--	--	--	--	7,60 ± 0,25 <sup>c</sup> (4)	5,95 ± 0,67 <sup>c</sup> (4)
	<b>TOB + RIF</b>	7,63 ± 0,57 <sup>c</sup> (4)	6,43 ± 0,99 <sup>c</sup> (4)	8,06 ± 0,46 <sup>c</sup> (4)	6,86 ± 0,15 <sup>c</sup> (4)	6,31 ± 0,32 <sup>c,f</sup> (4)	3,96 ± 0,30 <sup>c,f</sup> (4)
	<b>COL + RIF</b>	--	--	--	--	7,03 ± 0,50 <sup>c,f</sup> (4)	5,59 ± 1,17 <sup>c</sup> (4)

**Leyenda Tabla 5:**

- a: Los recuentos pulmonares están expresados en logaritmo<sub>10</sub> UFC/gramo de tejido pulmonar (media de recuentos  $\pm$  desviación estándar).
- b: Las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los 3 clones a las 24 y 48 horas respectivamente ni entre los grupos control de las 2 fases de experimentos (fase monoterapias y fase de combinaciones) (ANOVA con corrección de Scheffé).
- c: Las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) (t de Student).
- d: Los recuentos pulmonares fueron inferiores de forma significativa que los obtenidos con tobramicina, rifampicina o colistina.
- e: Los recuentos pulmonares fueron inferiores de forma significativa que los obtenidos con colistina.
- f: Las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al antibiótico más activo ( $p < 0,05$ ).

## Abreviaciones:

IMP = imipenem

SUL = sulbactam

TOB = tobramicina

RIF = rifampicina

COL = colistina.

## Comparación entre controles a las 24 y 48 horas en cada clon (t de Student):

CLON A: 24 horas  $\neq$  48 horas  $p < 0,05$ CLON D 24 horas  $\neq$  48 horas  $p < 0,05$ CLON E: 24 horas  $\neq$  48 horas  $p < 0,05$

TABLA 6: Comparación de resultados de bacteriemias según clones. Datos acumulados a las 48 horas.

<b>GRUPO TERAPÉUTICO [n positivos / n total (%)]</b>	<b>CLON A</b>	<b>CLON D</b>	<b>CLON E</b>
CONTROLES	60/60 (100)	60/60 (100)	66/66 (100)
IMIPENEM	2/8 (25)*	3/8 (37,5)*	8/8 (100)
SULBACTAM	4/8 (50)*	5/8 (62,5)*	7/8 (87,5)*
TOBRAMICINA	8/8 (100)	5/8 (62,5)*	2/8 (25)*
COLISTINA	6/8 (75)*	8/8 (100)	5/8 (62,5)*
RIFAMPICINA	3/8 (37,5)*	4/8 (50)*	3/8 (37,5)*
IMIPENEM + SULBACTAM	1/8 (12,5)*	3/8 (37,5)*	--
IMIPENEM + TOBRAMICINA	3/8 (37,5)*	0/8 (0)*	2/8 (25)*
IMIPENEM + RIFAMPICINA	2/8 (25)*	4/8 (50)*	2/8 (25)*
SULBACTAM + TOBRAMICINA	5/8 (62,5)*	7/8 (87,5)*	0/8 (0)*
SULBACTAM + RIFAMPICINA	--	--	1/8 (12,5)*
TOBRAMICINA + RIFAMPICINA	3/8 (37,5)*	3/8 (37,5)*	0/8 (0)*
COLISTINA + RIFAMPICINA	--	--	0/8 (0)*

**Leyenda:**

\* =  $p < 0,05$  respecto al grupo control (F de Fisher).

TABLA 7: Comparación de resultados de supervivencia según clones. Datos acumulados a las 48 horas.

<b>GRUPO TERAPÉUTICO</b> [n vivos / n total 24 + 48 horas (% de supervivencia)]	<b>CLON A</b>	<b>CLON D</b>	<b>CLON E</b>
CONTROLES <sup>@</sup>	16/30 (53,33)	12/30 (40)	16/33 (48,48)
IMIPENEM	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	5/8 (62,5)
SULBACTAM	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	5/8 (62,5)
TOBRAMICINA	6/8 (75)	7/8 (87,5)	8/8 (100)*
COLISTINA	5/8 (62,5)	6/8 (75)	6/8 (75)
RIFAMPICINA	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	8/8 (100)*
IMIPENEM + SULBACTAM	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	--
IMIPENEM + TOBRAMICINA	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	8/8 (100)*
IMIPENEM + RIFAMPICINA	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	8/8 (100)*
SULBACTAM + TOBRAMICINA	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	8/8 (100)*
SULBACTAM + RIFAMPICINA	--	--	8/8 (100)*
TOBRAMICINA + RIFAMPICINA	8/8 (100) ( $p=0,06$ )	8/8 (100)*	8/8 (100)*
COLISTINA + RIFAMPICINA	--	--	8/8 (100)*

**Leyenda:**

@ = diferencias no significativas entre los 3 clones a las 24 y 48 horas (F de Fisher).

\* =  $p < 0,05$  comparado con los controles (F de Fisher).



TABLA 8: Resultados de las curvas de letalidad *in vitro* del clon A de *A. baumannii* para las combinaciones de antibióticos usadas en el modelo, expresadas como actividad sinérgica (S) o indiferente (I) en relación a las monoterapias.

<i>ANTIBIOTICO</i>	<i>CONCENTRACION x CMI (µg/mL)</i>	<b>SULBACTAM</b>		<b>TOBRAMICINA</b>		<b>RIFAMPICINA</b>	
		$\frac{1}{2}$ (1 µg/mL)	$\frac{1}{4}$ (0,5 µg/mL)	$\frac{1}{4}$ (32 µg/mL)	$\frac{1}{8}$ (16 µg/mL)	$\frac{1}{2}$ (4 µg/mL)	$\frac{1}{4}$ (2 µg/mL)
<b>IMIPENEM</b>	$\frac{1}{4}$ (0,25 µg/mL)	S	S	S*	S	S*	S
	$\frac{1}{8}$ (0,125 µg/mL)	I	I	S	I	S	S
<b>SULBACTAM</b>	$\frac{1}{2}$ (1 µg/mL)			S	I	NR	NR
	$\frac{1}{4}$ (0,5 µg/mL)			I	I	NR	NR
<b>TOBRAMICINA</b>	$\frac{1}{4}$ (32 µg/mL)	S	I			I	I
	$\frac{1}{8}$ (16 µg/mL)	I	I			I	I

**Leyenda:**

\* = Actividad bactericida.

NR = No realizado.

TABLA 9: Resultados de las curvas de letalidad *in vitro* del clon D de *A. baumannii* para las combinaciones de antibióticos usadas en el modelo, expresadas como actividad sinérgica (S) o indiferente (I) en relación a las monoterapias.

<i>ANTIBIOTICO</i>	<i>CONCENTRACION x CMI (µg/mL)</i>	<b>SULBACTAM</b>		<b>TOBRAMICINA</b>		<b>RIFAMPICINA</b>	
		$\frac{1}{2}$ (2 µg/mL)	$\frac{1}{4}$ (1 µg/mL)	$\frac{1}{2}$ (4 µg/mL)	$\frac{1}{4}$ (2 µg/mL)	$\frac{1}{2}$ (4 µg/mL)	$\frac{1}{4}$ (2 µg/mL)
<b>IMIPENEM</b>	$\frac{1}{4}$ (2 µg/mL)	I	S	S	I	S	I
	$\frac{1}{8}$ (1 µg/mL)	I	I	S	I	I	I
<b>SULBACTAM</b>	$\frac{1}{2}$ (2 µg/mL)			S	S*	NR	NR
	$\frac{1}{4}$ (1 µg/mL)			I	I	NR	NR
<b>TOBRAMICINA</b>	$\frac{1}{2}$ (4 µg/mL)	S	I			I	I
	$\frac{1}{4}$ (2 µg/mL)	S*	I			I	I

**Leyenda:**

\* = Actividad bactericida.

NR = No realizado.

TABLA 10: Resultados de las curvas de letalidad *in vitro* del clon E de *A. baumannii* para las combinaciones de antibióticos usadas en el modelo, expresadas como actividad sinérgica (S) o indiferente (I) en relación a las monoterapias.

<b>ANTIBIOTICO</b>	<b>CONCENTRACION x CMI (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>SULBACTAM</b>		<b>TOBRAMICINA</b>		<b>RIFAMPICINA</b>	
		<b><math>\frac{1}{4}</math> (32 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b><math>\frac{1}{8}</math> (16 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b><math>\frac{1}{2}</math> (4 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b><math>\frac{1}{4}</math> (2 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b><math>\frac{1}{2}</math> (4 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b><math>\frac{1}{4}</math> (2 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
<b>IMIPENEM</b>	<b><math>\frac{1}{16}</math> (32 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	I	I	I	I	I	S
	<b><math>\frac{1}{32}</math> (16 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	I	I	I	I	I	I
<b>SULBACTAM</b>	<b><math>\frac{1}{4}</math> (32 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>			S	S	I	S*
	<b><math>\frac{1}{8}</math> (16 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>			S	S	I	S*
<b>TOBRAMICINA</b>	<b><math>\frac{1}{2}</math> (4 <math>\text{mg}/\text{L}</math>)</b>	S	S			S*	I
	<b><math>\frac{1}{4}</math> (2 <math>\text{mg}/\text{L}</math>)</b>	S	S			I	I
<b>COLISTINA</b>	<b><math>\frac{1}{2}</math> (0,25 <math>\text{mg}/\text{L}</math>)</b>	NR	NR	NR	NR	I	I
	<b><math>\frac{1}{4}</math> (0,12 <math>\text{mg}/\text{L}</math>)</b>	NR	NR	NR	NR	I	I

**Leyenda:**

\* = Actividad bactericida.

NR = No realizado.

TABLA 11: Discordancias entre resultados *in vitro* e *in vivo*.

	<b>CLON A</b>	<b>CLON D</b>	<b>CLON E</b>
<b>IMIPENEM</b>	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA
<b>SULBACTAM</b>	DISCORDANCIA IV: a 2 x CMI, $\Delta\log_2 = -0,5$ N: $\Delta\log_2 = -4,64$ a 48 h	DISCORDANCIA IV: a 2 x CMI, $\Delta\log_2 = -0,45$ N: $\Delta\log_2 = -3,67$ a 48 h	CONCORDANCIA
<b>TOBRAMICINA</b>	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA
<b>RIFAMPICINA</b>	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA
<b>COLISTINA</b>	CONCORDANCIA IV: bactericida a $\geq 16$ x CMI N: $\Delta\log_2 = -2,06$ a 48 h	CONCORDANCIA IV: No bactericida a $< 16$ x CMI N: $\Delta\log_2 = -0,4$ a 48 h	CONCORDANCIA IV: bactericida a $\geq 16$ x CMI N: $\Delta\log_2 = -2,39$ a 48 h
<b>IMIPENEM + SULBACTAM</b>	DISCORDANCIA IV: sinergia N: Combinación no más activa que IMP	DISCORDANCIA IV: sinergia N: Combinación no más activa que IMP	--
<b>IMIPENEM + TOBRAMICINA</b>	DISCORDANCIA IV: sinergia y efecto bactericida N: Combinación no más activa	CONCORDANCIA	DISCORDANCIA IV: combinaciones indiferentes N: Combinación más activa que TOB
<b>IMIPENEM + RIFAMPICINA</b>	CONCORDANCIA	DISCORDANCIA IV: sinergia N: Combinación no más activa	CONCORDANCIA
<b>SULBACTAM + TOBRAMICINA</b>	DISCORDANCIA IV: sinergia N: Combinación no más activa	CONCORDANCIA	CONCORDANCIA
<b>SULBACTAM + RIFAMPICINA</b>	--	--	DISCORDANCIA IV: sinergia y efecto bactericida N: No diferencias entre la combinación y RIF aislada
<b>TOBRAMICINA + RIFAMPICINA</b>	CONCORDANCIA	DISCORDANCIA IV: No sinergia N: Combinación más activa	CONCORDANCIA
<b>COLISTINA + RIFAMPICINA</b>	--	--	CONCORDANCIA

**Leyenda:**

IV = *In vitro*

CMI = Concentración mínima inhibitoria

N = Neumonía experimental

IMP = imipenem

TOB = tobramicina

RIF = rifampicina.

TABLA 12: Características clínicas, microbiológicas y evolución de las infecciones por *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos tratadas con imipenem + rifampicina.

PACIENTE	EDAD/ SEXO	DIAGNÓSTICO	Rx (días)	EVOLUCIÓN	FECHA	MUESTRA	CMI I	CMIR	CLON
1	55/V	NVM	8	Curado	22-1-01 14-2-01	LBA Sangre (bacteriemia primaria)	>256 >256	8 256	E E
2	63/V	NVM	9	Exitus	15-12-01 28-12-01	Sangre Sangre	128 128	4 256	A A
3	47/V	NVM	10	Curado	30-12-00 4-1-01	Espuito Lavado bronquial	>256 >256	8 4	A NR
4	80/V	NVM	8	Exitus Fallo del tratamiento	12-6-01 18-6-01	LBA Espuito	>256 >256	8 256	E E
5	52/F	Bacteriemia por catéter	6	Curado (retirada de catéter)	20-2-01 19-3-01 6-4-01	Sangre Catéter Sangre	>256 >256 >256	8 256 4	E E E
6	39/F	Absceso intraabdominal	15	Exitus (drenaje quirúrgico) Fallo del tratamiento	17-8-01 30-8-01	Líquido peritoneal Líquido peritoneal	>256 >256	8 256	E E

SIGUE:

CONTINUACIÓN:

7	58/V	Absceso intraabdominal	13	Curado (drenaje quirúrgico)	27-3-01 5-4-01 1-5-01	Absceso Absceso Absceso	64 64 64	6 256 4	A NR A
8	72/V	Absceso intraabdominal	24	Curado (drenaje quirúrgico)	24-5-00 1-6-00 4-6-00	Absceso Líquido peritoneal Absceso	>256 >256 >256	8 256 8	E E E
9	21/V	Empiema	6	Curado (drenaje torácico)	17-11-01	Derrame pleural	128	8	NR
10	65/V	Infección de artroplastia de cadera	22	Curado (drenaje quirúrgico)	27-3-01 23-4-01	Herida Herida	64 64	8 6	A A

**Leyenda:**

CMI I = Concentración mínima inhibitoria de imipenem

CMI R = Concentración mínima inhibitoria de rifampicina

NVM = Neumonía asociada a ventilación mecánica

LBA = Lavado broncoalveolar

NR = No realizado





**IX.**

**FIGURAS**



FIGURA 1: Brote epidémico por *A. baumannii* en el Hospital de Bellvitge. Tasas mensuales de pacientes con nueva adquisición (periodo 1991-1996).

Nº casos

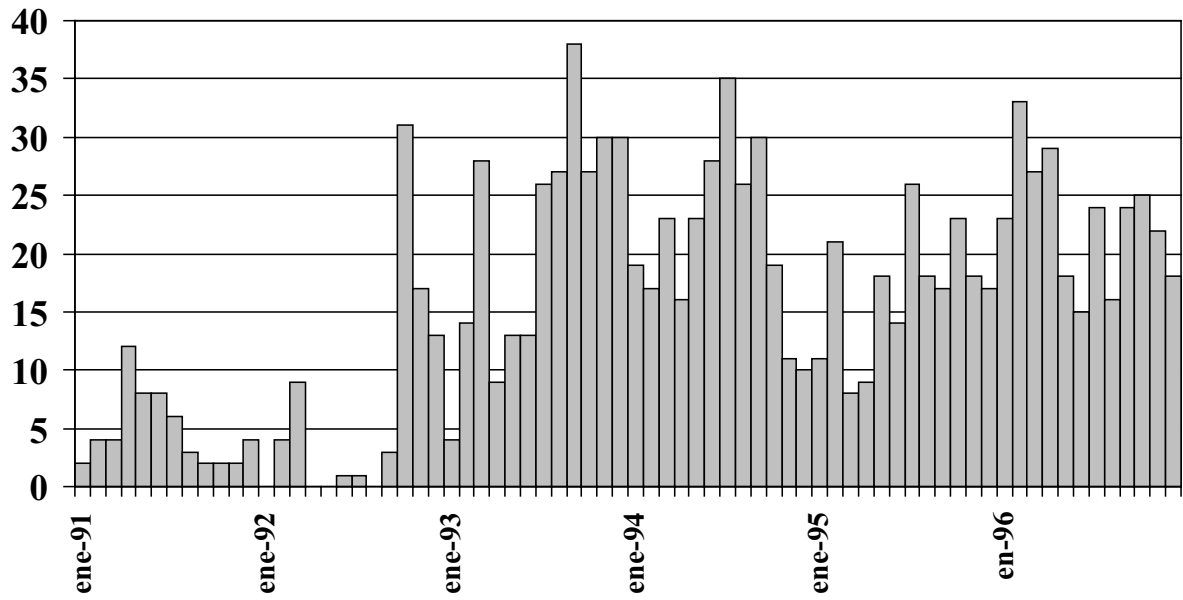


FIGURA 2: Brote epidémico por *A. baumannii* en el Hospital de Bellvitge. Evolución del protagonismo de los diferentes clones (1992-1997).

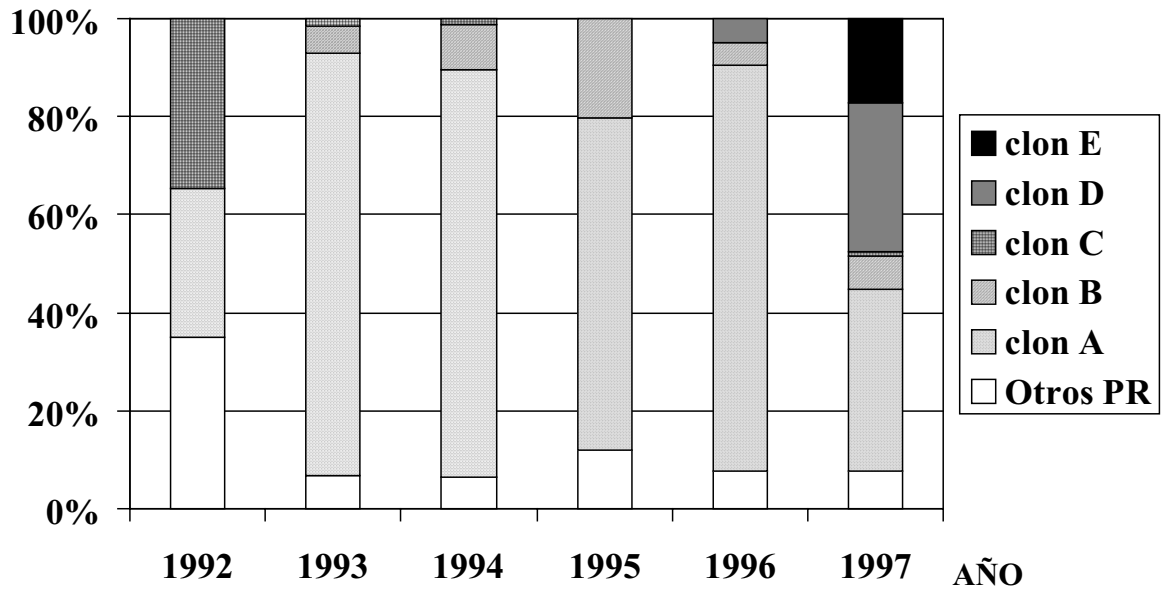


FIGURA 3: Evolución de casos nuevos de *A. baumannii* resistentes a imipenem y restricción del consumo de imipenem en el Hospital de Bellvitge (1997-1998).

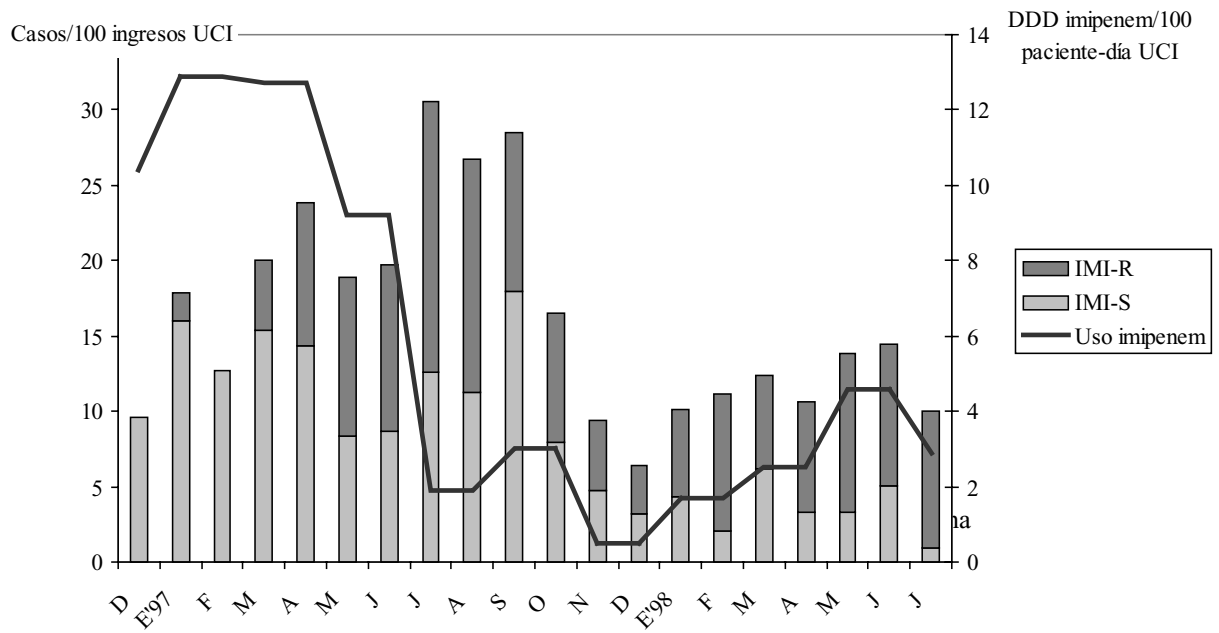


FIGURA 4: Tasas relativas de nuevos casos de *A. baumannii* sensibles y resistentes a imipenem, y restricción de imipenem. Hospital de Bellvitge, 1997-1998.

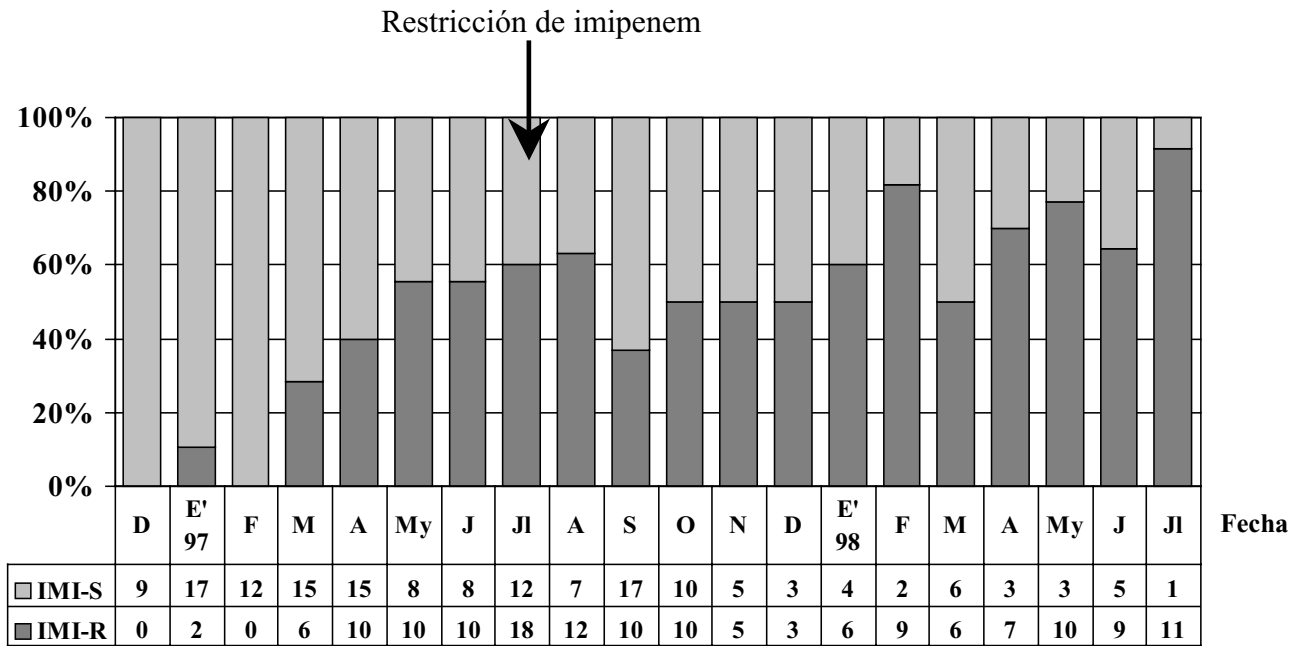


FIGURA 5: Evolución de clones endémicos de *Acinetobacter baumannii*. Hospital de Bellvitge 1998-2000.

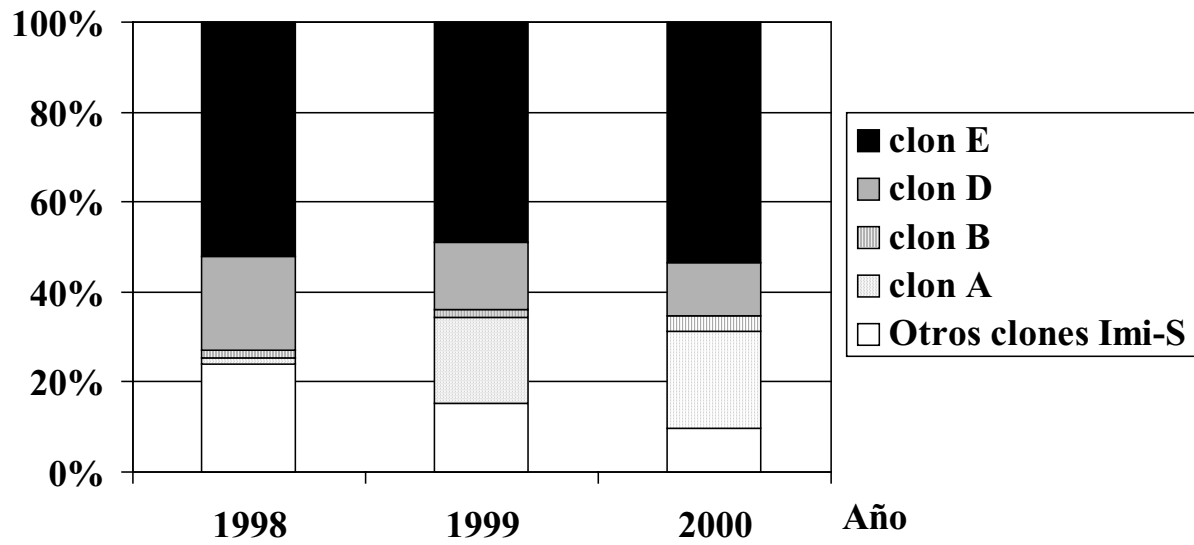


FIGURA 6: Dispersión de recuentos pulmonares en el clon A.

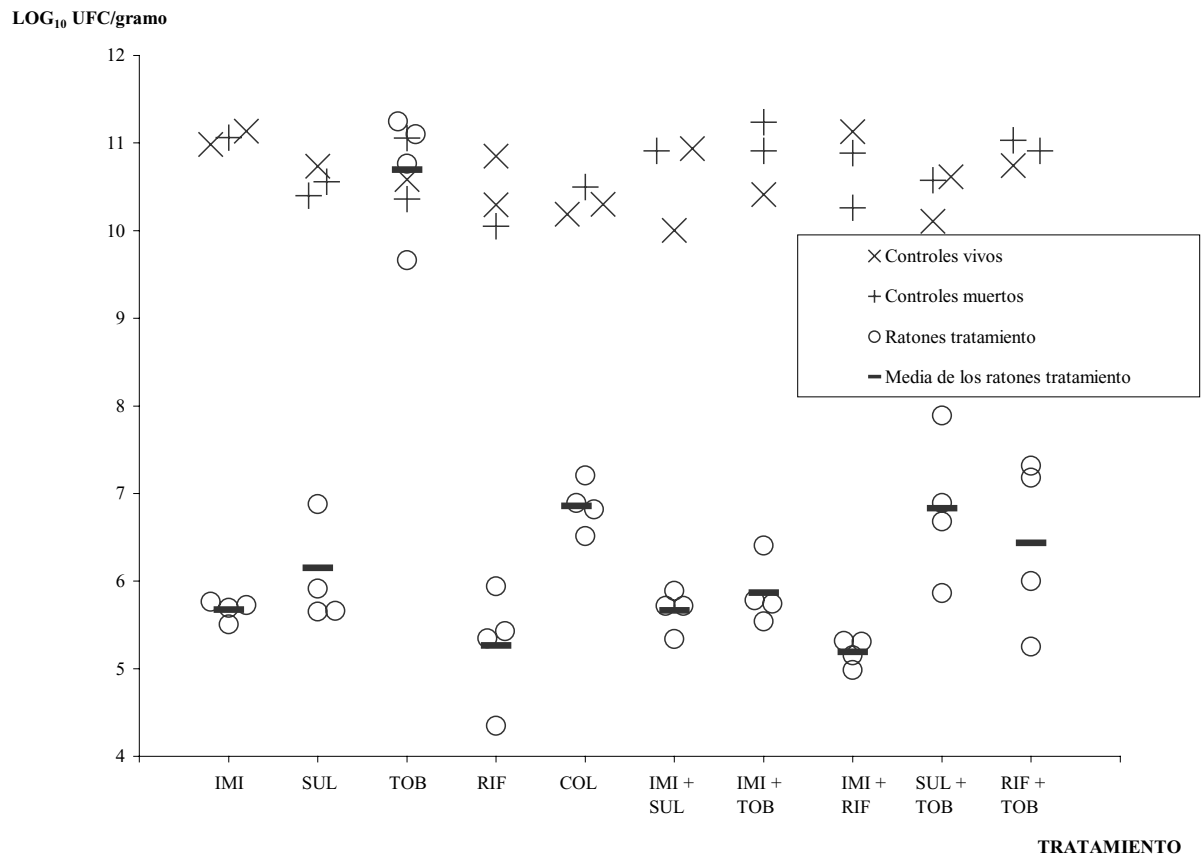




FIGURA 7: Dispersión de recuentos pulmonares en el clon D.

