



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudio de la Epidemiología Molecular y
Resistencia Antibiótica de Aislamientos
Clínicos de *Acinetobacter baumannii* del
Hospital Clínico Universitario Virgen de la
Arrixaca

D^a. Teresa García Lucas

2016

**ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y
RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* DEL HOSPITAL CLÍNICO
UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA**

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia D^a Teresa
García Lucas para optar al grado de Doctor, en el Área de
Microbiología Clínica

Fdo: Teresa García Lucas

V° B°

El director

V° B°

El director

Genoveva Yagüe Guirao

Carme Salvador García



D^a Genoveva Yagüe Guirao, Profesora Titular de Universidad de Murcia del Área de Microbiología Clínica del Departamento de Genética y Microbiología, y D^a Carme Salvador García, Profesora Asociada de Universidad de Murcia del Área de Microbiología Clínica del Departamento de Genética y Microbiología

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la epidemiología molecular y resistencia antibiótica de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca”, realizada por D^a Teresa García Lucas, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Genética y Microbiología, y que presenta para la obtención del grado de doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de mayo de 2016

Genoveva Yagüe Guirao

Carme Salvador García

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente la ayuda, colaboración y apoyo que muchas personas me han prestado para la realización de esta tesis.

Agradecer ante todo a mis directoras, la Dra. Genoveva Yagüe Guirao y la Dra. Carme Salvador García. Por proponer, apoyar, colaborar y dirigir esta tesis. Por sus correcciones y por su extraordinaria y admirable actividad docente. Les agradezco su permanente estímulo y exigencia sin los cuales esta tesis no hubiera sido posible.

Agradecer al Dr. Manuel Segovia Hernández, por su rigor profesional y por la oportunidad de realizar este proyecto en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

A todo el Servicio de Microbiología y Parasitología: facultativos, residentes y técnicos. Por todo lo que me han enseñado y por la cantidad de buenos ratos que hemos pasado juntos. El trabajo diario junto a todos ellos durante estos años y sus opiniones, microbiológicas o no, han sido muy importantes y enriquecedoras. Su apoyo, colaboración y cariño han sido imprescindibles. En especial, a mis residentes mayores, la Dra. María José Muñoz Dávila y la Dra. Miriam Albert Hernández, por todos sus consejos, su apoyo continuo, por cuidarme tanto y por ser ejemplos a seguir de esfuerzo y superación. También a mis residentes pequeños, Mercedes, Javi y Marina, por animarme todos los días, por estar dispuestos a echarme una mano en cualquier momento y por esos ratitos de desayuno juntos. Gracias a todos por vuestro cariño y amistad. Os voy a echar mucho de menos.

A mis padres y hermanos. Por estar siempre ahí. Por su comprensión, paciencia y por transmitirme la fuerza y el ánimo para terminar esta tesis.

A Dani, por ayudarme en los momentos difíciles, por su comprensión, por conocerme tanto, por ser como es.

A mis amigas de toda la vida, por preocuparse por mí todos los días que ha durado este proyecto, por animarme y porque siempre estáis ahí para lo bueno y lo malo.

A todas las personas que habiéndome prestado su colaboración haya podido omitir de forma involuntaria. A todos simplemente gracias.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
1. Género <i>Acinetobacter</i>: <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	9
1.1. Perspectiva histórica.....	9
1.2. Taxonomía actual.....	10
1.3. Características microbiológicas. Identificación de especies.....	12
1.4. Epidemiología.....	18
1.4.1. Reservorio ambiental.....	18
1.4.2. Reservorio humano.....	20
1.4.3. <i>A. baumannii</i> multirresistente en el hospital.....	21
2. Multirresistencia en <i>A. baumannii</i>. Mecanismos de resistencia.....	25
2.1. Mecanismos de resistencia en <i>A. baumannii</i>	27
2.1.1. Resistencia a betalactámicos.....	29
2.1.2. Resistencia a aminoglucósidos.....	47
2.1.3. Resistencia a quinolonas.....	48
2.1.4. Resistencia a tetraciclinas y glicilciclinas.....	49
2.1.5. Resistencia a polimixinas.....	49
2.1.6. Resistencia a otros antibióticos.....	50
3. Papel patógeno de <i>A. baumannii</i>.....	51
3.1. Factores de patogenicidad.....	51
3.2. Factores de riesgo.....	55
3.3. Infecciones causadas por <i>A. baumannii</i>	56
3.3.1. Modo de adquisición.....	57
3.3.2. Tipo de infecciones.....	59
3.4. Impacto clínico.....	62
3.5. Tratamiento de las infecciones.....	65
3.5.1. Carbapenems.....	68
3.5.2. Sulbactam.....	68
3.5.3. Polimixinas.....	69
3.5.4. Tigeciclina.....	72
3.5.5. Aminoglucósidos.....	74
3.5.6. Rifampicina.....	74
3.5.7. Otros.....	74
3.5.8. Terapia combinada.....	75
4. Brotes nosocomiales de <i>A. baumannii</i>. Epidemiología molecular.....	77
4.1. Brotes nosocomiales.....	77
4.2. Estudios de población de <i>A. baumannii</i>	80
4.3. Epidemiología global.....	81
4.4. Control de la infección nosocomial.....	84
4.5. Epidemiología molecular.....	86
4.5.1. Análisis de plásmidos.....	88

4.5.2. Ribotipificación.....	89
4.5.3. PFGE-RFLP.....	89
4.5.4. Métodos de tipificación basados en PCR.....	91
4.5.5. Análisis AFLP.....	93
4.5.6. MLST.....	94
4.5.7. PCR-ESI-MS.....	96
4.5.8. Genes <i>bla</i> _{OXA-51-like}	97
<hr/>	
II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	99
<hr/>	
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	103
<hr/>	
1. Selección y obtención de los aislamientos de <i>Acinetobacter baumannii</i>	105
2. Identificación y sensibilidad antibiótica.....	105
3. Tipificación molecular de los aislamientos.....	107
3.1. REP-PCR.....	107
3.2. PFGE-RFLP.....	109
3.3. MLST.....	112
4. Detección fenotípica de carbapenemasas mediante el test de Hodge y el Etest® MBL.....	114
5. Detección y caracterización genotípica de oxacilinasas mediante técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	115
6. Detección y caracterización genotípica de metalobetalactamasas mediante técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	117
7. Análisis estadístico.....	119
<hr/>	
IV. RESULTADOS.....	121
<hr/>	
1. Descripción de los aislamientos.....	123
1.1. Aislados de <i>A. baumannii</i>	123
1.2. Procedencia de los aislamientos de <i>A. baumannii</i>	127
1.3. Distribución temporal de los aislamientos de <i>A. baumannii</i>	130
1.4. Estudio de colonización-infección por <i>A. baumannii</i>	131
1.5. Sensibilidad antibiótica de los aislamientos de <i>A. baumannii</i>	132
2. Epidemiología molecular de los aislamientos de <i>A. baumannii</i>	143
2.1. Tipificación molecular mediante REP-PCR.....	144
2.2. Tipificación molecular mediante RFLP-PFGE.....	146
2.3. Estudio de la secuencia tipo (ST) obtenida mediante MLST.....	148
3. Caracterización fenotípica de carbapenemasas.....	153
3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas mediante el Test de Hodge.....	154
3.2. Detección de MBL mediante sinergismo con EDTA (Etest® MBL en Mueller-Hinton E).....	155

3.3. Influencia del medio de cultivo en los resultados del Test de Hodge y el Etest® MBL en los medios MHE y MH2.....	156
4. Caracterización genotípica de carbapenemasas.....	158
4.1. Detección molecular de oxacilinasas mediante PCR.....	158
4.2. Detección de los genes que codifican MBL.....	162
4.2.1. Detección molecular de MBL (VIM, SIM e IMP) mediante PCR.....	162
4.2.2. Detección molecular de oxacilinasas y MBL mediante PCR a tiempo real: Xpert Carba-R.....	163
5. Relación entre los perfiles de resistencia a los antibióticos con los patrones definidos mediante PFGE y la detección de carbapenemasas.....	167
<hr/>	
V. DISCUSIÓN.....	171
<hr/>	
VI. CONCLUSIONES.....	205
<hr/>	
VII. RESUMEN.....	209
<hr/>	
VIII.SUMMARY.....	213
<hr/>	
IX. LISTA DE FIGURAS.....	217
<hr/>	
X. LISTA DE TABLAS.....	221
<hr/>	
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	225

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo (10 ⁻⁶ gramos)
µl	Microlitro (10 ⁻⁶ litros)
3'	Extremo 3' del ADN
5'	Extremo 5' del ADN
A/S	Ampicilina/sulbactam
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
AMG	Aminoglucósidos
AMP	Ampicilina
AZT	Aztreonam
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CAE	Cefalosporinas de amplio espectro
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEF	Cefepime
cfu	Unidades formadoras de colonias
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO	Colistina
CPM	Carbapenems
CTX	Cefotaxima
CV	Catéter venoso
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al</i>	y colaboradores
FOR	<i>Forward</i>
FQ	Fluoroquinolonas
GM	Gentamicina
HCl	Ácido clorhídrico
HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
IMP	Imipenem
INH.FOL	Inhibidores de la síntesis de folato
IPPB	Infección de piel y partes blandas
IS	Secuencia de inserción (<i>Insertion Sequence</i>)
ITU	Infección del tracto urinario
KDa	KiloDaltons (1 KDa=1000 Daltons)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LEV	Levofloxacinó
M	Concentración molar (mol soluto/litro solución)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
MBL	Metalobetalactamasas
MDR	Multirresistente (<i>Multidrug-resistant</i>)
MEM	Meropenem
mg	Miligramo
MH	Agar Mueller-Hinton
min	Minutos
ml	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Concentración milimolar (M/1000)

MN	Minociclina
NaCl	Cloruro sódico
NET	Netilmicina
nm	Nanómetros (10^{-9} metros)
P(ANTIPS)+ INH	Penicilina antipseudomónicas + inhibidor de β -lactamasas
P/T	Piperacilina/tazobactam
P+INH	Penicilina + inhibidor de β -lactamasas
pb	Pares de bases del ADN
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDR	Panresistente (<i>Pandrug-resistant</i>)
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsante (<i>Pulsed- Field Gel Electrophoresis</i>)
pH	$\text{Log } 1/(\text{H}^+) = -\log [\text{H}^+]$
PIP	Piperacilina
PLX	Polimixinas
R	Resistente
r	Sensibilidad disminuida
REA	Unidad de Reanimación
REP-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos de secuencias repetidas (<i>Repetitive Extragenic Palindromic-PCR</i>)
REV	<i>Reverse</i>
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S	Sensible
SNC	Sistema nervioso central
SP	Espectinomicina
ST	Secuencia tipo (<i>Sequence type</i>)

SXT	Cotrimoxazol
TBE	Tris-Borato-EDTA
TC	Tetraciclinas
TG	Tigeciclina
TIC	Ticarcilina
Tris	Trihidroximetilaminometano
U	Unidades
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
V	Voltios
XDR	Extremadamente resistente (<i>Extensively drug-resistant</i>)

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Género *Acinetobacter*: *Acinetobacter baumannii*

1.1. Perspectiva histórica

La historia del género *Acinetobacter* se remonta hasta principios del siglo XX, en 1911, cuando Beijerinck, un microbiólogo holandés, describió un organismo llamado *Micrococcus calcoaceticus* que fue aislado del suelo tras cultivarlo en un medio con calcio-acetato (Beijerinck, 1911). Durante las siguientes décadas, se describieron organismos similares que fueron asignados al menos a 15 géneros y especies diferentes, incluyendo *Diplococcus mucosus* (Von Lingelsheim, 1908), *Micrococcus calcoaceticus* (Beijerinck, 1911), *Alcaligenes haemolysans* (Henriksen, 1973), *Mima polymorpha* (DeBord, 1939), *Moraxella lwoffii* (Audureau, 1940), *Herellea vaginicola* (DeBord, 1942), *Bacterium anitratum* (Schaub y Hauber, 1948), *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* (Piechaud et al., 1951), *Neisseria winogradskyi* (Lemoigne et al., 1952), *Achromobacter anitratus* (Brisou, 1953), y *Achromobacter mucosus* (Mannheim y Stenzel, 1962).

La designación actual del género *Acinetobacter* (del griego ακινετος [akinetos], inmóviles), fue inicialmente propuesta por Brisou y Prévot en 1954 para diferenciar los microorganismos inmóviles de los móviles dentro del género *Achromobacter* (Brisou y Prévot, 1954). Aunque no fue hasta 1968 cuando este nombre fue más ampliamente aceptado (Baumann et al., 1968a). Baumann et al. publicaron un extenso estudio y concluyeron que las diferentes especies mencionadas anteriormente pertenecían a un único género, para el que se propuso el nombre de *Acinetobacter* y, que no era posible realizar más subclasificaciones en diferentes especies basándose en características fenotípicas (Baumann et al., 1968a). Estos resultados permitieron el reconocimiento oficial del género *Acinetobacter* por el "Subcomité sobre la taxonomía de *Moraxella* y bacterias relacionadas" en 1971 (Lessele, 1971). En la edición de 1974 del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Lautrop, 1974), el género *Acinetobacter* estaba en la lista, con la descripción de una sola especie, *Acinetobacter calcoaceticus*. En el

documento “Approved List of Bacterial Names”, en contraste, se incluían dos especies diferentes, *A. calcoaceticus* y *A. Iwoffii*, basándose en el hecho de que algunos *Acinetobacter* eran capaces de acidificar la glucosa mientras que otros no (*Skerman et al., 1980*). En la literatura y según las mismas propiedades, la especie *A. calcoaceticus* fue subdividida en dos subespecies o biovares, *A. calcoaceticus* *bv. anitratus* (anteriormente llamado *Herellea vaginicola*) y *A. calcoaceticus* *bv. Iwoffii* (anteriormente llamado *Mima polymorpha*). Sin embargo, estas designaciones nunca fueron oficialmente aprobadas por taxónomos.

1.2. Taxonomía actual

En las últimas décadas la taxonomía del género *Acinetobacter* se ha sometido a un amplio desarrollo. En 1986 se logró un gran avance en la larga y complicada historia del género. Bouvet y Grimont, basándose en estudios de hibridación DNA-DNA (DDH), diferenciaron 12 grupos de DNA o genoespecies, algunos de los cuales recibieron nombres de especies, incluyendo *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* y *A. Iwoffii* (*Bouvet y Grimont, 1986*). El trabajo realizado por Bouvet y Jeanjean, Tjernberg y Ursing, y Nishimura *et al.* (*Bouvet y Jeanjean, 1989; Nishimura et al., 1988; Tjernberg y Ursing, 1989*) dio lugar a la descripción de más especies de *Acinetobacter*, aunque algunas de las especies descritas como diferentes resultaron ser iguales. Por ejemplo, *A. Iwoffii* y *Acinetobacter* genoespecie 9 o *Acinetobacter* genoespecie 14, descrita por Bouvet y Jeanjean (14BJ) y *Acinetobacter* genoespecie 13, descrita por Tjernberg y Ursing (13TU).