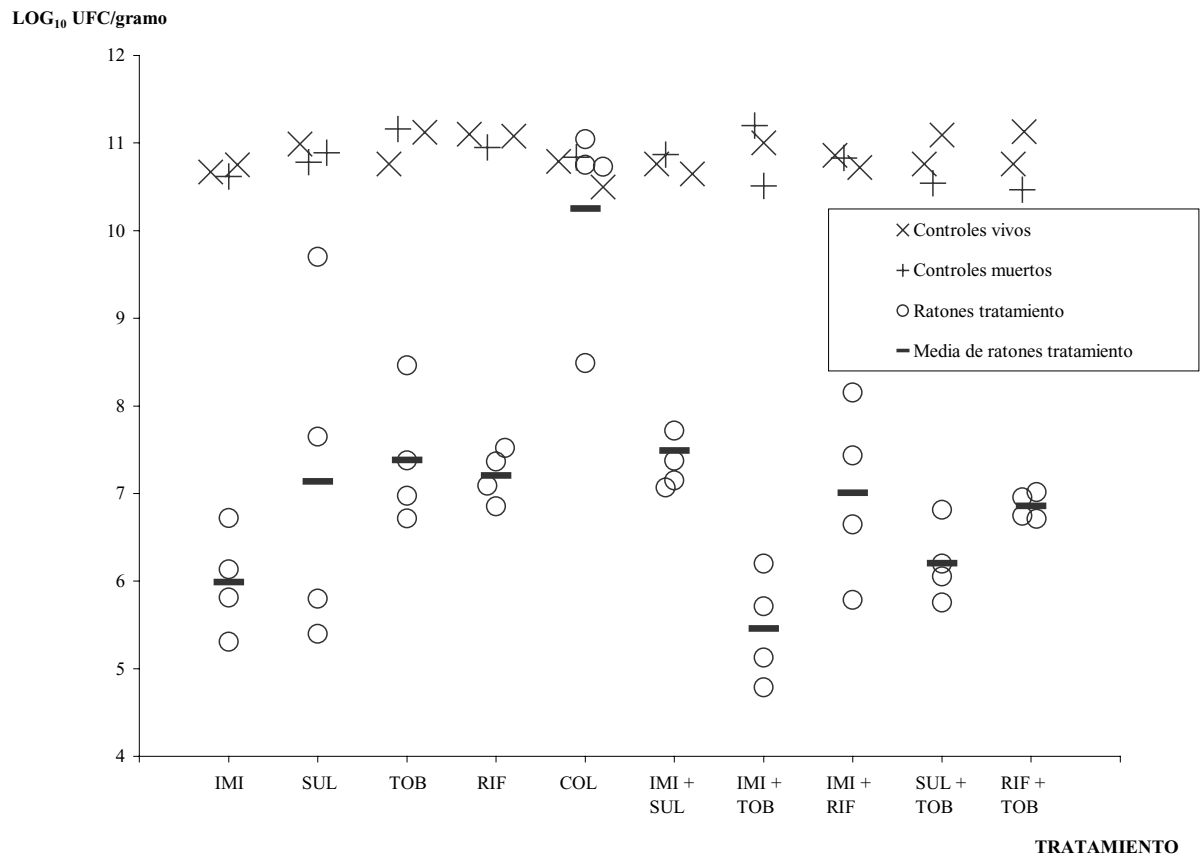


FIGURA 8: Dispersión de recuentos pulmonares en el clon E.

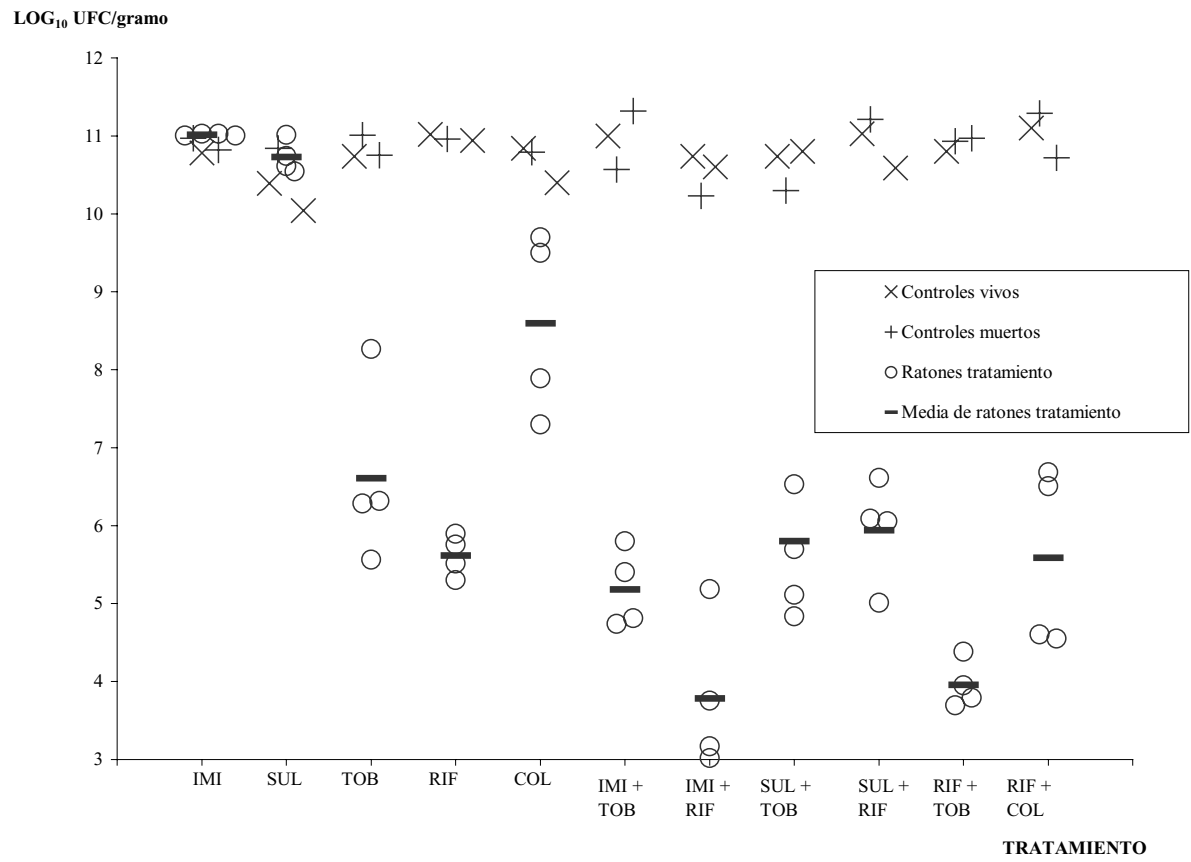
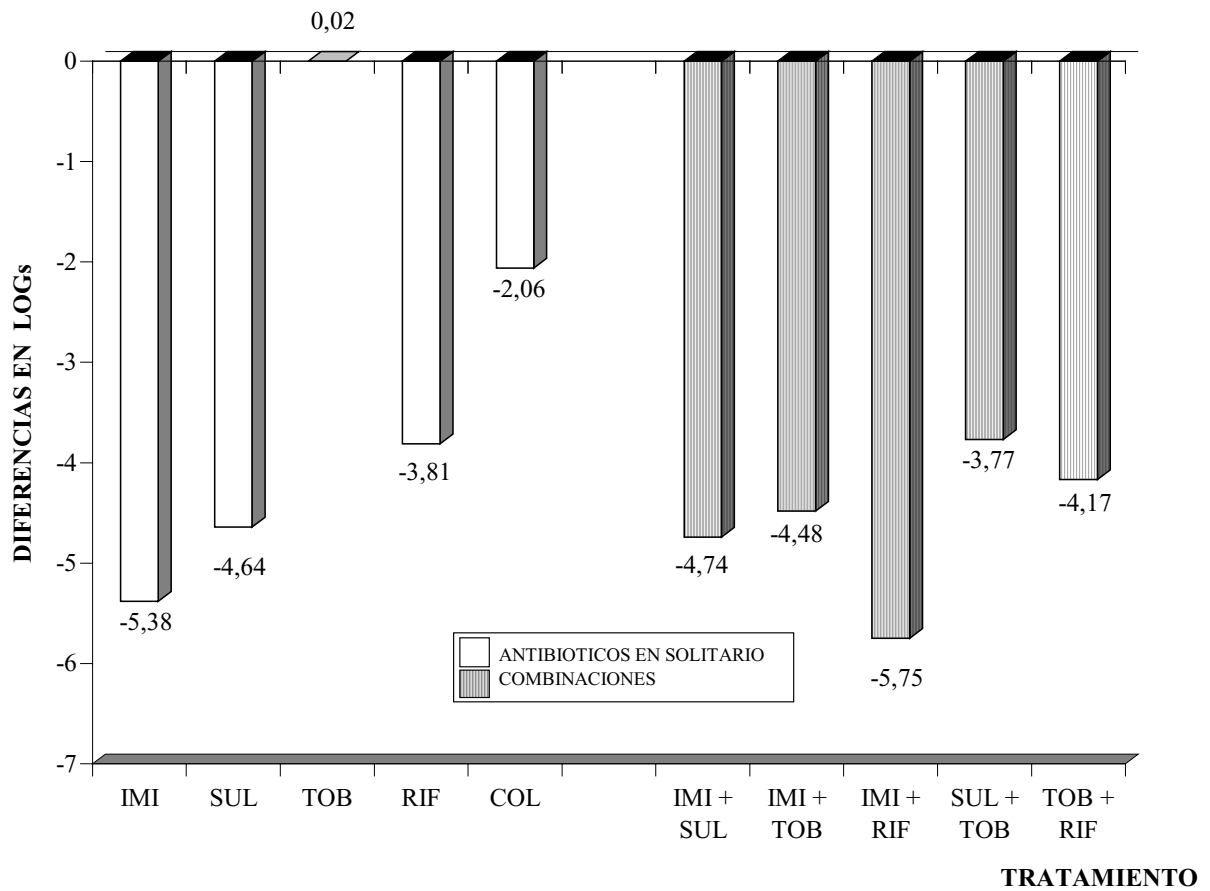
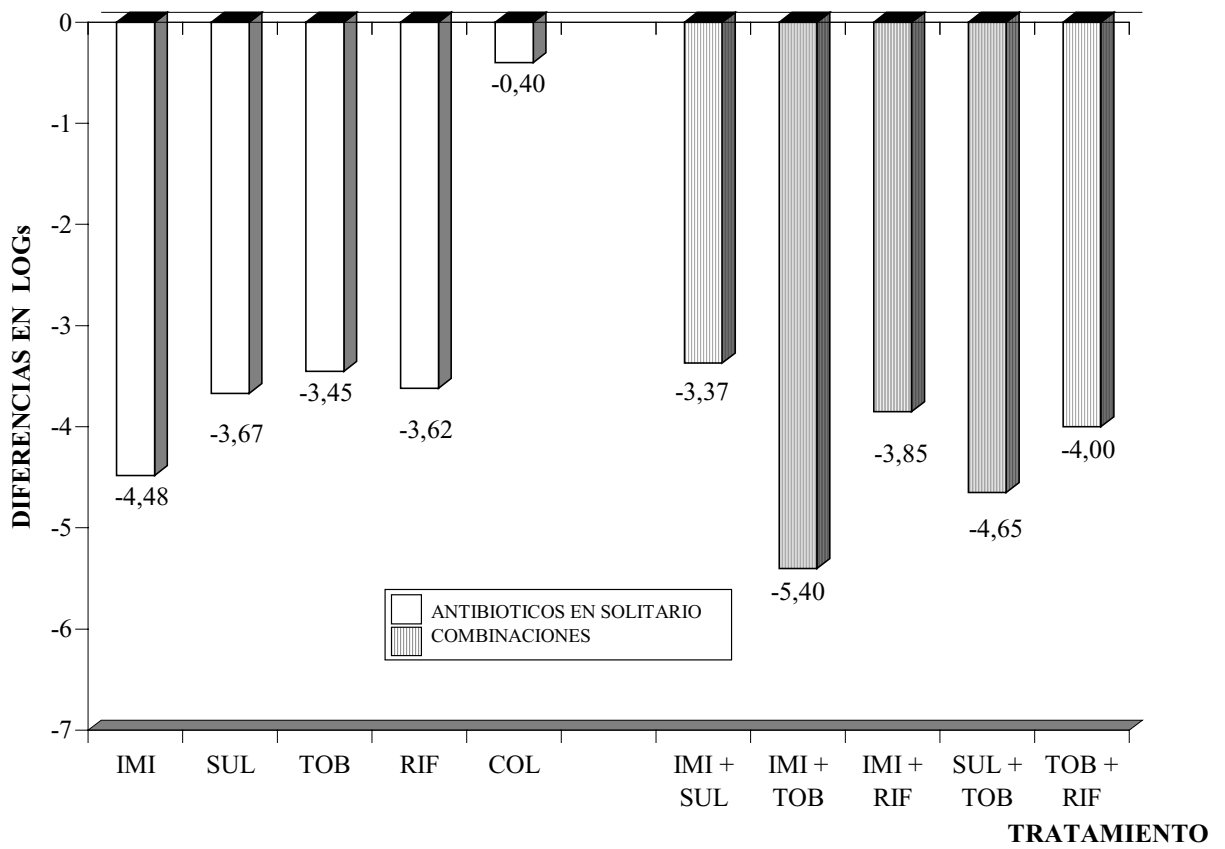


FIGURA 9: Diferencias en logs entre ratones tratamiento y controles en el clon A.



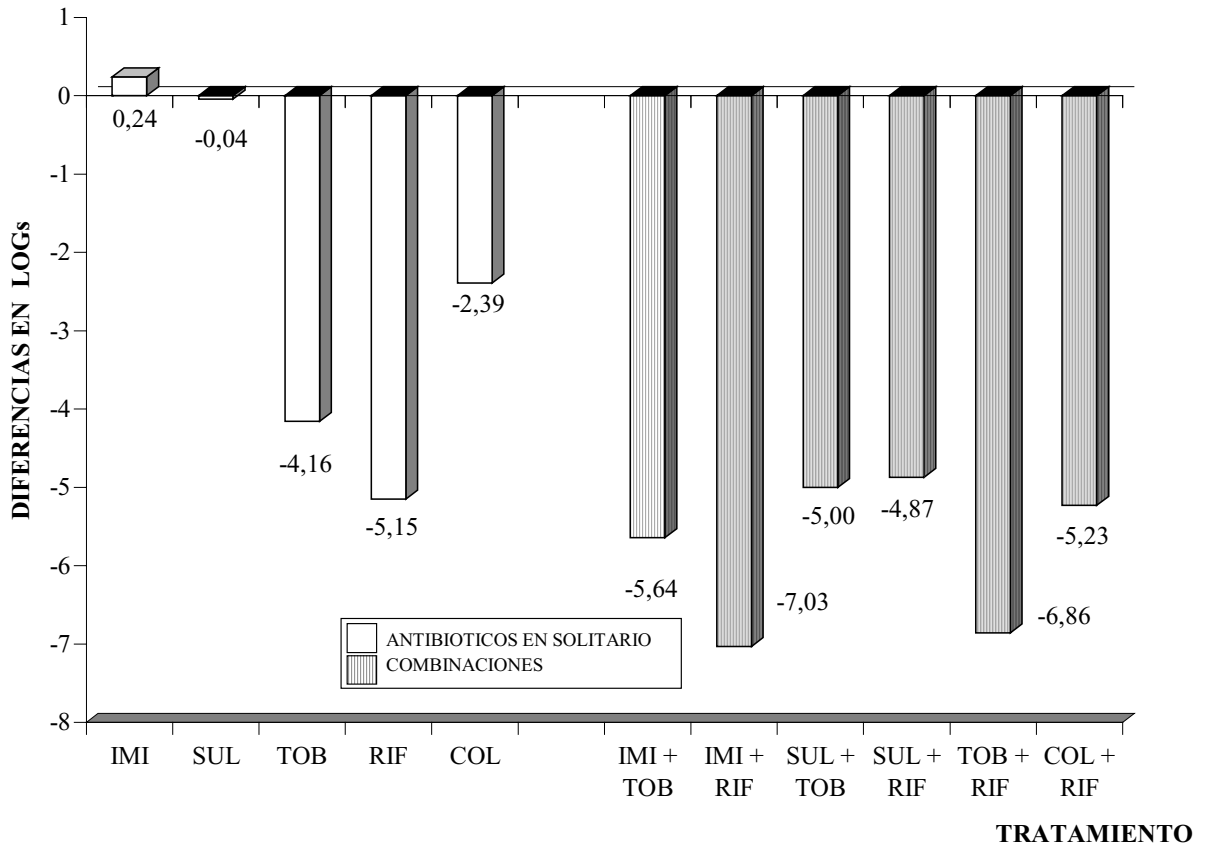
NOTA: Las diferencias en los recuentos pulmonares ( $\Delta\log$ s) de los animales tratados versus los controles, se han establecido respecto al grupo control correspondiente a la misma fase de los experimentos, es decir monoterapias o combinaciones por separado.

FIGURA 10: Diferencias en logs entre ratones tratamiento y controles en el clon D.



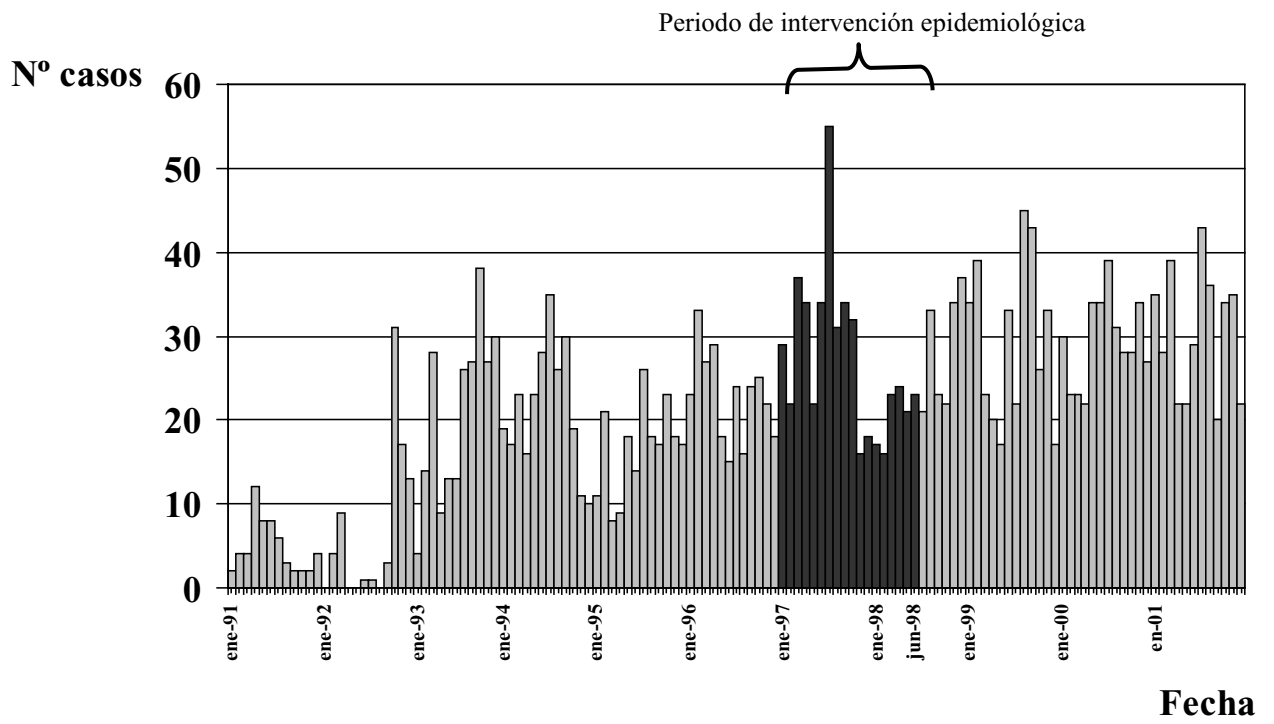
NOTA: Las diferencias en los recuentos pulmonares ( $\Delta$ logs) de los animales tratados versus los controles, se han establecido respecto al grupo control correspondiente a la misma fase de los experimentos, es decir monoterapias o combinaciones por separado.

FIGURA 11: Diferencias en logs entre ratones tratamiento y controles en el clon E.



NOTA: Las diferencias en los recuentos pulmonares ( $\Delta\log_s$ ) de los animales tratados versus los controles, se han establecido respecto al grupo control correspondiente a la misma fase de los experimentos, es decir monoterapias o combinaciones por separado.

FIGURA 12: Brote Epidémico por *A. baumannii*. Tasas mensuales de pacientes con nueva adquisición (1991-2001).



**X.**

**ARTÍCULOS PUBLICADOS**





## Emergence and Rapid Spread of Carbapenem Resistance during a Large and Sustained Hospital Outbreak of Multiresistant *Acinetobacter baumannii*

XAVIER CORBELLA,<sup>1\*</sup> ABELARDO MONTERO,<sup>1</sup> MIQUEL PUJOL,<sup>1</sup> M. ANGELES DOMÍNGUEZ,<sup>2</sup> JOSEFINA AYATS,<sup>2</sup> M. JOSÉ ARGERICH,<sup>1</sup> FREDERIC GARRIGOSA,<sup>3</sup> JAVIER ARIZA,<sup>1</sup> AND FRANCESC GUDIOL<sup>1</sup>

*Departments of Infectious Diseases,<sup>1</sup> Microbiology,<sup>2</sup> and Intensive Care Medicine,<sup>3</sup> Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 28 April 2000/Returned for modification 2 June 2000/Accepted 31 July 2000

Beginning in 1992, a sustained outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections was noted in our 1,000-bed hospital in Barcelona, Spain, resulting in considerable overuse of imipenem, to which the organisms were uniformly susceptible. In January 1997, carbapenem-resistant (CR) *A. baumannii* strains emerged and rapidly disseminated in the intensive care units (ICUs), prompting us to conduct a prospective investigation. It was an 18-month longitudinal intervention study aimed at the identification of the clinical and microbiological epidemiology of the outbreak and its response to a multicomponent infection control strategy. From January 1997 to June 1998, clinical samples from 153 (8%) of 1,836 consecutive ICU patients were found to contain CR *A. baumannii*. Isolates were verified to be *A. baumannii* by restriction analysis of the 16S-23S ribosomal genes and the intergenic spacer region. Molecular typing by repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis showed that the emergence of carbapenem resistance was not by the selection of resistant mutants but was by the introduction of two new epidemic clones that were different from those responsible for the endemic. Multivariate regression analysis selected those patients with previous carriage of CR *A. baumannii* (relative risk [RR], 35.3; 95% confidence interval [CI], 7.2 to 173.1), those patients who had previously received therapy with carbapenems (RR, 4.6; 95% CI, 1.3 to 15.6), or those who were admitted into a ward with a high density of patients infected with CR *A. baumannii* (RR, 1.7; 95% CI, 1.2 to 2.5) to be at a significantly greater risk for the development of clinical colonization or infection with CR *A. baumannii* strains. In accordance, a combined infection control strategy was designed and implemented, including the sequential closure of all ICUs for decontamination, strict compliance with cross-transmission prevention protocols, and a program that restricted the use of carbapenem. Subsequently, a sharp reduction in the incidence rates of infection or colonization with *A. baumannii*, whether resistant or susceptible to carbapenems, was shown, although an alarming dominance of the carbapenem-resistant clones was shown at the end of the study.

Initial concern about multiresistant, carbapenem-resistant (CR) *Acinetobacter baumannii* infections began when the first hospital-wide outbreak occurred in New York City in 1991 (31, 69). Since then, reports of CR *A. baumannii* have been accumulating from other parts of the world, such as Argentina, Belgium, Brazil, Cuba, England, France, Hong Kong, Kuwait, Singapore, and Spain (3, 9, 10, 22, 53, 66). Currently, the spread of hospital populations of resistant microorganisms is of great concern worldwide, raising the idea that we may be approaching the postantimicrobial era (2, 4, 16, 33, 52, 68). Although methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci have been the focus of much of this attention to date (32, 39, 46, 48, 54, 78), in recent years, emerging gram-negative organisms such as *A. baumannii* have provided the same challenge with regard to multiple-antibiotic resistance (7, 8, 21, 38, 55, 72, 73).

In September 1992, an outbreak of infections due to multiresistant *A. baumannii* began in the intensive care units (ICUs) of our institution. Although infection control measures based on strict barrier precautions were instituted, *A. baumannii* spread throughout the hospital. Since then, more than 1,400

patients have been colonized or infected, 60 to 70% of them during an ICU stay. The incidence rates of new colonized or infected patients ranged from 6.3 cases/100 ICU admissions in 1992 to 14 cases/100 ICU admissions in 1996. Currently, *A. baumannii* constitutes the most common cause of infection among ICU patients. Numerous efforts were conducted in our institution to investigate the epidemiology of the outbreak (5, 18, 20). Results indicated that colonized patients and environmental contamination might act as the major epidemiological reservoirs for infection. Inadequate prevention of cross-transmission is the main determinant for *A. baumannii* persistence. Control measures were repeatedly reinforced during this time, but only a transitory decrease in the incidence of *A. baumannii* infection or colonization was observed following each reinforcement.

From 1992 to 1996, annual susceptibility summaries showed that all *A. baumannii* epidemic or endemic isolates were resistant to two or more antibiotic groups, which uniformly included  $\beta$ -lactams and gentamicin, and were susceptible only to carbapenems, sulbactam, and colistin. However, on the basis of the variable susceptibilities to tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, and tetracycline, three major antibiotic susceptibility patterns among the *A. baumannii* population could be defined. Continued surveillance of *A. baumannii* isolates by molecular typing procedures showed three main clonal types that corresponded to the three major antibiotic susceptibility patterns

\* Corresponding author. Mailing address: Infectious Diseases Service, Hospital de Bellvitge, Feixa Llargu s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Phone: 34-93-2607625. Fax: 34-93-2607637. E-mail: xcorbella@csb.scs.es.

detected during the outbreak: clone A, 71%; clone B, 7%; clone C, 14%; and sporadic clones, 8% (M. A. Dominguez, J. Ayats, C. Ardanuy, X. Corbella, J. Liñares, and R. Martin, Abstr. 38th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. K-124, 1998). During this time, although yearly total antibiotic consumption decreased following a vigorous antibiotic use policy (from 60 daily definite doses [DDDs]/100 ICU hospitalization days in 1992 to 49.9 DDDs/100 ICU hospitalization days in 1996), the inability to control the outbreak indicated that the use of imipenem, the only recognized antibiotic alternative for treatment of infections, remained high, from 12.8 (21.3%) to 13.2 (26.5%) DDDs/100 ICU hospitalization days.

On January 4, 1997, a 75-year-old man who was admitted to our hospital with extensive cerebral infarction developed aspirate pneumonia requiring mechanical ventilation and ICU admission. Imipenem at 500 mg every 6 h was started, but the pneumonia progressed after 9 days of treatment. Respiratory specimens obtained by fiberoptic bronchoscopy with a protected specimen brush yielded *A. baumannii* with intermediate resistance to imipenem (MIC, 8 mg/liter). On day 12, the imipenem dosage was increased to 1 g every 6 h, but the patient died 24 h later. After that time, carbapenem resistance among *A. baumannii* isolates rapidly spread throughout the ICUs, prompting us to conduct a prospective investigation.

The emergence and spread of carbapenem resistance were managed from a combined laboratory-epidemiology point of view. Our aims were to identify the complexity of factors contributing to the clinical and microbiological epidemiology of such infections and to determine the effectiveness of a combination of infection control strategies.

(The work was presented in part at the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 24 to 27 September 1998, San Diego, Calif.).

#### MATERIALS AND METHODS

**Study design. (i) Setting.** The Hospital de Bellvitge is a 1,000-bed tertiary-care teaching hospital for adults in Barcelona, Spain. It provides acute medical and surgical care to a population of 1.5 million persons, excluding pediatrics, obstetrics, and burns, with about 26,000 patient admissions per year. It has four ICUs, with a total of 46 beds and about 1,200 patient admissions per year. One nurse cares for each two ICU patients; transplant recipients, however, are managed by only one nurse. Selective digestive decontamination is not applied to patients.

**(ii) Objectives.** The objectives of the study were (i) to identify risk factors for the development of clinical colonization or infection due to CR *A. baumannii*, (ii) to characterize molecularly the organisms and clones involved, and (iii) to evaluate the efficacy of a multicomponent intervention program.

**(iii) Design.** The study was an 18-month prospective longitudinal intervention investigation and was centered in the ICUs. From January 1997 to June 1998, all ICU patients harboring *A. baumannii* in clinical samples entered into a specially designed computer-assisted protocol. During the first 6-month period before intervention (January to June 1997), potential risk factors for the development of CR *A. baumannii*-positive clinical samples were identified by comparing demographic, clinical, and epidemiological data between CR *A. baumannii*-positive and carbapenem-susceptible (CS) *A. baumannii*-positive groups. Since we had observed that the previous carriage of *A. baumannii* at different body sites, such as the digestive tract, was a major attribute for the subsequent development of *A. baumannii*-positive clinical samples in our ICU setting (5, 18), rectal swab specimens were prospectively obtained upon ICU admission and weekly thereafter until ICU discharge or death for screening of *A. baumannii* carriers during this first 6-month study period. According to the risk factors identified, a combination of infection control measures was carefully designed and implemented in the ICUs in July 1997. The response to the intervention was evaluated during the subsequent 12-month period (July 1997 to June 1998) by comparing the incidence rates of new *A. baumannii* cases of the pre- and postintervention study periods.

**Definitions.** CR *A. baumannii*-positive and CS *A. baumannii*-positive patients were defined as those patients admitted to the ICUs from whom at least one clinical sample recovered during the ICU stay contained CR or CS *A. baumannii* (rectal swab specimens were not considered clinical samples). Clinical episodes of colonization or infection were considered acquired in the ICU if they appeared 72 h after ICU admission. Standard Centers for Disease Control and

Prevention (CDC) criteria were carefully used to define nosocomial infections (28).

Chronic health status was classified into three groups according to the McCabe classification: group 1 includes chronic or curable disease, group 2 includes malignancy or any other disease that results in a life expectancy of less than 5 years, and group 3 includes diseases that result in a life expectancy of less than 1 year (44). The severity of illness was calculated by means of evaluation of the Simplified Acute Physiologic Score (SAPS) measured at ICU admission (40). SAPS is a validated severity-of-disease scoring system that uses age and 13 physiological parameters to generate a score from 0 to 56 by increasing severity of illness.

Immunosuppressed patients included those with nonneoplastic immunosuppressive diseases or those who had used glucocorticoids, cyclosporine, cyclophosphamide, methotrexate, or azathioprine in the 2 weeks prior to the first episode of clinical colonization or infection due to *A. baumannii*. A urinary catheter, intravascular catheterization, parenteral alimentation, mechanical ventilation or tracheostomy, and antibiotic therapy were considered if they had been in use for more than 48 h from ICU admission to the day of the ICU stay that *A. baumannii* was detected in clinical samples. The term "previous CR *A. baumannii* carriage" was defined as the presence of CR *A. baumannii* in one or more fecal samples, before the detection of the first *A. baumannii* clinical isolate (either CR or CS *A. baumannii*). The term "concentration of CR *A. baumannii*-positive patients" was defined as the mean number of patients per day who were known to harbor CR *A. baumannii* and who were admitted to the same ICU ward during the week before the patient developed the first *A. baumannii* clinical colonization or infection.

**Infection control intervention.** Multicomponent intervention included the sequential closure of all ICUs for extensive decontamination; partial structural redesign of the units with placement of hand-washing facilities within the rooms; continued ICU personnel educational programs; rigorous open surveillance of adequate compliance with barrier precautions, cleaning protocols, and house-keeping procedures; and restriction of carbapenem use. Adequate compliance with the control program was supervised by two specially designated members of the infection control team (one physician and one nurse), who attended to the ICUs daily after the implementation of the intervention program in July 1997. Furthermore, since the ability of *A. baumannii* to survive in the hospital environment is well known (77), an environmental survey was conducted on the basis of the weekly performance of environmental sampling. A previously reported modification of the swab technique, which involved the use of sterile gauze rather than cotton applicator swabs, was used (20). The focus was on those ICU items that should have been free of contamination under adequate compliance with cleaning procedures and barrier precautions. During the 12-month postintervention study periods, continuous feedback information that comprised data on outbreak evolution, environmental contamination, and carbapenem consumption was provided.

During carbapenem restriction use, a "fourth-generation" cephalosporin (cefepime) or an antipseudomonas penicillin plus a  $\beta$ -lactamase inhibitor (piperacillin-tazobactam), preferably in combination with an aminoglycoside, was recommended as a broad-spectrum empirical regimen for ICU patients. On the basis of both susceptibility tests and previous published experiences (34-36), 1 to 2 g of intravenous sulbactam alone every 6 to 8 h (19), with or without tobramycin, or polymyxin E (colistimethate) administered at recommended doses (12, 37, 74, 80), either parenterally, intrathecally, topically, or aerosolized, was used as an alternative to imipenem against *A. baumannii* strains, when indicated.

**Microbiology procedures.** *A. baumannii* isolates were identified by the microbiology laboratory by using standard biochemical reactions (24) and its ability to grow at 37, 41, and 44°C. Confirmation of the identification as *A. baumannii* (either CS or CR *A. baumannii*) was verified by restriction analysis of the 16S-23S ribosomal genes and the intergenic spacer sequence (27) from representative isolates.

The antibiotic susceptibility of *A. baumannii* was determined by the microdilution method (MicroScan; NegCombo Type 61 plates; Dade International Inc., West Sacramento, Calif.). Susceptibility to the following antibiotics was determined: ampicillin, ticarcillin, piperacillin, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, and tetracycline. Imipenem resistance was confirmed by the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) and the agar dilution method. Results were interpreted according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) criteria (51). Susceptibilities to sulbactam and colistin were tested by the disk diffusion method with use of 10/10- $\mu$ g ampicillin-sulbactam disks and 10- $\mu$ g colistin disks (Becton Dickinson, Sparks, Md.), and isolates were considered susceptible if the inhibition zones were  $\geq 15$  and  $\geq 11$  mm, respectively. Sulbactam and colistin MICs were studied by the agar dilution method (50) with Mueller-Hinton agar (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). The breakpoints for sulbactam were those of NCCLS for ampicillin-sulbactam (51). Breakpoints for colistin were those defined by the French Society for Microbiology (1, 65); thus, isolates were considered susceptible to colistin if the MIC was  $\leq 2$  mg/liter.

Since all multiresistant *A. baumannii* strains, either CR or CS *A. baumannii* strains, isolated from clinical specimens during the outbreak were uniformly found to be gentamicin resistant, this antibiotic was selected for the screening of rectal and environmental specimens. Rectal swabs and environmental cultures were sampled on MacConkey agar plates (supplemented with 6  $\mu$ g of gentamicin

per ml) and 5% sheep blood agar plates. The plates were incubated at 37°C for 48 h.

**Molecular typing studies.** Genotyping was performed by the repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) and by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). For the present study we selected 77 CR *A. baumannii* strains isolated in 1997 from 45 patients. Sixty-one CR *A. baumannii* isolates were selected from 29 consecutive patients colonized or infected during the first 6-month period before the intervention (January to June 1997); of those isolates, 16 CR *A. baumannii* strains, were isolated from rectal swabs and 45 were isolated from clinical specimens (respiratory tract,  $n = 17$ ; blood,  $n = 7$ ; urine,  $n = 7$ ; catheter sites,  $n = 5$ ; and other,  $n = 9$ ). The remaining 16 clinical strains (respiratory tract,  $n = 6$ ; blood,  $n = 2$ ; wound,  $n = 2$ ; and other,  $n = 6$ ) belonged to 16 CR *A. baumannii*-colonized or -infected patients selected at random during the second 6-month period following the intervention (July to December 1997). In addition, five environmental CR *A. baumannii* strains isolated from ICU items were available for genotyping.

REP-PCR was performed with the primers and under the conditions described elsewhere (71). For PFGE, DNA extraction and purification were carried out as described previously (43, 61). For this analysis, two low-frequency restriction enzymes, *Sma*I and *Apa*I, were used separately, following the manufacturer's specifications (New England BioLabs, Beverly, Mass.). DNA restriction fragments were separated in a CHEF-DR III unit (Bio-Rad, Hercules, Calif.) for 20 h at 200 V, with pulse times ranging from 1 to 30 s when *Sma*I was used for restriction and from 0.5 to 15 s when *Apa*I was used for restriction.

**Statistical analysis.** Potential risk factors were compared between the CR and CS *A. baumannii* groups by chi-square, Fisher's exact, or Student's *t* test, when appropriate. For the purpose of statistical analysis, all those patients who harbored both CR and CS *A. baumannii* during their ICU stay were considered to be two patients. All variables with a two-tailed *P* value of  $\leq 0.05$  in the univariate analysis were considered statistically significant and were included in logistic regression modeling. Multivariate analysis was done by logistic regression, with significant variables selected by a backward stepwise procedure. To identify differences in the evolution of the outbreak before and after the interventions, the study was divided in three 6-month periods: period 1, preintervention (January to June 1997); period 2, early postintervention (July to December 1997); and period 3, late postintervention (January to June 1998). Temporal trends in incidence rates were evaluated before and after interventions by comparing the mean numbers of new CR- or CS-*A. baumannii*-colonized or -infected patients per 100 ICU admissions among periods 1, 2, and 3 by using the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance and the Mann-Whitney U Wilcoxon Rank Sum W test. The impact of restricted use of carbapenem on the carbapenem resistance trend among periods was analyzed by using linear trend analysis with proportions. Statistical analysis was performed by using the SPSS/PC (Microsoft Corp., Redmond, Wash.) and the BMDP (BMDP Statistical Software, Cork, Ireland) statistical packages, and EPI Info software (version 6.04a; CDC, Atlanta, Ga.).

## RESULTS

**Risk factors for clinical colonization or infection due to CR *A. baumannii*.** From January to June 1997, 106 (15.7%) of the 676 consecutive patients admitted to the ICUs developed clinical colonization or infection due to multiresistant *A. baumannii*: 22 (20.7%) due to CR *A. baumannii*, 67 (63.3%) due to CS *A. baumannii*, and 17 (16%) due to both CR and CS *A. baumannii* (Fig. 1). Risk factors were compared between the 39 CR *A. baumannii*-infected or -colonized patients and the 84 CS *A. baumannii*-infected or -colonized patients (Table 1), with no differences in terms of sex, underlying diseases, severity of illness at admission, type of ICU ward, mean number of days in an ICU prior to colonization or infection, and prior number of days with invasive devices or antibiotics being found. In contrast, patients infected or colonized with CR *A. baumannii* isolates were younger than those infected or colonized with CS *A. baumannii* isolates and belonged to group 1 of the McCabe classification (chronic or curable diseases) in a significantly greater proportion. Moreover, a higher proportion of CR *A. baumannii*-infected or -colonized patients had undergone major digestive surgery, had received parenteral nutrition or prior therapy with carbapenems, had been admitted into a ward with a high density of CR *A. baumannii*-infected or -colonized patients, and were more frequently previous fecal carriers of CR *A. baumannii*. Results of the logistic regression analysis are shown in Table 2 and identified the previous state of CR *A. baumannii* carriage, the previous use of imipenem, and the presence of a higher concentration of CR *A. bauman-*

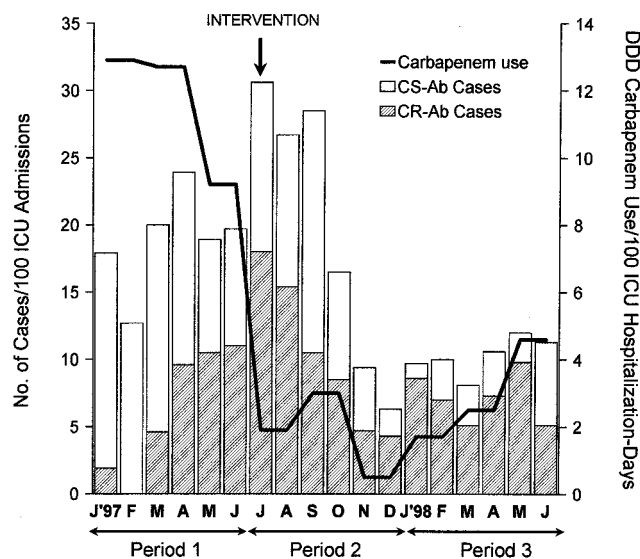


FIG. 1. Temporal trends in incidence of new patients colonized or infected with CR *A. baumannii* (CR-Ab) and CS *A. baumannii* (CS-Ab) and carbapenem consumption from January 1997 to June 1998.

*nii*-infected or -colonized patients in the same ICU ward to be the independent risk factors for the development of clinical colonization or infection due to CR *A. baumannii*.

Over the entire 18-month study period, 262 (14%) of a total of 1,836 consecutive patients admitted to our ICUs had clinical samples positive for multiresistant *A. baumannii*: 109 (42%) due to CS *A. baumannii*, 102 (39%) due to CR *A. baumannii*, and 51 (19%) due to both CS and CR *A. baumannii* (Fig. 1). Of the total of 153 patients from whom clinical samples harbored CR *A. baumannii*, 90 (59%) met the CDC criteria for infection and 63 (41%) met the CDC criteria for clinical colonization; similarly, 99 (62%) of 160 CS *A. baumannii*-infected or -colonized patients met the CDC criteria for infection. A comparison of the characteristics of patients with CR and CS *A. baumannii* infections revealed no statistical differences between the groups in terms of sex, age, severity of disease, chronic health status, or prevalence and type of underlying diseases. The clinical characteristics of patients with infections and the mortality rates are shown in Table 3 and do not reveal major differences when patients infected or colonized with CR *A. baumannii* are compared with those infected or colonized with CS *A. baumannii*. Intubation-associated respiratory tract infections, catheter-related bacteremia, and surgical wound infections were the most common infections found among members of both groups.

**Microbiology results.** Restriction analysis of the 16S-23S ribosomal operon was performed with representative strains of the CS and CR *A. baumannii* genotypes found during this study. This analysis confirmed the biochemical results and identified all the strains as belonging to DNA group 2, named *A. baumannii*. Results of the antibiotic susceptibility tests for the *A. baumannii* strains isolated during the study period are summarized in Table 4. The antibiotic susceptibility patterns among the CS *A. baumannii* isolates (susceptible only to carbapenems, sulbactam, and colistin) were consistent with those obtained by PFGE in previous studies (5, 18) and pertained to clone A, the major CS *A. baumannii* clone isolated during the outbreak. Among CR *A. baumannii* isolates, we found two antibiotic susceptibility patterns that corresponded to two new *A. baumannii* genotypes by REP-PCR and PFGE (named D



TABLE 1. Potential risk factors for ICU patients with clinical colonization or infection with CR *A. baumannii* compared with those for ICU patients with clinical colonization or infection with CS *A. baumannii*<sup>a</sup>

Characteristics	Patients with CR-Ab (n = 39)	Patients with CS-Ab (n = 84)	P value
Mean age (yr)	48.7 ± 20	57.3 ± 18	0.02
Male sex (no. [%] of patients)	29 (74)	63 (75)	1.0
Chronic health status (no. [%] of patients)			
McCabe criterion (groups 2 and 3)	5 (13)	24 (29)	0.05
Diabetes	7 (18)	11 (13)	0.66
Chronic pulmonary disease	7 (18)	20 (24)	0.46
Cardiovascular disease	12 (31)	26 (31)	0.98
Liver cirrhosis	1 (3)	5 (6)	0.70
Chronic renal failure	4 (10)	4 (5)	0.44
Solid cancer	3 (8)	14 (17)	0.17
Hematologic cancer	2 (5)	2 (2)	0.80
Immunosuppression	2 (5)	1 (1)	0.49
Disease at ICU admission			
SAPS	12.2 ± 4	12.3 ± 4	0.90
No. [%] of patients with:			
Polytrauma	8 (21)	12 (14)	0.38
Major digestive surgery	9 (23)	8 (10)	0.04
Cardiopulmonary surgery	4 (10)	14 (17)	0.50
Neurosurgery	4 (10)	12 (14)	0.74
Liver transplantation	1 (3)	3 (4)	1.0
Other	13 (33)	33 (41)	0.21
ICU of admission (no. [%] of patients)			
ICU-A	10 (26)	26 (31)	0.69
ICU-B	5 (13)	20 (24)	0.24
ICU-C	22 (56)	37 (44)	0.27
ICU-D	2 (5)	1 (1)	0.49
Concentration of CR-Ab patients	2.02 ± 2	0.87 ± 0.6	<0.001
Mean no. of days in ICU prior to isolation	15.7 ± 16	13.9 ± 23	0.61
No. (%) of patients with CR-Ab fecal carriage prior to isolation	16 (52)	3 (5)	<0.001
Presence of invasive devices (no. [%] of patients)			
Bladder catheter	39 (100)	82 (99)	1.0
Intravascular catheter	39 (100)	81 (98)	0.83
Parenteral nutrition	19 (49)	19 (23)	0.004
Intubation or tracheostomy	38 (97)	72 (87)	0.12
Prior no. of days with invasive devices			
Bladder catheter	19.9 ± 18	15.1 ± 11	0.13
Intravascular catheter	20.8 ± 18	15.3 ± 10	0.08
Parenteral nutrition	16.3 ± 9	13.1 ± 9	0.26
Intubation or tracheostomy	18.4 ± 17	12.9 ± 9	0.08
Use of antibiotics prior to isolation (no. [%] of patients)	39 (100)	68 (82)	0.01
Use of carbapenems prior to isolation (no. [%] of patients)	17 (44)	9 (11)	<0.001
Prior no. of days with antibiotic therapy	13.6 ± 10	13.3 ± 10	0.84
Prior no. of days with carbapenems	8.4 ± 5	10.2 ± 7	0.49

<sup>a</sup> Plus-or-minus values are means ± standard deviations. Ab, *A. baumannii*.

and E). Clone D was susceptible to sulbactam (MIC, 4 mg/liter) and colistin (MIC, ≤0.5 to 1 mg/liter) and was intermediate to tobramycin (MIC, 8 mg/liter) and imipenem (MIC, 8 mg/liter). Imipenem MICs were confirmed both by the E-test and the agar dilution method to avoid false imipenem resistance due to degradation of the drug during storage of the MicroScan panels. Clone E was only susceptible to colistin (MIC, ≤0.5 to 1 mg/liter), intermediate or highly resistant to tobramycin (MIC, 8 to >128 mg/liter), and highly resistant to

imipenem (MIC, >32 mg/liter). Neither clone D nor clone E seemed to be related to previous clones isolated during the outbreak (Fig. 2). The results obtained by PFGE reaffirmed those obtained by REP-PCR analysis, which also identified two new clones among the CR *A. baumannii* strains (Fig. 3).

Genotyping of CR *A. baumannii* isolates from patients colonized or infected during the first 6 months before intervention (January to June 1997) showed a dominance of clone D over clone E: 25 of the 29 patients studied harbored clone D, while

TABLE 2. Multivariate relative risks for potential variables independently associated with infection or colonization with a CR strain

Potential risk factor	Multivariate analysis <sup>a</sup>	
	RR (95% CI)	P value
Age	0.98 (0.95–1.14)	
McCabe criterion (groups 2 and 3)	0.57 (0.14–2.37)	
Major digestive surgery	1.29 (0.21–7.89)	
Parenteral nutrition	2.34 (0.63–8.62)	
Concentration of CR-Ab <sup>b</sup> patients	1.73 (1.21–2.47)	<0.001
Prior carbapenem use	4.58 (1.34–15.60)	<0.001
CR-Ab fecal carriage prior to isolation	35.30 (7.20–173.10)	<0.001

<sup>a</sup> RR, relative risk; CI, confidence intervals. Variables with a *P* value of 0.05 or less by univariate analysis (Table 1) were used in the multivariate model. Subgroup of prior carbapenem use rather than the composite variable of prior antibiotic use was included in the multivariate analysis.

<sup>b</sup> Ab, *A. baumannii*.

the remaining 4 patients harbored clone E. Identical genotypes were found for paired isolates (fecal swabs and clinical samples) from the 16 patients from whom both isolates were available. Among the 16 CR *A. baumannii*-colonized or -infected patients selected at random during the second period following intervention, clone D was found in 4 patients and clone E was found in 12 patients.

In view of the molecular typing results, the first CR *A. baumannii* isolate noted to have occurred in January 1997 was a clone D isolate. The first clone E strain was noted to have occurred in May 1997 and was isolated from the urinary tract of a 45-year-old polytraumatic man who had been transferred to our ICU from a hospital in Madrid, where he had been colonized with CR *A. baumannii* strain with susceptibility pattern identical to that of the clone E strain.

From January 1997 to June 1998, a total of 1,164 cultures of environmental samples were performed, showing a significant

TABLE 3. Characteristics of ICU patients with infection due to CR *A. baumannii* compared with those with infection due to CS *A. baumannii*<sup>a</sup>

Characteristics	Patients with CR-Ab (n = 90)	Patients with CS-Ab (n = 99)
Type of infection (no. [%] of patients)		
Tracheobronchitis	52 (58)	54 (55)
Bacteremia <sup>b</sup>	27 (30)	33 (33)
Wound infection	23 (26)	21 (21)
Pneumonia	12 (13)	10 (10)
Urinary tract infection	4 (4)	1 (1)
Catheter-associated ventriculitis <sup>c</sup>	2 (2)	1 (1)
Other	5 (6)	3 (3)
Polymicrobial	50 (56)	55 (56)
Total no. of days of ICU stay	32.7 ± 21	31.7 ± 26
Total no. of days of hospital stay	54.9 ± 35	50.7 ± 30
Crude mortality rate (no. [%] of patients)	38 (42)	50 (51)
Mortality at ≤5 days of infection (no. [%] of patients)	18 (20)	21 (21)

<sup>a</sup> Plus-or-minus values are means ± standard deviation. There were no significant differences between the CR and CS *A. baumannii* (Ab)-infected groups.

<sup>b</sup> Bacteremia was considered secondary to a distant site in three patients in the CR *A. baumannii*-infected group (wound, *n* = 2; intra-abdominal infection, *n* = 1) and in five patients in the CS *A. baumannii*-infected group (wound, *n* = 3, soft tissue 1, infection, *n* = 1; intra-abdominal infection, *n* = 1).

<sup>c</sup> Data were from a previous report (74).

TABLE 4. Antibiotic susceptibility patterns of *A. baumannii* clones isolated during the study<sup>a</sup>

Antibiotic	MIC (mg/liter)		
	Clone A (CS)	CR clones	
		Clone D	Clone E
Ticarcillin	32->96	>96	>96
Piperacillin	>96	>96	>96
Sulbactam	2	4	>64
Ceftazidime	>16	>16	>16
Cefepime	>32	>32	>32
Imipenem	≤1	8	>32
Meropenem	≤4	>16	>16
Gentamycin	>128	>128	>128
Tobramycin	>128	8	8->128
Amikacin	>128	>128	>128
Ciprofloxacin	>32	>32	>32
Colistin	<0.5-1	<0.5-1	<0.5-1

decrease in the rates of contamination with either CS or CR *A. baumannii* after the intervention (Fig. 4). Five of the environmental isolates studied were clone D and clone E isolates (two and three isolates, respectively). These CR *A. baumannii* strains had the same antibiotypes described for the clinical isolates. On the basis of antibiotic susceptibility, CR *A. baumannii* environmental isolates had the same clonal distribution throughout the study period as that documented for clinical samples containing CR *A. baumannii* strains.

**Response to infection control intervention program.** The incidence rate of new patients with clinical samples positive for CR *A. baumannii* reached its peak in July 1997, with 18 new CR *A. baumannii*-positive patients per 100 ICU admissions (Fig. 1). This represented a prevalence of 20 new CR *A. baumannii*-positive patients, or 60% of all those ICU patients with new clinical isolates that were multiresistant *A. baumannii*. The implementation of the multicomponent intervention in late

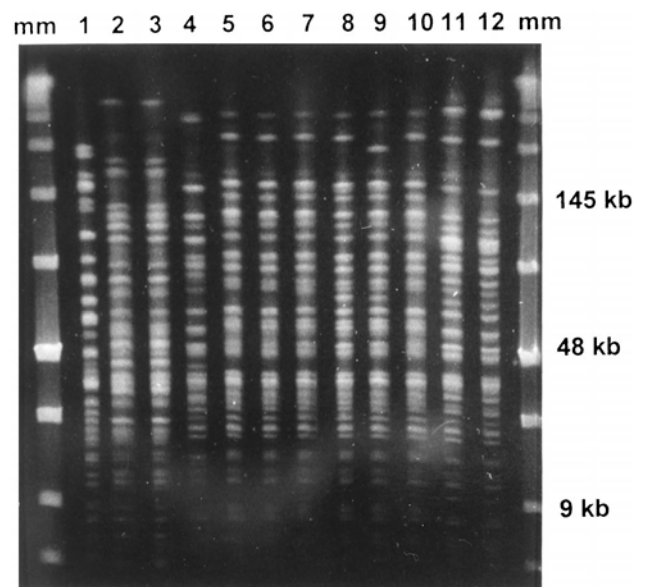


FIG. 2. Patterns obtained by PFGE for *A. baumannii* after digestion with *Sma*I. Lanes 1 to 4, CS isolates belonging to clone A (lane 1), clone B (lanes 2 and 3), and clone C (lane 4); lanes 5 to 12, CR isolates belonging to clone D (lanes 5 to 10) and clone E (lanes 11 and 12); lanes mm, molecular size marker.

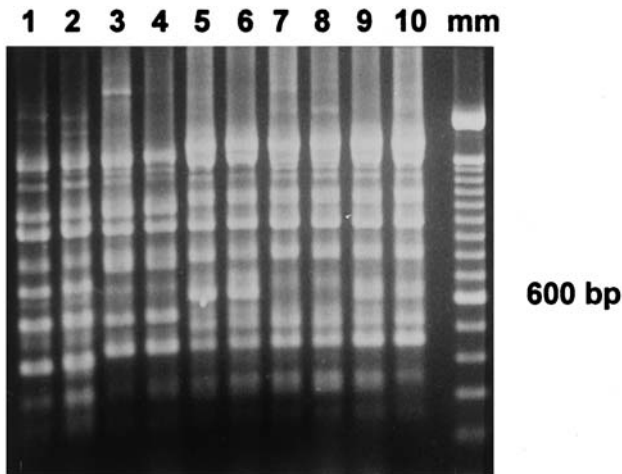


FIG. 3. Repetitive PCR patterns for *A. baumannii*. Lanes 1 and 2, CS isolates of clone A; lanes 3 and 4, other CS sporadic clones previously isolated during the endemic; lanes 5 to 10, CR isolates of clone D (lanes 7 and 8) and clone E (lanes 5, 6, 9, and 10); lane mm, 100-bp molecular size marker.

July 1997 resulted in a sharp reduction in the incidence rate of new *A. baumannii* infection or colonization, either CR or CS *A. baumannii*, from 30.6 cases per 100 ICU admissions in that month to 6.3 cases per 100 ICU admissions in December 1997. The incidence rates then remained at a constant, moderate level until the end of the study. The comparison of the mean incidence rates among periods 1, 2, and 3 is shown in Table 5 and indicates a relevant reduction between periods 1 and 3 that reached statistical significance.

The mean level of monthly carbapenem consumption was reduced 85% between the periods before (period 1) and early after implementation of restricted use of carbapenem (period 2), from 11.6 to 1.8 DDDs/100 ICU hospitalization days (Fig. 1). Afterward, low levels of monthly carbapenem consumption were maintained until the end of the study (period 3). Subsequently, the progressive dominance of CR *A. baumannii* in relation to CS *A. baumannii* was observed before the intervention was stopped (Fig. 5). Comparison of periods 1 and 2 and periods 1 and 3 showed differences that reached statistical significance. Of great concern was the fact that although the rates of CR and CS *A. baumannii* infection and colonization were similar for periods 2 and 3 (linear trend analysis between periods 2 and 3 showed nonsignificant differences), molecular typing of the CR *A. baumannii* isolates revealed an alarming dominance of clone E at the end of the study.

DISCUSSION

Over the past two decades, the ability to control multiresistant *A. baumannii* epidemic infections has differed widely from one hospital to another, probably depending on several epidemiological factors (6, 11, 13, 17, 26, 30, 49, 57, 60, 63, 70, 76). In some institutions, in which epidemic infections were circumscribed to a sole ICU ward, a common contaminated object in the environment could usually be identified as the source of infection. In these cases, the implementation of isolation precautions and modification of cleaning procedures resulted in the prompt eradication of the outbreak. In contrast, in other hospitals, epidemic infections have become endemic, and the clinical and microbiological epidemiologies of these infections remain obscure.

It is of great concern that when directives regarding effective infection control measures for large and sustained outbreaks

due to multiresistant *A. baumannii* were still not well defined, resistance involved carbapenems in our outbreak setting. Although resistance emerged after considerable pressure from imipenem use, a molecular typing approach showed that this was not due to the acquisition of resistance mechanisms by the clones responsible for the outbreak but, rather, was due to the sequential introduction of two new clones. After detection of the first CR *A. baumannii* infection, a dramatic increase in the incidence rate of new ICU patients infected or colonized with carbapenem-resistant isolates was observed. CR *A. baumannii* strains initially showed intermediate resistance to imipenem (clone D), but afterward a new, different clone (clone E) highly resistant to all commercially available antibiotics except polymyxins appeared and became dominant.

The risk factors associated with the development of *A. baumannii* infections have raised controversy. In most studies, the risk factors identified were in accordance with those associated with other nosocomial infections, such as the severity of illness, the prior use of antibiotics, or the previous number of days with invasive devices in place (41, 47, 75). However, when prospective screening for colonized patients was done by body site, we previously observed that a large proportion of ICU patients became secondarily colonized with *A. baumannii* at different body sites, similar to that which occurs in patients infected or colonized with other nosocomial pathogens (64). This previous state of *A. baumannii* carriage was a major attribute for the subsequent development of *A. baumannii* infections (18, 20). Under special epidemiological circumstances such as those noted in our ICUs, the inadequate prevention of cross-transmission determined that *A. baumannii* carriage occurred very early during ICU admission. In the present study our aim was not to again identify potential attributes for *A. baumannii* colonization of body sites for our ICU population but, rather, those risk factors particularly associated with the development of clinical episodes of CR *A. baumannii* colonization or infection among those patients harboring clinical *A. baumannii* isolates. The logistic regression analysis selected the previous state of CR *A. baumannii* carriage and the presence of a larger proportion of CR *A. baumannii*-infected or -colonized patients in the same ICU ward as statistically significant

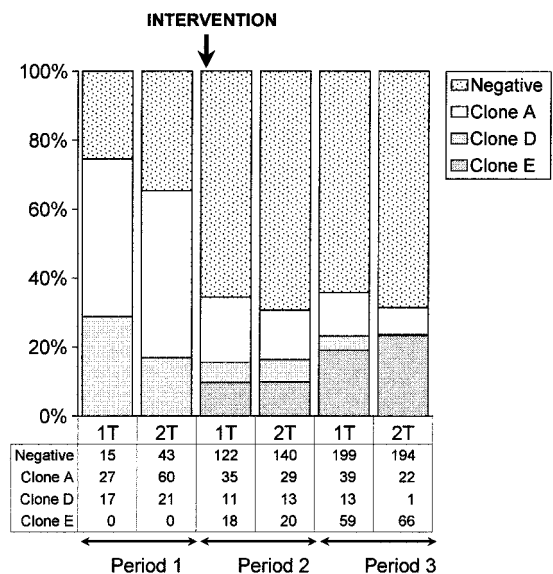


FIG. 4. Temporal trends in environmental contamination with *A. baumannii* clones before and after interventions.

TABLE 5. Temporal trends in incidence of new ICU patients colonized or infected with CR and CS *A. baumannii* strains: differences before and after interventions<sup>a</sup>

Evolution by period	Patients with CR-Ab <sup>d</sup>	Patients with CS-Ab	All patients (CR-Ab and CS-Ab)
Mean $\pm$ SD no. of new cases monthly			
Period 1 (January to June 1997)	6.2 $\pm$ 4.7	12.6 $\pm$ 3.3	18.9 $\pm$ 3.6
Period 2 (July to Dec. 97)	10.2 $\pm$ 5.5	9.4 $\pm$ 5.8	19.7 $\pm$ 10.4
Period 3 (January to June 1998)	7.1 $\pm$ 1.8	3.1 $\pm$ 1.7	10.3 $\pm$ 1.4
Comparison (Z value UMW <sup>b</sup> [P value])			
Period 1 versus period 2	-1.04 (0.29)	-1.28 (0.20)	-0.16 (0.87)
Period 1 versus period 3	-0.16 (0.87)	-2.88 (0.003)	-2.88 (0.003)
Period 2 versus period 3	-0.64 (0.52)	-1.92 (0.054)	-1.12 (0.26)
Global evolution ( $\chi^2$ KW <sup>c</sup> [P value])	1.02 (0.59)	9.31 (0.009)	5.71 (0.057)

<sup>a</sup> Patients were adjusted per every 100 ICU admissions.

<sup>b</sup> Z value UMW, Z value of Mann-Whitney U test.

<sup>c</sup>  $\chi^2$ KW, chi-square Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

<sup>d</sup> Ab, *A. baumannii*.

risk factors with regard to other classical risk factors for nosocomial infections, such as the severity of illness or the previous number of days an invasive device was in place. These results reaffirmed some of our previous observations regarding the epidemiology of *A. baumannii* and demonstrate the important role of horizontal transmission in the acquisition of *A. baumannii* organisms (either CR or CS strains). In such circumstances, exposure to carbapenems may provide a selective advantage for CR *A. baumannii* colonizing clones competing with CS *A. baumannii* clones.

Before the emergence of CR *A. baumannii*, the outbreak was never under control, although measures including strict attention to cleaning procedures and barrier precautions were repeatedly implemented. The urgent need for control of the outbreak increased definitively when our ability to treat *A. baumannii* infections became severely threatened by the spread of carbapenem resistance. With the risk factors mentioned above kept in mind, this spread was attacked by a complex combination of procedures that did not include the topical administration of antibiotics for decontamination of patients. Although selective intestinal decontamination might be considered a reasonable additional measure for control (58), in view of the high rates of fecal carriage observed in *A. baumannii* outbreaks (18, 67), in our ICU setting, several arguments discouraged us from using it during the study. These reasons were the possible exogenous route of the origin of such infections, either from the inanimate environment or from other concomitantly colonized body sites such as the skin, and the extremely narrow range of therapeutic options for our *A. baumannii*-infected patient population. Multiple-antibiotic resistance casts doubt on the real efficacy of digestive decontamination, since many strains were highly resistant to aminoglycosides (a family of antibiotics usually included in decontamination schedules, along with polymyxins). Taking all these factors into account, we believed that there was a true risk not only of failure from the use of monotherapy but also of the emergence of more resistant *A. baumannii* strains.

It is difficult to state whether the subsequent decrease in incidence rates was the consequence of interventions in *Acinetobacter* epidemics, since several confounding factors such as seasonality are known to influence incidence rates (56). In our case, the trend was slowed down and, thereafter, was dramatically reversed during the late summer months, the season in which *Acinetobacter* epidemics tend to rise worldwide. Determination of the relative role of the different interventions applied is problematic, because they concurred in time and

probably interacted with one another. However, we believe that the fact that the proportions of *A. baumannii* isolates were reduced similarly among the CR and CS *A. baumannii* groups (both clinical and environmental) strongly reinforces the roles of adequate compliance with hand-washing procedures, the use of barrier precautions, and cleaning procedures in controlling *A. baumannii* outbreaks. On the other hand, restriction of carbapenem use appeared to be useful in delaying the progres-

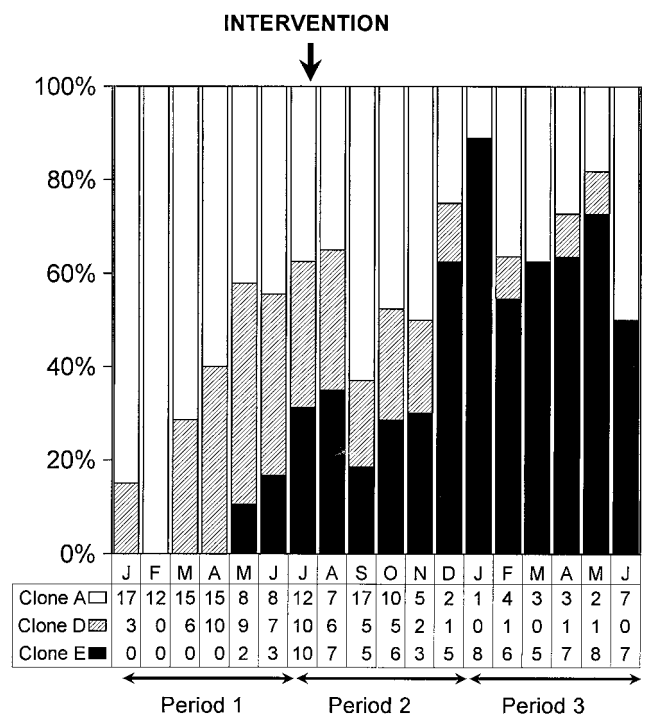


FIG. 5. Temporal trends in clonal spread of carbapenem resistance among *A. baumannii* isolates by using molecular characterization of epidemic and endemic clones. Differences before and after the interventions were analyzed by comparing CR *A. baumannii* (clones D and E) and CS *A. baumannii* (clone A) groups for periods 1, 2, and 3 by using linear trend analysis with proportions. Six levels of exposition were selected per each period; these corresponded to months 1 to 6 for each period compared. Differences reached significant differences when periods 1 and 2 were compared (chi-square for linear trend, 6.14;  $P = 0.013$ ) and periods 1 and 3 were compared (chi-square, 5.38;  $P = 0.02$ ) but not when periods 2 and 3 were compared (chi-square, 1.13;  $P = 0.28$ ).



sive increase in the incidence of CR *A. baumannii* infections or colonizations in relation to the incidence of CS *A. baumannii* infections or colonizations, although carbapenem resistance did not revert to susceptibility after 1 year of restricted use.