En 1991, mediante datos taxonómicos, se propuso que los miembros del género *Acinetobacter* debían ser clasificados en la nueva familia *Moraxellaceae* dentro del orden Gammaproteobacteria, que incluye los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y organismos relacionados (*Rossau et al., 1991*).

Posteriormente, se describieron 10 especies más de *Acinetobacter*, incluyendo 3 especies de origen humano, *A. parvus*, *A. schindleri*, y *A. ursingii* (Nemec et al., 2001; Nemec et al., 2003) y 7 especies aisladas de fangos activados (recuperados de plantas de aguas residuales) llamadas *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii*, y *A. gernerii* (Carr et al., 2003), incrementando el número actual de especies genómicas válidamente descritas.

Cuatro de las especies nombradas anteriormente, están estrechamente relacionadas y son difíciles de distinguir unas de otras mediante propiedades fenotípicas. Estas especies son *Acinetobacter calcoaceticus*, especie ambiental aislada de suelos y aguas, y rara vez de muestras clínicas humanas; *Acinetobacter baumannii*, la especie de mayor importancia clínica y epidemiológica (Karageorgopoulos y Falagas, 2008; Peleg et al., 2008); y dos especies genómicas a las que se les ha asignado nombre recientemente, *Acinetobacter pittii* (Nemec et al., 2011) (anteriormente geno especie 3) (Bouvet y Grimont, 1986) y *Acinetobacter nosocomialis* (Nemec et al., 2011) (anteriormente geno especie 13TU) (Tjernberg y Ursing, 1989). Debido a su alta similitud, se ha propuesto referirse a estas cuatro especies como el complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) (Gerner-Smidt et al., 1991). Desde una perspectiva clínica, esto podría no ser apropiado, ya que el complejo combina tres de las especies de mayor relevancia clínica (*A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*) con una especie ambiental (*A. calcoaceticus*). Posteriormente, mediante hibridación DNA-DNA se definieron otros dos grupos pequeños dentro del complejo ACB, que se denominan "between 1 y 3" y "close to 13TU" (Gerner-Smidt y Tjernberg, 1993).

Actualmente, el género comprende 32 especies con nombres válidos (www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html) y 8 especies genómicas que han sido definidas por hibridación DNA-DNA (Dijkshoorn et al., 2007). De todas éstas, la que se ha identificado con más frecuencia es *A. baumannii*. Recientemente se ha comprobado la participación de *A. nosocomialis* y de *A. pittii* en infecciones nosocomiales, pero con

menor mortalidad asociada que *A. baumannii* (Chuang et al., 2011; Wisplinghoff et al., 2012).

1.3. Características microbiológicas. Identificación de especies

El género *Acinetobacter* sp. está constituido por cocobacilos Gram-negativos, aerobios estrictos, catalasa-positiva, oxidasa-negativa, inmóviles y no fermentadores. Son bacilos cortos y difíciles de decolorar, por lo que, mediante la tinción de Gram pueden ser identificados tanto como cocos Gram-negativos como Gram-positivos (Figura 1). Las especies de *Acinetobacter* de origen humano crecen bien en los medios de cultivo habitual, tales como agar sangre de oveja o agar tripton de soja, incubándolos a 37°C. Estos organismos forman colonias lisas, a veces mucosas, de color blanco grisáceo. Las colonias del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* se asemejan a las de la familia *Enterobacteriaceae*, con un diámetro de 1.5 a 3 mm después de incubar durante la noche, mientras que la mayoría de las otras especies de *Acinetobacter* producen colonias más pequeñas y más translúcidas. A diferencia de las enterobacterias, algunas especies de *Acinetobacter* no pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, no crecen en agar McConkey. Los aislamientos de la especie *A. haemolyticus* y otras especies, aún no bien definidas, como *Acinetobacter* genoespecie 6, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16 y 17, pueden mostrar hemólisis en Agar sangre de oveja, una propiedad que no está presente en los aislamientos de *Acinetobacter* pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Peleg et al., 2008).

Para la recuperación "selectiva" de *Acinetobacter* de muestras clínicas, muestras de colonización y muestras ambientales, demostró ser útil el cultivo de enriquecimiento a pH bajo en un medio mineral líquido aireado suplementado con acetato u otra fuente de carbono adecuada y con nitrato como fuente de nitrógeno (Baumann, 1968b). Existe un medio selectivo que facilita el aislamiento de *Acinetobacter* de poblaciones mixtas bacterianas, el medio LAM "Leeds *Acinetobacter* Medium" (Jawad et al., 1994).

La identificación de *A. baumannii* es compleja y es difícil diferenciar mediante métodos fenotípicos el género *Acinetobacter* de otras bacterias Gram-negativas no fermentadoras similares.

Existe un esquema de identificación fenotípica propuesto y modificado por Bouvet y Grimont basado en 28 pruebas fenotípicas que incluyen el crecimiento a 37°C, 41°C y 44°C, la producción de ácido de glucosa, la hidrólisis de gelatina, y la asimilación de 14 fuentes de carbono distintas (Bouvet y Grimont, 1987). En un estudio realizado por Seifert *et al.*, este esquema de identificación simplificada permitió la discriminación entre 11 de las 12 genoespecies inicialmente descritas e identificó correctamente a nivel de especie el 95,6% de los 136 aislados estudiados de *Acinetobacter* procedentes de muestras de piel humana (Seifert *et al.*, 1997). En cambio, no permitió la identificación de las genoespecies más recientemente descritas. En particular, las especies más importantes en clínica, *A. baumannii* y *Acinetobacter* genoespecie 13 TU, no se pueden distinguir mediante este esquema, mientras que *A. calcoaceticus* y *Acinetobacter* genoespecie 3 sólo pueden diferenciarse por sus propiedades de crecimiento a diferentes temperaturas (Gerner-Smidt *et al.*, 1991). Desafortunadamente, las pruebas fenotípicas simples que son comúnmente utilizadas en los laboratorios de diagnóstico para la identificación a nivel de especie de otros géneros bacterianos son inadecuadas para la identificación inequívoca de las especies de *Acinetobacter* más comunes.

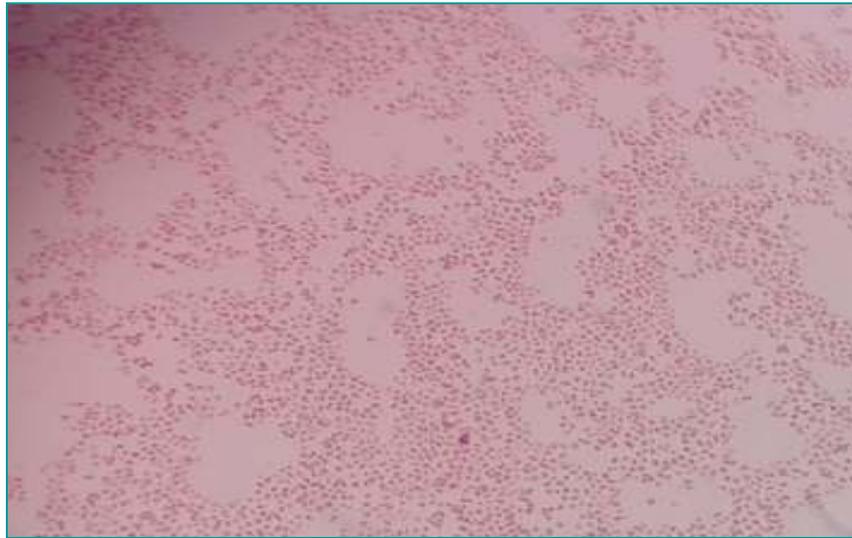


Figura 1. Tinción de Gram de *A. baumannii*.

La hibridación DNA-DNA es de los pocos métodos que han sido validados para la identificación de especies de *Acinetobacter* y sigue siendo el método de referencia (Bouvet y Grimont, 1986).

Tanto la hibridación DNA-DNA como el sistema de identificación fenotípica de Bouvet y Grimont son métodos laboriosos y no son adecuados para los laboratorios de microbiología clínica (Bouvet y Grimont, 1987). De hecho, estos métodos están disponibles sólo en unos pocos laboratorios de referencia en todo el mundo. Por tanto, la diferenciación fenotípica de *A. baumannii* de otras genopecies pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* resulta prácticamente imposible con los métodos fenotípicos convencionales de identificación bacteriana.

La identificación de especies con los sistemas comerciales de identificación manual y semiautomatizada que se utilizan actualmente, tales como el API 20NE (BioMérieux, La Balme Les Grottes, France), Vitek 2 (BioMérieux, La Balme Les Grottes, France), Phoenix (Becton Dickinson), y los sistemas de MicroScan Walkaway (Dade MicroScan), también son insatisfactorios (Bernards et al., 1995; Bernards et al., 1996; Horrevorts et al., 1995). Esto puede ser debido, en parte, a su limitada base de datos y también al hecho de que los substratos utilizados para la identificación de las especies

bacterianas no han sido adaptados específicamente para identificar *Acinetobacter*. Con el uso de estos sistemas, las tres especies clínicamente más relevantes del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* no pueden ser diferenciadas; de hecho, *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii* (anteriormente *Acinetobacter* genoespecie 3), y *Acinetobacter nosocomialis* (anteriormente *Acinetobacter* genoespecie 13TU) se identifican de manera uniforme como *A. baumannii*. Por lo tanto, al referirse a estas especies parece apropiado utilizar el término de grupo *A. baumannii* en lugar de complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* ya que estas especies comparten características clínicas y epidemiológicas importantes (Dijkshoorn et al., 1993; Lim et al., 2007; Seifert y Gerner-Smidt, 1995) y también elimina la confusión resultante de la inclusión de especies ambientales como *A. calcoaceticus*.

Para poder diferenciar las genoespecies de este complejo, así como otras especies de *Acinetobacter*, se requiere el uso de métodos moleculares de identificación bacteriana. Actualmente están disponibles varios métodos genotípicos como el análisis de restricción del gen 16S ARNr [ARDRA, "amplified 16S ribosomal RNA (rRNA) restriction analysis"] (Vanechoutte et al., 1995) (**Figura 2**), el análisis de huellas de alta resolución mediante amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP, "amplified fragment length polymorphism") (Janssen et al., 1997; Nemeč et al., 2001) (**Figura 2**), ribotipificación (Gerner-Smidt, 1992), huella del ARNt espaciador (Ehrenstein et al., 1996), análisis de restricción de las secuencias intergénicas 16S-23S ARNr (Dolzani et al., 1995), análisis de secuencias de la región espaciadora del gen ARNr 16S-23S (Chang et al., 2005), y el análisis de la secuencia del gen *rpoB* y los espaciadores que la flanquean (La Scola et al., 2006). ARDRA y el análisis AFLP son actualmente los métodos de referencia más ampliamente aceptados y validados para la identificación de especies de *Acinetobacter*, con una gran biblioteca de perfiles disponible tanto para cepas de referencia como para cepas clínicas, mientras que la huella del ARNt espaciador aunque, por lo general, también es adecuado para la identificación de especies, no discrimina entre *A. baumannii* y *Acinetobacter* genoespecie 13TU. Tanto la ribotipificación como el análisis de la región espaciadora

del gen ARNr 16S-23S discriminan entre las especies del complejo *A. calcoeticus*-*A. baumannii*, pero no se han aplicado a otras especies de *Acinetobacter*, y la secuenciación del gen *rpoB*, aunque es muy prometedora, se tiene que validar. Todos estos métodos han contribuido a una mejor comprensión de la epidemiología y la importancia clínica de las especies de *Acinetobacter* durante los últimos años, pero son demasiado laboriosos para ser aplicados en el día a día de la microbiología diagnóstica y su uso, hasta el momento, se limita principalmente a los laboratorios de referencia.

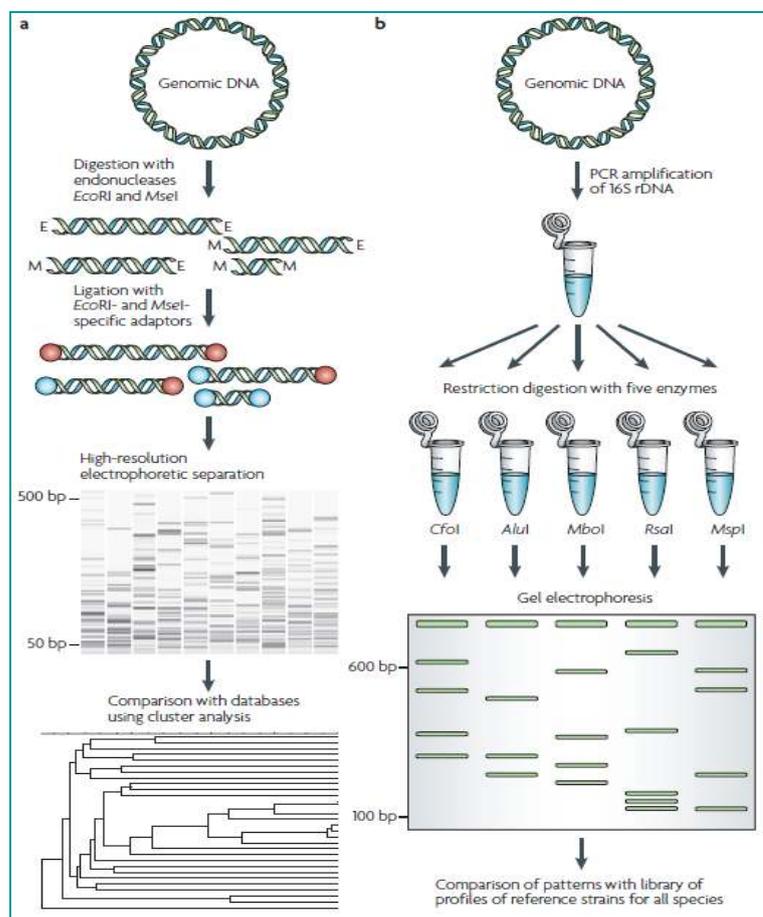


Figura 2. Métodos genotípicos para la identificación de *Acinetobacter*. A) AFLP, B) ARDRA. (Dijkshoorn et al., 2007).