Multiresistant, carbapenem-resistant *A. baumannii* outbreaks are now gradually posing a threat to the hospitalized populations in some public tertiary-care hospitals (14, 15, 31, 42, 59, 66). However, only very few of these outbreaks, such as that described by Go et al. (31), were managed from a combined clinical-microbiological point of view (23, 45). In contrast to our results, those investigators achieved not only a progressive decrease in the *A. baumannii* incidence rates but also a complete reversion of carbapenem resistance. It is difficult to assess the extent to which this different response may be due in part to the fact that in the outbreak reported by Go et al. (31) imipenem resistance developed from *A. baumannii* strains belonging to the previous clones responsible for the endemic, while in our case, the carbapenem resistance was due to the acquisition of two new epidemic clones (clones D and E).

Similar to other multiresistant populations, for *A. baumannii* organisms it is difficult to separate resistance from their clinical behavior (29). Prior to the spread of CR *A. baumannii*, the clinical virulence of CS *A. baumannii* had not been well defined, although it was noted to be almost uniformly associated with high crude mortality rates (about 40 to 50%) (6, 14, 25, 62). However, the facts that the isolation of *A. baumannii* from clinical specimens may often reflect colonization rather than significant infection, that most isolates occur in severely ill ICU patients with several underlying diseases, that a large proportion of infections are polymicrobial, and that most infections are usually associated with multiple invasive procedures make controlled investigations extremely difficult. Therefore, in the immediate future, only clinical judgment in the selection of the sort of patients who really need antibiotics and animal models may provide an appropriate basis to assess the role of CR *A. baumannii* in such infections and of antibiotic alternatives in modifying the final outcomes for patients (79).

This study has provided evidence that the fateful trend toward antibiotic resistance in *A. baumannii* may finally include carbapenems, the last recognized antibiotic alternative for most strains isolated worldwide, during large and sustained hospital outbreaks. Management of these emerging organisms is complex and requires a combination of molecular typing techniques and epidemiological studies. High-level and extended environmental contamination, close contact between colonized patients and health care workers, and widespread imipenem use were the main determinant factors that promoted rapid clonal dissemination of CR *A. baumannii* throughout the hospital. Restriction of carbapenem use and, probably more importantly, strict compliance with basic infection control measures may have a strong impact on controlling *A. baumannii* outbreaks, although carbapenem resistance may not be eliminated. In summary, to confront the imminent threat of untreatable *A. baumannii* infections, physicians should sharpen their good clinical judgment when making antibiotic treatment decisions and should strongly ensure strict compliance with basic control measures for the containment of infection. Although controversial, other potential measures, such as the use of selective decontamination programs that prevent patient carriage, may be considered in addition to basic infection control strategies when the "traditional" approach fails to control an outbreak.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the doctors and nurses from the Intensive Care Medicine Service (Hospital de Bellvitge) who provided care for the

patients included in the study, Rafael Abós from the Unitat Clínic-Epidemiològica (Hospital de Bellvitge) for assistance with statistical analysis, Mercedes Sora from the Pharmacy Department (Hospital de Bellvitge) for providing antibiotic consumption data, Isabel García-Arata from the Microbiology Laboratory (Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain) for ribotype analysis, and Amaya Virós for helpful advice in manuscript preparation.

The study was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (grants 96-0674 and 98-0525) from the National Health Service of Spain.

#### REFERENCES

1. Acar, J. F., E. Bergogne-Bérézin, Y. Chabbert, R. Cluzel, P. Courvalin, H. Dabernat, H. Drugeon, J. Duval, J. P. Flandrois, J. Fleurette, F. Goldstein, M. Meyran, C. L. Morel, A. Philippon, J. Sirot, C. J. Soussy, A. Thabaut, and M. Veron. 1992. Statement of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology. *Pathol. Biol.* **40**:741-748.
2. Acar, J. F., and F. W. Goldstein. 1998. Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. *Clin. Infect. Dis.* **27**(Suppl. 1):S125-S130.
3. Afzal-Shah, M., and D. M. Livermore. 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:576-577.
4. Archibald, L., L. Phillips, D. Monnet, J. E. McGowan, Jr., F. Tenover, and R. Gaynes. 1997. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* **24**:211-215.
5. Ayats, J., X. Corbella, C. Ardanuy, M. A. Dominguez, A. Ricart, J. Liñares, J. Ariza, and R. Martín. 1997. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *J. Hosp. Infect.* **37**:287-295.
6. Beck-Sague, C. M., W. R. Jarvis, J. H. Brook, D. H. Culver, A. Potts, E. Gay, B. W. Shotts, B. Hill, R. L. Anderson, and M. P. Weinstein. 1990. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am. J. Epidemiol.* **132**:723-733.
7. Bergogne-Bérézin, E., and K. J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:148-165.
8. Bergogne-Bérézin, E., and M. L. Joly-Guillou. 1991. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* **18**(Suppl. A): 250-255.
9. Bou, G., G. Cervero, M. A. Dominguez, C. Quereda, and J. Martínez-Beltrán. 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3299-3305.
10. Brown, S., C. Bantar, H. K. Young, and S. G. B. Amyes. 1997. Limitation of *Acinetobacter baumannii* treatment by plasmid-mediated carbapenemase. *ARI 2. Lancet* **351**:186-187.
11. Buisson, Y., G. Tran van Nhieu, L. Ginot, P. Bouvet, H. Schill, L. Driot, and M. Meyran. 1990. Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation with amikacin usage. *J. Hosp. Infect.* **15**:83-93.
12. Catchpole, C. R., J. M. Andrews, N. Brenwald, and R. Wise. 1997. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:255-260.
13. Cefai, C., J. Richards, F. K. Gould, and P. McPeake. 1990. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection ventilatory equipment. *J. Hosp. Infect.* **15**:177-182.
14. Cisneros, J. M., M. J. Reyes, J. Pachón, B. Becerril, F. J. Caballero, J. L. García-Garmendia, C. Ortiz, and A. R. Cobacho. 1996. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin. Infect. Dis.* **22**:1026-1032.
15. Clark, R. B. 1996. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:245-251.
16. Cohen, M. L. 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* **257**:1050-1055.
17. Contant, J., E. Kemeny, C. Oxley, E. Perry, and G. Garber. 1990. Investigation of an outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* infections in an adult intensive care unit. *Am. J. Infect. Control* **18**:288-291.
18. Corbella, X., M. Pujol, J. Ayats, M. Sendra, C. Ardanuy, M. A. Dominguez, J. Liñares, J. Ariza, and F. Gudiol. 1996. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **23**:329-334.
19. Corbella, X., J. Ariza, C. Ardanuy, M. Vuelta, F. Tubau, M. Sora, M. Pujol, and F. Gudiol. 1998. Efficacy of sulbactam alone and in association with ampicillin in nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:793-802.
20. Corbella, X., M. Pujol, M. J. Argerich, J. Ayats, M. Sendra, C. Peña, and J. Ariza. 1999. Environmental sampling of *Acinetobacter baumannii*: moist-



- ened swabs versus moistened sterile gauze pads. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**:458–460.
21. **Crombach, W. H. J., L. Dijkshoorn, M. van Noort-Klaassen, J. Niessen, and G. van Knippenberg-Gordebeke.** 1989. Control of an epidemic spread of a multi-resistant strain of *Acinetobacter calcoaceticus* in a hospital. *Intensive Care Med.* **15**:166–170.
  22. **Da Silva, G. J., G. J. Leitao, and L. Peixe.** 1999. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2109–2010.
  23. **Dijkshoorn, L., H. M. Auckan, 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.
  24. **Dijkshoorn, L.** 1996. *Acinetobacter*—microbiology, p. 37–69. In E. Bergogne-Bérézin, M. L. Joly-Guillou, and K. J. Towner (ed.), *Acinetobacter: microbiology, epidemiology, infections, management*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
  25. **Fagon, J. Y., J. Chastre, Y. Domart, J. L. Trouillet, and C. Gibert.** 1996. 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.* **23**:538–542.
  26. **French, G. L., M. W. Casewell, A. J. Roncoroni, S. Knight, and I. Phillips.** 1980. A hospital outbreak of antibiotic resistant *Acinetobacter anitratus*: epidemiology and control. *J. Hosp. Infect.* **1**:125–131.
  27. **Garcia-Arata, M. L., P. Gerner-Smidt, F. Baquero, and A. Ibrahim.** 1997. PCR-amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res. Microbiol.* **148**:777–784.
  28. **Garner, J. S., W. R. Jarvis, T. C. Emori, T. C. Horan, and J. M. Hughes.** 1988. CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control* **16**:128–140.
  29. **Gerner-Smidt, P.** 1987. Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **10**:265–272.
  30. **Getchell-White, S. L., L. G. Donowitz, and D. H. Groschel.** 1989. The inpatient environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**:402–406.
  31. **Go, E. S., C. Urban, J. Burns, B. Kreiswirth, W. Eisner, N. Mariano, K. Mosinka-Snipas, and J. J. Rahal.** 1994. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* **344**:1329–1332.
  32. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670–1673.
  33. **Jacoby, G. A., and G. L. Archer.** 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N. Engl. J. Med.* **324**:601–612.
  34. **Jiménez-Mejías, M. E., J. Pachón, B. Becerril, J. Palomino-Nicás, A. Rodríguez-Cobacho, and M. Revuelta.** 1997. Treatment of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin. Infect. Dis.* **24**:932–935.
  35. **Joly-Guillou, M. L., D. Decre, J. L. Herrman, E. Bourdelier, and E. Bergogne-Berezin.** 1995. Bactericidal in-vitro activity of  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors, alone or associated, against clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: effect of combination with aminoglycosides. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:619–629.
  36. **Jones, R. N., and M. N. Dudley.** 1997. Microbiologic and pharmacodynamic principals applied to the antimicrobial susceptibility testing of ampicillin/sulbactam: analysis of the correlations between in vitro test results and clinical response. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:5–18.
  37. **Kucers, A., S. Crowe, M. L. Graysson, and J. Hoy.** 1997. Polymyxins, p. 667–675. In A. Kucers, S. Crowe, M. L. Graysson, and J. Hoy (ed.), *The use of antibiotics. A comprehensive review with clinical emphasis*, 5th ed. William Heinemann Medical Books, Oxford, United Kingdom.
  38. **Lambert, T. G., G. Gerbaud, P. Bouvet, J. F. Vieu, and P. Courvalin.** 1990. Dissemination of amikacin resistance gene *aphA6* in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1244–1248.
  39. **Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157–161.
  40. **Le Gall, J. R., P. Loirat, A. Alperovich, P. Glaser, C. Granthil, D. Mathieu, P. Mercier, R. Thomas, and D. Villers.** 1984. A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit. Care Med.* **12**:975–977.
  41. **Lortholary, O., J. Y. Fagon, A. Buu-Hoi, M. A. Slama, J. Pierre, P. Giralt, R. Rosenzweig, L. Gutmann, M. Safar, and J. Acar.** 1995. Nosocomial acquisition of multiresistant A. baumannii: risk factors and prognosis. *Clin. Infect. Dis.* **20**:790–796.
  42. **Lyytikäinen, O., S. Koljaig, M. Harma, and J. Vuopio-Varkila.** 1995. Outbreak caused by two multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: emergence of resistance to imipenem. *J. Hosp. Infect.* **31**:41–54.
  43. **Maslow, J. N., A. M. Slutsky, and R. D. Arbeit.** 1993. Application of pulsed-field electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563–571. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  44. **McCabe, W. R., and G. G. Jackson.** 1962. Gram negative bacteremia. *Am. J. Med.* **110**:847–855.
  45. **McDonald, L. C., and W. R. Jarvis.** 1998. Linking antimicrobial use to nosocomial infections: the role of a combined laboratory-epidemiology approach. *Ann. Intern. Med.* **129**:245–247.
  46. **Moellering, R. C., Jr.** 1992. Emergence of enterococcus as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **14**:1173–1178.
  47. **Mulin, B., D. Talon, J. F. Viel, C. Vicent, R. Leprat, M. Thouverez, and Y. Michel-Briand.** 1995. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:569–576.
  48. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:46–65.
  49. **Musa, E. K., N. Desai, and M. W. Casewell.** 1990. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J. Hosp. Infect.* **15**:219–227.
  50. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. NCCLS document M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
  51. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1999. Performance for antimicrobial susceptibility testing: 9th informational supplement. NCCLS document M100–S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
  52. **Neu, H. C.** 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064–1073.
  53. **Paton, R. H., S. Miles, J. Hood, and S. G. B. Amyes.** 1993. ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2**:81–88.
  54. **Peacock, J. E., Jr., F. J. Marsik, and R. P. Wenzel.** 1980. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction and spread within a hospital. *Ann. Intern. Med.* **93**:526–532.
  55. **Quinn, J. P.** 1998. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram-negative pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **27**(Suppl.1):S117–S124.
  56. **Retailiau, H. F., A. W. Hightower, R. E. Dixon, and J. R. Allen.** 1979. *Acinetobacter calcoaceticus*: a nosocomial pathogen with an unusual seasonal pattern. *J. Infect. Dis.* **139**:371–375.
  57. **Sakata, H., K. Fujita, S. Maruyama, H. Kakehashi, Y. Mori, and H. Yoshioka.** 1989. *Acinetobacter calcoaceticus* biovar. *anitratus* septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. *J. Hosp. Infect.* **14**:15–22.
  58. **Sanchez, M., J. A. Cambroner, J. Lopez, E. Cerda, J. Rubio, M. A. Gomez, A. Nuñez, S. Rogero, J. J. Oñoro, and J. A. Sacristan.** 1998. Effectiveness and cost of selective decontamination of the digestive tract in critically ill intubated patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**:908–916.
  59. **Scaife, W., H. K. Young, R. Paton, and S. G. B. Amyes.** 1995. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:585–587.
  60. **Seifert, H., B. Boullion, A. Schulze, and G. Pulverer.** 1994. Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **15**:520–528.
  61. **Seifert, H., and P. Gerner-Smidt.** 1995. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1402–1407.
  62. **Seifert, H., A. Strate, and G. Pulverer.** 1995. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* **74**:340–349.
  63. **Sherertz, R. J., and M. L. Sullivan.** 1985. An outbreak of infection in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J. Infect. Dis.* **151**:252–258.
  64. **Silvestri, L., C. Monti Bragadin, M. Milanese, D. Gregori, C. Consales, A. Gullo, and H. K. F. Van Saene.** 1999. Are most ICU infections really nosocomial? A prospective observational cohort study in mechanically ventilated patients. *J. Hosp. Infect.* **42**:125–133.
  65. **Soussy, C. J., R. Cluzel, P. Courvalin, and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** 1994. Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:238–246.
  66. **Tankovic, J., P. Legrand, G. de Gatines, V. Chemineau, C. Brun-Buisson, and J. Duval.** 1994. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2677–2681.
  67. **Timsit, J. F., V. Garrait, B. Misset, F. W. Goldstein, B. Renaud, and J. Carlet.** 1993. The digestive tract is a major site for *Acinetobacter baumannii* colonization in intensive care unit patients. *J. Infect. Dis.* **168**:1336–1337.
  68. **Tomasz, A.** 1994. Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *N. Engl. J. Med.* **330**:1247–1251.
  69. **Urban, C., E. Go, N. Mariano, B. J. Berger, I. Avraham, D. Rubin, and J. J. Rahal.** 1993. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratus*. *J. Infect. Dis.* **167**:448–451.

70. Vila, J., M. Amela, and M. T. Jimenez de Anta. 1989. Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1086–1089.
71. Vila, J., M. A. Marcos, and M. T. Jimenez de Anta. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* **44**:482–489.
72. Vila, J., M. Navia, J. Ruiz, and C. Casal. 1997. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding a OXA-derived  $\beta$ -lactamase in *A. baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2757–2759.
73. Vila, J., J. Ruiz, M. Navia, B. Becerril, I. Garcia, S. Perea, I. Lopez-Hernandez, I. Alamo, F. Ballester, A. M. Planes, J. Martinez-Beltran, and M. T. Jimenez de Anta. 1999. Spread of amikacin resistance in *A. baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J. Clin. Microbiol.* **37**:758–761.
74. Viladrich, P. F., X. Corbella, L. Corral, F. Tubau, and A. Mateu. 1999. Successful treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis with intraventricular colistin sulphomethate sodium. *Clin. Infect. Dis.* **28**:916–917.
75. Villers, D., E. Espaze, M. Coste-Burel, F. Giauffret, E. Ninin, F. Nicolas, and H. Richet. 1998. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann. Intern. Med.* **129**:182–189.
76. Weernink, A., W. P. J. Severin, I. Tjernberg, and L. Dijkshoorn. 1995. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J. Hosp. Infect.* **29**:189–199.
77. Wendt, C., B. Dietze, E. Dietz, and H. Ruden. 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1394–1397.
78. Wenzel, R. P., and M. B. Edmon. 1998. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. *Clin. Infect. Dis.* **27**:245–251.
79. 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.
80. Wood, C. A., and A. C. Reboli. 1993. Infections caused by imipenem-resistant *A. calcoaceticus* biotype *anitratus*. *J. Infect. Dis.* **168**:1602–1603.

## Efficacy of Colistin versus $\beta$ -Lactams, Aminoglycosides, and Rifampin as Monotherapy in a Mouse Model of Pneumonia Caused by Multiresistant *Acinetobacter baumannii*

A. Montero,<sup>1\*</sup> J. Ariza,<sup>1</sup> X. Corbella,<sup>1</sup> A. Doménech,<sup>1</sup> C. Cabellos,<sup>1</sup> J. Ayats,<sup>2</sup> F. Tubau,<sup>2</sup> C. Ardanuy,<sup>2†</sup> and F. Gudiol<sup>1</sup>

Laboratory of Experimental Infection, Infectious Disease Service,<sup>1</sup> and Microbiology Department,<sup>2</sup> Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Received 3 December 2001/Returned for modification 2 January 2002/Accepted 7 March 2002

**The treatment of life-threatening infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* has become a serious challenge for physicians worldwide. Often, only colistin shows in general good in vitro activity against these carbapenem-resistant strains, but its antibacterial efficacy in comparison with the antibiotics most used in clinical practice is not well known. We studied the efficacy of colistin versus those of imipenem, sulbactam, tobramycin, and rifampin in an experimental pneumonia model with immunocompetent mice. We used three strains of *A. baumannii* corresponding to the main clones (A, D, and E) involved in the outbreaks of our hospital, with different grades of resistance to imipenem (imipenem MICs of 1, 8, and 512  $\mu\text{g/ml}$ , respectively) and to the other antibiotics. The MIC of colistin was 0.5  $\mu\text{g/ml}$  for the three strains. Reduction of  $\log_{10}$  CFU/g in lung bacterial counts, clearance of bacteremia, and survival versus results with controls were used as parameters of efficacy. Imipenem and sulbactam ( $\Delta$ lung counts:  $-5.38$  and  $-4.64 \log_{10}$  CFU/ml) showed the highest level of bactericidal efficacy in infections by susceptible and even intermediate strains. Tobramycin and rifampin ( $-4.16$  and  $-5.15 \log_{10}$  CFU/ml) provided good results against intermediate or moderately resistant strains, in agreement with killing curves and pharmacodynamics. On the contrary, colistin showed the weakest antibacterial effect among the antibiotics tested, both in killing curves and in the in vivo model ( $-2.39 \log_{10}$  CFU/ml;  $P < 0.05$ ). We conclude that colistin did not appear as a good option for treatment of patients with pneumonia due to carbapenem-resistant *A. baumannii* strains. Other alternatives, including combinations with rifampin, may offer better therapeutic profiles and thus should be studied.**

Over the last 15 years, *Acinetobacter baumannii* has emerged as an important nosocomial pathogen, and hospital outbreaks caused by this organism have increased worldwide (3, 4, 15, 16, 19, 28, 31). Its extraordinary ability to acquire resistance to almost all groups of commercially available antibiotics presents a clinical problem of great concern. In fact, most *A. baumannii* strains isolated in hospitals today are highly resistant to modern noncarbapenem  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones (2, 15, 17, 38, 39, 43). Imipenem used to be considered the “gold standard” therapy for severe infections (39, 44), but many countries have reported growing resistance to carbapenems (1, 5, 14, 23, 28, 30, 31, 41, 42).

Since 1992, our hospital has suffered from sustained large outbreaks of multiresistant (resistant to two or more groups of antibiotics) *A. baumannii* infections. In 1997, intermediate and high-grade carbapenem-resistant isolates appeared, posing a serious challenge to the treatment of life-threatening infections due to these multiresistant microorganisms. Currently, only colistin shows in vitro activity against the majority of *A. baumannii* strains in our hospital (MIC, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and according to some reports of other authors (7, 17, 28, 38). Although we achieved good results using local intrathecal colistin for

treatment of catheter-associated ventriculitis (13) and successful intravenous therapy has also been reported in a case of meningitis (20) and in a variety of nosocomial infections (27), clinical experience with colistin is still limited (6, 11), and relatively little is known of its efficacy in treating severe infections, especially in comparison with other antibiotics. Furthermore, very few experimental studies using colistin in animal models in protection tests using *Pseudomonas aeruginosa* have been published (9, 35).

Pneumonia is the most serious nosocomial infection due to multiresistant *A. baumannii* (7, 12, 16). Effective mouse models of pneumonia due to this microorganism have been described (21, 22, 36). For these reasons we decided to study this infection using the clinical strains responsible for the current outbreaks in our hospital. Our aim was to compare the efficacy of colistin with that of  $\beta$ -lactams (imipenem and sulbactam), an aminoglycoside (tobramycin), and rifampin using a mouse model of experimental pneumonia due to strains of *A. baumannii* which were susceptible, intermediate, and highly resistant to  $\beta$ -lactams, intermediate and highly resistant to tobramycin, and resistant to rifampin.

(This work was presented in part at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Ill., December 2001 [abstr. 998]).

### MATERIALS AND METHODS

**Challenge microorganisms.** We selected three multiresistant strains of *A. baumannii* (A, D, and E), uniformly susceptible to colistin but with various

\* Corresponding author. Mailing address: N S Desamparados, 68 Ent. 1<sup>a</sup>, 08903 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Phone: 34 93 260 7625. Fax: 34 93 260 7637. E-mail: amontero@bell.uib.es.

† Present address: Hospital Universitari Joan XXIII, 43007 Tarragona, Spain.

TABLE 1. MICs and MBCs for strains of *Acinetobacter baumannii* used in the model<sup>a</sup>

Antibiotic	MIC/MBC ( $\mu\text{g/ml}$ ) for:		
	Strain A (Ipm <sup>s</sup> )	Strain D (Ipm <sup>i</sup> )	Strain E (Ipm <sup>r</sup> )
Imipenem	1/1	8/16	512/512
Sulbactam	2/64	4/64	128/>128
Tobramycin	128/256	8/32	8/32
Rifampin	8/8	8/8	8/8
Colistin	0.5/0.5	0.5/1	0.5/2

<sup>a</sup> Ipm<sup>s</sup>, imipenem susceptible; Ipm<sup>i</sup>, imipenem intermediate resistant; Ipm<sup>r</sup>, imipenem resistant. Ticarcillin, piperacillin, gentamicin, and amikacin showed MICs of  $>256 \mu\text{g/ml}$  for all the strains. Ceftazidime, cefepime, and ciprofloxacin showed MICs of  $>32 \mu\text{g/ml}$ . For tetracycline, MICs were  $>8 \mu\text{g/ml}$  for all the strains. MIC interpretative standards of resistance ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtained from NCCLS (34) were as follows: piperacillin,  $\geq 128$ ; ticarcillin,  $\geq 128$ ; sulbactam,  $\geq 16$  (in combination with ampicillin); ceftazidime,  $\geq 32$ ; cefepime,  $\geq 32$ ; imipenem,  $\geq 16$ ; gentamicin,  $\geq 16$ ; amikacin,  $\geq 64$ ; tobramycin,  $\geq 16$ ; tetracycline,  $\geq 16$ ; ciprofloxacin,  $\geq 4$ . There are no data about rifampin for infections by gram-negative bacteria; this is the reason we used the same standard as for *Staphylococcus aureus*,  $\geq 4$ . In the case of polymyxins, the NCCLS does not provide data of sensitivity (11); we used the concentration of  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  to define resistance (6).

degree of susceptibility to carbapenems and other antibiotics. Strains corresponded to the three major clones, named A, D, and E, responsible for the outbreak noted in our hospital (7).

**Determination of MICs and MBCs.** The MICs and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of different antibiotics were determined by the standard macrodilution method in Mueller-Hinton broth by geometric twofold serial dilutions (32, 33). The cutoff concentrations are showed in Table 1 according to NCCLS standards (34).

**Time-kill curves.** In vitro bactericidal activity was also evaluated with time-kill curves by determining the killing rate for a bacterial isolate by an antimicrobial agent. Aliquots of *A. baumannii* strains used in the experimental study were unfrozen and cultured in tubes containing brain heart infusion, the bacterial inoculum at an approximate size of  $10^5$  CFU/ml, and the antibiotics to be tested at chosen concentrations of 0.25 MIC, 0.5 MIC, 1 $\times$  MIC, and 2 $\times$  MIC according to strain. For colistin, we also used 4 $\times$ , 8 $\times$ , 16 $\times$ , and 32 $\times$  MIC. One tube without antibiotic was used as a growth control in all the experiments. At 0, 6, and 24 h of incubation at 37°C, aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were obtained from each tube and 10-fold dilutions were made and cultured in Trypticase soy agar (TSA) plates for 24 h at 37°C to obtain quantitative results. Bactericidal activity, defined as 99.9% killing of the final inoculum, was determined from time-kill curves by noting the presence or absence of a 3-log<sub>10</sub> decrease in CFU/ml (32).

**Preparation of inoculum.** Aliquots of the three strains of *A. baumannii* selected for the model were performed and frozen with milk at  $-80^\circ$  until use. For the preparation of inoculum, one aliquot of the selected strain was thawed at ambient temperature and cultured in TSA with 5% sheep blood plates at 37°C for 24 h. Once grown, three or four colonies were resuspended in a tube with Trypticase soy broth (TSB) and incubated in a continuous shaking bath until reaching the exponential growth phase after approximately 4 h. Finally, the tubes were centrifuged and the deposit was reconstituted with sterile saline serum (sodium chloride, 0.9%) until it achieved 1 McFarland turbidity measured by spectrophotometry, equivalent to a concentration of  $5 \times 10^8$  CFU/ml.

**Drugs used.** The anesthetics used in the model, ketamin and xylazin, were supplied by Parke-Davis (Morris Plains, N.J.) and Bayer AG (Leverkusen, Germany), respectively. All antibiotics used were obtained from laboratory standard powders and diluted in sterile saline serum immediately prior to administration. We used imipenem (Merck Sharp & Dohme, Madrid, Spain), sulbactam (Pfizer, Madrid, Spain), tobramycin (Braun, Barcelona, Spain), rifampin (Aventis, Barcelona, Spain), and colistin (Pharmax Limited, Bexley, United Kingdom). Colistin was used in the form of methanesulfonate in all in vitro and in vivo experiments because it is the unique form that can be given to humans (27, 29).

**Animal experiments.** (i) **Mice.** Immunocompetent specific-pathogen-free C57BL/6N young female mice, weighing 14 to 16 g, were used. They were supplied by Harlan (Gannat, France). Animals were quarantined for 1 week immediately after reception. They were given standard laboratory food and water ad libitum. After induction of pneumonia, infected mice were isolated in a biologic storage chamber with light controlled in 12-h day-night periods and with room air purified by HEPA filters. Treated and control animals were kept in

separate cages. The study was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona (Bellvitge Campus).

(ii) **Pneumonia model.** We used the model described by Esposito and Pennington (10), modified by Rodríguez-Hernández et al. (36). After the quarantine period, animals were anesthetized with a mixture of 100 mg of ketamin/kg of body weight and 10 mg of xylazin/kg administered intraperitoneally. When animals were completely asleep and in a vertical position, the trachea was cannulated via the mouth with a blunt needle. The correct location was indicated by palpation of the epiglottis with the tip. A 50% mixture of a bacterial suspension containing  $5 \times 10^8$  CFU/ml and porcine mucin (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) diluted to 10%, to enhance the virulence of bacteria (35, 36), was prepared, and finally 50  $\mu\text{l}$  was instilled with a microliter syringe (80601; Hamilton Co., Reno, Nev.).

Mice remained suspended in a vertical position for 4 min and then in a 30° decubitus position until awake. Individualized experiments were performed to test each antibiotic and each *A. baumannii* strain. In each experiment, 14 infected animals were randomized to two groups: the control group ( $n = 6$ ) and the treatment group ( $n = 8$ ). Therapy was initiated 4 h after induction of the pneumonia when histological features of pneumonia had started to appear (36). All antibiotics and the placebo were administered intraperitoneally. Total daily doses of imipenem, sulbactam, tobramycin, and colistin were divided in four doses and administered every 6 h, except for rifampin, which was administered in a once-daily dose regimen. Treatment or placebo was continued until 44 h after inoculation. At 24 and 48 h after inoculation, four treated animals and three control animals were killed. Thoracotomies were performed, and lungs were removed, weighed, and finally processed for quantitative cultures by manual homogenization in 1 ml of sterile saline serum. Tenfold dilutions were performed, and aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were plated on TSA with 5% sheep blood plates for 24 h at 37°C. Once grown, colonies were counted in each dilution and each animal. Results of cultures were expressed as log<sub>10</sub> of CFU per gram of lung. The lower limit of detection was 1.5 log CFU/g. The mean counts  $\pm$  the standard deviation of the log<sub>10</sub> CFU/g were obtained for the treated and control groups at 24 and 48 h after induction of pneumonia, and the difference between the two groups was calculated ( $\Delta\text{logs} = \text{mean}_{\text{treated group}} - \text{mean}_{\text{control group}}$ ). A minimum sample of 100  $\mu\text{l}$  of blood was collected by cardiac puncture immediately after death and cultured in Trypticase soy broth for 24 h at 37°C. Then, 100  $\mu\text{l}$  was plated on TSA sheep blood agar plates and incubated for another 24 h at 37°C to identify bacterial growth. Results of blood cultures were qualitative and were expressed as positive or negative.

To evaluate the therapeutic efficacy in each experiment, we compared the lung bacterial counts and the percentages of bacteremia and mortality in the group of treated mice with those of the control group.

**Pharmacokinetics.** Prior to the pneumonia experiments, the pharmacokinetics of each antibiotic were determined. One single individualized weight-adjusted dose of antibiotics was administered intraperitoneally to a group of 21 healthy animals. In sets of three animals and at different time points after administration of antibiotic, blood was obtained from anesthetized mice from an incision in the periorbital plexus and was centrifuged; finally, the serum was separated. Levels of imipenem and colistin in serum were determined immediately after obtaining the specimens. The rest of the samples were immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters were determined by a computer-assisted method. These parameters were the following: (i) the peak drug concentration in serum ( $C_{\text{max}}$ ); (ii) the elimination half-life ( $t_{1/2}$ ); (iii) the area under the concentration-time curve (AUC); (iv) the inhibitory quotient (IQ) ( $\text{IQ} = C_{\text{max}}/\text{MIC}$ ); and (v) the time the serum concentration remained above the MIC ( $\Delta t > \text{MIC}$ ). Finally, based on previous studies (8), single doses of antibiotics administered to mice were selected to achieve serum levels and pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters similar to human ones: imipenem, 50 mg/kg (equivalent to a daily dose of 200 mg/kg); sulbactam, 30 mg/kg (daily dose, 120 mg/kg); rifampin, 25 mg/kg (daily dose, 25 mg/kg); and tobramycin, 15 mg/kg (daily dose, 60 mg/kg). Since no published data are available regarding the most appropriate dose of colistin in mice, we tested the dosage required to achieve levels in serum similar to those obtained with humans at the recommended dosage for treatment in life-threatening infections, that is, 50,000 U/kg/day (24). In humans, after a single intramuscular injection of colistin methanesulfonate in a dose of 31,250 U per kg, a peak serum level of 5 to 7  $\mu\text{g/ml}$  occurs, with a serum half-life of 1.6 to 2.7 h. Repeated administration yields higher serum levels, with concentrations of 11 to 12  $\mu\text{g/ml}$  (24). We finally used the dosage of 125,000 U/kg (daily dose of 500,000 U/kg). In order to exclude some toxicity of colistin in mice, we tested this dosage with a group of 10 uninfected mice and compared survival, weight differences, and activity with those of another group of 5 mice treated with sterile saline serum as a placebo. Since no significant differences in survival or weight were found between the two



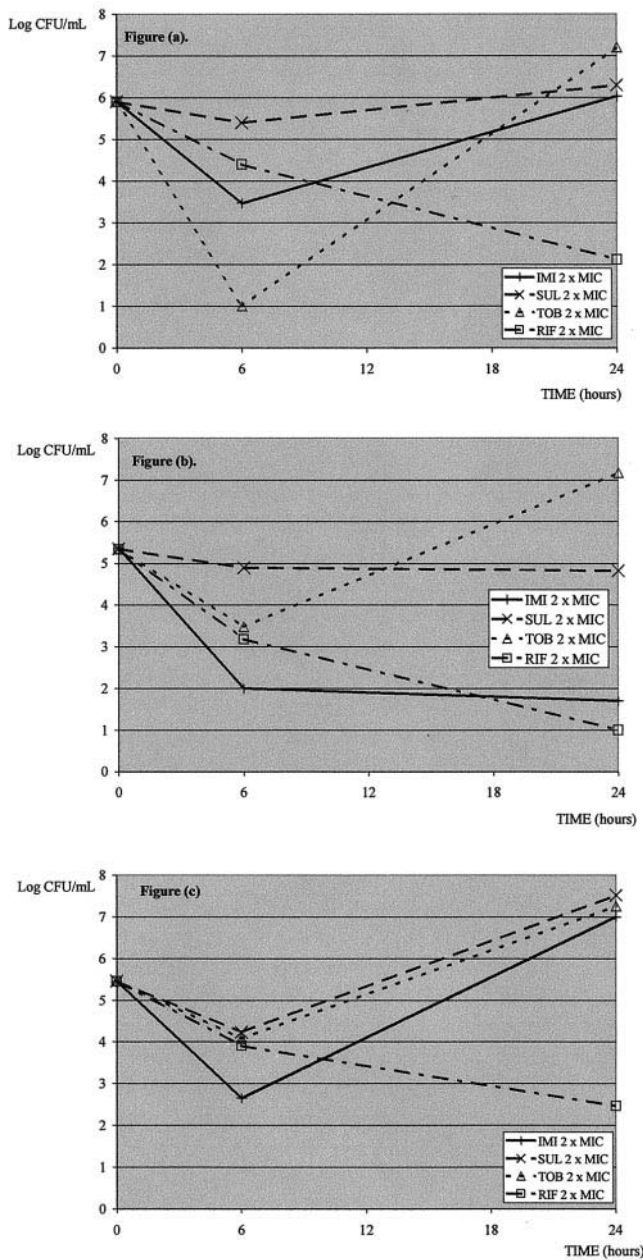


FIG. 1. Killing curves with imipenem (IMI), sulbactam (SUL), tobramycin (TOB), and rifampin (RIF) at 2× MIC for strains A (a), D (b), and E (c) of *A. baumannii*. See Table 1 for MICs of each strain.

groups (data not shown) and no differences in activity were observed, toxicity was excluded.

**Drug assays.** Two different aliquots from each sample were analyzed, each one in duplicate. (i) The imipenem concentration in serum was determined by a bioassay method using *Escherichia coli* ATCC 25922 as the reference standard. (ii) The method for measuring sulbactam concentrations was derived from the technique described by Haginaka (18). Serum concentrations were determined by high-performance liquid chromatography with UV detection at 326 nm. First, proteins were precipitated from the samples with acetonitrile and centrifuged. The supernatant was submitted to a precolumn derivatization with 1,2,4-triazole (2 M, pH 10) (volume 1:1) at ambient temperature for 24 h. Chromatographic separation was performed with an anionic exchange column of amine polyacrylamide (50 by 4.6 mm; IC Pak Anion). The mobile phase was a solution consisting of gluconate-borate buffer (25 ml), glycerin (3 ml), ultrapure Milli-Q water (1,000 ml), and acetonitrile (200 ml). The temperature was 30°, and the flow rate

was 1 ml/min. The calibration curve was linear from 0.887 to 99.997 mg/liter. Variation within replicates was <5%. (iii) Tobramycin was measured by the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method. (iv) Rifampin concentrations were measured by a modification of the technique previously published by Swart and Paggis (40). Proteins were initially precipitated with acetonitrile and centrifuged. Chromatographic separation of the supernatant was performed with a Nova Pak C<sub>18</sub> column (200 by 4.6 mm; Waters) and a solution of 60% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-30% acetonitrile-10% methanol as a mobile phase. The flow rate was 1 ml/min. Determinations of rifampin concentrations were performed by UV detection at 342 nm. We used benzocaine as an internal standard and ascorbic acid as an antioxidant. The calibration curve was linear from 0.07 to 46.6 mg/liter. Variation within replicates was <5%. (v) Colistin concentrations were determined by microdilution using *E. coli* ATCC 25922 as the reference standard.

**Statistical analysis.** All bacterial counts and pharmacokinetic data are presented as mean ± standard deviation. Data of lung bacterial counts were found to be normally distributed in control and treated animals after applying the Kolmogorov-Smirnov test. After that, analysis of variance (ANOVA) and Scheffé's correction test were used to compare lung counts in control animals for each strain. Student's *t* test was used to compare differences between groups in bacterial counts. To compare bacteremia or mortality between groups, two-tailed Fisher's exact test was performed. For all tests, differences were considered statistically significant when *P* values were <0.05.

**RESULTS**

**In vitro studies. (i) MICs and MBCs.** MICs and MBCs of imipenem, sulbactam, tobramycin, rifampin, and colistin for strains A, D, and E are shown in Table 1. These microorganisms were tolerant to sulbactam.

**(ii) Time-kill curves.** At tested concentrations of 2× MIC, imipenem reached a decline of 2.44, 3.36, and 2.8 logs at 6 h for strains A, D, and E, respectively (concentrations of 2, 8, and 1,024 μg/ml). Similarly, tobramycin at 2× MIC (256 μg/ml) reached bactericidal activity at 6 h with strain A. Also, rifampin at 2× MIC (16 μg/ml) at 24 h reached bactericidal activity for all strains (Fig. 1).

At 1× MIC, only rifampin (8 μg/ml) (data not shown) was bactericidal for strains D and E. In contrast, sulbactam and colistin did not show any bactericidal activity even at the maximum concentration used of 2× MIC. Colistin reached bactericidal activity only at 24 h with concentrations of 16× MIC and 32× MIC (Fig. 2) in strains A and E.

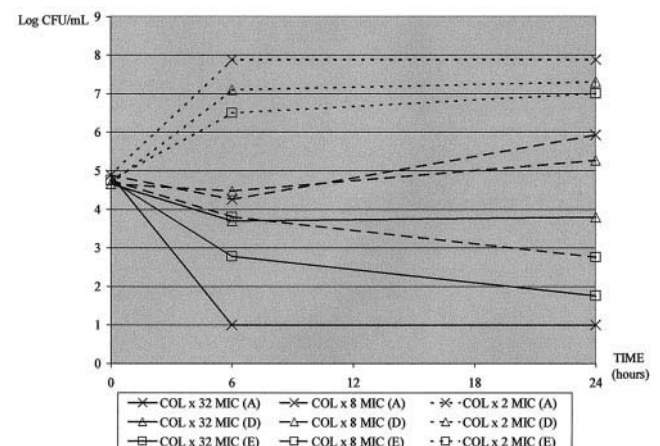


FIG. 2. Killing curves with colistin (COL) at 2×, 8×, and 32× MIC for strains A, D, and E of *A. baumannii*. See Table 1 for MICs of each strain.

TABLE 2. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics used in the experiments

Parameter	Value for drug <sup>a</sup>				
	Imipenem (50 mg/kg)	Sulbactam (30 mg/kg)	Tobramycin (15 mg/kg)	Rifampin (25 mg/kg)	Colistin (125,000 U/kg)
$C_{\max}$ (mg/liter)	37.49 ± 1.37	91.03 ± 0.04	32.87 ± 5.45	24.29 ± 10.26	13.33 ± 4.61
$t_{1/2}$ (h)	0.19	0.18	0.37	5.44	0.52
AUC (mg · h/liter)	11.99	24.57	11.54	196.22	11.96
IQ ( $C_{\max}/MIC$ )					
Strain A	37.49	45.51	0.26	3.03	26.66
Strain D	4.69	22.76	4.11	3.03	26.66
Strain E	0.07	0.71	4.11	3.03	26.66
$t > MIC$ (h)					
Strain A	1.15	1.1	0	9.71	3.05
Strain D	0.58	0.91	0.69	9.71	3.05
Strain E	0	0	0.69	9.71	3.05

<sup>a</sup> Dosage is given in parentheses after drug name.

**(iii) Pharmacokinetics.** Serum pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters obtained are shown in Table 2.  $\Delta t > MICs$  of imipenem and sulbactam were low (below 20% of the interdose time) even for the most susceptible strain (strain A), due to the very short  $t_{1/2}$  shown by these  $\beta$ -lactams in mice: 0.19 and 0.17 h, respectively. The  $C_{\max}$  value of sulbactam was more than twice that of imipenem. In the case of tobramycin, we achieved a high serum peak, which determined a  $C_{\max}/MIC$  ratio (IQ) of  $>4$  for strains D and E with MICs of 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The half-life time of rifampin was very long (5.43 h), showing a very high AUC of 196.224 mg · h/liter and  $\Delta t > MIC$  values of greater than 40% for all strains with intermediate resistance. Colistin showed an IQ of 26.666 and  $\Delta t > MICs$  of more than 50% for all the strains.

**Therapeutic efficacy by strains: Bacterial clearance from lungs and from blood and survival.** Lung bacterial counts for treated and control animals are shown in Table 3. Differences between means for treated and control animals are expressed in Fig. 3. The efficacies of different antibiotics were more evident at 48 h of therapy. In control animals, 100% of mice had positive blood cultures at 24 and 48 h after induction of pneumonia, reflecting the virulence of the infection model. Mortality at 48 h in the control animals of the three strains showed small differences (46.6% [strain A], 60% [strain D], and 53.3% [strain E], respectively), but they did not reach statistical significance. To analyze survival in treated animals,

we compared treated animals with control animals infected with the same strain.

**(i) Strain A.** Imipenem, sulbactam, and rifampin showed significant bactericidal activity in reducing lung bacterial counts compared with controls. Imipenem and sulbactam were the most active. On the other hand, tobramycin was totally ineffective, and colistin demonstrated only moderate activity. The antibiotics that showed some activity in lung bacterial clearance also reduced bacteremia, with imipenem being the most effective: (imipenem, 25% bacteremia; sulbactam, 50%; rifampin, 37.5%; and colistin, 75% [ $P < 0.05$  versus controls]). All mice receiving therapy with imipenem, sulbactam, and rifampin survived. Survival rates with these antibiotics showed a trend towards significance ( $P = 0.06$ ) compared with rates for the control group. Tobramycin and colistin showed some reduction in mortality (25 and 37.5% mortality, respectively, versus 46.6% in controls), but it was not significant.

**(ii) Strain D.** In lung bacterial counts, imipenem, sulbactam, tobramycin, and rifampin showed significant bactericidal activity compared with controls. The activity of imipenem and sulbactam was lower than that obtained with strain A, according to pharmacodynamic findings, but the differences were not statistically significant. Overall, the most effective therapy was imipenem. Again, all antibiotics active in the lung bacterial clearance showed some reduction in the percentage of positive blood cultures: imipenem, 37.5% bacteremia; sulbactam,

TABLE 3. Results of lung bacterial counts<sup>a</sup> of *A. baumannii*

Therapeutic group	Bacterial count (no. of mice) for:					
	Strain A		Strain D		Strain E	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	10.55 ± 0.46 <sup>b</sup> (15)	10.70 ± 0.37 <sup>b</sup> (15)	10.58 ± 0.26 <sup>b</sup> (15)	10.80 ± 0.38 <sup>b</sup> (15)	10.51 ± 0.43 <sup>b</sup> (15)	10.78 ± 0.30 <sup>b</sup> (15)
Imipenem	6.49 ± 0.39 <sup>c</sup> (4)	5.32 ± 0.11 <sup>c,d</sup> (4)	8.72 ± 1.32 <sup>c</sup> (4)	6.32 ± 0.59 <sup>c,d</sup> (4)	10.3 ± 0.98 (4)	11.02 ± 0.2 (4)
Sulbactam	7.89 ± 1.08 <sup>c</sup> (4)	6.06 ± 0.58 <sup>c,d</sup> (4)	8.73 ± 1.07 <sup>c</sup> (4)	7.13 ± 1.95 <sup>c</sup> (4)	10.31 ± 0.2 (4)	10.74 ± 0.20 (4)
Tobramycin	10.69 ± 0.3 (4)	10.72 ± 0.71 (4)	10.37 ± 0.26 (4)	7.35 ± 0.94 <sup>c</sup> (4)	7.88 ± 0.73 <sup>c</sup> (4)	6.62 ± 1.16 <sup>c</sup> (4)
Rifampin	7.77 ± 0.26 <sup>c</sup> (4)	6.89 ± 0.28 <sup>c,e</sup> (4)	8.8 ± 0.5 <sup>c</sup> (4)	7.18 ± 0.29 <sup>c</sup> (4)	7.64 ± 0.45 <sup>c</sup> (4)	5.63 ± 0.26 <sup>c,e</sup> (4)
Colistin	9.68 ± 0.99 <sup>c</sup> (4)	8.64 ± 0.66 <sup>c</sup> (4)	10.61 ± 0.26 (4)	10.4 ± 1.09 (4)	10.41 ± 0.41 (4)	8.39 ± 1.22 <sup>c</sup> (4)

<sup>a</sup> Lung bacterial counts are expressed in  $\log_{10}$  of CFU/gram of lung tissue (mean of counts ± standard deviation).

<sup>b</sup> No significant differences were found between the three strains at 24 and 48 h.

<sup>c</sup> Differences were statistically significant compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

<sup>d</sup> Lung bacterial counts were significantly lower than those obtained with tobramycin, rifampin, and colistin.

<sup>e</sup> Lung bacterial counts were significantly lower than those obtained with colistin.

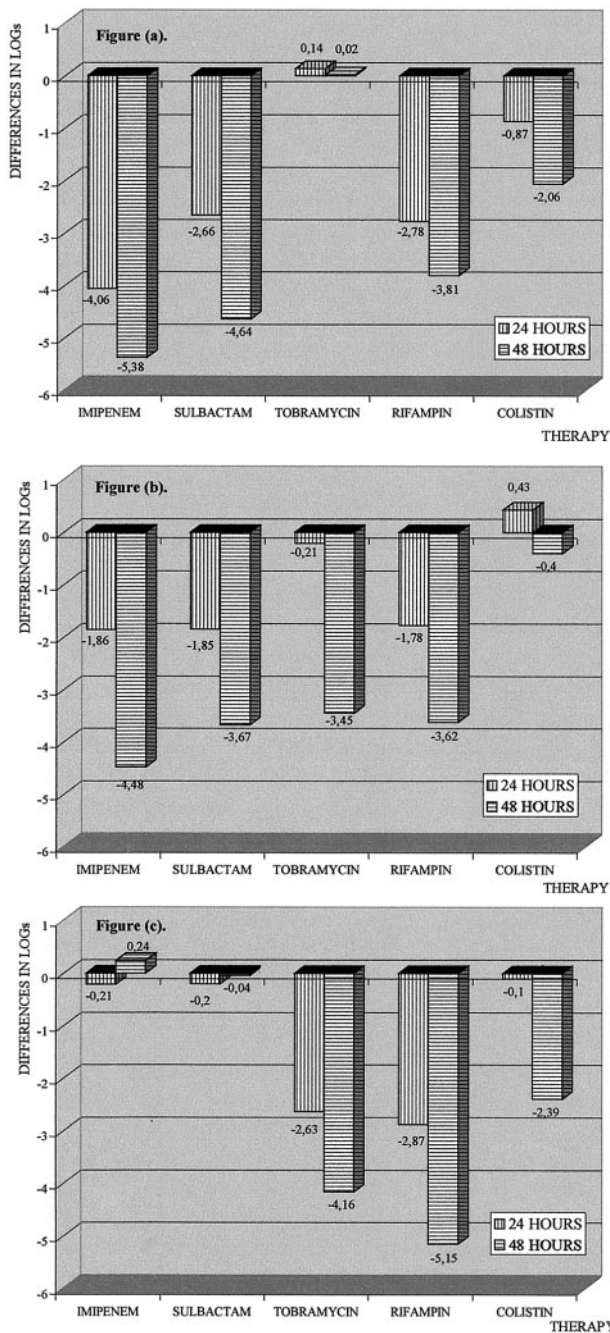


FIG. 3. In vivo therapeutic efficacy: results of lung counts in the pneumonia model for mice expressed as differences in log<sub>10</sub> between the means of the treated and the control groups at 24 and 48 h of therapy by strains A (a), D (b), and E (c) of *A. baumannii*.

62.5%; tobramycin, 37.5%; and rifampin, 50% ( $P < 0.05$  versus controls). All animals in the group with imipenem and that with rifampin survived, and only one in those treated with sulbactam or tobramycin died ( $P < 0.05$  versus controls). Colistin did not show any effect according to lung counts and bacteremia reduction, and although some reduction in mortality was achieved, it was not significant.

(iii) **Strain E.** Imipenem and sulbactam did not reduce lung bacterial counts, and mortality was similar to that with control

animals. Only sulbactam showed low efficacy in reducing bacteremia (87.5%). Tobramycin showed high lung bacterial clearance, as with strain D. Of note was the high bactericidal activity observed with rifampin in reducing the lung bacterial counts, significantly greater than that observed with tobramycin ( $P = 0.06$ ) or colistin ( $P < 0.05$ ). Tobramycin and rifampin were the most effective antibiotics in reducing bacteremia, 25 and 37.5%, respectively ( $P < 0.05$  versus controls); all animals receiving these therapies survived ( $P < 0.05$  versus controls). The behavior of colistin was similar to that observed with strain A, its results being poorer than those of the other effective therapies ( $\Delta$ logs in Fig. 3; 62.5% bacteremia,  $P < 0.05$  versus controls; and 12.5% mortality,  $P = 0.06$  versus controls).

### DISCUSSION

The emergence and further persistence of imipenem resistance among *A. baumannii* strains responsible for the outbreak in our hospital presented a serious therapeutic challenge (7). Our experimental study provides the first information regarding the efficacy of colistin for the treatment of experimental pneumonia due to multiresistant *A. baumannii*. Testing activity against the three major clones in our hospital, which were uniformly susceptible to colistin but presented different degrees of resistance to imipenem, sulbactam, tobramycin and rifampin, allowed us to examine in detail the comparative effects of these antibiotics at the time in order to choose the best alternative for use in clinical practice.

Of the previously described models of *A. baumannii* pneumonia in mice (21, 36), we selected the one described by Rodríguez-Hernández et al., since it does not require immunosuppression to facilitate the development of pneumonia and thus reproduces more faithfully the usual condition of ventilated patients suffering from nosocomial *A. baumannii* pneumonia in ICU wards (7, 12, 16). The mouse model of pneumonia used was reproducible, systematically causing histological findings of pneumonia with bacterial counts of 10 to 11 log<sub>10</sub> CFU/g of lung tissue, 100% bacteremia, and mortality varying between 46 and 66% according to strain. The fact that the results for control animals did not differ significantly between strains meant that the model was suitable for comparing the efficacy of different antibiotics.

Pharmacodynamics in mice and in humans differ (8). Although we obtained standardized and reproducible results using doses which according to previous studies produce pharmacodynamics quite similar to those in humans, some aspects should be noted. In the case of  $\beta$ -lactams, despite the high  $C_{max}$  reached, the  $\Delta t > MICs$  was only 20% of the interdose time due to the short  $t_{1/2}$  of these antibiotics. In contrast, the  $C_{max}$  with tobramycin was higher than usual in humans. The dose we used in this study complied with the idea of using aminoglycosides in monodose in humans, but we repeated the dose in mice every 6 h, which means that the total dose administered was probably larger than estimated. Data for rifampin may be similar to those observed for humans using high doses. The colistin results appeared to be reasonable, but very little published data are available on the pharmacokinetics of the antibiotic.

Overall, the in vivo efficacies of the different antibiotics used were in accordance with the pharmacokinetics and pharmaco-



dynamics obtained in mice. We observed a good correlation between the three parameters used to evaluate clinical efficacy: bacterial clearance from lungs, bacterial clearance from the blood, and survival.

The unexpectedly weak effect shown by colistin was an exception to this observation. On the basis of MICs and MBCs, it might appear that colistin exhibited a good antibacterial activity for all the strains. However, the killing curves showed bactericidal activity only at high concentrations (greater than  $8 \times$  MIC) and only for strains A and E. In the in vivo model, moderate bacterial clearance from lungs and blood and a small reduction in mortality rates were obtained, but, as in the in vitro studies, only in the infections due to strains A and E; no effect was detected against the infection by strain D. Overall, these results were the worst obtained for all the antibiotics used in this study and did not correlate with the good serum pharmacodynamic profile observed. The existent data are very limited, but it does not seem that binding to proteins in serum could interfere with the bactericidal effect of colistin (26). Reasons for these poor results may be the low level of bactericidal activity exhibited by this antibiotic and the fact that pharmacodynamics of colistin in serum may not be a good marker of antibiotic levels in lungs, since it is known that the large size of its molecule may cause poor distribution in tissues (24). The clinical experience with colistin nowadays is very sparse, since polymyxins were not used for many years to treat infections by gram-negative bacteria because other, less toxic antibiotics were available (11). Although it is true that some successful results have been reported, including with patients with cystic fibrosis or central nervous system *A. baumannii* infections (13, 20), other cases did not have a good outcome (27). In fact, our findings are in agreement with the fact that this antibiotic has been classically considered less effective than other groups of antibiotics, such as  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and quinolones.

Imipenem and sulbactam showed high bactericidal efficacy in therapy for pneumonia caused by susceptible and even intermediately resistant strains. These findings are in agreement with those reported in previous studies (21, 37, 45). These effects may even have been underestimated, taking into account the low  $\Delta t >$  MICs achieved by these antibiotics in mice due to its short  $t_{1/2}$ . The pharmacokinetics of the two antibiotics were similar and were more or less equivalent to those obtained in humans using high daily doses (imipenem, 50 mg/kg, and sulbactam, 100 to 150 mg/kg). Surprisingly, the  $C_{max}$  of sulbactam was notably higher, a finding also found in other experimental studies (45). However, as a whole, imipenem demonstrated higher efficacy, even against strains that were intermediately resistant to imipenem and susceptible to sulbactam, although these differences did not reach statistical significance. This result was probably due to the greater in vitro bactericidal activity exhibited by imipenem than sulbactam in killing curves and the postantibiotic effect reported with imipenem in treating *A. baumannii* (8, 21). The pharmacodynamics suggested that these two antibiotics were totally ineffective against pneumonia caused by strain E.

Tobramycin was very effective for treating pneumonia caused by moderately tobramycin-resistant strains such as D and E (MIC, 8  $\mu$ g/ml). However, as we noted above, the pharmacodynamics of tobramycin in this model may well have

been overestimated, since the peak levels achieved are usually not found in humans at the recommended doses. Tobramycin had no effect on pneumonia caused by the highly resistant strain A (MIC, 128  $\mu$ g/ml).

The excellent efficacy of rifampin against infections by strains A, D, and E, which were intermediately resistant to this antibiotic (MIC, 8  $\mu$ g/ml) (33), was unexpected. However, these results were in agreement with the pharmacodynamics, which showed very high AUC and IQ, as well as the bactericidal activity observed in time-kill curves. Similar findings were reported by Jolly-Guillou (45). These pharmacokinetic data may be very similar for humans using doses of 20 mg/kg/day (25). The early development of resistance is well known and limits the use of monotherapy with rifampin. While no resistance developed in this in vivo model after 48 h of therapy, this phenomenon was reported in a previous study (45).

We conclude that this model is well suited to the comparison of antibiotic efficacy against multiresistant *A. baumannii* pneumonia in mice. Though the results of experimental infections require careful interpretation and any extrapolation to humans should be made with great caution, some preliminary conclusions can be drawn regarding antibiotic use in management care of these difficult-to-treat infections. Our results do not favor the use of colistin to treat *A. baumannii* pneumonia, even though in vitro studies using MICs have suggested that it is the most active alternative.  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and rifampin provided better therapeutic margins, including susceptible and intermediately resistant strains: imipenem was the most effective therapy, sulbactam used at high doses may be a secondary alternative to imipenem, and rifampin had very good efficacy against all the strains tested. Although the last drug cannot be recommended as monotherapy because of the development of resistance, it should definitely be considered in combination regimens. Studies of antibiotic combinations are now in progress in our laboratory in the search for better therapeutic alternatives for infections caused by multiresistant, carbapenem-resistant strains such as strain E.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to J. Pachón, M. J. Rodríguez-Hernández, and C. Pichardo, from the Infectious Diseases Service, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain, for their technical assistance in the experimental model; to I. Casals and M. Riera, from the Unit of Chromatography, Serveis Científico-Tècnics, University of Barcelona, for their technical support in HPLC methods; to R. Bernat, from the Pathology Department, Hospital de Bellvitge, for pathological studies of lungs; and to J. M. Ramón, from Hospital de Bellvitge, for his assistance in statistical analysis.

This work was supported by a research grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 98/0525 from Ministerio de Sanidad, Spain. A.M. and A.D. were supported by grants from the Fundació August Pi i Sunyer. This work has been carried out without any financial support from laboratories.

#### REFERENCES

1. Afzal-Shah, M., N. Woodford, and D. M. Livermore. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:583–588.
2. Appleman, M. D., H. Belzberg, D. M. Citron, P. N. R. Heseltine, A. E. Yellin, J. Murray, and T. V. Berne. 2000. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1035–1040.
3. Basustaoglu, A. C., O. Kisa, S. C. Sacilik, M. Ozyurt, and S. T. Yildiran.