Se han desarrollado nuevos métodos que incluyen la identificación de *A. baumannii* mediante la detección del gen *bla*_{OXA-51-like}, un gen intrínseco en esta especie que codifica una carbapenemasa (Turton et al., 2006a), la espectrometría de

masas de los productos de ionización por "electrospray" (PCR-ESI-MS) (Ecker *et al.*, 2006), y un método simple basado en la PCR descrito por Higgins *et al.* (Higgins *et al.*, 2007) que estudia las diferencias entre los genes *gyrB* de *A. baumannii* y *Acinetobacter* genoespecie 13TU para diferenciarlas rápidamente. Se han obtenido resultados prometedores con espectrometría de masas MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight").

La identificación de los microorganismos mediante MALDI-TOF se basa en la comparación del espectro proteico generado con una base de datos de referencia de perfiles proteicos. No requiere un procedimiento previo de extracción ya que se utiliza directamente una colonia bacteriana o incluso, se puede realizar directamente desde una muestra clínica y es una técnica rápida (aprox. 90 microorganismos/hora). Permite la identificación a nivel de género y especie, en ocasiones subespecies. En un estudio publicado en 2014, mediante MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper) se identificó con precisión el 98,6% (142/144) de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, el 72,4% (63/87) de *A. nosocomialis*, y el 97,6% (41/42) de *A. pittii* (Hsueh *et al.*, 2014). Recientemente se ha realizado un estudio por Lee *et al.* en el que se comparan tres sistemas: el Vitek®MS (BioMérieux, La Balme Les Grottes, France), Vitek®2 (BioMérieux, La Balme Les Grottes, France) y MicroScan® (Siemens). En él se analizan 187 aislamientos y concluyen que el sistema Vitek®MS es superior a Vitek®2 y Microscan® en la identificación de *Acinetobacter* de hemocultivos, con menos errores en la identificación y mayor discriminación entre los aislamientos pertenecientes al grupo de *Acinetobacter* de los no pertenecientes a este grupo. (Lee *et al.*, 2015).

La necesidad de identificación de especies de *Acinetobacter* en los laboratorios clínicos ha sido cuestionada por algunos investigadores (Gerner-Smidt *et al.*, 1991). Desde el punto de vista del control clínico y de las infecciones, sin embargo, es necesario distinguir entre las especies del grupo *A. baumannii* y las especies que no se encuentran en este grupo, ya que estos últimos microorganismos rara vez están implicados en infecciones, son generalmente sensibles a una amplia variedad de

antimicrobianos, y las infecciones que causan son a menudo leves. Desde la perspectiva de la investigación, los estudios clínicos con métodos adecuados para la identificación de las especies de *Acinetobacter*, incluidas las del grupo *A. baumannii*, son obligatorios para conocer mejor la epidemiología, patogenia, sensibilidad antibiótica y resultados clínicos de las distintas especies de este género tan diverso (Dijkshoorn et al., 2007; Lee et al., 2011a; Lee et al., 2011b; Wisplinghoff et al., 2012).

1.4. Epidemiología

La mayoría de especies de *Acinetobacter* se han aislado de muestras clínicas y, aunque no todas se han considerado clínicamente significativas, casi todas han tenido alguna significación como patógenos humanos y es importante definir cuál es su reservorio: ambiental y/o humano.

La investigación epidemiológica de *A. baumannii* se ha producido principalmente en el contexto del entorno clínico, siendo muy poco conocidos los reservorios ambientales potenciales de este organismo

1.4.1. Reservorio ambiental

Los miembros del género *Acinetobacter* se consideran organismos ambientales desde que se demostró que las especies pertenecientes a este género se pueden recuperar de todas las muestras obtenidas de suelo y aguas superficiales mediante un cultivo de enriquecimiento (Baumann, 1968b). Estos hallazgos han contribuido a la idea errónea de que *A. baumannii* está omnipresente en la naturaleza (Fournier y Richet, 2006).

Varias especies de *Acinetobacter* tienen su hábitat en suelo y agua. *Acinetobacter* genoespecie 3, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, y *Acinetobacter* genoespecie 11 se han aislado de suelo, medios acuáticos, plantas de

tratamiento de aguas residuales (Berlau et al., 1999a) y de lodos activados (Carr et al., 2001; Okabe et al., 2010; Peleg et al., 2008). *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. towneri*, y *A. tandoii* se encuentran comúnmente en ambientes naturales pero ocasionalmente se han aislado de lodos activados y no se han encontrado asociados con humanos (Chen et al., 2008; Peleg et al., 2008).

A. baumannii se ha descrito como un microorganismo propio del suelo, pero probablemente las especies de *Acinetobacter* aisladas en el suelo y en el agua correspondan a otras especies no identificadas y no *A. baumannii*. De hecho, hay poca evidencia de que *A. baumannii* sea un residente típico del suelo. Todos estos datos indican, que *A. baumannii* tiene una baja prevalencia en la comunidad y que su presencia en el medio ambiente es escasa.

Acinetobacter spp. también se ha relacionado con contaminación de alimentos. Se ha aislado de verduras, frutas y tubérculos (Berlau et al., 1999a; Peleg et al., 2008). Estas bacterias también se han implicado en el deterioro de carne, pescado y huevos, incluso cuando se almacenan en condiciones adecuadas de refrigeración o después de la irradiación gamma adecuada (Peleg et al., 2009; Towner, 2006). Varios estudios que analizan las verduras procedentes de Reino Unido y Hong Kong muestran que el 17% y 51%, respectivamente, de las verduras analizadas fueron positivas para el cultivo de *Acinetobacter* (Berlau et al., 1999b; Houang et al., 2001).

Acinetobacter baumannii se ha asociado con infección y diseminación epidémica en animales (Boerlin et al., 2001). Se ha encontrado ocasionalmente como agente etiológico de septicemias en pollos y mastitis en vacas (Francey et al., 2000; Vanechoutte et al., 2000), aunque nunca se ha estudiado sistemáticamente la presencia de estos microorganismos como parte de su flora normal.

Hay pocos datos disponibles en cuanto a la incidencia medioambiental de *A. baumannii*, y de otras especies del género, pero se han encontrado en porcentajes

variables en vegetales, pescado, carne y en el suelo (Berlau et al., 1999a; Carr et al., 2001; Chen et al., 2008; Okabe et al., 2010; Peleg et al., 2008; Towner, 2006). No obstante, aún no está claro si estos hallazgos hacen referencia a un reservorio ambiental de *A. baumannii* o reflejan el contacto con humanos o animales colonizados y/o infectados.

En conclusión, la mayoría de las especies del género *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genoespecie 3, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens* y *Acinetobacter* genoespecie 11) son microorganismos que se encuentran en el ambiente (agua, plantas, vegetales y suelo). Sin embargo, aunque algunos estudios han encontrado *A. baumannii* en muestras de suelo (Houang et al., 2001) y en verduras, no parece ser un microorganismo ubicuo y no se observa con frecuencia en la naturaleza (Peleg et al., 2008).

1.4.2. Reservorio humano

Acinetobacter es parte de la flora de piel humana y puede colonizar la cavidad oral, faringe e intestino (Anstey et al., 2002; Chu et al., 1999). Hasta un 43% de los individuos no hospitalizados están colonizados por este microorganismo (Berlau et al., 1999b) y un 25% son portadores fecales (Dijkshoorn et al., 2005). El porcentaje de pacientes colonizados en un hospital pueden llegar a ser del 75% (Savov et al., 2002). Las especies que se aíslan con más frecuencia son *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus* y *Acinetobacter* genoespecie 3 y 13.

En dos estudios europeos, *A. lwoffii* fue la especie aislada con más frecuencia de la piel de individuos sanos, con índices de portadores del 29% y 58% (Berlau et al., 1999b; Seifert et al., 1997). La tasa de portadores de *Acinetobacter* (incluyendo gen. sp. 13TU) osciló del 0,5 a 3%, mientras que para la gen. sp. 3 las tasas variaron de 2 a 6% (Berlau et al., 1999b; Seifert et al., 1997). En pacientes hospitalizados la tasa de

portadores de las especies de *Acinetobacter* fue superior, un 75% (Seifert *et al.*, 1997). Dijkshoorn *et al.* estudiaron la colonización fecal por *Acinetobacter* y encontraron una tasa de portadores del 25% entre individuos sanos predominando *A. johnsonii* y *Acinetobacter* genoespecie 11. Por el contrario, *A. baumannii*, se encontró rara vez en las heces humanas (0,8%) (Dijkshoorn *et al.*, 2005), y *Acinetobacter* genoespecie 13TU no se aisló (Berlau *et al.*, 1999b; Dijkshoorn *et al.*, 2005; Seifert *et al.*, 1997). En un estudio en Hong Kong, las tasas de portadores de *A. baumannii*, gen. sp. 3 y gen. sp. 13TU en la piel de individuos sanos fue del 4, 32 y 14%, respectivamente (Chu *et al.*, 1999). Así, las tasas de portadores de gen. sp. 3 y gen. sp. 13TU en este estudio fueron notablemente superiores que en los estudios europeos.

Estos hallazgos indican que, al menos en Europa, las tasas de colonización por *A. baumannii* en la comunidad son relativamente bajas.

Se ha observado también variabilidad estacional en la colonización por *Acinetobacter* spp. En Hong Kong, Chu *et al.* mostraron un porcentaje mayor de colonización durante el verano (53% de los estudiantes de medicina y enfermeras colonizados) frente a un 32% en invierno (Chu *et al.*, 1999). Tal variabilidad estacional en la colonización de la piel explica la variación estacional observada en la prevalencia de *A. baumannii* en muestras clínicas (McDonald *et al.*, 1999).

A. baumannii coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico o debilitados por sus comorbilidades, siendo una bacteria común en unidades de cuidados intensivos y unidades de quemados.

1.4.3. *A. baumannii* multirresistente en el hospital

La característica más importante de *A. baumannii* es la aparición epidémica y endémica de cepas multirresistentes en el hospital. Las cepas epidémicas suelen ser

introducidas en el hospital por un paciente colonizado, a partir del cual la cepa puede extenderse a otros pacientes y al ambiente.

Un esquema que representa la dinámica de *A. baumannii* en una planta de hospitalización se muestra en la **figura 3**. Una cepa epidémica pertenece generalmente a un paciente que está colonizado. Una vez en la planta, la cepa puede extenderse a otros pacientes y su entorno. *A. baumannii* puede sobrevivir en condiciones secas (Jawad et al., 1998) y durante los brotes se ha recuperado de varios sitios en el entorno de los pacientes, incluyendo cortinas de la cama, muebles y el equipamiento del hospital (van den Broek et al., 2006). Estas observaciones, así como el éxito que la limpieza y la desinfección de las habitaciones de los pacientes han tenido en la disminución de los brotes destacan el papel del medio hospitalario como reservorio para *A. baumannii* durante los brotes. Las bacterias se pueden diseminar a través del aire a distancias cortas mediante gotitas de agua y a través de la descamación de la piel de los pacientes que están colonizados (Bernards et al., 1998), pero el modo más común de transmisión es a través de las manos del personal sanitario. Los pacientes que están colonizados o infectados por una determinada cepa *A. baumannii* pueden tener esta cepa en diferentes partes del cuerpo durante días e incluso semanas (Dijkshoorn et al., 1987), y la colonización puede pasar desapercibida si no se aisló el microorganismo en las muestras clínicas (Dijkshoorn et al., 1989; Joly-Guillou, 2005).

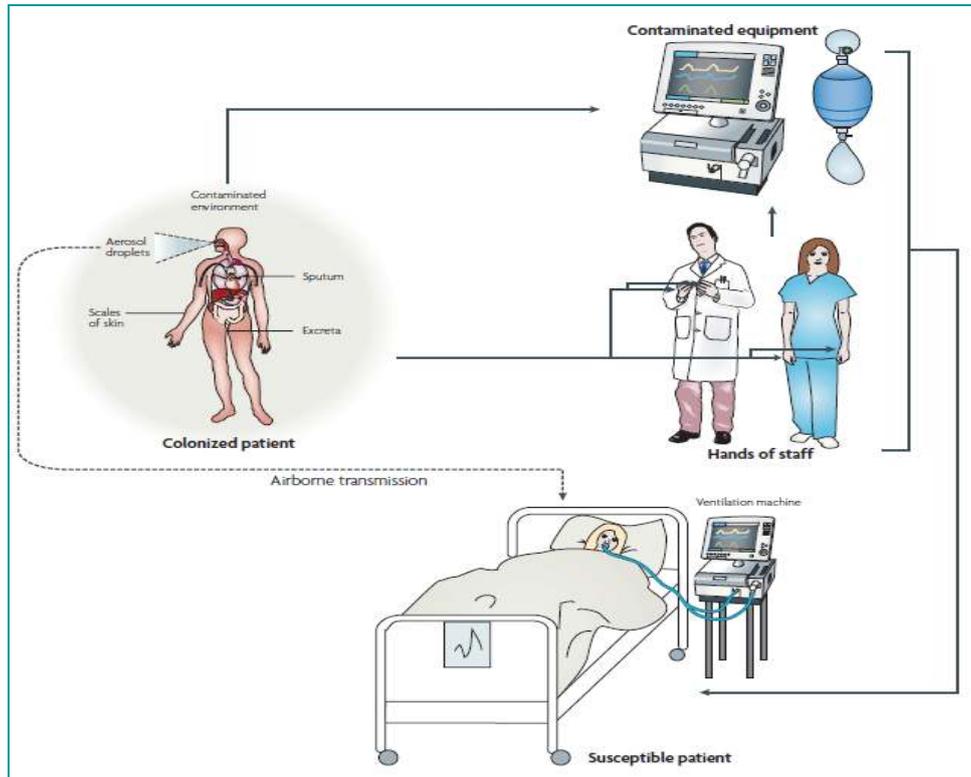


Figura 3. Visión general de la dinámica entre pacientes, bacterias y ambiente hospitalario (Diikshoorn et al., 2007).

El ambiente hospitalario constituye un reservorio y una fuente de infección para el paciente ingresado (López-Cerero, 2014). Hay tres factores principales que posiblemente contribuyen a la capacidad de *A. baumannii* para persistir durante largos periodos de tiempo en el ambiente hospitalario: la resistencia a los principales antimicrobianos, a la desecación, y a los desinfectantes. La facilidad que *A. baumannii* tiene para desarrollar resistencia a los antimicrobianos, incluyendo los de amplio espectro, como los carbapenems, colistina y tigeciclina puede proporcionar a ciertas cepas una ventaja selectiva en ciertos lugares, como las unidades de cuidados intensivos, donde los microorganismos se enfrentan a una gran exposición a los antimicrobianos (Kempf y Rolain, 2012; Pérez et al., 2007).