2001. Epidemiological characterization of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* isolates from a 1500-bed teaching hospital by phenotypic and genotypic methods. *J. Hosp. Infect.* **47**:246–249.
4. **Bergogne-Berezin, E., and K. J. Towner.** 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:148–165.
  5. **Bou, G., G. Cerveró, M. A. Domínguez, C. Quereda, and J. Martínez-Beltrán.** 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3299–3305.
  6. **Catchpole, C. R., J. M. Andrews, N. Brenwald, and R. Wise.** 1997. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:255–260.
  7. **Corbella, X., A. Montero, M. Pujol, M. A. Domínguez, J. Ayats, M. J. Argerich, F. Garrigosa, J. Ariza, and F. Gudiol.** 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4086–4095.
  8. **Craig, W. A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1–12.
  9. **Davis, S. D.** 1975. Activity of gentamicin, tobramycin, polymixin B, and colistimethate in mouse protection tests with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**:50–53.
  10. **Esposito, A. L., and J. E. Pennington.** 1983. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**:662–667.
  11. **Evans, M. E., D. J. Feola, and R. P. Rapp.** 1999. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Ann. Pharmacother.* **33**:960–967.
  12. **Fagon, J. Y., J. Chastre, A. J. Allan, P. Montravers, A. Novara, and C. Gibert.** 1993. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am. J. Med.* **94**:281–288.
  13. **Fernández-Viladrich, P., X. Corbella, L. Corral, F. Tubau, and A. Mateu.** 1999. Successful treatment of ventriculitis due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with intraventricular colistin sulfomethate sodium. *Clin. Infect. Dis.* **28**:916–917.
  14. **Fierobe, L., J. C. Lucet, D. Decre, C. Muller-Serieys, A. Deleuze, M. L. Joly-Guillou, J. Mantz, and J. M. Desmouts.** 2001. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **22**:35–40.
  15. **Fluit, A. C., M. E. Jones, F. J. Schmitz, J. Acar, R. Gupta, J. Verhoef, and The SENTRY Participants Group.** 2000. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clin. Infect. Dis.* **30**:454–460.
  16. **Forster, D. H., and F. D. Daschner.** 1998. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:73–77.
  17. **Go, E. S., C. Urban, J. Burns, B. Kreiswirth, W. Eisner, N. Mariano, K. Mosinka-Snipas, and J. J. Rahal.** 1994. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* **344**:1329–1332.
  18. **Haginaka, J., J. Wakai, H. Yasuda, T. Uno, and T. Nakagawa.** 1985. High-performance liquid chromatographic assay of sulbactam using pre-column reaction with 1,2,4-triazole. *J. Chromatogr.* **341**:115–122.
  19. **Hospital Infections Program, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention.** 1996. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report, data summary from October 1986–April 1996, issued May 1996. *Am. J. Infect. Control* **24**:380–388.
  20. **Jiménez-Mejías, M. E., B. Becerril, F. J. Márquez-Rivas, C. Pichardo, L. Cuberos, and J. Pachón.** 2000. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with intravenous colistin sulfomethate sodium. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:970–971.
  21. **Joly-Guillou, M. L., M. Wolff, J. J. Pocidallo, F. Walker, and C. Carbon.** 1997. Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:345–351.
  22. **Joly-Guillou, M. L., M. Wolff, R. Farinotti, A. Bryskier, and C. Carbon.** 2000. In vivo activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:827–830.
  23. **Jones, M. E., C. Thornberry, D. M. Livermore, and D. F. Sahn.** 1999. Prevalence of *Acinetobacter* spp. isolates with reduced susceptibility to imipenem, as determined by a USA-wide electronic surveillance network. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:429–431.
  24. **Kucers, A., S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy.** 1997. Polymyxins, p. 667–675. In A. Kucers, S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy (ed.), *The use of antibiotics. A clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs*, 5th ed. Butterworth, Heinemann, Oxford, United Kingdom.
  25. **Kucers, A., S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy.** 1997. Rifampicin (rifampin), p. 676–708. In A. Kucers, S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy (ed.), *The use of antibiotics. A clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs*, 5th ed. Butterworth, Heinemann, Oxford, United Kingdom.
  26. **Kunin, C. M., and A. Bugg.** 1971. Binding of polymyxin antibiotics to tissues: the major determinant of distribution and persistence in the body. *J. Infect. Dis.* **124**:394–400.
  27. **Levin, A. S., A. A. Barone, J. Penco, M. V. Santos, I. S. Marinho, E. A. Arruda, E. I. Manrique, and S. F. Costa.** 1999. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **28**:1008–1011.
  28. **Levin, A. S. S., C. M. F. Mendes, S. I. Sinto, H. S. Sader, C. R. M. Scarpitta, E. Rodrigues, N. Sauaia, and M. Boulos.** 1996. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **17**:366–368.
  29. **Li, J., J. Turnidge, R. Milne, R. L. Nation, and K. Coulthard.** 2001. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:781–785.
  30. **Lyytikäinen, O., S. Kõljalg, M. Härmä, J. Vuopio-Varvika.** 1995. Outbreak caused by two multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: emergence of resistance to imipenem. *J. Hosp. Infect.* **31**:41–54.
  31. **Manikal, V. M., D. Landman, G. Saurina, E. Oydna, H. Lal, and J. Quale.** 2000. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin. Infect. Dis.* **31**:101–106.
  32. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1992. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Tentative guideline, NCCLS document M26-T, vol. 12, no. 19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
  33. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed., NCCLS document M7-A5, vol. 20, no. 2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
  34. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement, NCCLS document M100-S11, vol. 21, no. 1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
  35. **Obana, Y., T. Nishino, and T. Tanino.** 1985. In vitro and in vivo activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **15**:441–448.
  36. **Rodríguez-Hernández, M. J., J. Pachón, C. Pichardo, L. Cuberos, J. Ibáñez-Martínez, A. García-Curiel, F. J. Caballero, I. Moreno, and M. E. Jiménez-Mejías.** 2000. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:493–501.
  37. **Rodríguez-Hernández, M. J., L. Cuberos, C. Pichardo, F. J. Caballero, I. Moreno, M. E. Jiménez-Mejías, A. García-Curiel, and J. Pachón.** 2001. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:479–482.
  38. **Ruiz, J., M. L. Núñez, J. Pérez, E. Simarro, L. Martínez-Campos, and J. Gómez.** 1999. Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:292–295.
  39. **Seifert, H., R. Baginski, A. Schulze, and G. Pulverer.** 1993. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:750–753.
  40. **Swart, K. J., and M. Pappis.** 1992. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of rifampicin in plasma. *J. Chromatogr.* **593**:21–24.
  41. **Takahashi, A., S. Yomoda, I. Kobayashi, T. Okubo, M. Tsunoda, and S. Iyobe.** 2000. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J. Clin. Microbiol.* **38**:526–529.
  42. **Tankovic, J., P. Legrand, G. De Gatines, V. Chemineau, C. Brun-Buisson, and J. Duval.** 1994. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2677–2681.
  43. **Towner, K. J.** 1997. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Proceedings of a symposium held on 4–5 November 1996 at Eilat, Israel. *J. Med. Microbiol.* **46**:721–746.
  44. **Vila, J. A., A. Marcos, F. Marco, S. Abdalla, Y. Bergara, R. Reig, R. Gómez-Lus, and T. Jiménez de Anta.** 1993. In vitro antimicrobial production of  $\beta$ -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:138–141.
  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.



## Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model

Abelardo Montero<sup>1\*</sup>, Javier Ariza<sup>1</sup>, Xavier Corbella<sup>1</sup>, Alejandro Doménech<sup>1</sup>, Carmen Cabellos<sup>1</sup>, Josefina Ayats<sup>2</sup>, Fe Tubau<sup>2</sup>, Carmen Borraz<sup>2</sup> and Francesc Gudiol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Infection, Infectious Disease Service; <sup>2</sup>Microbiology Department, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, C/Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Received 30 April 2004; returned 10 June 2004; revised 23 September 2004; accepted 28 September 2004

**Objectives:** Successful therapy of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains has been reported with colistin, but recently we argued against its use as monotherapy because of the poor results obtained in a mouse pneumonia model. Our aim was to identify antibiotic combinations that were valid therapeutic alternatives in the same model.

**Methods:** We used two carbapenem-resistant *A. baumannii* strains (D and E; MICs of imipenem, 8 and 512 mg/L, respectively). MICs of tobramycin, rifampicin and colistin for both strains were 8, 8 and 0.5 mg/L, respectively.

**Results:** In infections caused by strain D, lung bacterial counts ( $\log_{10}$  cfu/g, mean  $\pm$  s.d.) were: controls ( $10.86 \pm 0.25$ ), imipenem ( $5.99 \pm 0.59$ ,  $P < 0.05$  versus controls), and colistin ( $10.43 \pm 1.09$ ); imipenem + tobramycin was the most active combination ( $5.46 \pm 0.62$ ,  $P < 0.05$  versus controls). In infections caused by strain E, results were: controls ( $10.82 \pm 0.33$ ), rifampicin ( $5.62 \pm 0.26$ ,  $P < 0.05$  versus controls), colistin ( $8.38 \pm 1.22$ ,  $P < 0.05$  versus controls), and imipenem ( $11.01 \pm 0.2$ ); rifampicin + imipenem ( $3.79 \pm 0.99$ ) and rifampicin + tobramycin ( $3.96 \pm 0.30$ ) were the most active combinations ( $P < 0.05$ ); results with rifampicin + colistin ( $5.59 \pm 1.17$ ) were similar to those with rifampicin alone.

**Conclusions:** Our data indicate that imipenem can still be the best alternative for carbapenem-resistant *A. baumannii* infections with moderate levels of imipenem resistance, preferably combined with aminoglycosides. For strains highly resistant to imipenem, a combination of rifampicin with imipenem, tobramycin or colistin may be useful, if resistance to rifampicin is only moderate.

Keywords: multiresistant, *A. baumannii*, experimental, animals

### Introduction

*Acinetobacter baumannii* is a major nosocomial pathogen worldwide.<sup>1–7</sup> *A. baumannii* infections pose a serious clinical problem due to the ability of the microorganism to acquire resistance to almost all groups of commercially available antibiotics, including carbapenems.<sup>3,6–22</sup>

Since 1992, our hospital has suffered a sustained endemic of multiresistant *A. baumannii* infections. The pathogen became carbapenem-resistant in 1997 and since then, most of the strains have only been susceptible to colistin *in vitro*.<sup>6</sup> Because of its toxicity, colistin has not been used to treat infections caused by

Gram-negative bacilli for many years. This antibiotic has been classically considered less effective than others, and clinical experience in treating infections caused by *A. baumannii* with colistin remains limited.<sup>23–26</sup>

Effective mouse models of pneumonia due to *A. baumannii* have been described previously, using immunosuppressed<sup>27</sup> and immunocompetent mice.<sup>28</sup> In our recent paper comparing the efficacy of colistin versus  $\beta$ -lactams, aminoglycosides and rifampicin in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *A. baumannii*, colistin showed the poorest results of all the antibiotics tested. We therefore argued against its use in patients with pneumonia caused by carbapenem-resistant *A. baumannii*

\*Correspondence address. C/Diputació 89–91, 4<sup>o</sup> 4<sup>a</sup>, 08015 Barcelona, Spain. Tel: +34-93-2607625; Fax: +34-93-2607637; E-mail: amontero@gencat.net

strains.<sup>29</sup> This study aimed to assess the efficacy of several antibiotic combinations, including rifampicin plus  $\beta$ -lactams (imipenem and sulbactam), tobramycin or colistin in a mouse model of pneumonia caused by carbapenem-resistant *A. baumannii*, and thus to identify valid therapeutic alternatives for patients infected with such strains.

## Materials and methods

### Challenge strains

We selected two multiresistant<sup>29</sup> strains of *A. baumannii* that belonged to two major clones (named D and E) endemic in our hospital.<sup>22</sup> MICs, MBCs and criteria of susceptibility or resistance were established according to NCCLS recommendations,<sup>30–32</sup> except for rifampicin, for which we used the interpretative breakpoint recommended for *Staphylococcus aureus* (resistance indicated by MIC  $\geq$  4 mg/L), and for colistin, for which the criterion of resistance was established according to MENSURA guidelines.<sup>23</sup>

Genes encoding known carbapenemases of classes B and D were sought by PCR using specific primers as previously reported.<sup>33</sup>

### In vitro procedures

We evaluated the *in vitro* bactericidal activity by time–kill curves.<sup>32,34</sup> The methodology was described in detail in our previous work.<sup>29</sup> The experiments were carried out with a final inoculum of  $10^5$  cfu/mL. To investigate possible synergy between combinations of two antibiotics, we selected subinhibitory concentrations of drugs ranging from 1/2 to 1/32  $\times$  MIC according to the MICs for the strains and concentrations achievable in serum in humans. Bactericidal activity of combinations was defined as  $\geq 3$ -log<sub>10</sub> decrease in the initial inoculum in cfu/mL<sup>32</sup> at 6 and 24 h. The results were interpreted by the effect of the combination in comparison with the most active single drug alone. Synergy was defined as a  $\geq 2$ -log<sub>10</sub> increase in killing with the combination, in comparison with the most active single drug. Indifference was defined by  $< 1$ -log<sub>10</sub> change (increase or decrease) in killing, in comparison with the most active single antimicrobial alone. Antagonism was defined as a  $\geq 2$ -log<sub>10</sub> decrease in killing with the combination, compared with the most active single drug alone.<sup>34</sup>

### In vivo experiments

**Mouse pneumonia model.** As we described elsewhere,<sup>29</sup> we used immunocompetent specific pathogen-free C57BL/6N young female mice, weighing 14–16 g, supplied by Harlan (Gannat, France). We used the model described by Esposito & Pennington,<sup>35</sup> and modified by Rodríguez-Hernández *et al.*<sup>28</sup> For the intratracheal instillation, we used 50  $\mu$ L of an inoculum of  $5 \times 10^8$  cfu/mL in exponential growth phase diluted to 50% with porcine mucin.

All antibiotics used were obtained from laboratory standard powders and diluted in sterile saline serum immediately before intraperitoneal administration. Total daily doses of imipenem (Merck Sharp & Dohme, Madrid, Spain) (200 mg/kg), sulbactam (Pfizer, Madrid, Spain) (120 mg/kg), tobramycin (Braun, Barcelona, Spain) (60 mg/kg) and colistin-methanesulphonate (Pharmax Limited, Bexley, UK) (500 000 U/kg) were divided into four doses and administered every 6 h. Rifampicin (Aventis, Barcelona, Spain) (25 mg/kg) was administered in a single daily dose. The determination of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of each antibiotic was described previously.<sup>29</sup>

The antibiotic combinations studied in the pneumonia model differed for the two strains of *A. baumannii*, due to differences in their

susceptibility patterns and their therapeutic applicability in humans. Therapies for strain D included a combination of two  $\beta$ -lactams (imipenem with sulbactam), one  $\beta$ -lactam (imipenem or sulbactam) with an aminoglycoside (tobramycin), and combinations of rifampicin with one  $\beta$ -lactam (the ‘gold standard therapy’ such as imipenem) or tobramycin. In pneumonia caused by strain E with OXA-24-mediated high-level imipenem resistance, imipenem and sulbactam showed no activity, and this combination was not tested. In contrast, combinations of rifampicin with sulbactam or colistin were included for this strain. The combination of tobramycin and colistin was not tested, since the high risk of nephrotoxicity precludes consideration in routine clinical practice.

Therapy was initiated 4 h after induction of the pneumonia, when histological features of pneumonia had already appeared and lung bacterial counts had reached a peak, which remained stable for at least 48 h. We randomized the infected animals to the control or treatment group. Controls were 15 and 18 mice at each time point of 24 and 48 h after inoculation in strains D and E, respectively. Furthermore, four mice were used in the treatment group at each combination therapy at each 24 and 48 h time points. Lungs were processed to obtain quantitative counts and results were expressed as mean  $\pm$  S.D. of log<sub>10</sub> of cfu per g of lung in the control and treated groups at the two time points, and the difference between the two groups was calculated ( $\Delta$ logs = mean<sub>treated group</sub> – mean<sub>control group</sub>). Moreover, bacteraemia was investigated by collecting blood via cardiac puncture, and the survival of all animals was recorded at each 24 and 48 h time points.

To eliminate the antibiotic carry-over effect, we killed the treated animals more than 3 h after the last dose of antibiotic and homogenates of lungs were cultured in undiluted form in plates to analyse this effect. To investigate the development of rifampicin resistance, we determined the MIC by Etest at the end of therapy in a sample of isolates from lung homogenates of treated mice.

All control animals had positive blood cultures at 24 and 48 h after induction of pneumonia, reflecting the virulence of the infection model. At 24 h, all the control animals survived. Mortality at 48 h in controls infected with the two strains was not significantly different: six out of 15 animals (40%) (strain D) and eight out of 18 animals (44.4%) (strain E).

The studies described in this manuscript were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona (Bellvitge Campus). Animal experimentation guidelines were followed.

### Statistical analysis

The investigations were done in two sets of experiments, for monotherapies and combinations. Results of experiments regarding monotherapies were published previously.<sup>29</sup> In the present set of combination experiments, the lung bacterial counts were calculated in the control and treated groups and presented as mean  $\pm$  S.D. The Kolmogorov–Smirnov test showed that the data for lung bacterial counts were normally distributed. To evaluate the therapeutic efficacy of each antibiotic combination, we compared the lung counts and the percentages of bacteraemia and mortality in each group of treated mice for each therapy, strain and time point with the same data from the controls infected with the same strain in this set of experiments.

We compared the lung bacterial counts in the two groups of control animals (the previous set of monotherapies versus the present set of combinations) with the Student’s *t*-test. As we did not find significant differences, we assumed that the two groups of control animals were equal and that we could also compare the counts obtained in the therapy groups between combinations

## Experimental therapies against multiresistant *A. baumannii* infections

and monotherapies. Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA) with Scheffé's correction test were used when appropriate to compare differences in bacterial counts between groups.

In a similar way, we have shown that there were no significant differences in data for bacteraemia and mortality between the control groups of the two sets of experiments (monotherapies and combinations). To compare bacteraemia or mortality between groups, the two-tailed Fisher's exact test was used. In all tests, differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### Results

#### *Susceptibilities of challenge strains and carbapenemase production*

*A. baumannii* strains D and E differed in their level of resistance to imipenem (MIC/MBC: 8/16 and 512/512 mg/L, respectively) and sulbactam (MIC/MBC: 4/64 and 128/>128 mg/L, respectively). Both strains were resistant to rifampicin (MIC/MBC 8/8 mg/L), showed intermediate resistance to tobramycin (MIC/MBC 8/32 mg/L), and were susceptible to colistin (MIC/MBC 0.5/1 and 0.5/2 mg/L for strains D and E, respectively).

A gene encoding an OXA-24-like carbapenemase was detected by PCR in strain E, but not in strain D. Neither of the strains contained genes encoding OXA-23-like enzymes or IMP- and VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases.

#### *In vitro time-kill studies*

Among the combinations tested at concentrations that were potentially achievable in serum in humans, a synergic effect was shown against strain D with imipenem and sulbactam, tobramycin or rifampicin; and with sulbactam and tobramycin (Table 1). For strain E, a synergic effect was found with rifampicin and imipenem, sulbactam or tobramycin; and with sulbactam and tobramycin (Table 2). Antagonism was not found for any combination.

#### *In vivo therapeutic efficacy*

Lung bacterial counts in treated and control animals are shown in Table 3. No significant differences in lung bacterial counts were found between the control animals for the two strains. Differences between means for treated and control animals are expressed in Figure 1. The efficacy of the antibiotics was more

**Table 1.** Results of *in vitro* time-kill curves of *A. baumannii* strain D for combinations of antibiotics used in the model expressed as synergic (S) or indifferent (I) activity in relation to monotherapies

Antibiotic	Concentrations $\times$ MIC (mg/L)	Sulbactam		Tobramycin		Rifampicin	
		1/2 (2 mg/L)	1/4 (1 mg/L)	1/2 (4 mg/L)	1/4 (2 mg/L)	1/2 (4 mg/L)	1/4 (2 mg/L)
Imipenem	1/4 (2 mg/L)	I	S	S	I	S	I
	1/8 (1 mg/L)	I	I	S	I	I	I
Sulbactam	1/2 (2 mg/L)			S	S <sup>a</sup>	ND	ND
	1/4 (1 mg/L)			I	I	ND	ND
Tobramycin	1/2 (4 mg/L)	S	I			I	I
	1/4 (2 mg/L)	S <sup>a</sup>	I			I	I

ND, not done.

<sup>a</sup>Bactericidal activity.

**Table 2.** Results of *in vitro* time-kill curves of *A. baumannii* strain E (OXA-24 producer) for combinations of antibiotics used in the model expressed as synergic (S) or indifferent (I) activity in relation to monotherapies

Antibiotic	Concentrations $\times$ MIC (mg/L)	Sulbactam		Tobramycin		Rifampicin	
		1/4 (32 mg/L)	1/8 (16 mg/L)	1/2 (4 mg/L)	1/4 (2 mg/L)	1/2 (4 mg/L)	1/4 (2 mg/L)
Imipenem	1/16 (32 mg/L)	I	I	I	I	I	S
	1/32 (16 mg/L)	I	I	I	I	I	I
Sulbactam	1/4 (32 mg/L)			S	S	I	S <sup>a</sup>
	1/8 (16 mg/L)			S	S	I	S <sup>a</sup>
Tobramycin	1/2 (4 mg/L)	S	S			S <sup>a</sup>	I
	1/4 (2 mg/L)	S	S			I	I
Colistin	1/2 (0.25 mg/L)	ND	ND	ND	ND	I	I
	1/4 (0.12 mg/L)	ND	ND	ND	ND	I	I

ND, not done.

<sup>a</sup>Bactericidal activity.

**Table 3.** Lung bacterial counts<sup>a</sup> (log<sub>10</sub> cfu/g of lung tissue, expressed as mean counts ± S.D.) after 48 h of therapy according to therapy and infecting strain of *A. baumannii*

Therapy	Strain D	Strain E
Control	10.86 ± 0.25	10.82 ± 0.33
<b>Monotherapies<sup>b</sup></b>		
imipenem	5.99 ± 0.59 <sup>c</sup>	11.01 ± 0.2
sulbactam	7.16 ± 1.95 <sup>c</sup>	10.73 ± 0.20
tobramycin	7.38 ± 0.94 <sup>c</sup>	6.61 ± 1.16 <sup>c</sup>
rifampicin	7.21 ± 0.29 <sup>c</sup>	5.62 ± 0.26 <sup>c</sup>
colistin	10.43 ± 1.09	8.38 ± 1.22 <sup>c</sup>
<b>Combinations</b>		
IPM + SUL	7.49 ± 0.29 <sup>c</sup>	ND
IPM + TOB	5.46 ± 0.62 <sup>c,d</sup>	5.18 ± 0.64 <sup>c,d</sup>
IPM + RIF	7.01 ± 1.01 <sup>c</sup>	3.79 ± 0.99 <sup>c,d</sup>
SUL + TOB	6.21 ± 0.44 <sup>c,d</sup>	5.82 ± 1.14 <sup>c,d</sup>
SUL + RIF	ND	5.95 ± 0.67 <sup>c</sup>
RIF + TOB	6.86 ± 0.15 <sup>c</sup>	3.96 ± 0.30 <sup>c,d</sup>
RIF + COL	ND	5.59 ± 1.17 <sup>c</sup>

IPM, imipenem; SUL, sulbactam; TOB, tobramycin; RIF, rifampicin; COL, colistin; ND, not done.

<sup>a</sup>15 and 18 animals were used as controls for strains D and E, respectively. Furthermore, four mice were used in each therapy.

<sup>b</sup>Data for monotherapies were published previously.<sup>29</sup>

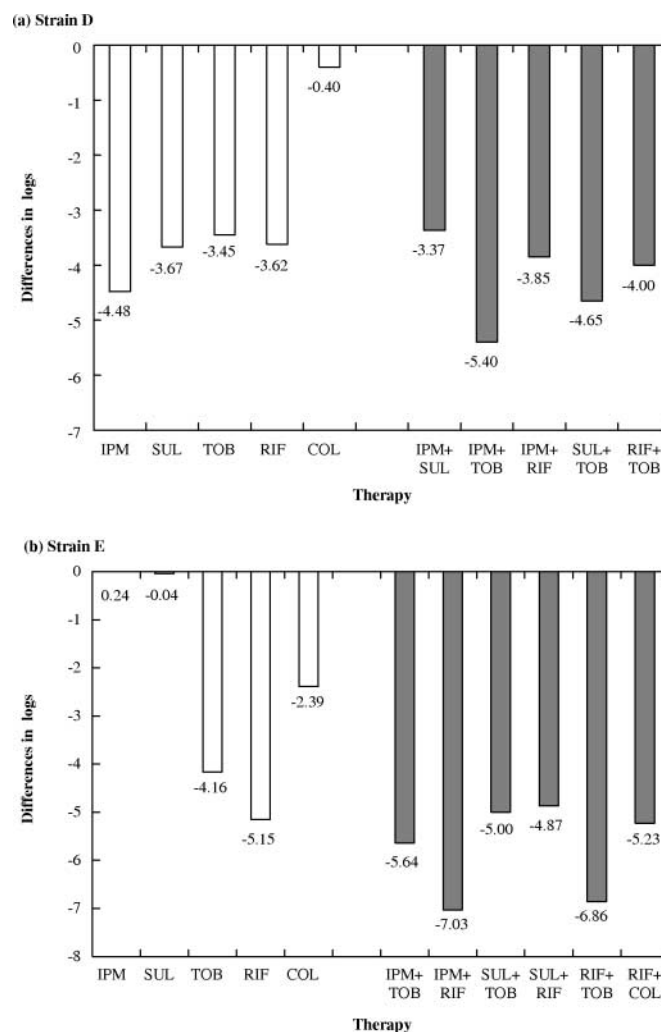
<sup>c</sup>Differences were statistically significant compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

<sup>d</sup>Differences were statistically significant compared with the more active antibiotic alone ( $P < 0.05$ ).

evident at 48 h of therapy, so we show data only at this time point. Interestingly, all combinations tested showed some degree of antibacterial activity, reducing lung counts and bacteraemia significantly compared with controls ( $P < 0.05$ ). In addition, survival was 100% in mice treated with any of the combinations used ( $P < 0.05$  versus controls). For monotherapies versus strain D, survival was 100% for imipenem or rifampicin, 75% for sulbactam or tobramycin and similar to control animals for colistin alone; versus strain E, survival was similar to controls for imipenem or sulbactam, 100% for tobramycin or rifampicin and 87.5% for colistin alone.

**Strain D (moderately carbapenem-resistant, MIC 8 mg/L).** The addition of tobramycin to imipenem or sulbactam improved lung bacterial clearance by about 0.5–1 log [ $P =$  not significant (NS)], though this strain showed moderate tobramycin resistance (MIC, 8 mg/L). Imipenem plus tobramycin was the most active combination of those tested, reducing lung counts by 5.4 logs ( $P < 0.05$ ). The possible additive effect of the imipenem–tobramycin combination was also observed in blood clearance, but it was not significant (bacteraemia 0% for the combination versus 37.5% for each antibiotic alone).

The imipenem–sulbactam combination did not provide any additive effect in decreasing lung bacterial counts and there was even a degree of antagonism. No differences in bacteraemia were found (sulbactam 62.5%, the combination 37.5%,  $P =$  NS). Addition of rifampicin to imipenem or tobramycin did not result in any significant improvement versus monotherapies either in lung counts or in blood clearance (bacteraemia with rifampicin or imipenem–rifampicin 50%, tobramycin–rifampicin 37.5%).



**Figure 1.** *In vivo* therapeutic efficacy. Results of lung counts in the pneumonia model in mice expressed as differences in log<sub>10</sub> between the means of the treated and control groups at 48 h of therapy for strains D (a) and E (b) of *A. baumannii*. Data regarding monotherapies were published previously.<sup>29</sup> IPM, imipenem; SUL, sulbactam; TOB, tobramycin; RIF, rifampicin; COL, colistin. Open bars, antibiotics alone; filled bars, combinations of antibiotics.

**Strain E (highly carbapenem-resistant, MIC 512 mg/L).** Though monotherapies with imipenem or sulbactam were totally ineffective against this pneumonia, the addition of either tobramycin significantly decreased lung bacterial counts in comparison with tobramycin alone ( $P < 0.05$ ) (Table 3). This additive effect was not significant in the bacteraemia results (imipenem 100%, sulbactam 87.5%, tobramycin 25%, imipenem–tobramycin 25%, sulbactam–tobramycin 0%,  $P =$  NS).

While the addition of sulbactam to rifampicin did not have a significant effect, imipenem added to rifampicin provided better lung clearance than rifampicin alone ( $P < 0.05$ ). In fact, the imipenem–rifampicin combination was the most active of all those tested, decreasing lung bacterial counts by 7 logs compared with control animals. As for bacteraemia, neither sulbactam–rifampicin (bacteraemia 12.5%) nor imipenem–rifampicin (bacteraemia 25%) combinations showed a significant additive effect versus rifampicin alone (bacteraemia 37.5%).

## Experimental therapies against multiresistant *A. baumannii* infections

The addition of tobramycin to rifampicin significantly improved the efficacy of rifampicin alone ( $P < 0.05$ ), decreasing lung bacterial counts by 6.8 logs in comparison with control animals. However, this additive effect did not reach statistical significance in blood clearance (bacteraemia 0%,  $P = \text{NS}$  versus monotherapies). In contrast, the addition of colistin to rifampicin did not provide any significant difference in lung bacterial counts and bacteraemia (0%) in comparison with rifampicin alone.

With regard to the possible development of resistance to rifampicin, we did not find any changes in the MICs of rifampicin at the end of therapy in the samples examined.

### Discussion

Among the nosocomial infections caused by *A. baumannii*, ventilation-associated pneumonia has been reported to be particularly severe.<sup>21,36,37</sup> Since imipenem has been widely accepted in recent years as the gold standard therapy for these infections,<sup>16,38</sup> the appearance of carbapenem resistance in many hospitals, including our own,<sup>6–10,12–14,17,18</sup> is a matter of great concern.

For this study, we selected the *A. baumannii* mouse pneumonia model described by Rodríguez-Hernández *et al.*,<sup>28</sup> because it does not require immunosuppression to facilitate the development of pneumonia and thus reproduces more faithfully the usual condition of patients suffering from *A. baumannii* nosocomial pneumonia in an ICU setting.<sup>6,36,37</sup> We used carbapenem-resistant isolates representing two clinical strains that are responsible for the current outbreak in our hospital: one was moderately resistant (strain D, imipenem MIC, 8 mg/L) and the other highly resistant (strain E, imipenem MIC, 512 mg/L). While the mechanism of low-level carbapenem resistance in strain D remains undefined, an OXA-24-like carbapenemase was identified in strain E. These enzymes have been reported previously in Spain.<sup>9,39</sup> A combination of  $\beta$ -lactamase activity, loss of outer membrane proteins and penicillin-binding protein changes have been proposed to account for high-level carbapenem resistance in similar strains.<sup>9,40</sup>

The present paper reports the results of our investigations with several antibiotic combinations, in search of potential therapeutic alternatives to treat patients with carbapenem-resistant *A. baumannii* life-threatening infections.

Our model systematically caused histological findings of pneumonia, with bacterial counts of 10–11 log<sub>10</sub> cfu/g of lung, 100% bacteraemia at 24 and 48 h and mortality at 48 h varying between 40% and 44.4% according to strains. The results in control animals for lung bacterial counts, bacteraemia or survival were strongly homogenous, even between the two strains with different susceptibilities, demonstrating that the model was able to compare the efficacy of therapies. Overall, the results of *in vivo* efficacy of the antibiotics used alone were in close agreement with the pharmacokinetics and pharmacodynamics obtained in mice, with the exception of colistin.<sup>29</sup> However, as we noted in our first report, the pharmacodynamics of tobramycin in this model may well have been overestimated, since the peak levels achieved are not usually found in humans at the recommended doses. Lung bacterial count at 48 h was the most useful comparative parameter for evaluation of antibiotic efficacy in this experimental model, since all antibiotic combinations provided 100% survival and the differences found in bacteraemia rates between the antibiotic schedules were usually in the narrow

range. While we had to use a reduced number of animals in each therapeutic group, according to the current and strict guidelines for animal experimentation, this number was enough to make evident the significant differences obtained in the variable 'lung bacterial counts' at 48 h between the majority of therapies.

In infections caused by the moderately resistant strain D, imipenem and sulbactam maintained good bactericidal efficacy. Tobramycin conferred a possible greater efficacy on these  $\beta$ -lactams, in the light of the synergy found with these combinations in time–kill curves. The imipenem–tobramycin combination was the most active therapy against pneumonia caused by this moderately carbapenem-resistant strain. Interestingly, the combination also showed a higher effect on the infection by the highly resistant strain E, against which monotherapy with imipenem or sulbactam was totally ineffective. The higher antibacterial effect of imipenem–tobramycin versus sulbactam–tobramycin was probably due to the greater *in vitro* bactericidal activity exhibited by imipenem than sulbactam in killing curves and the post-antibiotic effect reported with imipenem in treating *A. baumannii*.<sup>27,41</sup> To our knowledge, no clinical data are currently available to evaluate the systematic use of the  $\beta$ -lactam–aminoglycoside combination to treat serious *A. baumannii* infections, but probably this practice is not routinely required. However, the additive effect of the combination of tobramycin and imipenem or sulbactam may be particularly important in the treatment of *A. baumannii* pneumonia with moderate carbapenem resistance.

In contrast, the combination of imipenem and sulbactam did not show any additive effect on the pneumonia caused by strain D, which was in disagreement with that reported by Wolff *et al.*<sup>27</sup> in a pneumonia model in immunosuppressed mice.

Rifampicin presented high bactericidal activity when used alone against pneumonia caused by the highly carbapenem-resistant strain E. This efficacy was also observed with strain D, though to a lesser degree.<sup>29</sup> The two strains had previously been considered resistant to rifampicin *in vitro* (MIC, 8 mg/L), but at high doses *in vivo* the pharmacodynamic parameters of rifampicin in this animal model were favourable. A similar pharmacokinetic behaviour may be achievable in humans using tolerable high doses about 20 mg/kg per day.<sup>42</sup> In their model, Wolff *et al.*,<sup>27</sup> using *A. baumannii* strains with rifampicin MICs of 4–8 mg/L, reported similar results. Furthermore, among the combinations including rifampicin, rifampicin–imipenem and rifampicin–tobramycin were particularly active against the pneumonia due to strain E, providing a significantly better antibacterial effect than rifampicin alone. This effect was correlated to the microbiological results shown by time–kill curves. In contrast, the rifampicin–sulbactam combination had no impact on pneumonia caused by strain E, despite the synergy found *in vitro*. It is unclear why we observed different efficacy of rifampicin alone or in combination against strains D and E, while they showed similar MICs. We may speculate that the increase in antibiotic resistance in *A. baumannii* could lead these strains to a higher vulnerability, as reported for other multiresistant microorganisms. Finally, although *in vitro* synergic activity has been reported with the combination of colistin and rifampicin,<sup>43–45</sup> it was not observed in the *in vivo* model, in a similar way to our results from the time–kill curves.