La tolerancia a la desecación de *A. baumannii*, ha sido demostrada en algunos estudios. Jawad *et al.* compararon los tiempos de supervivencia en cubreobjetos de vidrio de 22 cepas aisladas de ocho brotes hospitalarios bien definidos con los tiempos de supervivencia de 17 cepas esporádicas. La media general de tiempo de supervivencia fue de 27 días, con un rango de 21 a 33 días (Jawad *et al.*, 1998). No hubo diferencias en los tiempos de supervivencia entre las cepas del brote y esporádicas; todas las cepas de *A. baumannii* estudiadas tienen la capacidad de sobrevivir durante mucho tiempo en superficies secas y por lo tanto, un mayor potencial de propagación epidémica. También se ha demostrado que las cepas de *A. baumannii* sobreviven a la desecación mucho mejor que otras especies de *Acinetobacter*, tales como *A. johnsonii*, *A. junii* y *A. lwoffii* (Jawad *et al.*, 1996; Musa *et al.*, 1990). Esto, junto con su mayor sensibilidad a los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, puede explicar el por qué las cepas de *Acinetobacter* pertenecientes a estas especies han sido implicadas muy raramente en los brotes hospitalarios. La mayoría de las cepas de *A. baumannii* tuvieron tiempos de supervivencia que eran considerablemente más largos que los encontrados para *Escherichia coli* y otras enterobacterias, pero similares a los observados para *Staphylococcus aureus*. Estas observaciones, así como la transmisión aérea de *Acinetobacter* spp. en salas de hospital (Allen y Green, 1987; Bernards *et al.*, 1998), pueden explicar la aparición de repetidos brotes después de la desinfección incompleta de superficies secas contaminadas. La supervivencia prolongada de *A. baumannii* en un entorno clínico, por ejemplo, en los rieles de las camas, se ha asociado con un brote en curso en una UCI y muestra que los vectores secos pueden ser reservorios secundarios donde *A. baumannii* puede sobrevivir (Catalano *et al.*, 1999). Se ha especulado que la resistencia a los desinfectantes puede contribuir también a la epidemicidad del organismo en un entorno clínico, pero la asociación de la resistencia a los biocidas y la tendencia a la propagación de la epidemia nunca ha sido estudiada sistemáticamente.

2. Multirresistencia en *A. baumannii*. Mecanismos de resistencia

En los últimos años se está produciendo a nivel mundial un preocupante aumento en la resistencia de *A. baumannii* a los antimicrobianos (Gales et al., 2011; Miyakis et al., 2011; Rhomberg y Jones, 2009; Rodloff et al., 2008; Turner, 2009), con la alarmante aparición de cepas que son resistentes a prácticamente todos los antibióticos disponibles (Pérez et al., 2007). Este organismo es, por lo general, intrínsecamente resistente a un número de antibióticos de uso común, incluyendo aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y cloranfenicol (Seifert et al., 1993a; Vila et al., 1993). También tiene una notable capacidad para adquirir mecanismos que confieren resistencia a betalactámicos de amplio espectro, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas (Bergogne-Bérézín y Towner, 1996).

Hasta la década de los años 70 las cepas de *A. baumannii* eran sensibles a los antimicrobianos, pero por factores tanto propios como externos han desarrollado multirresistencia (MR). Estas cepas MR son resistentes a 3 o más familias de antibióticos, todas las penicilinas y cefalosporinas (incluyendo las combinaciones con inhibidores de las betalactamasas), fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Si además son resistentes a los carbapenems reciben el nombre de extremadamente resistentes (XDR), y si amplían la resistencia a colistina y tigeciclina se las denomina panresistentes (PDR) (Falagas y Karageorgopoulos, 2008).

La emergencia de especies de *Acinetobacter baumannii* multirresistente (ABMR) se debe tanto a la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos de amplio espectro como a la transmisión de cepas entre pacientes, aunque la contribución relativa de cada mecanismo no está aún clara (Bonomo y Szabo, 2006; Maragakis y Perl, 2008). Un factor importante que favorece la aparición de multirresistencia es la capacidad de adquirir y acumular genes de resistencia que codifican diferentes mecanismos de resistencia como betalactamasas (Damier-Piolle et al., 2008). En el proceso de adquisición de estos genes son de gran importancia los

elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones (González *et al.*, 2004). Adicionalmente, la membrana externa de *A. baumannii* posee una baja permeabilidad a ciertos antimicrobianos y, de manera constitutiva, expresa bombas de expulsión, lo cual se traduce en una menor sensibilidad a los antimicrobianos.

Esta tendencia a la multirresistencia es difícil de cuantificar a nivel global debido a la escasez de estudios de vigilancia a gran escala desde la década de 1970 a la década de 1990 y las dificultades en la comparación de los informes locales. Las tasas de resistencia pueden variar según el país y el hospital, y dependerá de factores biológicos, epidemiológicos o metodológicos. Desde un punto de vista más local las tasas de resistencia, sobre todo a carbapenems, son muy variables, dependiendo del área geográfica (Gales *et al.*, 2011; Miyakis *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2007; Rhomberg y Jones, 2009; Rodloff *et al.*, 2008; Turner, 2009). En algunos países europeos y del continente asiático la situación actual es alarmante debido a la circulación de clones de *A. baumannii* panresistentes o extremadamente resistentes que producen infecciones para las que no hay alternativas terapéuticas eficaces (Chen *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010). Después de realizarse el primer estudio nacional multicéntrico en España (GEIH-Ab 2000) (Fernández-Cuenca *et al.*, 2004) para determinar la sensibilidad antimicrobiana en *A. baumannii*, solo se han realizado algunos estudios en los que se ha analizado la actividad antimicrobiana o la situación de la resistencia antimicrobiana desde una perspectiva global (Gimeno *et al.*, 2010; Guembe *et al.*, 2008; Picazo *et al.*, 2006; Villalón *et al.*, 2011). Por ejemplo, las pruebas de sensibilidad local, sin corrección de las cepas epidémicas multirresistentes predominantes, tiende a sobreestimar el nivel de resistencia (Seifert *et al.*, 2006). También se ha mostrado que los aislados multirresistentes de áreas geográficamente distantes pueden estar relacionados clonalmente, mientras que las cepas sensibles son genotípicamente heterogéneas (Dijkshoorn *et al.*, 1996; Nemec *et al.*, 1999) lo que sugiere que el problema de la resistencia podría estar asociado con un número limitado de linajes de *A. baumannii*.

Como se ha comentado anteriormente, existen problemas en la evaluación de la literatura publicada sobre la epidemiología de ABMR. La mayoría de los estudios de vigilancia indican los porcentajes de cepas sensibles (o resistentes) a una variedad de antibióticos. Sin embargo, pocos evalúan el porcentaje de resistentes a múltiples antibióticos. Por otra parte, cuando se han producido dichas evaluaciones, se han utilizado una variedad de definiciones de multirresistencia. Este hecho ha obstaculizado claramente la comparación de la epidemiología de ABMR en diferentes regiones del mundo (*Peleg et al., 2008*).

2.1. Mecanismos de resistencia en *A. baumannii*

Se han descrito una amplia variedad de mecanismos de resistencia a antimicrobianos para *A. baumannii* (*Pérez et al., 2007; Poirel y Nordmann, 2006a*). A pesar de las dificultades para estimar la tendencia a la resistencia, el potencial de *A. baumannii* para desarrollar resistencia contra prácticamente todos los fármacos disponibles es incuestionable. El rápido surgimiento global de cepas de *A. baumannii* resistentes a todos los betalactámicos, incluyendo carbapenems, muestra la capacidad de este organismo para responder con rapidez a los cambios en la presión selectiva del medio ambiente (*Peleg et al., 2008*). Esta resistencia a carbapenems, betalactámicos de amplio espectro que se introdujeron en 1985 y que, desde hace años, han sido los agentes más importantes para el tratamiento de infecciones por ABMR, es de particular preocupación. Aunque los aislados clínicos de *A. baumannii* mostraron ser sensibles a estos fármacos en los primeros estudios (*Seifert et al., 1993a; Vila et al., 1993*), los brotes hospitalarios causados por cepas resistentes a carbapenems ya se habían informado a principios de 1990s (*Tankovic et al., 1994*) y, en la actualidad, la frecuencia de estas cepas en algunas áreas puede exceder del 25% (*Turner y Greenhalgh, 2003*). También se ha descrito la resistencia a la polimixina (*Li et al., 2006a*) y tigeciclina (*Peleg et al., 2007a*), lo que indica que *A. baumannii* puede causar infecciones que son completamente refractarias al arsenal antimicrobiano disponible.

La resistencia de *A. baumannii* a los antibióticos está mediada por todos los principales mecanismos de resistencia conocidos en bacterias incluyendo la modificación de los sitios diana, inactivación enzimática, eflujo activo y disminución de la entrada de fármacos. Algunos los posee de forma innata y otros son adquiridos.

Un estudio realizado por Fournier *et al.* describe las secuencias del genoma de aislamientos de *A. baumannii* sensibles y de resistentes. En él demuestra la presencia de gran cantidad de genes de resistencia en este organismo (Fournier *et al.*, 2006). En la cepa resistente se identificó una isla de resistencia denominada AbaR1. La mayoría de los marcos de lectura (ORF, "open reading frames") en esta región genómica, se originaron a partir de otros organismos Gram-negativos. En total se identificaron 52 genes de resistencia, y 45 de ellos (86,5%) fueron localizados en la isla de resistencia AbaR1 (Fournier *et al.*, 2006). El entorno genético de estos determinantes de resistencia proporciona más evidencia de la diversidad genética, con una amplia gama de elementos genéticos móviles identificados, entre ellos tres integrones de clase 1 (Figura 4), transposones, y la secuencia de inserción (IS). Se estudió una cepa sensible de *A. baumannii* (SDF) de la misma región geográfica. Se identificó una estructura similar (AbaG1) en el ORF tipo ATPasa homólogo, pero carecía de los determinantes de resistencia (Fournier *et al.*, 2006). Para evaluar si este punto caliente se conserva entre las cepas de *A. baumannii*, se seleccionaron otras 22 cepas clínicas. Setenta y siete por ciento tenía una ORF ATPasa intacta, sin embargo, también tenía un fenotipo de multiresistencia (Fournier *et al.*, 2006), lo que indica que los determinantes de resistencia se pueden insertar en otras áreas del genoma. Del mismo modo, la secuencia publicada del genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 demostró una amplia gama de marcadores de resistencia, pero sólo uno dentro de la ubicación homóloga a la descrita por Fournier *et al.*, que muestra de nuevo la flexibilidad genética de este patógeno (Smith *et al.*, 2007).

Actualmente, se sabe que los transposones son importantes en la diseminación de los determinantes genéticos de resistencia en *Acinetobacter spp.* (Devaud *et al.*,

1982; Palmen y Hellingwerf, 1997). Muchos de estos transposones contienen integrones (predominantemente de clase 1). Los integrones son elementos genéticos móviles y por lo tanto, están localizados dentro de plásmidos o transposones que actúan como vehículos para la difusión de la resistencia facilitando rápidamente la transferencia entre las bacterias (Corvec et al., 2008; Hujer et al., 2006; Ikonomidis et al., 2005; Queenan y Bush, 2007; Torres et al., 2010). Contienen un gen *int* y casetes de genes que se pueden movilizar a otros integrones o a sitios secundarios en el genoma bacteriano (Poirel et al., 2005a; Severino y Magalhaes, 2004; Turton et al., 2005). Al igual que en otras bacterias Gram-negativas, un fenotipo MDR en *A. baumannii* resulta de la coexistencia de determinantes de resistencia frente a diferentes clases de antibióticos, dando lugar a casetes genéticos MDR. La selección y la difusión de los elementos móviles que llevan estos genes de resistencia pueden aumentar en el contexto clínico por el uso indiscriminado de antibióticos (Seward, 1999; Weldhagen, 2004).

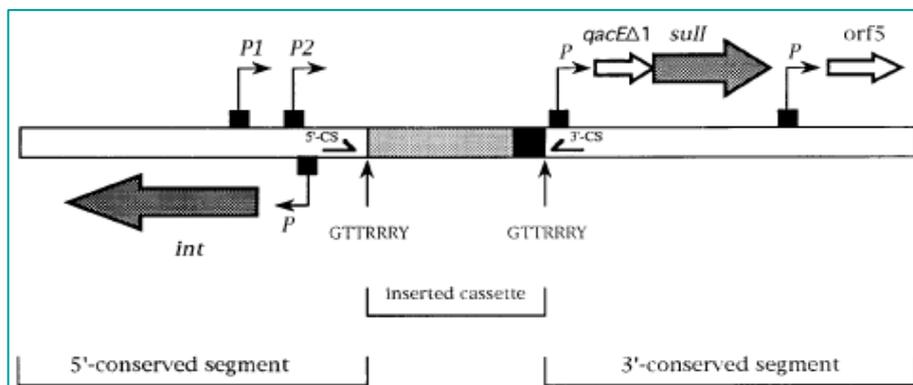


Figura 4. Esquema de integrón de clase I (León et al., 2010).

2.1.1. Resistencia a betalactámicos

En la actualidad, *A. baumannii* es resistente a la mayoría de betalactámicos, incluidos los carbapenems, considerados el tratamiento de elección en infecciones nosocomiales por cepas de *A. baumannii* sensibles a estos antimicrobianos ya que *in*

vitro han demostrado actividades superiores a las de otros antimicrobianos. La resistencia a carbapenems está aumentando de forma considerable y constituye un primer paso para la aparición de multirresistencia (Poirel y Nordmann, 2006a; Richet et al., 2001), considerándose por sí misma, suficiente para definir un aislamiento de *A. baumannii* como altamente resistente (Kluytmans-Vandenbergh et al., 2005; Poirel y Nordmann, 2006a).

En la tabla se describen los principales fenotipos de resistencia a betalactámicos en *A. baumannii* (Tabla 1).

Tabla 1. Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Acinetobacter baumannii* (modificado de Vila y Marco, 2010).

AMP	TIC	PIP	CTX	CAZ	CEF	IMP	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	S	S	-
R	S	S	S	S	S	S	Bajo nivel de expresión de AmpC
R	R	R/r	R	R	R/r	S	Elevado nivel de expresión de AmpC
R	R	R/r	R	R	S	S	BLEEs*
R	R	S	S	S	S	R/r	Carbapenemasa**
R	R	R	R	R	R	R	Carbapenemasa+AmpC

AMP: ampicilina; **CAZ:** ceftazidima; **CEF:** cefepima; **CTX:** cefotaxima; **IMP:** imipenem; **PIP:** piperacilina; **R:** resistente; **r:** sensibilidad disminuida; **S:** sensible; **TIC:** ticarcilina.

* Patrón que genera la OXA-37.

** La CMI generada por la presencia de oxacilinasas con actividad carbapenemasa puede ser baja pero si concomitantemente tiene lugar una disminución de una porina asociada a la resistencia a carbapenems se observa un incremento en la CMI.

Mecanismos enzimáticos

El mecanismo más importante de resistencia a betalactámicos es la degradación enzimática por betalactamasas (Bou y Martínez-Beltrán, 2000; Corvec et al., 2003; Danes et al., 2002; Ruíz et al., 2007a). Sin embargo, a menudo varios mecanismos (enzimáticos y no enzimáticos) trabajan conjuntamente para producir el mismo fenotipo (Bou et al., 2000a; Fernández-Cuenca et al., 2003; Quale et al., 2003).

Las especies de *Acinetobacter* poseen una amplia variedad de betalactamasas que hidrolizan y confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. Se han identificado más de 50 enzimas diferentes en *A. baumannii* (Dijkshoorn et al., 2007), que pertenecen a los 4 tipos de enzimas según la clasificación molecular de Ambler (Ambler et al., 1991): A, C, D (serin-beta-lactamasas) y B (metalo-beta-lactamasas).

Existen dos tipos de betalactamasas intrínsecas que se encuentran en todos los aislamientos de *A. baumannii*:

✓ Cefalosporinasa tipo AmpC (clase C de Ambler): codificada cromosómicamente también denominada como cefalosporinasa derivada de *Acinetobacter* (ADC, "Acinetobacter derived cephalosporinase") (Bou y Martínez-Beltrán, 2000; Hujer et al., 2005; Hujer et al., 2006; Perilli et al., 1996; Ruíz et al., 2007a). A diferencia de las enzimas AmpC que se encuentran en otros organismos Gram-negativos, en *A. baumannii* no se produce la expresión inducible de AmpC (Bou y Martínez-Beltrán, 2000; Héritier et al., 2006). Varios estudios sugieren que la sobreexpresión de esta cefalosporinasa es el mecanismo más frecuente de resistencia a betalactámicos (Bou y Martínez-Beltrán, 2000; Corvec et al., 2003; Danes et al., 2002; Ruíz et al., 2007a). Esta cefalosporinasa cromosómica se expresa a bajo nivel y en estos casos no confiere resistencia a ceftazidima. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *bla_{ampC}* se asocia a la presencia de una secuencia de inserción (IS*Aba1*) insertada en el promotor de dicho gen (Ruíz et al., 2007a; Segal et al., 2004; Turton et al., 2006b). Esta secuencia de inserción, factor determinante en la regulación de la sobreexpresión de esta enzima (Corvec et al., 2003; Héritier et al., 2006; Ruíz et al., 2007a; Segal et al., 2004), posee un promotor que es utilizado por la RNA polimerasa para expresar dicha cefalosporinasa. La hiperproducción de AmpC confiere resistencia a ticarcilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam sin afectar a ceftoxitina o carbapenems (**Tabla 1**). Diversos estudios han demostrado que, de manera general, aproximadamente el 50% de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* presentan una

hiperproducción de AmpC (Corvec et al., 2003; Danes et al., 2002). La secuencia de inserción IS*Aba1* se encuentra aproximadamente en el 69% de los aislamientos clínicos y, de éstas, en aproximadamente el 78%, la IS*Aba1* se encuentra insertada en la región del promotor del gen *bla_{ampC}*, confiriendo resistencia a ceftazidima (Vila y Marco, 2010).

✓ OXA-51/69, la cual está codificada cromosómicamente y ha sido encontrada en todas las cepas estudiadas (Héritier et al., 2005a; Turton et al., 2006b; Woodford et al., 2006). El primer gen descrito fue *bla_{OXA-51}*, (Brown et al., 2005) pero hasta la actualidad se han encontrado más de 45 derivados de la OXA-51/69 (Brown y Amyes, 2005; Héritier et al., 2005a; Nowak et al., 2012; Poirel et al., 2010; Turton et al., 2006b). Colectivamente son denominados como *bla_{OXA-51-like}*. Los genes que codifican OXA-51/69 se identificaron en diferentes colecciones de aislamientos de *A. baumannii* recuperados de áreas geográficas extensas (Héritier et al., 2005a; Merkier y Centrón, 2006). Algunas de estas variantes han sido identificadas en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems diseminadas por todo el mundo (Brown y Amyes, 2005; Evans et al., 2007; Turton et al., 2006b). En condiciones normales esta enzima presenta una actividad carbapenemasa débil. Sin embargo, se ha observado que puede tener lugar una sobreexpresión del gen *bla_{OXA-51}* asociada también a la inserción de la secuencia IS*Aba1* en el promotor de dicho gen (Figueiredo et al., 2009a; Figueiredo et al., 2009b; Ruíz et al., 2007a; Turton et al., 2006b), pudiendo derivar en resistencia a carbapenem (Figueiredo et al., 2009a; Hu et al., 2007).

Entre las betalactamasas adquiridas en *A. baumannii* se encuentran:

Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs)

Las BLEEs, pertenecientes a la clase A de Ambler, hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de estrecho y amplio espectro, y el monobactámico aztreonam (Anderson y Gums, 2008; Paterson y Bonomo, 2005; Queenan et al., 2007). Por el

contrario, las BLEEs no degradan eficientemente cefamicinas, carbapenems e inhibidores de betalactamasas. Desde su descripción inicial se han descrito más de 200 BLEEs diferentes, lo que plantea un riesgo significativo para la salud pública y para los pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos. La mayoría de las BLEEs son de las familias SHV, TEM, y CTX -M, con menor frecuencia BES, GES- 1, VEB y PER (Naas et al., 2008).

Se han descrito diversos tipos de BLEEs en *A. baumannii* como PER (PER-1), identificada en el 31% de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* en Turquía (Vahaboglu et al., 1997), también en Corea del Sur, Bélgica y Francia (Naas et al., 2006a; Naas et al., 2007a; Yong et al., 2003); PER-2, descrita en Sudamérica (Celenza et al., 2006; Pasteran et al., 2006); BLEE tipo oxacilinas (OXA-37), detectada en España en el 27% de las cepas de *A. baumannii* aisladas de diversos hospitales (Navia et al., 2002). También otras BLEEs tales como CTX-M-2, TEM-92, SHV-5, SHV-12 y VEB-1 (Al Naiemi et al., 2005; Endemiani et al., 2007; Naas et al., 2007b; Nagano et al., 2004; Poirel et al., 2003). Esta última BLEE fue descrita en un clon de *A. baumannii* causante de un brote epidémico en Francia y posteriormente se encontró en diversos hospitales de todo el país y del sur de Bélgica. La resistencia a ampicilina, ticarcilina y piperacilina también se ha relacionado con la presencia de betalactamasas plasmídicas de amplio espectro como las tipo TEM-1, TEM-2, OXA-21 y la carbenicilinas, CARB-5 (Devaud et al., 1982; Paul et al., 1989; Vila et al., 1993; Vila et al., 1997a). En el año 2007 se describió la penicilinas SCO-1 en diversas especies de *Acinetobacter* aisladas en Argentina (Poirel et al., 2007a).

La evaluación de la prevalencia real de estas enzimas en *A. baumannii* se ve obstaculizada por las dificultades en la detección de laboratorio, especialmente en presencia de AmpC (Peleg et al., 2008). El significado clínico de estas betalactamasas también es poco conocido dada la potencia de los otros determinantes de resistencia (Pérez et al., 2007).

Carbapenemasas

Los carbapenems son, generalmente, más activos y más resistentes a las betalactamasas, incluidas las betalactamasas de espectro extendido y las betalactamasas cromosómicas desreprimidas tipo AmpC debido principalmente a las características de las cadenas laterales presentes en su estructura química (Bonfiglio et al., 2002). La resistencia a estos compuestos no se debe sólo a la presencia de un único mecanismo, sino a una combinación de mecanismos clasificados como enzimáticos y no enzimáticos, siendo el mecanismo de resistencia más importante la hidrólisis enzimática. Por lo que, son más preocupantes las betalactamasas con actividad carbapenemasa (Queenan y Bush, 2007).

Estas enzimas pertenecen a cualquiera de las tres clases moleculares de acuerdo con la clasificación molecular de Ambler (Ambler, 1980), aunque las carbapenemasas más extendidas en *A. baumannii* son las betalactamasas de la clase D. En el esquema de clasificación funcional de Bush y Medeiros las carbapenemasas se encuentran principalmente en los grupos 2F y 3 (Queenan y Bush, 2007).

✓ Carbapenemasas de clase A:

Estas carbapenemasas incluyen betalactamasas que poseen serina en su sitio activo y son inhibidas por ácido clavulánico (KPC, GES, SME, NMC, e IMI). Forman parte del grupo funcional 2f de Bush (Bush et al., 1995) y se han descrito principalmente en *Enterobacteriaceae*, sin embargo, las enzimas tipo KPC y tipo GES se han detectado en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems aisladas en Puerto Rico y París, respectivamente (Bonnin et al., 2011; Robledo et al., 2010).

✓ Carbapenemasas de clase B (Metalobetalactamasas):

Las betalactamasas de la clase B son carbapenemasas dependientes de zinc, denominadas metalobetalactamasas (MBLs) (Poirel y Nordmann, 2006a; Queenan y Bush, 2007; Vila y Marco, 2010; Walsh et al., 2005). Éstas forman parte del grupo funcional 3 (Bush et al., 1995; Queenan y Bush, 2007). Tienen la capacidad de hidrolizar todos los betalactámicos (incluyendo carbapenems), excepto el monobactam, aztreonam (Thomson y Bonomo, 2005), propiedad que puede ayudar a su detección en el laboratorio. Son resistentes a los inhibidores de betalactamasas disponibles comercialmente (ácido clavulánico y tazobactam), pero sensibles a la inhibición por los quelantes de iones metálicos como el EDTA, un quelante del zinc (Zn) y otros cationes divalentes. Esta inhibición por EDTA puede ser restaurada mediante la adición de Zinc. A pesar de que las MBLs se identifican menos comúnmente en *A. baumannii* que las carbapenemasas de tipo OXA, sus actividades hidrolíticas hacia carbapenems son significativamente más potentes (de 100 a 1.000 veces) (Poirel y Nordmann, 2006a).

Las familias más comunes de metalobetalactamasas incluyen las enzimas VIM, IMP, GIM, y SIM. Comúnmente se encuentran codificadas en integrones. La mayoría de estos genes adquiridos en *A. baumannii* se han encontrado dentro de integrones clase 1, que a menudo se encuentran en casetes de genes de resistencia, junto con genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Houang et al., 2003; Lee et al., 2005a; Riccio et al., 2000; Tsakris et al., 2006a; Zarrilli et al., 2004). Las cepas de *A. baumannii* que llevan integrones son significativamente más resistentes a los fármacos que las cepas sin integrones (Gu et al., 2007).

De los cinco grupos descritos hasta la fecha (Walsh et al., 2005), sólo se han identificado tres en *A. baumannii* (Ruíz et al., 2007b): el grupo IMP con IMP-1,-2,-4,-5,-6 y -11 (Chu et al., 2001; Cornaglia et al., 1999; Da Silva et al., 2002; Gales et al., 2003; Houang et al., 2003; Jeong et al., 2006; Koh et al., 2007; Lee et al., 2003a; Nishio et al., 2004; Sader et al., 2005a; Shibata et al., 2003; Takahashi et al., 2000; Tognim et al., 2006; Zarrilli et al., 2004), el grupo VIM con VIM-1 y -2 (Lee et al., 2003a; Lim et al., 2007; Tsakris et al., 2006a; Wroblewska et al., 2007; Yum et al., 2002), y finalmente

SIM-1, sólo descrita en Corea del Sur (*Lee et al., 2005a; Poirel y Nordmann, 2006a; Ruíz et al., 2007b; Zarrilli et al., 2009*). Las variantes de IMP y VIM confieren un elevado nivel de resistencia a carbapenems (CMI >32 mg/l), además confieren resistencia a todos los betalactámicos excepto aztreonam, mientras que la presencia de SIM-1 genera niveles de resistencia a imipenem entre 8-16 mg/l (*Walsh et al., 2005*). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de MBL denominada NDM-1 (*New Dehli metallo-beta-lactamase*) identificada inicialmente en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* procedentes de India y Pakistán, pero actualmente descritas en otras especies de Enterobacterias (*Nordmann et al., 2011; Yong et al., 2009*) y en cepas de *A. baumannii* de todo el mundo (*Göttig et al., 2010; Kaase et al., 2011; Karthikeyan et al., 2010*).

Varias regiones geográficas, como España, Singapur, Grecia y Australia, han demostrado la presencia de enzimas, tipo OXA (se detallarán en el apartado posterior) y tipo MBL en una misma cepa (*Canduela et al., 2006; Koh et al., 2007; Peleg et al., 2006a; Tsakris et al., 2006a*). A diferencia de las enzimas tipo OXA, las MBLs se encuentran más comúnmente en integrones.

Existen métodos fenotípicos sensibles para la detección de MBL en *A. baumannii*. Éstos son fáciles de realizar y económicos por lo que se pueden incorporar en las pruebas rutinarias de cualquier laboratorio de microbiología. Uno de ellos es el E-test que contiene imipenem con o sin EDTA. El principal inconveniente de estos métodos es que no son fiables porque puede haber resultados falsos positivos (*Omair et al., 2012*). Además, no todas las metalobetalactamasas hidrolizan fácilmente la nitrocefina, el popular indicador colorimétrico de actividad betalactamasa (*Matthew et al., 1975*).