It is generally accepted that rifampicin should not be used as monotherapy against Gram-positive infections because of the early development of resistance.<sup>42</sup> However, Gram-negative

bacteria are also probably able to develop early rifampicin resistance.<sup>44</sup> In our *A. baumannii* pneumonia model, we did not detect resistance to rifampicin after 48 h of therapy, but this time appears to be too short and the study was not designed to analyse this phenomenon.<sup>29</sup> Wolff *et al.*<sup>27</sup> did not report it *in vivo*, but they observed emergence of resistance *in vitro* after 24 h of incubation. When rifampicin combinations are recommended for therapy against carbapenem-resistant *A. baumannii* infections, their bactericidal efficacy and the possible development of rifampicin resistance should be taken into account. Although rifampicin–imipenem or rifampicin–tobramycin were the two most effective combinations for treating infections by the highly resistant strain E, it is difficult to make recommendations since the most favourable pharmacokinetic profile of antibiotics in combination for the prevention of resistance requires simultaneous but separate microbiological efficacy of each drug.<sup>46</sup>

This study focuses on the urgent problem of treating serious infections caused by carbapenem-resistant *A. baumannii* strains. While any extrapolation of results of experimental infections to humans should be made with great caution,<sup>41</sup> we believe that our model provides reproducible and comprehensive data that could inform optimal therapeutic management for these patients, although clinical and more *in vitro* studies are needed. The fact that the susceptibility patterns of multiresistant *A. baumannii* infections may vary widely from hospital to hospital advises against recommending a single therapy for these infections. Accordingly, from our data, we conclude that imipenem is ineffective against infections caused by strains with high-level carbapenem resistance, but that it can still be the best alternative for some strains with moderate carbapenem resistance, preferably used in combination with aminoglycosides. Monotherapy with colistin may not be the best option for infections caused by highly carbapenem-resistant strains susceptible only to this antibiotic *in vitro*; a combination of rifampicin–imipenem, rifampicin–aminoglycoside or even rifampicin–colistin may be more advisable, if resistance to rifampicin is only moderate. Further studies on the use of rifampicin in clinical practice should aim to identify which of these combinations is the most efficacious and which best prevents the emergence of resistance to this drug.

### Acknowledgements

We are indebted to: J. Pachón, M. J. Rodríguez-Hernández and C. Pichardo, from the Infectious Diseases Service, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain, for their technical assistance in the experimental model; M. A. Domínguez, from the Microbiology Department, Hospital de Bellvitge, and B. Mirelis, from the Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, for their contribution to characterization of carbapenemases; I. Casals and M. Riera, from the Unit of Chromatography, Serveis Científico-Tècnics, University of Barcelona, for their technical support in HPLC methods; R. Bernat, from the Pathology Department, Hospital de Bellvitge, for pathological studies of lungs; J. M. Ramón, from Hospital de Bellvitge, for his assistance in statistical analysis; M. Maudsley, from the University of Barcelona, for help with the English; and J. Gavalda, from the Infectious Diseases Service, Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain, for revision of the manuscript. This study was carried out without any financial support from pharmaceutical companies. The work was supported in part by a research grant from the Fondo

de Investigaciones Sanitarias (FIS 98/0525) from Ministerio de Sanidad, Spain. A.M. and A.D. were supported by grants from the Fundació August Pi i Sunyer. This study was presented in part at the 41st ICAAC, held in Chicago, IL, USA, in December 2001 (Abstract no. 998).

### References

1. Basustaoglu, A. C., Kisa, O., Sacilik, S. C. *et al.* (2001). Epidemiological characterization of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* isolates from a 1500-bed teaching hospital by phenotypic and genotypic methods. *Journal of Hospital Infection* **47**, 246–9.
2. Bergogne-Bérézin, E. & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 148–65.
3. Fluit, A. C., Jones, M. E., Schmitz, F. J. *et al.* (2000). Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clinical Infectious Diseases* **30**, 454–60.
4. Forster, D. H. & Daschner, F. D. (1998). *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 73–7.
5. Anon. (1996). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986–April 1996, issued May 1996. *American Journal of Infection Control* **24**, 380–8.
6. Levin, A. S. S., Mendes, C. M. F., Sinto, S. I. *et al.* (1996). An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **17**, 366–8.
7. Manikal, V. M., Landman, D., Saurina, G. *et al.* (2000). Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clinical Infectious Diseases* **31**, 101–6.
8. Afzal-Shah, M., Woodford, N. & Livermore, D. M. (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 583–8.
9. Bou, G., Cerveró, G., Domínguez, M. A. *et al.* (2000). Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3299–305.
10. Fierobe, L., Lucet, J. C., Decre, D. *et al.* (2001). An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **22**, 35–40.
11. Go, E. S., Urban, C., Burns, J. *et al.* (1994). Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* **344**, 1329–32.
12. Jones, M. E., Thornsberry, C., Livermore, D. M. *et al.* (1999). Prevalence of *Acinetobacter* spp. isolates with reduced susceptibility to imipenem, as determined by a USA-wide electronic surveillance network. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 429–31.
13. Lyytikäinen, O., Kõljalg, S., Härmä, M. *et al.* (1995). Outbreak caused by two multiresistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: emergence of resistance to imipenem. *Journal of Hospital Infection* **31**, 41–54.
14. Rahal, J. J., Urban, C. & Segal-Maurer, S. (2002). Nosocomial antibiotic resistance in multiple Gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance balloon at multiple sites. *Clinical Infectious Diseases* **34**, 499–503.
15. Ruiz, J., Núñez, M. L., Pérez, J. *et al.* (1999). Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**, 292–5.



## Experimental therapies against multiresistant *A. baumannii* infections

16. Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A. *et al.* (1993). Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 750–3.
17. Takahashi, A., Yomoda, S., Kobayashi, I. *et al.* (2000). Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 526–9.
18. Tankovic, J., Legrand, P., de Gatines, G. *et al.* (1994). Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 2677–81.
19. Towner, K. J. (1997). Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Proceedings of a symposium held on 4-5 November 1996 at Eilat, Israel. *Journal of Medical Microbiology* **46**, 721–46.
20. Wisplinghoff, H., Edmond, M. B., Pfaller, M. A. *et al.* (2000). Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infectious Diseases* **31**, 690–7.
21. Wood, G. C., Hanes, S. D., Croce, M. A. *et al.* (2002). Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of *Acinetobacter* ventilator associated pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* **34**, 1425–30.
22. Corbella, X., Montero, A., Pujol, M. *et al.* (2000). Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 4086–95.
23. Catchpole, C. R., Andrews, J. M., Brenwald, N. *et al.* (1997). A reassessment of the *in-vitro* activity of colistin sulphomethate sodium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**, 255–60.
24. Evans, M. E., Feola, D. J. & Rapp, R. P. (1999). Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Annals of Pharmacotherapy* **33**, 960–7.
25. Kucers, A., Crowe, S., Grayson, M. L. *et al.* (1997). Polymyxins. In *The Use of Antibiotics. A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*, 5th edn (Kucers, A., Crowe, S., Grayson, M. L. *et al.*, Eds), pp. 667–75. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
26. Garnacho-Montero, J., Ortiz-Leyva, C., Jiménez-Jiménez, F. J. *et al.* (2003). Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases* **36**, 1111–8.
27. Wolff, M., Joly-Guillou, M. L., Farinotti, R. *et al.* (1999). *In vivo* efficacies of combinations of  $\beta$ -lactams,  $\beta$ -lactamase inhibitors and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1406–11.
28. Rodríguez-Hernández, M. J., Pachón, J., Pichardo, C. *et al.* (2000). Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**, 493–501.
29. Montero, A., Ariza, J., Corbella, X. *et al.* (2002). Efficacy of colistin versus  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1946–52.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement, M100-S12*. NCCLS, Villanova, PA, USA.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—5th Edition: Approved Standard M7-A5*. NCCLS, Villanova, PA, USA.
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1992). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Tentative Guideline, M26-T*. NCCLS, Villanova, PA, USA.
33. Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M., Souza, H. *et al.* (2003). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3403–6.
34. Lorian, V. (1996). Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn (Lorian, V., Ed.), pp. 339–41. Williams and Wilkins, MD, USA.
35. Esposito, A. L. & Pennington, J. E. (1983). Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. *American Review of Respiratory Disease* **128**, 662–7.
36. Chastre, J. & Fagon, J. Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **165**, 867–903.
37. Kaul, R., Burt, J. A., Cork, L. *et al.* (1996). Investigation of a multiyear multiple critical care unit outbreak due to relatively drug-sensitive *Acinetobacter baumannii*: risk factors and attributable mortality. *Journal of Infectious Diseases* **174**, 1279–87.
38. Vila, J. A., Marcos, A., Marco, F. *et al.* (1993). *In vitro* antimicrobial production of  $\beta$ -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 138–41.
39. Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K. J. *et al.* (2002). Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 4741–3.
40. Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Conejo, M. C. *et al.* (2003). Relationship between  $\beta$ -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 565–74.
41. Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1–12.
42. Kucers, A., Crowe, S., Grayson, M. L., *et al.* (1997). Rifampicin (Rifampin). In *The Use of Antibiotics. A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*, 5th edn. (Kucers, A., Crowe, S., Grayson, M. L. *et al.*, Eds), pp. 676–708. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
43. Giamarellos-Bourboulis, E. J., Xirouchaki, E. & Giamarellou, H. (2001). Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **40**, 117–20.
44. Hogg, G. M., Barr, J. G. & Webb, C. H. (1998). *In vitro* activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**, 494–5.
45. Yoon, J., Urban, C., Terzian, C. *et al.* (2004). *In vitro* double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 753–7.
46. Zhao, X. & Drlica, K. (2002). Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *Journal of Infectious Diseases* **185**, 561–5.



## Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections

Mireia Saballs<sup>1\*</sup>, Miquel Pujol<sup>1</sup>, Fe Tubau<sup>2</sup>, Carmen Peña<sup>1</sup>, Abelardo Montero<sup>3</sup>,  
M. Angeles Domínguez<sup>2</sup>, Francesc Gudiol<sup>1</sup> and Javier Ariza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Infectious Disease Service, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, C/Feixa Llarga s/n 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Microbiology Department, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Laboratory of Experimental Infection, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 7 November 2005; returned 10 March 2006; revised 19 April 2006; accepted 2 June 2006

**Background:** In the setting of a large endemic of *Acinetobacter baumannii* infections, treatment of those due to carbapenem-resistant strains, susceptible only to colistin, has become a major problem in our hospital during the past years. Successful results have been reported using colistin, but clinical experience with this antibiotic is limited. In our experimental studies using these strains in a mouse pneumonia model, the best results were observed with a combination of rifampicin and imipenem.

**Methods:** From July 2000 to September 2001, we performed a pilot study with patients suffering from serious infections due to carbapenem-resistant *A. baumannii*. Patients were treated with a rifampicin/imipenem combination and followed up prospectively. Cultures were repeated during and after treatment, and *in vitro* activity of rifampicin was monitored. Genotyping of these strains was performed by means of PFGE.

**Results:** Ten patients were selected: four with ventilator-associated pneumonia, and six with other infections (one catheter-related bacteraemia, five surgical infections). Three patients died, two of whom were considered therapeutic failures. In five of the seven patients who were cured, other procedures were also performed such as surgical drainage or catheter removal. *In vitro* development of high resistance to rifampicin was shown in seven (70%). PFGE demonstrated that initial isolates and high-resistant strains belonged to the same clones.

**Conclusions:** The results of our study argue against the use of a rifampicin/imipenem combination for the treatment of carbapenem-resistant *A. baumannii* infections. However, combinations of rifampicin with other antibiotics merit further studies.

Keywords: *A. baumannii*, carbapenem resistance, antibiotic combinations

### Introduction

The treatment of life-threatening infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains, often susceptible only to colistin, poses a serious challenge to clinicians.<sup>1</sup> Though some authors have reported successful results with the use of this antibiotic, clinical experience is limited.<sup>2</sup>

Over the past years, our hospital has been suffering from a sustained endemic due to carbapenem-resistant *A. baumannii*.<sup>3</sup>

In this setting, a mouse model of pneumonia caused by carbapenem-resistant *A. baumannii* was developed in our laboratory.<sup>4,5</sup> The poor results obtained with colistin argued against its choice in the treatment of pneumonia. The best results were observed with rifampicin/imipenem and rifampicin/tobramycin combinations.<sup>4,5</sup>

In the light of these results, we subsequently treated a series of patients with serious infections due to carbapenem-resistant *A. baumannii* with the combination of rifampicin and imipenem.

\*Corresponding author. Tel: +34-93-2607625; Fax: +34-93-2607637; E-mail: msaballs@csb.scs.es

Their data were collected prospectively in order to assess the efficacy of this combination and to monitor the development of rifampicin resistance.

## Materials and methods

### Setting and patients

The study was carried out at the Hospital Universitari de Bellvitge, a 1000 bed teaching hospital for adult patients (July 2000–September 2001). Patients suffering from serious infections due to carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates were prospectively identified and treated with rifampicin/imipenem combined therapy. Patients receiving therapy for <48 h or treated with other concomitant antibiotics with potential activity against carbapenem-resistant *A. baumannii* were excluded. Cultures were repeated during and after treatment whenever the relevant sites were easily accessible. *In vitro* activity of rifampicin was monitored against *A. baumannii* isolates obtained in these subsequent cultures.

### Therapeutic protocol

The study was conducted as a pilot study in a non-comparative fashion and was approved by the Ethics Committee of our hospital. Written informed consent was obtained from patients or their legal representatives. The dose of imipenem was 2 g per day (500 mg, four times a day, intravenously); the dose of rifampicin was 600 mg/12 h by intravenous infusion.

### Definitions

Serious infections included bacteraemia or sepsis, ventilator-associated pneumonia (VAP), and intraabdominal or other organ-space infections. Underlying condition and severity of illness were defined according to McCabe classification and SAPS II score and source of infection according to the CDC criteria. Therapy was determined as the number of days of combined regimen. Overall mortality was defined as death during hospitalization. Death was considered related to *A. baumannii* infection when persistent signs or symptoms of infection were present at the time of death and/or when death occurred within 1 week of the beginning of antibiotic therapy without any other clear explanation. Therapeutic failure was considered if clinical findings worsened after 72 h of initiation of therapy or did not improve during the treatment period. Criteria of cure required the disappearance of symptoms and signs of infection, but not the microbiological eradication of the microorganism at the site of source of infection.

### Microbiological methods

*A. baumannii* isolate identification and susceptibility testing was performed using commercial panels Neg Combo 1S from Walkaway system. Definitive identification was performed by their ability to grow at 44°C. MICs of antibiotics were confirmed by the Etest method. The MIC of imipenem was determined by an agar dilution method according to the NCCLS guidelines. Breakpoints for colistin were those defined by the French Society for Microbiology (susceptibility: MIC ≤ 2 mg/L).<sup>6</sup> Since data regarding rifampicin and Gram-negative bacteria are not available, we considered strains with rifampicin MICs of 4–8 mg/L as low resistant and strains that increased their rifampicin MIC up to 256 mg/L as high resistant.

Analysis of chromosomal DNA of strains collected before, during and after treatment was performed by PFGE.<sup>7</sup>

## Results

Among the 14 patients considered suitable for rifampicin and carbapenem therapy, 4 were excluded (1 was given antibiotic therapy for 24 h only and 3 additionally received colistin). Thus, 10 patients (9 in intensive care units) were given rifampicin/imipenem for a mean time of 12.1 days (6–24 days) and were considered evaluable cases (Table 1). The source of *A. baumannii* infection was VAP in four patients and others in the remaining six patients (one catheter-related bacteraemia, five post-surgical infections). *A. baumannii* isolates from all patients belonged to two multiresistant clones named A and E, *in vitro* susceptible only to colistin (MICs of imipenem ≥32 mg/L; MICs of rifampicin 4–8 mg/L) (Table 2). As previously described,<sup>5</sup> *in vitro* time–kill curves showed a synergic effect with the combination of rifampicin and imipenem.

Among patients with VAP managed with antibiotic therapy only, two patients were cured (Patients 1 and 3); a third patient (Patient 2) was cured after 9 days of therapy, but 1 week later developed primary bacteraemia due to high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* and died; and the fourth patient (Patient 4) was considered a therapeutic failure and died at 8 days of treatment. Among patients with other infections, one with an intraabdominal abscess secondary to pancreatic surgery (Patient 6) failed and died at 15 days of treatment, and the remaining five patients were cured, one with catheter-related bacteraemia and removal of catheter (Patient 5) and four with surgical infections and concomitant surgical drainage (Patients 7–10) (Table 1). Overall, three patients died, two because of a therapeutic failure, including persistent clinical findings and positive cultures that identified high-level rifampicin-resistant *A. baumannii*, and seven were cured.

*In vitro* susceptibility testing of carbapenem-resistant *A. baumannii* strains successively isolated showed development of high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* in seven patients (70%). In four cases high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* appeared in successive samples collected at the site of the initial infection: Patients 4 and 6 with therapeutic failures already mentioned, and peritoneal samples in two other patients with intraabdominal abscesses obtained at 8 and 9 days of therapy (Patients 7 and 8). The remaining three patients (Patients 1, 2 and 5) developed catheter-associated infection or primary bacteraemia unrelated to the initial source of infection, at 15, 7 and 21 days, respectively, after therapy. In three of these seven patients who developed high-level rifampicin-resistant *A. baumannii*, low-level rifampicin-resistant *A. baumannii* were subsequently found; in one patient high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* and low-level rifampicin-resistant *A. baumannii* were identified concomitantly. PFGE performed in these strains demonstrated that low-level rifampicin-resistant *A. baumannii* and the following high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* and further low-level rifampicin-resistant *A. baumannii* isolates belonged to the same clone (Table 1)

## Discussion

In our setting of endemic carbapenem-resistant *A. baumannii* infections that were only susceptible to colistin, and in view of our experience in pneumonia models in mice,<sup>4,5</sup> we thought that the rifampicin/imipenem combination might be the best therapeutic option. Although all carbapenem-susceptible

## Rifampicin/imipenem versus carbapenem-resistant *A. baumannii*

**Table 1.** Characteristics and outcome of carbapenem-resistant *A. baumannii* infections treated with rifampicin + imipenem

Patient	Age/sex	Diagnosis	Ward /SAPSII	Rx (days) <sup>a</sup>	Evolution	Date	Sample	MIC <sup>b</sup>	MIC <sup>c</sup>	Clone
1	55/M	VAP	ICU/27	8	cured	22/01/01	BAL	>256	8	E
						14/02/01	blood (primary bacteraemia)	>256	256	E
2	63/M	VAP	ICU/35	9	died	15/12/00	blood	128	4	A
						31/12/00	blood	128	256	A
3	47/M	VAP	ICU/25	10	cured	30/12/00	sputum	>256	8	A
4	80/M	VAP	ICU/33	8	died	04/01/01	bronchial brushing	>256	4	ND
						12/06/01	BAL	>256	8	E
5	52/F	catheter bacteraemia	ICU/35	6	cured (catheter removal)	18/06/01	sputum	>256	256	E
						20/02/01	blood	>256	8	E
6	39/F	intraabdominal abscess	ICU/44	15	died (surgical drainage) therapeutic failure	19/03/01	catheter	>256	256	E
						06/04/01	blood	>256	4	E
						17/08/01	peritoneal fluid	>256	8	E
7	58/M	intraabdominal abscess	ICU/36	13	cured (surgical drainage)	30/08/01	peritoneal fluid	>256	256	E
						27/03/01	abscess	64	6	A
8	72/M	intraabdominal abscess	ICU/35	24	cured (surgical drainage)	05/04/01	abscess	64	256	ND
						01/05/01	abscess	64	4	A
						24/05/00	abscess	>256	8	E
9	21/M	empyema	ICU/40	6	cured (thoracic drainage)	01/06/00	peritoneal fluid	>256	256	E
						04/06/00	abscess	>256	8	E
10	65/M	arthroplasty hip infection	non-ICU/ND	22	cured (surgical drainage)	17/09/01	pleural effusion	128	8	ND
						27/03/01	wound	64	8	A
						23/04/01	wound	64	6	A

VAP, ventilator-associated pneumonia; ND, not done; BAL, bronchoalveolar lavage.

<sup>a</sup>Length of treatment.

<sup>b</sup>MIC of imipenem.

<sup>c</sup>MIC of rifampicin.

**Table 2.** Antibiotic susceptibility patterns of *A. baumannii* clones isolated at the beginning of the study (MICs in mg/L)

Antibiotic	Clone E	Clone A
Ticarcillin	>256 (R)	>256 (R)
Piperacillin	>256 (R)	>256 (R)
Ampicillin/sulbactam (2:1)	>256/128 (R)	16/8→256/128 (I/R)
Ceftazidime	>256 (R)	16→256 (I/R)
Cefepime	>256 (R)	>256 (R)
Imipenem	>256 (R)	64–256 (R)
Meropenem	>256 (R)	128→256 (R)
Gentamicin	>256 (R)	>256 (R)
Tobramycin	8–64 (R)	>256 (R)
Amikacin	>256 (R)	>256 (R)
Ciprofloxacin	>32 (R)	>32 (R)
Colistin	0.5–64 (S/R)	0.5 (S)
Rifampicin	4–8 (LR)	4–8 (LR)

R, resistant; LR, low resistant; I, intermediate; S, susceptible.

*A. baumannii* and carbapenem-resistant *A. baumannii* strains we tested showed moderate resistance to rifampicin (MICs 4–8 mg/L), in our model rifampicin at high doses, equivalent to doses of 20 mg/kg/day in humans, provided successful

pharmacodynamic parameters<sup>8</sup> and better results than colistin against pneumonia due to carbapenem-susceptible *A. baumannii* and carbapenem-resistant *A. baumannii*. Similar results have been reported by other authors.<sup>9</sup> While we did not detect an increase of rifampicin resistance in these experimental studies, we assumed that monotherapy with rifampicin could not be considered and therefore studied the effect of several combinations; of note, we found that the rifampicin/imipenem combination was additive in 'killing' curves and significantly more effective than rifampicin alone against clone E carbapenem-resistant *A. baumannii* pneumonia.<sup>5</sup>

Although a non-comparative study has some limitations, we believed that it was clinically important to apply and confirm in patients with serious infections due to carbapenem-resistant *A. baumannii* strains the information provided by our experimental studies.

In the study, a small sample of patients was treated with a rifampicin/imipenem combination. Of note, three of the four episodes of VAP were cured with this antibiotic regimen. Among patients with other infections, five were cured, although concomitant non-antibiotic treatments such as surgical drainage and device removal may have been decisive in this outcome. Overall, the crude mortality rates of 30% may be considered acceptable and within the range of figures usually reported. However, closer analysis shows that two of these cases were evaluated

as therapeutic failures and died, and in both cases mortality was considered directly related to infection and ineffective antibiotic therapy.

It is difficult to establish whether the efficacy of rifampicin/imipenem we observed in our patients was due to the activity of rifampicin alone or was provided by an additive or synergic effect of the combination. In any case, the frequent development of high-level rifampicin-resistant *A. baumannii*, and the potential risk that this resistance determined therapeutic failure, should be considered as a strongly negative effect of this combination. PFGE studies demonstrated that high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* belonged to the same clone as isolates found before the beginning of therapy. This resistance reverted in three cases in which follow-up of isolates was possible and no spread of high-level rifampicin-resistant *A. baumannii* between patients was detected.

Imipenem at usual human doses could not achieve sustained serum levels higher than the MIC for carbapenem-resistant *A. baumannii* (MIC  $\geq$  64 mg/L) and accordingly it was unable to prevent the development of high-level rifampicin-resistant *A. baumannii*.<sup>10</sup> When we chose the rifampicin/imipenem combination to treat our patients, we based our criteria on the antibiotic's efficacy recorded in the experimental model, but we did not pay sufficient attention to the non-favourable pharmacokinetic profile of these antibiotics in combination for the prevention of resistance.

Our results argue against the use of the rifampicin/imipenem combination for the treatment of carbapenem-resistant *A. baumannii* infections. However, the possible usefulness of rifampicin in other combinations should be further explored. The antibiotic chosen for administration with rifampicin in combination should itself have good *in vitro* activity against carbapenem-resistant *A. baumannii*. In the setting of our carbapenem-resistant *A. baumannii* strains, only colistin appears to offer this alternative. In fact, colistin should be considered a therapeutic option for these infections, since successful results have been reported.<sup>2</sup> Whether the rifampicin/colistin combination provides better results than colistin alone and the extent to which colistin prevents the development of high rifampicin resistance are points that should be investigated further.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

1. Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 1268–74.
2. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leiba C, Jiménez-Jiménez 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.
3. Corbella X, Montero A, Pujol M *et al.* Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 4086–95.
4. 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.
5. 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.
6. Soussy CJ, Cluzel R, Courvalin P. Definition and determination of *in vitro* antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**: 238–46.
7. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC *et al.*, eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993; 563–71.
8. Kucers A, Crowe S, Grayson ML *et al.* Rifampicin (Rifampin). In: Kucers A, Crowe S, Grayson ML *et al.*, eds. *The Use of Antibiotics. A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs, 5th edn*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997; 676–708.
9. Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti R *et al.* *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.
10. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis* 2002; **185**: 561–5.



ture. Franks et al. (7) found that xenon, despite a relatively simple atomic structure, acts selectively by blocking the *N*-methyl-D-aspartate receptor. Because *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists are known to possess neuroprotective properties, a first study in rats was performed to investigate possible neuroprotection. During cardiopulmonary bypass surgery, neuroprotection of xenon was confirmed. The protective effect of xenon in animals is seen in subanaesthetic concentrations. In an unpublished study by our group, when cardiopulmonary resuscitation was performed in pigs, xenon reduced damage to the central nervous system (T. Marx, unpublished data). The use of xenon therefore is proposed in procedures where potential central nervous impairment is expected, including cardiac bypass surgery, cerebral trauma, and stroke (8). Prolonged ICU stay due to neuronal damage after cardiac bypass surgery alone is regarded to cost \$2–4 billion in the United States annually (9). The cost/benefit relationship, which in the view of other authors limits xenon's use in anesthesia (4), therefore must be considered. Cost reduction by minimizing cerebral damage and reducing the length of ICU stay must be taken into consideration. Xenon's use during ICU therapy can be expected in the near future, if further studies confirm the results of the animal experiments. Regarding this, the work of Dr. Bedi et al. (10), published in this issue of *Critical Care Medicine*, is overdue concerning the future of xenon. The application for ICU sedation was found to be feasible when using a closed ven-

tilator system. The authors explain that in addition to the well-known properties like rapid recovery and hemodynamic stability, in closed-system anesthesia the requirements for the substance are reduced dramatically when all tissues are saturated. The inhaled concentrations used for sedation are below the concentration of xenon used in anesthesia (approximately 70%) (10). It is an important milestone for xenon's future to demonstrate how xenon could be administered during ICU therapy. I regret that the authors did not measure the real xenon usage to give a rough estimation of the expected costs. Regarding closed-system ventilation during ICU therapy, some further studies have to be kept in mind regarding the accumulation of volatile compounds in breathing systems. High concentrations of possibly toxic compounds must be avoided. Under physiologic conditions, human breath contains >100 gaseous and volatile substances (11). This composition of human exhaled breath could be changed totally under conditions of severe organ failure. During conditions like sepsis or multiple organ failure, this might be a problem whose importance could not be assessed until now (12).

Thomas Marx, MD  
Department of Cardiac Anaesthesia  
University of Ulm  
Ulm, Germany

## REFERENCES

- Behnke AR, Yarborough OD: Respiratory resistance, oil water solubility and mental effects of argon compared with helium and nitrogen. *Am J Physiol* 1939; 126:409–415
- Lawrence JH, Loomis WF, Tobias CA, et al: Preliminary observations on the narcotic effect of xenon with a review of values for solubilities of gases in water and oils. *J Physiol* 1946; 105:197–204
- Marx T, Schmidt M, Schirmer U, et al: Xenon anaesthesia. *J R Soc Med* 2000; 93: 513–517
- Goto T, Nakata Y, Morita S: Will Xenon be a stranger or a friend? The cost, benefit, and future of xenon anesthesia. *Anesthesiology* 2003; 98:1–2
- Marx T, Schmidt M, Schirmer U, et al: Pollution of the environment and the workplace with anesthetic gases. *Int Anesth Clin* 2001; 39:15–27
- Rossaint R, Reyle-Hahn M, Schulte Am Esch J, et al: Multicenter randomized comparison of the efficacy and safety of xenon and isoflurane in patients undergoing elective surgery. *Anesthesiology* 2003; 98:6–13
- Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, et al: How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 1998; 6709:324
- Ma D, Yang H, Lynch J, et al: Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology* 2003; 98:690–698
- Roach GW, Kanchuger M, Mangano CM, et al: Adverse cerebral outcome after coronary bypass surgery. *N Engl J Med* 1996; 335:1857–1863
- Bedi A, Murray JM, Dingley J, et al: The use of xenon as a sedative for patients receiving critical care. *Crit Care Med* 2003; 31:2470–2477
- Krotoszynski B, Gabriel G, O'Neill H: Characterization of human expired air: A promising investigative and diagnostic technique. *J Chromat Sci* 1977; 15:239–244
- Kneepkens CMF, Lepage G, Roy CC: The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:127–160

## Clinical relevance of *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia\*

**A** *Acinetobacter baumannii* recently has emerged as an important nosocomial pathogen, representing between 2% and 10% of intensive care unit infections (1).

The microorganism's capacity to spread and its persistence in hospitals are due to the surprising ease with which it acquires antimicrobial multiple resistance and its ability to survive on most environmental surfaces. Nowadays, most *A. baumannii* nosocomial strains isolated worldwide are highly resistant to almost all available families of modern antibiotics (2), making treatment of these infections a chal-

lenge for physicians. In this setting, the analysis of the clinical relevance of *A. baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP), the most important among nosocomial infections by such organisms, takes on particular significance.

It is well known that *A. baumannii* has low virulence, reflecting the majority of clinical isolates colonization rather than significant infection (2). No more than

\*See also p. 2478.

Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000089937.38406.9F

10% of isolates appear to correspond to a reliably identified, clinically important infection and require antibiotic treatment. However, differentiation becomes particularly difficult in respiratory infections in intubated intensive care unit patients, in whom confusion with other pathologies such as distress or atelectasis may arise and in whom tracheobronchitis is common. The usual quantitative microbiological criteria for the diagnosis of VAP may not be totally reliable in these cases, and the diagnosis of pneumonia may be overestimated. In addition, the clinical significance of *A. baumannii* is uncertain because many patients show polymicrobial cultures.

VAP caused by *A. baumannii* is associated with very high crude mortality rates (50–70%) (3, 4); however, the attributable mortality rate of these infections is extremely difficult to establish since controlled investigations are lacking. In fact, most investigations conducted to date have included a low number of cases and have analyzed those by *A. baumannii* in an overall group of patients with VAP due to other multiresistant microorganisms. Therefore, differences between *A. baumannii* and other infections such as those caused by *Pseudomonas aeruginosa* have not been conclusively established (5).

In this issue of *Critical Care Medicine*, the study by Dr. Garnacho and colleagues (6), conducted in patients with VAP caused by *A. baumannii* only, constitutes the first that approaches the unanswered question about the real attributable mortality rate of such infections. The study is an interesting multiple-center retrospective investigation, carried out in four teaching hospitals in Spain. Although retrospective cohort studies designed to measure attributable mortality rate are gaining acceptance, the study design carries with it some inherent limitations. Matching must be extremely close, so that the difference between the outcomes in case patients and controls can be confidently attributed to the disease (7). Dr. Garnacho and colleagues (6) showed great care with the matching of patients, using three variables in a logical order of priority from a clinical perspective, selecting the variable "severity of illness" as the most important influence on the outcome in critically ill patients with VAP (3). Nonetheless, 27.7% of the total of 83 case patients were eventually found unsuitable for matching. Another limitation, stressed by the authors, was the low

sample size, meaning that differences were statistically nonsignificant: This in turn made it difficult to identify potential differences when comparing imipenem-resistant and imipenem-susceptible groups, raising doubts about the validity of the multivariate analysis.