✓ *Carbapenemasas de clase D (Oxacilinasas)*

Las carbapenemasas de clase D pertenecen al grupo de las oxacilinasas de clase D o betalactamasas tipo OXA ("Oxacillin-hydrolyzing"). Se definieron inicialmente como enzimas que hidrolizaban cloxacilina y oxacilina más rápido que la bencilpenicilina (Bush *et al.*, 1995), de ahí su denominación como oxacilinasas, en contraste con la relativamente lenta hidrólisis de oxacilina por las clases A y C (Danel *et al.*, 2007). Esta definición no parece tener valor desde que se ha descrito que estas enzimas en realidad inactivan cloxacilina y oxacilina pobremente, incluso a veces preservan estos sustratos. Sin embargo, todas las betalactamasas de clase D hidrolizan significativamente amino y carboxipenicilinas. Por lo general no son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (con algunas excepciones, por ejemplo, OXA-2 y OXA-32 son inhibidas por tazobactam pero no por sulbactam y clavulánico, y OXA-53 es inhibida por ácido clavulánico) (Danel *et al.*, 2007; Mulvey *et al.*, 2004; Naas y Nordmann, 1999; Poirel y Nordmann, 2002). Sus actividades pueden ser inhibidas *in vitro* mediante cloruro de sodio (NaCl). Esta propiedad no la comparten las betalactamasas de otras clases, por lo que resulta una característica útil para la identificación *in vitro*. El NaCl a una concentración de 100 mM inhibe totalmente las actividades de la mayoría de las betalactamasas de la clase D (por ejemplo, OXA-25 y OXA-26) (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Aubert *et al.*, 2001; Girlich *et al.*, 2004; Héritier *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2004; Poirel *et al.*, 2005a)

Las enzimas tipo OXA son un grupo cada vez más amplio que incluye más de 150 miembros (<http://www.lahey.org/Studies/>) (Higgins *et al.*, 2009). Se clasifican en varios grupos: betalactamasas clase D de espectro estrecho (con los subgrupos OXA-1, OXA-2 y OXA-10), ES-OXA ("expanded spectrum oxacillinase") y CHDLs ("carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase") (Drawz y Bonomo, 2010; Poirel *et al.*, 2010).

En *A. baumannii* las CHDLs son las carbapenemasas más prevalentes (Bonomo y Szabo, 2006; Bush et al., 1995; Peleg et al., 2008; Poirel y Nordmann, 2006a; Poirel et al., 2010; Queenan y Bush, 2007; Zarrilli et al., 2009).

Además de carbapenems (imipenem pero no siempre meropenem), inactivan penicilinas y cefalosporinas (Nordmann y Poirel, 2002; Pérez et al., 2007; Poirel y Nordmann, 2006a; Poirel et al., 2007b). En general, la hidrólisis de imipenem, aunque es lenta, es más rápida que la del meropenem. Se ha debatido la contribución exacta de estas enzimas a la expresión fenotípica de resistencia a carbapenems. Sin embargo, en el año 2005 se demostró, usando experimentos “knockout” o complementación, que las CHDLs adquiridas como OXA-23, OXA-40 y OXA-58 identificadas en *A. baumannii* si contribuyen significativamente a esta resistencia (Héritier et al., 2005b).

Aunque las CHDLs tienen una eficiencia catalítica inferior para hidrolizar carbapenems en comparación con las MBLs (100 a 1000 veces menor), es importante considerarlas como potencialmente peligrosas ya que su discreta actividad carbapenemasa puede incrementarse por la presencia de promotores fuertes presentes en secuencias de inserción como IS*Aba1* (Turton et al., 2006b; Segal et al., 2005). Al igual que las MBLs, son resistentes a la inhibición por clavulánico y tazobactam. La mayoría de CHDLs, *in vitro*, son sensibles a la inhibición por NaCl. La actividad frente a los carbapenems se puede intensificar si están presentes otros mecanismos de resistencia, como el aumento de la expresión de bombas de eflujo y la pérdida de porinas (Luo et al., 2011; Opazo et al., 2009; Vila et al., 2007).

La localización cromosómica de muchos de los genes que codifican carbapenemasas tipo OXA sin duda ha contribuido a la lenta difusión de estos genes. Mediante el uso inadecuado de los carbapenems los genes de codificación plasmídica para estas oxacilinasas probablemente se extiendan, debido al aumento de la presión selectiva (Poirel y Nordmann, 2006a; Walther-Rasmussen y Høiby, 2006).

Las CHDLs están divididas en 9 subgrupos diferentes basándose en la igualdad en la secuencia de aminoácidos (Queenan y Bush, 2007; Walther-Rasmussen y Høiby, 2006). Cinco de ellos han sido identificados en *A. baumannii*, y los aislamientos fueron encontrados en Europa, América del Sur, Asia y Polinesia Francesa.

La primera enzima tipo OXA con capacidad de hidrolizar carbapenems procedía de una cepa clínica de *A. baumannii* aislada en 1985 en un hospital escocés, e inicialmente fue llamada ARI-1 ("Acinetobacter resistant to imipenem") (Paton et al., 1993). Este gen fue secuenciado y ahora es denominada como OXA-23 (Donald et al., 2000; Scaife et al., 1995). El gen *bla*_{OXA-23} fue localizado en un plásmido (45 kb) que fue transferido a *Acinetobacter junii* (Scaife et al., 1995). Sin embargo, actualmente los cinco principales subgrupos filogenéticos (basados en la homología de las secuencias variables) (Garnacho-Montero y Amaya-Villar, 2010) de CHDLs han sido descritos en *A. baumannii*: tipo OXA-23, tipo OXA-40, tipo OXA-51, tipo OXA-58 y tipo OXA-143 (Higgins et al., 2009; Higgins et al., 2010; Peleg et al., 2008).

El **subgrupo** más grande es el tipo **OXA-51**, que como se comentó anteriormente, corresponde a las enzimas codificadas cromosómicamente y por lo tanto son CHDLs que ocurren de forma natural en *A. baumannii*, de ahí su elevada prevalencia (Brown et al., 2005; Coelho et al., 2006a; Héritier et al., 2005a; Hujer et al., 2006; Turton et al., 2006a; Vahaboglu et al., 2006; Wroblewska et al., 2007; Zhou et al., 2007). Las enzimas incluidas en este subgrupo difieren en 1 a 15 aminoácidos (Evans et al., 2008; Walther-Rasmussen y Høiby, 2006).

El **subgrupo** tipo **OXA-23** incluye los siguientes derivados de *A. baumannii*: OXA-27 y OXA-49 (Poirel et al., 2010; Zarrilli et al., 2009), y se han encontrado principalmente mediadas por plásmidos. Aunque el subgrupo de carbapenemasas tipo OXA-23 se ha descrito principalmente en *A. baumannii*, en 2002 se detectó en un aislado de *Proteus mirabilis* resistente a carbapenem (Bonnet et al., 2002). Es importante destacar que, las enzimas tipo OXA-23 se han detectado en las cepas de *A.*

radioresistens (Poirel et al., 2008a), lo que podría ser el reservorio natural de estas enzimas. Actualmente este tipo de enzima contribuye a la resistencia a carbapenem en *A. baumannii* en todo el mundo como Francia (Corvec et al., 2007), Bulgaria (Stoeva et al., 2008), Irán (Feizabadi et al., 2008), los Emiratos Árabes Unidos (Mugnier et al., 2008), Túnez (Mansour et al., 2008), Brasil (Dalla-Costa et al., 2003), y Australia (Valenzuela et al., 2007). Además, cepas productoras de OXA-23 han sido responsables de brotes en hospitales de la Polinesia Francesa (Naas et al., 2005), Colombia (Villegas et al., 2007), el Reino Unido (Coelho et al., 2006a), Turquía (Meric et al., 2008), China (Wang et al., 2007; Zong et al., 2008), y Corea (Kim et al., 2008a).

El tercer **subgrupo** está representado por **OXA-58**, que fue identificada por primera vez en ABMR aislado en Francia (Poirel et al., 2005a). Se han descrito dos variantes dentro de este subgrupo: OXA-96 y OXA-97 (Koh et al., 2007; Poirel et al., 2008b). OXA-58 hidroliza penicilinas y carbapenems a niveles bajos. Se detectó una hidrólisis débil de cefpiroma, y una hidrólisis menos débil de cefepima, ceftazidima y cefotaxima. La velocidad de hidrólisis de imipenem y meropenem fue 10 y 100 veces inferior, respectivamente, que la de las bencilpenicilinas (Poirel et al., 2005a). En la mayoría de los aislados de *A. baumannii* productores de OXA-58 informados en todo el mundo el gen *bla*_{OXA-58} se encuentra en un plásmido, lo que puede explicar su amplia distribución (Coelho et al., 2006a; Marqué et al., 2005; Peleg et al., 2006b; Peleg et al., 2008). Se ha descrito en aislados de Europa, Argentina, Australia, y Estados Unidos (Castanheira et al., 2008; Coelho et al., 2006a; Coelho et al., 2006b; Hujer et al., 2006; Marqué et al., 2005; Peleg et al., 2006a). OXA-58 a menudo se asocia con brotes hospitalarios y ha participado en brotes en Francia, Bélgica, Italia, Turquía, Grecia y Estados Unidos (Bertini et al., 2006; Bogaerts et al., 2006; Giordano et al., 2007; Héritier et al., 2005c; Hujer et al., 2006; Poirel et al., 2006; Vahaboglu et al., 2006). También ha sido identificada en otras especies de *Acinetobacter*, tales como *A. junii* en Rumania (Marqué et al., 2005) y Australia (Peleg et al., 2006a), *Acinetobacter* genoespecie 3 en España (Marti et al., 2008a), y *Acinetobacter* fenotipo 6/ct13TU en España (Marti et al., 2008b). OXA-97 comparte las mismas propiedades hidrolíticas y se

ha identificado en aislados de *A. baumannii* de Túnez (Poirel *et al.*, 2008b). OXA-96, ha sido identificada en *A. baumannii* en Singapur (Koh *et al.*, 2007).

El cuarto **subgrupo** corresponde al tipo **OXA-24/40**, originalmente llamado OXA-24, con tres variantes, OXA-25, OXA-26 y OXA-72, que han sido identificadas en plásmidos (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2009). Estas enzimas difieren solamente en unas pocas sustituciones aminoacídicas. OXA-24/OXA-40 fue identificada originalmente en el cromosoma de un aislado de *A. baumannii* resistente a carbapenem en España (Bou *et al.*, 2000a; Bou *et al.*, 2000b). El gen *bla*_{OXA-40} ya se ha descrito en diferentes áreas, sobre todo en Portugal y España (Da Silva *et al.*, 2004; Peixe, 1999; Quinteira *et al.*, 2007; Ruíz *et al.*, 2007b), pero también en Estados Unidos (Lolans *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2008). Curiosamente, el gen *bla*_{OXA-40} se encuentra codificado tanto en el cromosoma como en plásmidos (Quinteira *et al.*, 2007). Se ha identificado en un plásmido de dos aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenem en España (Sevillano *et al.*, 2009). OXA-40 no es inhibida por NaCl (Héritier *et al.*, 2003). OXA-25 y OXA-26 se han descrito en aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenem recuperados de España y Bélgica, respectivamente (Afzal-Shah *et al.*, 2001); y OXA-72 en aislados de *A. baumannii* de China, Corea del Sur, Taiwán, y Bahrein (Lee *et al.*, 2009a; Lu *et al.*, 2009; Mugnier *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). No se ha descrito que este grupo de enzimas esté asociado con secuencias de inserción (Peleg *et al.*, 2008).

En 2009, Higgins *et al.* describieron una nueva CHDLs, la **OXA-143**, que se identificó en una cepa de *A. baumannii* resistente a carbapenem aislada en Brasil en 2004. Esta enzima se encontró en un plásmido y tiene una homología en la secuencia del 88% de aminoácidos con OXA-40, el 63% con OXA-23, y el 52% con OXA-58 (Higgins *et al.*, 2009), lo que representa un nuevo subgrupo de CHDLs (Higgins *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2010). OXA-143 hidroliza penicilinas y carbapenems pero no hidroliza significativamente cefalosporinas de amplio espectro, como se observa en otras CHDLs. Al igual que en las últimas enzimas, OXA-143 muestra una elevada afinidad por

los carbapenems, pero con bajas tasas de hidrólisis (Afzal-Shah et al., 2001; Poirel et al., 2005a; Poirel et al., 2008b). A pesar de esta hidrólisis débil, es muy probable que OXA-143 contribuya significativamente a la resistencia a imipenem y meropenem, como se ha demostrado previamente con OXA-23, OXA-40, y OXA-58 (Héritier et al., 2005b).

Los genes *bla*_{OXA} se han relacionado con una variedad de estructuras genéticas diferentes, especialmente en las secuencias de inserción, que tienen un papel importante en la expresión de estos genes, específicamente *ISAb*₁, *ISAb*₂, *ISAb*₃ o *IS18* en el caso de *A. baumannii* (Poirel y Nordmann, 2006b; Segal et al., 2005; Turton et al., 2006b). Estos elementos pueden contener regiones promotoras que conducen a la sobreexpresión de determinantes de resistencia aguas abajo, lo que representa un mecanismo real de resistencia a los carbapenems, o al menos una disminución en la sensibilidad (Turton et al., 2006b). Muchos de los genes de oxacilinasas presentes en los aislados de *A. baumannii* se han detectado como casetes de genes en integrones. Sin embargo, la mayoría de los genes de CHDLs fueron identificados en plásmidos, pero no en forma de casetes genéticos dentro de integrones (Walther-Rasmussen y Høiby, 2006).

Por lo general, estos elementos se han descrito en asociación con *bla*_{OXA-23} (Corvec et al., 2007; Hujer et al., 2006; Naas et al., 2005; Turton et al., 2006b; Valenzuela et al., 2007; Zhou et al., 2007) y *bla*_{OXA-58} (Giordano et al., 2007; Poirel et al., 2005a; Poirel et al., 2006; Poirel y Nordmann, 2006b; Tsakris et al., 2006b), pero también pueden promover la resistencia a carbapenem en asociación con *bla*_{OXA-51} al mejorar la expresión de esta carbapenemasa intrínseca (Turton et al., 2006b). Curiosamente, ciertos elementos IS, especialmente *ISAb*₁, parecen relativamente únicos en *A. baumannii* (Segal et al., 2005). Los elementos IS son también importantes para la expresión de la resistencia a otros antibióticos en este microorganismo (Poirel et al., 2005b; Poirel et al., 2003; Ribera et al., 2003a; Ruíz et al., 2007a; Ruzin et al., 2007).

Dada la multiplicidad de mecanismos de resistencia a betalactámicos en *A. baumannii* (Poirel y Nordmann, 2006a), es difícil determinar la aportación de las oxacilinasas adquiridas que hidrolizan carbapenems a la resistencia a carbapenem. Este tema ha sido abordado por Héritier *et al.* Compararon los perfiles de sensibilidad mediante el estudio de plásmidos naturales y recombinantes que contenían los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, y *bla*_{OXA-58} (Héritier *et al.*, 2005b). Con los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-40} se obtuvieron CMI's más altas de imipenem que *bla*_{OXA-58}, y todos los genes *bla*_{OXA} produjeron CMI's más altas de imipenem en presencia de una bomba de eflujo AdeABC ("ATP-binding cassette") sobreexpresada. Se observó sensibilidad a carbapenems cuando se inactivó el gen *bla*_{OXA-40}. Curiosamente, los plásmidos naturales que contenían los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58}, obtenidos a partir de aislados clínicos, generaron mayores niveles de resistencia a carbapenems que sus respectivos plásmidos recombinantes en huéspedes similares (Héritier *et al.*, 2005b). Esta discrepancia se debe probablemente a la presencia de elementos IS en los plásmidos naturales.

La distribución geográfica de estos subgrupos de CHDLs es bastante heterogénea. En España, analizando 83 aislamientos clínicos pertenecientes a 28 clones distintos, se encontró que el 19% poseían carbapenemasa tipo OXA-58, el 42% OXA 24/40 y el 13% poseían el elemento genético IS*Aba1* insertado en el promotor del gen *bla*_{OXA-51}, lo que favorece la sobreexpresión de dicho gen. En el mismo estudio no se detectaron carbapenemasas tipo OXA-23, VIM o IMP sugiriendo una baja prevalencia de este tipo de carbapenemasas en aislados de *A. baumannii* en España (Ruíz, 2007b). Por regla general, las cepas que poseen una oxacilinasas tipo OXA24/40 presentan una CMI de imipenem < 32 mg/l, mientras que las que poseen una OXA-58 la CMI es de 16 mg/l (Vila y Marco, 2010).

Mecanismos no enzimáticos

Se han descrito mecanismos no enzimáticos que contribuyen a la resistencia a betalactámicos, incluyendo la resistencia a carbapenems. Estos mecanismos incluyen cambios en las proteínas de membrana externa (OMPs, "outer membrane proteins") (Bou et al., 2000a; Costa et al., 2000; del Mar et al., 2005; Fernández-Cuenca et al., 2003; Gribun et al., 2003; Limansky et al., 2002; Mussi et al., 2005; Quale et al., 2003; Siroy et al., 2005; Siroy et al., 2006), bombas de eflujo de múltiples fármacos (Héritier et al., 2005b; Higgins et al., 2004a; Magnet et al., 2001), y alteraciones en la afinidad o la expresión de las proteínas de unión a penicilina (Fernández-Cuenca et al., 2003; Gehrlein et al., 1991; Obara y Nakae, 1991; Siroy et al., 2006).

✓ *Modificaciones en proteínas de membrana externa*

Se sabe muy poco sobre las proteínas de membrana externa de *A. baumannii*, pero se han descrito aislamientos clínicos resistentes a betalactámicos por la pérdida de estas proteínas de membrana (Vila et al., 2007).

Se ha demostrado que la pérdida de la proteína de 29 kDa, conocida como CarO, se asocia con la resistencia a imipenem y meropenem (Limansky et al., 2002; Mussi et al., 2005; Siroy et al., 2005). Esta porina forma canales no específicos (Siroy et al., 2005). La pérdida de esta porina en *A. baumannii* resistente a imipenem parece secundaria a la interrupción del gen *carO* por distintos elementos de inserción (Mussi et al., 2005). También se han descrito brotes de *A. baumannii* resistentes a carbapenem por la reducción de la expresión de OMPs de 47-, 44-, y 37- kDa en cepas de *A. baumannii* endémicas en Nueva York (Quale et al., 2003) y la reducción de la expresión de OMPs de 22- y 33- kDa en asociación con OXA-24 en España (Bou et al., 2000a). Otras OMPs relevantes identificadas para la resistencia a betalactámicos incluyen la HMP-AB ("heat-modifiable protein") (Gribun et al., 2003), homóloga a OmpA de *Enterobacteriaceae* y OmpF de *P. aeruginosa* (Vila et al., 2007); una proteína

de 33- a 36- kDa (Clark, 1996; del Mar et al., 2005); una proteína de 43- kDa que muestra una homología significativa con OprD ("outer membrane porine") de *P. aeruginosa* (Dupont et al., 2005) y que ha sido descrita en aislamientos resistentes a imipenem, y OmpW, que es homóloga a las proteínas OmpW encontradas en *E. coli* y *P. aeruginosa* (Siroy et al., 2006; Vila et al., 2007). Curiosamente, cuando se realizaron estudios proteómicos comparativos entre una cepa de ABMR y una cepa de referencia, no se observaron diferencias en la expresión para Omp33/36 o OprD, pero la expresión de CarO y las isoformas estructurales de OmpW eran diferentes (Siroy et al., 2006). Todavía se requieren otros estudios para dilucidar el significado de estas porinas y su prevalencia general en *A. baumannii* multirresistente.

✓ Bombas de expulsión de múltiples fármacos

El genoma de una cepa de *A. baumannii* multirresistente codifica una amplia gama de sistemas de flujo de salida de múltiples fármacos (Fournier et al., 2006). La bomba multifármacos AdeABC (**Figura 5**), perteneciente a la familia RND ("resistance-nodulation-cell division"), es la mejor estudiada hasta el momento. Este sistema de flujo tiene un perfil de sustrato que incluye betalactámicos (incluyendo carbapenems) (Héritier et al., 2005b; Higgins et al., 2004a), aminoglucósidos, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclinas, fluoroquinolonas, trimetoprim, tigeciclina y bromuro de etidio (Héritier et al., 2005b; Higgins et al., 2004a; Magnet et al., 2001; Marchand et al., 2004; Nemeč et al., 2007; Peleg et al., 2007b; Ruzin et al., 2007). Cepas completamente sensibles que contienen los genes que codifican AdeABC pueden producir espontáneamente mutaciones de resistencia en los genes *adeS* y *adeR*, que regulan la expresión de AdeABC (Marchand et al., 2004). La regulación aguas arriba de AdeABC es hasta ahora el único mecanismo que se ha demostrado que disminuye la sensibilidad a múltiples clases de antimicrobianos en *A. baumannii*.

De manera importante, en el año 2005 se relacionó a la bomba AdeABC con una menor sensibilidad frente a carbapenems (Héritier et al., 2005a). En el trabajo de

Opazo *et al.* (Opazo *et al.*, 2009) se informa del aislamiento de una cepa con una mutación puntual en un gen regulador de la expresión de AdeABC, lo que se traduce en la sobreexpresión de la bomba, disminuyendo a la mitad la CMI de meropenem e imipenem, en comparación con los valores de CMI de la cepa salvaje (Héritier *et al.*, 2005a; Poirel y Nordmann, 2006a). Sin embargo, en el año 2008, Huang *et al.* asociaron esta bomba directamente con la resistencia a meropenem (Huang *et al.*, 2008).

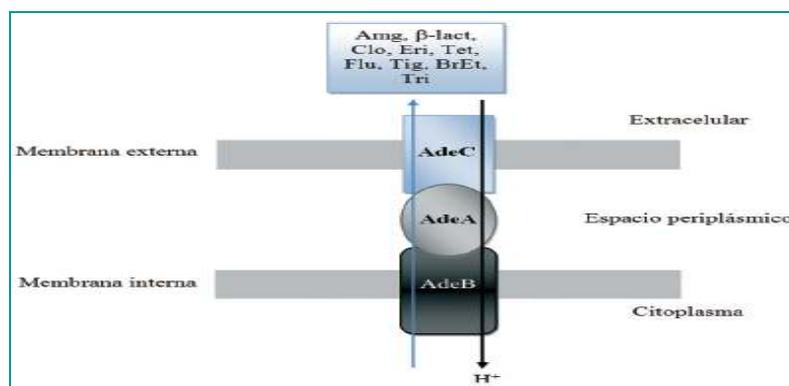


Figura 5. Representación esquemática de la bomba multidroga AdeABC de *A. baumannii*. Amg: aminoglucósidos, β-lact: betalactámicos, Clo: cloranfenicol, Eri: eritromicina, Tet: tetraciclina, Flu: fluoroquinolonas, Tig: tigeciclina, BrEt: bromuro de etidio, Tri: trimetoprim. La bomba AdeABC se encuentra constituida por la proteína AdeA, la cual corresponde a una proteína de fusión de membrana, AdeB, que corresponde a la proteína transportadora multidroga y AdeC que representa a una proteína de membrana externa. Los distintos antimicrobianos son expulsados desde el interior celular mediante un mecanismo de antiporte en relación con los protones (Opazo *et al.*, 2009).

✓ Alteración de las PBPs ("Penicillin Binding Proteins")

Finalmente, se ha descrito que la ausencia de una PBP de 73,2 kDa (PBP2a) podría relacionarse con resistencia a imipenem y/o meropenem de bajo nivel (CMI de 4mg/l), mientras que la ausencia simultánea de esta PBP y otra de 70,1 kDa (PBP2b) se asocia con niveles de resistencia más elevados frente a ambos compuestos (CMI de 8–32mg/l) (Juan *et al.*, 2008; Vila y Marco, 2010).

2.1.2. Resistencia a aminoglucósidos

La resistencia a aminoglucósidos, además de deberse a la bomba de múltiples fármacos AdeABC, comentada anteriormente, se ha atribuido al menos a nueve enzimas modificantes distintas, que se pueden encontrar en diferentes combinaciones en algunas cepas (Doi et al., 2004; Seward et al., 1998). La correlación entre fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos y enzimas modificantes se resume en la **tabla 2**.

Tabla 2. Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos en *Acinetobacter baumannii* (modificado de Vila y Marco, 2010).

GM	TOB	NET	AK	SP	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	Sin EMA* o <i>aph</i> A1/APH (3')-I**
R	S	S	S	S	<i>aac</i> C1***/AAC (3)-I****
R	R	R	S	S	<i>aac</i> C2/AAC (3)-II
S	R	R	R	S	<i>aac</i> A4/AAC (6')-I
S	S	S	S	R	<i>aad</i> A1/ANT (3'') (9)
R	R	S	S	S	<i>aad</i> B/ANT (2'')-I
S	S	S	R	S	<i>aph</i> A6/APH (3')-VI
R	R	R	R	R	Enzimas + bombas de eflujo (AdeABC)

AK: amikacina; **GM:** gentamicina; **NET:** netilmicina; **R:** resistente; **S:** sensible; **SP:** espectinomocina; **TOB:** tobramicina.

***EMA,** enzima modificante de aminoglucósidos.

**Los sustratos de este enzima son kanamicina, neomicina, lividomicina y paromomicina.

***Gen.

****Proteína.

En cepas de *A. baumannii* multirresistente es muy frecuente la presencia de genes que codifican estas enzimas modificantes de aminoglucósidos en integrones de clase 1 (Houang et al., 2003b; Lee et al., 2005a; Nemeč et al., 2004a; Riccio et al., 2000; Seward et al., 1998; Tsakris et al., 2006a; Turton et al., 2005; Zarrilli et al., 2004). Se han descrito todas las principales clases de enzimas, incluyendo acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas, y fosfotransferasas (Hujer et al., 2006; Nemeč et al., 2004a). También se ha descrito la metilación del 16S ARNr por cepas de *A. baumannii* (*armA*) de Japón, Corea, y Estados Unidos (Doi et al., 2007; Lee et al., 2006; Yamane et al., 2005). Este mecanismo de resistencia emergente confiere resistencia de alto nivel a

todos los aminoglucósidos clínicamente útiles, incluyendo gentamicina, tobramicina y amikacina (Doi y Arakawa, 2007).

Entre los fenotipos de resistencia cabe destacar por su frecuencia el de resistencia a todos los aminoglucósidos, que puede ser debida a la combinación de diversas enzimas modificantes, o tal vez a la disminución de la acumulación de estos antibióticos relacionada con la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa codificado en el operón AdeABC (Magnet et al., 2001).

Además de la bomba de eflujo AdeABC, que con menos eficacia transporta amikacina y kanamicina debido a su naturaleza más hidrófila (Magnet et al., 2001), los aminoglucósidos (gentamicina y kanamicina), son también sustratos de AdeM, bomba perteneciente a la familia MATE ("multidrug and toxic compound extrusion") (Su et al., 2005).

2.1.3. Resistencia a quinolonas

Las modificaciones en las subunidades A de la ADN girasa o topoisomerasa IV a través de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, respectivamente, han sido bien descritas en *A. baumannii* (Hamouda y Amyes, 2004; Higgins et al., 2004a; Seward y Towner, 1998; Vila et al., 1995; Vila et al., 1997b). Estas mutaciones interfieren con la unión al sitio diana, provocando una menor afinidad de la quinolona por su diana. Similar a los aminoglucósidos, muchas quinolonas también son sustratos para bombas de eflujo de varios fármacos (Ribera et al., 2002), incluyendo la bomba AdeABC de la familia RND (Higgins et al., 2004a; Magnet et al., 2001) y la bomba AdeM de la familia MATE ("multidrug and toxic compound extrusion") (Su et al., 2005). Hasta el momento, no se ha descrito la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, por los genes *qnr*, en *A. baumannii*.

2.1.4. Resistencia a tetraciclinas y glicilciclinas

Se han descrito ampliamente dos mecanismos de resistencia a tetraciclinas en *A. baumannii*. El primer mecanismo se ha asociado con los genes que codifican la bomba de eflujo específica de tetraciclinas (Huys *et al.*, 2005a). Hasta el momento, las bombas más descritas en *A. baumannii* son aquellas codificadas por los determinantes *tet* (A) y *tet* (B) (Guardabassi *et al.*, 2000; Ribera *et al.*, 2003a; Ribera *et al.*, 2003b). Ambas son bombas multidrogas pertenecientes a la superfamilia MFS ("major facilitator superfamily") (Pao *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2007) y están mediadas por transposones. El sistema Tet (A) confiere resistencia a la tetraciclina, pero no a minociclina, un agente con mayor actividad frente a *A. baumannii*. El sistema Tet (B) determina el flujo de salida tanto de tetraciclina como de minociclina (Guardabassi *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2005a; Marti *et al.*, 2006; Vila *et al.*, 2007).

El segundo mecanismo es la protección ribosómica que está mediada por los determinantes *tet* (M) y *tet* (O) (Fluit *et al.*, 2005; Ribera *et al.*, 2003b). El gen *tet* (M) codifica una proteína, la cual sirve para proteger el ribosoma de la tetraciclina, doxiciclina, y minociclina.

Además de las bombas de eflujo específicas de tetraciclina y la protección ribosomal, esta clase de antimicrobianos también es sensible a los sistemas de flujo de múltiples fármacos (Peleg *et al.*, 2007b; Ruzin *et al.*, 2007), tales como la bomba AdeABC (Magnet *et al.*, 2001).