Despite these observations, we believe that the study by Dr. Garnacho and colleagues (6) significantly contributes to the understanding of the clinical impact on attributable mortality rate of *A. baumannii* VAP. Results showed that even though a high crude mortality rate was observed, attributable mortality rate was not significantly different between case patients and controls, especially in those with imipenem-susceptible strains. This conclusion is in agreement with our own personal experience and with the idea that the majority of patients with *A. baumannii* isolates who do not survive seem to die with the infection rather than because of it.

Of major concern is the finding that imipenem-resistant *A. baumannii* VAP may have a higher, although not significant, attributable mortality rate. Thus, in many hospitals worldwide there is an urgent need for new therapeutic alternatives after the ability to treat *A. baumannii* infections became severely threatened by the spread of carbapenem resistance.

Although recent data available on the efficacy of polymyxins, usually the last *in vitro* active antibiotic family against *A. baumannii*, are of great interest, colistin performed worse than imipenem, sulbactam, tobramycin, or rifampin in experimental models of *A. baumannii* pneumonia in mice, using strains with variable degrees of multiple resistance (8). The probable reason for these poor results is that colistin is a macromolecule that shows low antibacterial efficacy and poor penetration in pulmonary tissue. These data contrast with a recently reported clinical experience by the same author of the present study (4), who found good clinical and microbiological success rates using intravenous colistin to treat *A. baumannii* VAP caused by carbapenem-resistant strains. In that case, colistin efficacy was comparable to that obtained with imipenem at the time to treat VAP due to imipenem-susceptible strains. A similarity in the efficacy of these two schedules was found, although appropriate early empirical antibiotic therapy was 9.5% in the colistin group and 71% in the imipenem group.

In our opinion, there could be two possible explanations for the disagreement between the results reported by Garnacho et al. (4) and the well-known evidence of the importance of correct early antibiotic therapy in the outcome of VAP due to other Gram-negative bacteria (9). First is the possible overestimation of *A. baumannii* VAP when using nonselective microbiological criteria for VAP diagnosis. Second, *A. baumannii* VAP may be less severe than other Gram-negative VAP, making the influence of early correct therapy less important.

Nowadays, the challenge is to decide whether empirical therapy with colistin is needed in a critically ill patient with VAP in the setting of a hospital outbreak due to *A. baumannii* resistant to all commercially available antibiotics, including imipenem, and only susceptible to polymyxins. In such cases, the results of the study by Dr. Garnacho and colleagues (6), and our own experience, argue against the generalized use of empirical intravenous colistin and rather support an initial approach with a broad-spectrum antibiotic therapy schedule plus aerosolized colistin. Furthermore, while we await further prospective studies to determine the sort of patients in whom appropriate early antibiotic therapy would be mandatory, new therapeutic regimens including antibiotics in combination also should be considered (10, 11).

Abelardo Montero

Xavier Corbella

Javier Ariza

Hospital de Bellvitge

University of Barcelona

Barcelona, Spain

## REFERENCES

1. Bergogne-Bérézin E: *Acinetobacter*: A challenge to infection control. *Acinetobacter* 96. Paper presented at: 4th International Symposium on the biology of *Acinetobacter*, November 3–5, 1996, Eilat, Israel
2. Corbella X, Montero A, Pujol M, et al: Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4086–4095
3. Chastre J, Fagon JY: Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:867–903
4. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyva C, Jiménez-Jiménez 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; 36:1111–1118



5. Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, et al: Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:531–539
6. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, et al: Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: A matched cohort study. *Crit Care Med* 2003; 31:2478–2482
7. Wenzel RP: Perspective: Attributable mortality—The promise of better antimicrobial therapy. *J Infect Dis* 1998; 178:917–919
8. 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; 46:1946–1952
9. Kollef MH: An empirical approach to the treatment of multidrug-resistant ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1119–1121
10. Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti R, et al: 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; 43:1406–1411
11. Montero A, Corbella X, Cabellos C, et al: Single and combined therapy against highly carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in an immunocompetent mouse pneumonia model. Paper presented at: 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), American Society for Microbiology, December 2001, Chicago, IL (abstract no. 998)

## Hypertonic/hyperoncotic treatment for brain damage\*

Contemporary interest in hypertonic solutions as treatment for shock was triggered in 1980 (1), when we demonstrated that a bolus injection of 7.5% NaCl, 4 mL/kg (HS) rapidly restored arterial pressure and cardiac output in severely hemorrhaged dogs. Injected volume corresponded to only 10% of the shed blood, and a purely physical component was responsible for its initial effect, namely volume expansion resulting from the osmotic gradient, which shifts fluid to the intravascular compartment. The 4 mL/kg HS dosage adds 5.13 mEq/kg of  $\text{Na}^+$ . Its distribution is extracellular (200 mL/kg), and the theoretically expected concentration increase is 25 mEq/L to 160–165 mEq/L. In practice, HS only results in an average  $\text{Na}^+$  increase of 15 mEq/L, with a gradual decrease to 145 mEq/L over the next 2–3 hrs, showing that it is being diluted by fluid shift. The ultimate origin of this expansion is the intracellular compartment, into which  $\text{Na}^+$  cannot freely permeate. The addition of 6% dextran-70 to HS gave origin to the HSD formulation, which retains the osmotic features of HS but incorporates an oncotic force that shifts fluid differentially from the interstitial to the intravascular compartment.

The immediate sources for the observed plasma expansion after HS injection are endothelial and red blood cells, in closest contact with hypertonicity, which shed about 8% of their volumes

directly into the intravascular compartment (2). This is actually a reversal of the cell swelling, which unspecifically affects most cell types, as a result of hypoxia. HS reverses this swelling and the neuron is no exception. In the pioneer human study of Felipe et al. (3), HS was given to patients in refractory hypovolemic shock, and the observed results were hemodynamic benefits invariably accompanied by an immediate arousal of conscience. In animal experiments, HS consistently has been shown to reduce intracranial pressure consequent to head trauma (4). In clinical trials, the effect of hypertonic resuscitation on cerebral hemodynamics during hemorrhagic shock in the presence of intracranial hypertension and systemic hypotension has been noted (5). The rapid restoration of the arterial pressure associated with a reduction in intracranial hypertension induced by HS suggests a potential clinical application of these solutions for trauma victims with head injury and associated lesions with hypotension. This subset of trauma victims, with the poorest of all trauma prognoses when treated with standard-of-care procedures, benefited most from the initial HS infusion (6). Specifically, hypotensive patients sustaining head injury with Glasgow Coma Scale scores of  $\leq 8$  who received hypertonic saline treatment presented significantly higher survival at hospital discharge. This was demonstrated in a multiple-center trial (7) as well as in a meta-analysis of individual patients from all the known clinical trials (8).

The basic concern with hypertonic resuscitation in the management of brain injury is hypernatremia with its poten-

tially deleterious consequences. It would result from cellular dehydration produced by the osmotic shift. Evidence of cellular dehydration manifests itself earlier in the central nervous system than elsewhere. Its symptoms include lethargy, tremors, weakness, irritability, delirium, mental confusion, seizures, coma, and death. They occur in severe cases and, particularly, in small children and in the elderly. The use of hypertonic sodium solutions to correct hyponatremia in patients with severe malnutrition or alcoholism may result in central pontine myelinolysis (9). Another described complication with using hypertonic sodium solutions to correct hyponatremia in neonates is the rupture of cerebral veins and intracranial hemorrhage, caused by the retraction of the cerebral tissue (10). This is the rationale for the presently standing contraindication of HS in the perinatal period.

Patients receiving HS have been carefully evaluated for signs and symptoms of hypernatremia, particularly in the presence of head injury. Moderate hypernatremia and hyperosmolarity were detected in the overwhelming majority of patients receiving HS, but there has never been a single case, among >1,700 patients, of seizures, intracranial bleeding, or neurologic deterioration induced by the hypertonic solution (8, 11). Necropsies performed in trauma victims produced no evidence of central pontine demyelination or of focal intracranial bleeding that could be attributed to the use of 7.5% NaCl (8, 11). HSD has been available for routine clinical use in the European Union for the past 3 yrs, and no such complica-

\*See also p. 2495.

Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000084865.08684.BB



**XI.**

**REFERENCIAS**



## REFERENCIAS.

Acar JF, Goldstein FW (1998). Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. *Clinical Infect Dis*; 27 (s1): S125-30.

Afzal-Shah M, Livermore DM (1998). Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*; 41: 576-7.

Afzal-Shah M., Woodford N, Livermore DM (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45 (2): 583-588.

Agustí C, Pujol M, Argerich MJ, Ayats J, Badía M, Domínguez MA, Corbella X, Ariza J (2002). Short- term effect of the application of selective decontamination of the digestive tract on different body site reservoir ICU patients colonized by multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*; 49 (1): 205-208.

Alanis AJ (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*; 36 (6): 697-705.

Alvarez-Lerma F, Palomar M, Olaechea P, De la Cal MA, Inasusti J, Bermejo B, y Grupo de Estudio de Vigilancia de Infección Nosocomial en UCI (2002). Estudio nacional de vigilancia en unidades de cuidados intensivos. Informe del año 2000. *Med Intensiva*; 2: 39-50.

Ardanuy C, Tubau F, Ayats J, Corbella X, Ariza J, Liñares J, Martín R (1998). Actividad de 7 antibióticos y sus combinaciones frente *A. baumannii* resistente a imipenem. VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Mallorca.

Ariza J, Corbella X (2001). Cap. 7 *Acinetobacter*: Epidemiology and control. Págs. 77-91. En: Weinstein RA, Bonten MJM. Infection control in the ICU environment. Kluwer Academic Pub., Boston.

Ayats J, Corbella X, Ardanuy C, Dominguez MA, Ricart A, Liñares J, Ariza J, Martin R (1997). Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. J Hosp Infect; 37:287-295.

Bergogne-Bérézin E, Towner KJ (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev; 9: 148-165.

Borraz C, Montero A, Ayats J, Tubau F, Doménech A, Ribes S, Gudiol F, Ariza J (2002). Análisis *in vitro* de la actividad bactericida y sinérgica de varios antibióticos respecto a la colistina frente a una cepa de *Acinetobacter baumannii* con alta resistencia a carbapenémicos. X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla.

Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J (2000-1). Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: High-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. J Clin Microbiol ; 38: 3299-3305.

Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J (2000-2). OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother; 44 (6): 1556-1561.

Bou G (2001). El alto nivel de resistencia a los carbapenemes en *Acinetobacter baumannii* es un problema multifactorial. Enferm Infecc Microbiol Clin; 19: 336-338.

Burke JP (1998). Antibiotic resistance –Squeezing the ballon? JAMA; 280 (14): 1270-1271.

Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R (1997). A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother*; 39: 255-260.

Chastre J, Fagon JY (2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*; 165: 867-903.

Chastre J (2003). Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. *Semin Respir Crit Care Med*; 24 (1): 69-78.

Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ETS, Palepou MFI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM (2001). IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother*; 45 (3): 710-4.

Cisneros JM, Reyes MJ, Pachón J, Becerril B, Caballero FJ, García-Garmendia JL, Ortiz C, Cobacho AR (1996). Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin Infect Dis*, 22: 1026-1032.

Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martínez-Martínez L, Bou G, Pachón J (2005). Risk factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: A nationwide study. *Clin Microbiol Infect*; 11: 874-879.

Conway SP, Pond MN, Watson A, Etherington C, Robey HL, Goldman MH (1997). Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax*; 52 (11): 987-993.

Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domínguez MA, Liñares J, Ariza J, Gudiol F (1996-1). Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*; 23: 329-334.

Corbella X, Pujol M, Ayats J, Peña C, Sendra M, Ardanuy C, Liñares J, Ariza J, Gudiol F (1996-2). Descripción de un brote epidémico nosocomial por *Acinetobacter*

*baumannii* multirresistente: Análisis preliminar de 415 pacientes. VII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC), Torremolinos, Málaga.

Corbella X, Ariza J, Ardanuy C, Vuelta M, Tubau F, Sora M, Pujol M, Gudiol F (1998). Efficacy of sulbactam alone and in association with ampicillin in nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*; 47: 479-482.

Corbella X, Pujol M, Argerich MJ, Ayats J, Sendra M, Peña C, Ariza J (1999). Environmental sampling of *Acinetobacter baumannii*: Moistened swabs versus moistened sterile gauze pads. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 20:458-460.

Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F (2000). Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*; 38: 4086-4095.

Craig WA, Kunin CM (1976). Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. *Annu Rev Med*; 27: 287-300.

Craig WA (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis*; 26: 1-12.

Craig WA (2001). Does the dose matter? *Clin Infect Dis*; 33 (Suppl 3): S233-7.

Da Silva GJ, Leitao R, Peixe L. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microb* 1999; 37 (6): 2109-10.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza H, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford N (2003). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microb*; 41: 3403-6.



Davis SD (1975). Activity of gentamicin, tobramycin, polymyxin B, and colistimethate in mouse protection tests with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 8: 50-53.

De Jong G, Duse A, Richards G, Marais E (2004). Back to basics – optimizing the use of available resources during an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter* spp. *J Hosp Infect*; 57 (2): 186-187.

Domínguez MA, Ayats J, Ardanuy C, Tubau F, Corbella X, Martín R (1998). Evolution and molecular characterization of epidemic clones of multiresistant *Acinetobacter baumannii* (1992-1997) Abstract K-124. 38<sup>th</sup> Interscience Conference of Antimicrobial Agent and Chemotherapy (ICAAC), San Diego, CA, USA.

Esposito AL, Pennington JE (1983). Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. *Am Rev Respir Dis*; 128: 662-667.

Esposito AL, Pennington JE (1984). Experimental pneumonia due to *Haemophilus influenzae*: Observations on pathogenesis and treatment. *J Infect Dis*; 149 (5): 728-34.

Evans ME, Feola DJ, Rapp RP (1999). Polymyxin B sulfate and colistin: Old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother*; 33: 960-967.

Fagon JY, Chastre J, Allan AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C (1993). Nosocomial pneumonia in ventilated patients: A cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med*; 94 (3): 281-288.

Fantin B, Carbon C (1992). *In vivo* antibiotic synergism: Contribution of animal models. *Antimicrob Agents Chemother*; 36 (5): 907-12.

Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A (2003). 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*; 51: 565-574.

Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pachón J, Martínez-Martínez L y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) (2004). Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* aislados en hospitales españoles. Estudio multicéntrico nacional: Proyecto GEIH-Ab 2000. *Enferm Infecc Microb Clin*; 22 (5): 267-71.

Fernández-Viladrich P, Corbella X, Corral L, Tubau F, Mateu A (1999). Successful treatment of ventriculitis due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with intraventricular colistin sulfomethate sodium. *Clin Infect Dis* ; 28: 916-917.

Fierobe L, Lucet JC, Decre D, Muller-Serieys C, Deleuze A, Joly-Guillou ML, Mantz J, Desmots JM (2001). An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 22 (1): 35-40.

Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J, and the SENTRY participants Group (2000). Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* ; 30: 454-460.

Fuentes Martínez F, Giménez Mestre MJ, Prieto Prieto J (2000). Modelos experimentales en farmacodinamia. *En: Modelos experimentales de patología infecciosa*. Monografías Dr. Antonio Esteve. Eds: Miró JM, Gatell JM. Ed. Doyma, Barcelona.

Gales AC, Jones RN, Forward KR, Liñares J, Sader HS, Verhoef J (2001-1). Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: Geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-1999). *Clin Infect Dis*; 32 (Suppl 2): 104-113.

Gales AC, Reis AO, Jones RN (2001-2). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: Review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microb*; 39 (1): 183-190.

Gales AC, Sader HHS, Jones RN (2002). Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: Results from de SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*; 44 (3): 301-311.

García Garmendia JL, Ortiz Leyba C, Garnacho Montero J, Jiménez Jiménez FJ, Monterrubio Villar J, Gili Miner M (1999). Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit Care Med*; 27 (9): 1794-1799.

Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J (2003). Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: A matched cohort study. *Crit Care Med*; 31 (10): 2478-2482.

Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyva C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittell M, Gallego-Lara SL, Madrazo-Osuna J (2003). Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis*; 36: 1111-1118.

Gavalda J, Capdevila JA, Almirante B, Otero J, Ruiz I, Laguarda M, Allende H, Crespo E, Pigrau C, Pahissa A (1997). Treatment of experimental pneumonia due to penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent rats. *Antimicrob Agents Chemother*; 41 (4): 795-801.

Gavaldà J, Pahissa A (2000). El modelo de farmacocinética humanizada en los modelos animales de infección. Págs. 35-45. *En: Modelos experimentales de patología infecciosa. Monografías Dr. Antonio Esteve. Eds: Miró JM, Gatell JM. Ed. Doyma, Barcelona.*

Gerner-Smidt P (1987). Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratu*s in an intensive care unit. *J Hosp Infect*; 10: 265-272.

Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H (2001). Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 40: 117-20.

Giráldez A, Romero A (2001). Procedimientos experimentales en farmacología y toxicología. Capítulo 18. *En*: Zuñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, 1ª edición.

Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal JJ (1994). Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet*; 344: 1329-1332.

Gómez-Lus R, Gómez-Lus P, Martín C (1997). Bases genéticas y mecanismos bioquímicos de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Cap. 3. *En*: Tratamiento antimicrobiano. L. Drobnic. EMISA.

Goodwin NJ, Friedman EA (1968). The effects of renal impairment, peritoneal dialysis, and hemodialysis on serum sodium colistimethate levels. *Ann Intern Med*; 68 (5): 984-94.

Gravallese DA, Musson DG, Pauliukonis LT, Bayne WF (1984). Determination of imipenem (N-formimidoyl thienamycin) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Comparison with microbiological methodology and stability. *J Chromatography*; 310: 71-84.

Gunderson BW, Ibrahim KH, Hovde LB, Fromm TL, Reed MD, Rotschafer JC (2003). Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*; 47 (3): 905-9.

Gunseren F, Mamikoglu L, Ozturk S, Yucesoy M, Biberoglu K, Yulug N, Doganay M, Sumerkan B, Kocagoz S, Unal S, Çetin S, Çalangu S, Koksall I, Leblebicioglu H, Gunaydin M (1999). A surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative

bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother*; 43 (3): 373-378.

Haginaka J, Wakai J, Yasuda H, Uno T, Nakagawa T (1985). High-performance liquid chromatographic assay of sulbactam using pre-column reaction with 1,2,4-triazole. *J Chromatography*; 341: 115-122.

Hogg GM, Barr JG, Webb CH (1998). *In vitro* activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*; 41:494-5.

Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, Chen WH, Yu CJ, Ho SW, Luh KY (2002). Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a University Hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis*; 8: 827-32.

Jellison TK, Mckinnon PS, Rybak MJ (2001). Epidemiology, resistance, and outcome of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy*; 21 (2): 142-8.

Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Becerril B, Palomino-Nicás J, Rodríguez-Cobacho A, Revuelta M (1997). Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin Infect Dis*; 24: 932-935.

Jiménez-Mejías ME, Becerril B, Márquez-Rivas FJ, Pichardo C, Cuberos L, Pachón J (2000). Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with intravenous colistin sulfomethate sodium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 19 (12): 970-971.

Jiménez-Mejías ME, Pichardo Guerrero C, Márquez Rivas FJ, Martín Lozano D, Prados T, Pachón J (2002). Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic / pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur J Clin Microb Infect Dis*; 21 (3): 212-4.

Joly-Guillou ML, Decre D, Herrman JL, Bourdelier E, Bergogne-Berezin E (1995). Bactericidal *in vitro* activity of beta-lactams and beta-lactamase inhibitors, alone or associated, against clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: Effect of combination with aminoglycosides. J Antimicrob Chemother; 36 (4): 619-629.

Joly-Guillou ML, Wolff M, Pocidalo JJ, Walker F, Carbon C (1997). Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. Antimicrob Agents Chemother; 41: 345-351.

Joly-Guillou ML, Wolff M, Farinotti R, Bryskier A, Carbon C (2000). *In vivo* activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. J Antimicrob Chemother; 46 (5): 827-830.

Joly-Guillou ML, Hidri N, Wolff M (2002). *Acinetobacter*, agent d'infections nosocomiales. apport des modèles expérimentaux. Presse Med; 31: 651-6.

Jones ME, Thornsberry C, Livermore DM, Sahm DF (1999). Prevalence of *Acinetobacter* spp. isolates with reduced susceptibility to imipenem, as determined by a USA-wide electronic surveillance network. J Antimicrob Chemother; 43: 429-431.

Jones RN (2001). Resistance patterns among nosocomial pathogens: Trends over the past few years. Chest; 119: Suppl.2: 397S-404S.

Karlowski JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF (2003). Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. J Clin Microbiol; 47: 1681-1688.

Karabinis A, Paramythiotou E, Mylona-Petropoulou D, Kalogeromitros A, Katsarelis N, Kontopidou F, Poularas I, Malamou-Lada H (2004). Colistin for *Klebsiella pneumoniae*-associated sepsis. Clin Infect Dis; 38: e7-9.

Klastersky J, Meunier-Carpentier F, Prevost JM (1977). Significance of antimicrobial synergism for the outcome of gram-negative sepsis. Am J Med; 273: 157-67.

Kollef MH, Silver P, Murphy DM, Trovillion E (1995). The effect of late-onset ventilator-associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest*; 108: 1655-1662.

Kollef MH (2003). An empirical approach to the treatment of multidrug-resistant ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*; 36: 1119-1121.

Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy J (1997-1). Rifampicin (Rifampin). Págs. 676-708. *En*: Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy J (ed.), *The use of antibiotics. A clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs*, 5<sup>th</sup> ed. Butterworth, Heinemann, Oxford, United Kingdom.

Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy J. 1997-2. Polymyxins. Págs. 667-675. *En*: Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy J (ed.), *The use of antibiotics. A clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs*, 5<sup>th</sup> ed. Butterworth, Heinemann, Oxford, United Kingdom.

Kunin CM, Bugg A (1971). Binding of polymyxin antibiotics to tissues: The major determinant of distribution and persistence in the body. *J Infect Dis*; 124 (4): 394-400.

Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S (2002). Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. *Arch Intern Med*; 162: 1515-20.

Leal R, Camacho P, Flores JM, Herruzo A (1998). Neumonía nosocomial por *Acinetobacter*. *En*: *Acinetobacter baumannii* en pacientes críticos. Alvarez Lerma F (Ed), Merck Sharp and Dohme.

Leggett JE, Fantin B, Ebert S, Totsuka K, Vogelmann B, Calame W, Mattie H, Craig WA (1989). Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J Infect Dis*; 159 (2): 281-92.

Levin ASS, Mendes CMF, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CRM, Rodrigues E, Sauaia N, Boulos M (1996). An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 17 (6): 366-368.

Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA, Manrique EI, Costa SF (1999). Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*; 28: 1008-1011.

Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF (2003). Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents*; 21: 58-62.

Levy SB (1998). Multidrug resistance – A sign of the times. *N Eng J Med*; 338 (19): 1376-1378.

Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K (2001). *In vitro* pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 781-785.

Linden PK, Kusne S, Coley K, Fontes P, Kramer DJ, Paterson D (2003). Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*; 37: e154-160.

Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner K J, Tysall L, Woodford N, Livermore DM (2002). Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microb*; 40 (12), 4741-3.

Lorian V (1996). Antimicrobial combinations. Págs. 339-341. *En Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, Maryland, USA.



Lyytikäinen O, Kõljalg S, Härmä M, Vuopio-Varvika J (1995). Outbreak caused by two multiresistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: Emergence of resistance to imipenem. *J Hosp Infect*; 31: 41-54.

MacKay DN, Kaye D (1964). Serum concentrations of colistin in patients with normal and impaired renal function. *N Eng J Med*; 270 (8): 394-7.

Maddison J, Dodd M, Webb AK (1994). Nebulized colistin causes chest tightness in adults with cystic fibrosis. *Respir Med*; 88:145-147.

Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J (2000). Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis*; 31: 101-106.

Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB (1997). Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 881-5.

Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Ardanuy C, Gudiol F (2002). 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*; 46: 1946-52.

Montero A, Corbella X, Ariza J (2003). Clinical relevance of *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (editorial). *Crit Care Med*; 31 (10): 2557-8.

Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Borraz C, Gudiol F (2004). Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother*; 54 (6): 1085-1091.

Mouton JW, Van Ogtrop ML, Andes D, Craig WA (1999). Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 2473-8.

Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P (2005). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*; 43 (9): 4826-4829.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1992). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Tentative Guideline, NCCLS Document M26-T, Vol. 12 No. 19, Villanova, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5<sup>th</sup> Edition, NCCLS Document M7-A5, Vol. 20 No. 2, Villanova, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh Informational Supplement, NCCLS Document M100-S11, Vol. 21 No. 1, Villanova, PA.

Nungester WJ, Jourdonais LF (1936). Mucin as an aid in the experimental production of lobar pneumonia. *J Infect Dis*; 59: 258-265.

Obana Y, Nishino T, Tanino T (1985). *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother*; 15: 441-448.

Obana Y (1986). Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: Analysis of experimental infection in mice. *Microbiol Immunol*; 30 (7): 645-57.

Obana Y, Nishino T (1990). *In vitro* and *in vivo* activities of sulbactam and YTR830H against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother*; 26 (5): 677-682.

Pachón J, Gavaldà J, Miró JM (2000). Modelo de neumonía. *En: Modelos experimentales de patología infecciosa. Monografías Dr. Antonio Esteve. Eds: Miró JM, Gatell JM. Ed. Doyma, Barcelona.*

Pascual A, López-Hernández I, Martínez-Martínez L, Perea EJ (1997). In-vitro susceptibilities of multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii* to eight quinolones. *J Antimicrob Chemother*; 40: 140-142.

Paton RH, Miles RS, Hood J, Amyes SG (1993). ARI-1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*; 2:81-8.

Pennington JE (1985). Animal models of pneumonia for evaluation of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*; 16: 1-6.

Pfaller MA, Jones RN, Biedenbach DJ, MYSTIC Program Study Group (USA) (2001). Antimicrobial resistance trends in medical centers using carbapenems: Report of 1999 and 2000 results from the MYSTIC Program (USA). *Diag Microb Infect Dis*; 41: 177-182.

Peña C, Pujol M, Pallares R, Corbella X, Vidal T, Tortras N, Ariza J, Gudiol F (1996). Estimación de costes atribuibles a la infección nosocomial: Prolongación de hospitalización y cálculo de costes alternativos. *Med Clin (Barc)*; 106 (12): 441-4.

Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F (1997). Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect*; 35 (1): 9-16.

Quale J, Bratu S, Landman S, Heddurshetti R (2003). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York city. *Clin Infect Dis*; 37 (2): 214-220.

Quinn JP (1998). Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis*; 27 (S1): S117-24.

Rahal JJ, Urban C (2001). Cap. 6 *Acinetobacter*: Epidemiology and control. Págs. 67-76. En: Weinstein RA, Bonten MJM. Infection control in the ICU environment. Kluwer Academic Pub., Boston.

Rahal JJ, Urban C, Segal-Maurer S (2002). Nosocomial antibiotic resistance in multiple Gram-negative species: Experience at one hospital with squeezing the resistance balloon at multiple sites. Clin Infect Dis; 34: 499-503.

Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH (2002). Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. Chest; 122; 2115-2121.

Ribera A, Fernández-Cuenca F, Beceiro A, Bou G, Martínez-Martínez L, Pascual A, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pachón J, Vila J, and the Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH) (2004). Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and  $\beta$ -lactams in *Acinetobacter* genospecies 3. Antimicrob Agents Chemother; 48 (4): 1430-2.

Rodríguez-Hernández MJ, Pachón J, Pichardo C, Cuberos L, Ibáñez-Martínez J, García-Curiel A, Caballero FJ, Moreno I, Jiménez-Mejías ME (2000). Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. J Antimicrob Chemother; 45: 493-501.

Rodríguez-Hernández MJ, Cuberos L, Pichardo C, Caballero FJ, Moreno I, Jiménez-Mejías ME, García-Curiel A, Pachón J (2001). Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. J Antimicrob Chemother; 47: 479-482.

Rodríguez-Hernández MJ, Jiménez-Mejías ME, Pichardo C, Cuberos L, García-Curiel A, Pachón L (2004). Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. Clin Microbiol Infect; 10 (6): 581-4.

Ruiz A, Avilés PM (2001). Procedimientos experimentales y específicos en Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Págs. 513-528. En: Zúñiga JM, Tur JA,

Milocco SN, Piñeiro R (eds.), Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid.

Ruiz J, Núñez ML, Pérez J, Simarro E, Martínez Campos L, Gómez J (1999). Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 18: 292-295.

Saballs M, Pujol M, Tubau F, Peña C, Montero A, Domínguez MA, Gudiol F, Ariza J (2006). Rifampin-imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. J Antimicrob Chemother (aceptado para publicación).

Sato K, Nakae T (1991). Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother; 28: 35-45.

Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol; 35 (11): 2819-2825.

Smith IM, Hazard EC (1970). Anomalous results of high dose chemotherapy in experimental peritonitis. Surg Gynecol Obst; 130 (1): 94-8.

Swart KJ, Pappis M (1992). Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of rifampicin in plasma. J Chromatography; 593: 21-24.

Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunuda M, Iyobe S (2000). Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. J Clin Microbiol 38: 526-529.

Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J (1994). Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. J Clin Microbiol; 32: 2677-2681.

Thomas JK, Forrest A, Bhavnani SM, Hyatt JM, Cheng A, Ballow CH, Schentag JJ. (1998). Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of

bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 521-7.

Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Combaux D, Dombret MC, Gibert C (1998). Ventilator associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*; 157: 531-539.

Turner PJ, Greenhalgh JM, MYSTIC Study Group (Europe) (2003). The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000, *Clin Microbiol Infect*; 9: 563-567.

Urban C, Go E, Mariano N, Berger BJ, Avraham I, Rubin D, Rahal JJ (1993). Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratus*. *J Infect Dis*; 167 (2): 448-51.

Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ (2003). Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*; 36: 1268-74.

Vasen W, Desmery P, Ilutovich S, Di Martino A (2000). Intrathecal use of colistina. *J Clin Microb*; 38 (9): 3523.

Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, Gomez-Lus R, Jiménez de Anta T (1993). *In vitro* antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 37 (1): 138-141.

Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C (1997). Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41 (12): 2757-9.

Vila J (1998). Mecanismos y factores que influyen en el desarrollo de multirresistencia en *Acinetobacter*spp. En: *Acinetobacter baumannii* en pacientes críticos. Alvarez Lerma F (Ed), Merck Sharp and Dohme.

Vincent JL (1997). Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med*; 25 (2): 372-4.

Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA (1988). Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis*; 158: 831-47.

Waterer GW, Wunderink RG (2001). Increasing threat of Gram-negative bacteria. *Crit. Care Med*; 29, Suppl 4: N75-N81.

Weinstein RA (1998). Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* 4(3): 416-420.

Wenzel RP, Wong MT (1999). Managing antibiotic use – Impact of infection control. *Clin Infect Dis*; 28:1126-7.

Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti R, Carbon C (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.

Wood GC, Hanes SD, Croce MA, Fabian TC, Boucher BA (2002). Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of *Acinetobacter* ventilator associated pneumonia. *Clin Infect Dis*; 34: 1425-30.

Yates RR (1999). New intervention strategies for reducing antibiotic resistance. *Chest*; 115 (3S): 24S-27S.

Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. (2004). *In vitro* double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 48 (3), 753-7.

Zak O, O'Reilly T (1991). Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*; 35: 1527-1531.

Zak O, O'Reilly T (1993). Animal infection models and ethics - the perfect infection model. *J Antimicrob Chemother*; 31 (suppl. D) : 193-205.

Zhao X, Drlica K (2001). Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: A general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis*; 33 (Suppl 3): S147-56.

Zhao X, Drlica K (2002). Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: Measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis*; 185: 561-5.