2.1.5. Resistencia a polimixinas

Polimixina B y polimixina E (colistina, intravenosa colistimetato de sodio) son antibióticos peptídicos aislados por primera vez en 1947, y que se han utilizado cada vez más como un tratamiento de "último recurso" de las infecciones causadas por *A. baumannii* multirresistente. Desafortunadamente, ya se han informado cepas de *A.*

baumannii resistentes a colistina que han generado una gran alarma (Gales et al., 2001; Gales et al., 2006; Li et al., 2006b; Reis et al., 2003; Urban et al., 2001). En 2001, Urban et al. describieron un caso de *A. baumannii* resistente a Polimixina B (Urban et al., 2001). La heterorresistencia es un problema aterrador que ya se ha descrito para este microorganismo (Li et al., 2006a). El impacto de la heterorresistencia necesitará ser evaluado y monitorizado de forma prospectiva mediante el estudio de los resultados en los pacientes sometidos a tratamiento con colistina. Se piensa que la resistencia a la colistina está mediada por cambios en la membrana celular bacteriana (modificaciones en el lipopolisacárido) que interfieren con la capacidad de este antibiótico para unirse a la diana correspondiente (Li et al., 2005). Se teme que esta resistencia se hará más generalizada con el aumento del uso de polimixinas.

2.1.6. Resistencia a otros antibióticos

La prevalencia de la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol en *A. baumannii* es alta en muchas regiones geográficas (Gu et al., 2007; Van Looveren y Goossens, 2004). Como se mencionó anteriormente, los integrones son muy comunes en cepas de *A. baumannii* con un fenotipo de multirresistencia. La región 3' conservada de un integrón frecuentemente contiene un gen *qac* fusionado a un gen *sul*, confiriendo resistencia a los antisépticos y sulfonamidas, respectivamente (Walsh et al., 2005). Por consiguiente, la resistencia a sulfonamida ha demostrado ser altamente predictiva de cepas de *A. baumannii* portadoras de integrones (Chen et al., 2006; Gu et al., 2007). Del mismo modo, los genes que codifican la resistencia a trimetoprim (*dhfr*) y cloranfenicol (*cat*) también se han descrito dentro de estructuras de integrones en *A. baumannii* (Gu et al., 2007; Houang et al., 2003; Lee et al., 2005a; Tsakris et al., 2006a). El eflujo de salida también puede contribuir a la resistencia contra estos agentes (Su, 2005).

A pesar de los progresos en la elucidación de la función y la base genética de los mecanismos de resistencia particulares, el conocimiento de los factores genéticos que

contribuyen a la resistencia a múltiples fármacos en *A. baumannii* es limitada. Aunque la resistencia a múltiples fármacos puede estar asociada con algunos linajes epidémicos (*Dijkshoorn et al., 1996; Nemec et al., 2004b*), cepas MDR estrechamente relacionadas pueden diferir mucho entre sí en términos de la presencia de determinantes de resistencia particulares y sus combinaciones (*Nemec et al., 2004a*). Una observación importante realizada por *Fournier et al.* es la facilidad de adquisición horizontal de genes de resistencia que ha tenido un papel crucial en el desarrollo de *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos (*Fournier et al., 2006*).

3. Papel patógeno de *A. baumannii*

A. baumannii es un patógeno oportunista que se ha relacionado con varios tipos de infección que afectan fundamentalmente a pacientes gravemente enfermos y/o ingresados en unidades de alto riesgo del hospital. En la producción de infección intervienen tanto la virulencia del microorganismo (Factores de patogenicidad) como el estado del paciente (Factores de riesgo)

3.1. Factores de patogenicidad

El hecho de que la colonización por *A. baumannii* sea más común que la infección, incluso en pacientes con factores de riesgo, hace pensar que la patogenicidad de esta especie sea generalmente baja. Sin embargo, una vez que se desarrolla una infección, ésta puede ser grave. Los estudios sobre los factores de epidemividad y patogenicidad de *A. baumannii* se encuentran aún en una etapa inicial.

En un estudio realizado en el año 2007 se secuenció el ADN de una sola cepa de *A. baumannii*. Se identificaron 16 islas genómicas que contenían los posibles genes de virulencia relacionados con la biogénesis de la envoltura celular, resistencia a los antibióticos, percepción del quórum (o *quorum sensing*), la biogénesis de pilis y el metabolismo de lípidos (*Smith et al., 2007*)

En la **figura 6** se resumen los mecanismos que podrían tener un papel en la colonización, la infección y la propagación del microorganismo. Se requieren estudios genéticos, moleculares y experimentales para dilucidar estos mecanismos en más detalle (*Dijkshoorn et al., 2007*).

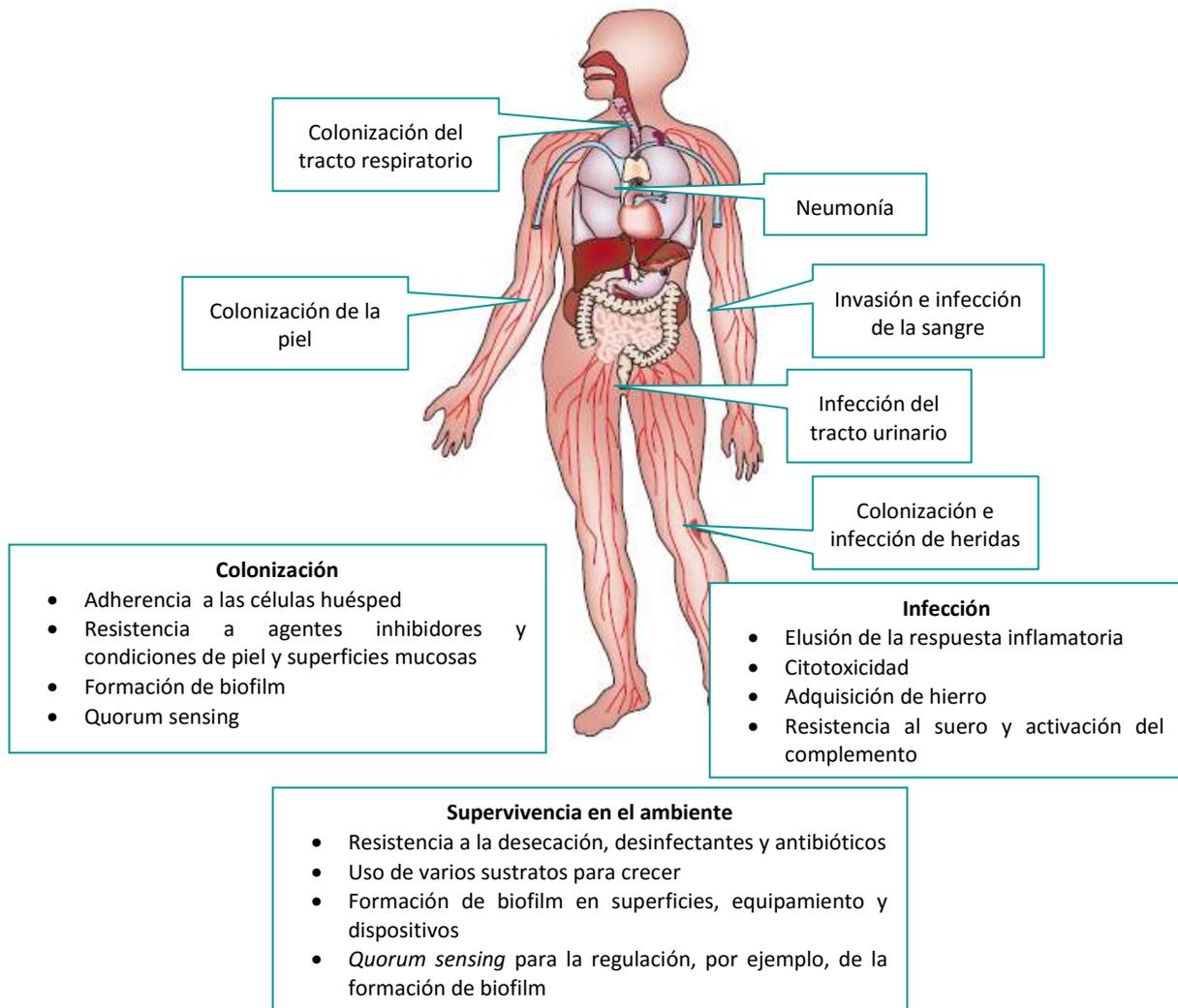


Figura 6. Factores que contribuyen a la permanencia de *A. baumannii* en el ambiente, infección y colonización (*Dijkshoorn et al., 2007*).

Entre los factores que pueden contribuir a la patogenicidad de *A. baumannii* pueden destacar:

1.- Capacidad de supervivencia en el ambiente

La supervivencia y proliferación en el ambiente se debe a ciertas características como resistencia a la desecación, desinfectantes y antibióticos (*Jawad et al., 1998; Wisplinghoff et al., 2007*), versatilidad metabólica (*Bouvet y Grimont, 1986; Diomed, 2005*), capacidad de formación de biofilm (*Tomaras et al., 2003*) y, probablemente, actividad *quorum sensing* (*Smith et al., 2007*). Finalmente, también se requieren mecanismos adecuados de respuesta a estrés para la adaptación a diferentes condiciones.

2.- Capacidad de colonización: Mecanismos implicados

La adherencia a las células del hospedador se considera el primer paso para la colonización. Esta adherencia se ha demostrado en modelos *in vitro* usando células epiteliales bronquiales (*Lee et al., 2005b*). Los pilis y los azúcares hidrófobos de la cadena lateral del lipopolisacárido (LPS) podrían promover esta adhesión (*Haseley et al., 1997*).

Un factor necesario para la supervivencia y la permanencia en la piel y en las superficies mucosas es la resistencia del microorganismo a la acción de agentes inhibidores como los antibióticos, así como resistencia a las condiciones protectoras de la piel (sequedad, bajo pH, microorganismos de la flora normal y lípidos tóxicos) y las de las membranas mucosas (presencia de moco, lactoferrina, lactoperoxidasa y desprendimiento de células). Su capacidad de formación de biofilm permite la colonización de superficies mucosas y dispositivos médicos, como catéteres intravasculares y tubos endotraqueales (*Tomaras et al., 2003*). Estos biofilms proporcionan un nicho para las bacterias, desde los que podrían colonizar pacientes y dar lugar a infecciones del tracto respiratorio o del torrente sanguíneo.

El *quorum sensing* es otro factor implicado en la colonización. La percepción del quórum o *quorum sensing* es un mecanismo de regulación de la expresión génica en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y excretan sustancias, llamadas autoinductores, que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva. Este mecanismo podría controlar diversos procesos metabólicos, incluyendo la formación de biopelículas (Antunes *et al.*, 2011; Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Smith *et al.*, 2007).

3.- Capacidad de infección: Mecanismos implicados

En experimentos *in vitro* y en animales se han identificado varios factores que podrían tener un papel en la infección por *A. baumannii*. Por ejemplo:

- La capacidad de producir respuesta inflamatoria. El lipopolisacárido (LPS) ha demostrado ser el principal componente inmunoestimulador que conduce a una respuesta proinflamatoria en modelos animales (Brade y Galanos, 1983; Knapp *et al.*, 2006).
- La citotoxicidad. La proteína A de la membrana externa de *A. baumannii* se ha asociado con inducción de citotoxicidad *in vitro*, causando muerte celular (Choi *et al.*, 2007).
- Los mecanismos de adquisición del hierro (Dorsey *et al.*, 2003) y la resistencia a la actividad bactericida del suero humano (Jankowski *et al.*, 1992) son importantes para sobrevivir en el torrente sanguíneo durante una bacteriemia.

En conjunto, la variedad de circunstancias ambientales y factores implicados en la colonización e infección de los pacientes, demuestra la extraordinaria capacidad de *A. baumannii* de adaptarse a condiciones variables. Esta capacidad sugiere que, este organismo debe poseer, además de otros factores, mecanismos eficaces de respuesta

a estrés. Junto con su resistencia a los antibióticos, estos mecanismos podrían explicar el éxito de determinadas cepas de *A. baumannii* en los hospitales.

3.2. Factores de riesgo

Diversos estudios se han ocupado de averiguar los factores de riesgo que predisponen a los individuos a la adquisición, y la infección por ABMR. Estos factores son similares a los que han sido identificados para otros organismos resistentes a múltiples fármacos e incluyen:

- Factores del huésped tales como cirugía mayor, traumatismo grave (en particular, quemados-trauma), inmunosupresión, prematuridad en recién nacidos.
- Factores de exposición tales como estancia anterior en UCI, duración de la estancia en un hospital o unidad de cuidados intensivos, la residencia en una unidad en la que *A. baumannii* es endémica y la exposición a equipos médicos contaminados.
- Factores que están relacionados con el tratamiento médico, como ventilación mecánica, presencia de dispositivos permanentes (tales como catéteres intravasculares, catéteres urinarios y tubos de drenaje), el número de procedimientos invasivos que se llevan a cabo y tratamiento antimicrobiano previo (*García-Garmendia et al., 2001*), es decir, lo habitual para la colonización e infección por patógenos oportunistas (*Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Cisneros et al., 2005; Sheng et al., 2010; Ye et al., 2010*).
- También han sido identificados otros factores de riesgo como la hidroterapia utilizada para el tratamiento de pacientes con quemaduras y el tratamiento de lavado pulsátil que se utiliza para el desbridamiento de heridas (*Maragakis et al., 2004; Wisplinghoff et al., 1999*).

Así mismo, se han descrito factores de riesgo asociados a mayor mortalidad como el tipo de infección, enfermedad grave subyacente, inmunosupresión, fallo respiratorio, necesidad de ventilación mecánica, cronicidad, estancia anterior en UCI y colonización previa por *A. baumannii*, comorbilidades (enfermedad cardiovascular, tumores malignos, mal estatus funcional, puntuación ≥ 4 según el índice de Pitt de previsión de mortalidad por sepsis) y tratamiento inadecuado (Esterly et al., 2011; Falagas et al., 2006a; Peleg et al., 2008; Sheng et al., 2010; Ye et al., 2010).

3.3. Infecciones causadas por *A. baumannii*

Es difícil valorar la frecuencia y la importancia de *A. baumannii* como agente etiológico de diferentes infecciones. Por una parte, en la gran mayoría de las publicaciones sobre las manifestaciones clínicas de las infecciones por *Acinetobacter*, los métodos utilizados para la identificación de especies no permitían la diferenciación a nivel de especie en el género *Acinetobacter* spp. y en particular las especies incluidas en el complejo *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* (*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* y *A. calcoaceticus*), algo relevante desde el punto de vista clínico por el diferente comportamiento que presentan las distintas especies en relación con su patogenicidad y sensibilidad a los antimicrobianos (Cantón y Ruíz-Garbajosa, 2013). Adicionalmente, en ocasiones es difícil diferenciar entre infección y colonización por *A. baumannii* (Joly-Guillou, 2005), existiendo una gran controversia sobre si las infecciones causadas por este organismo conducen a resultados desfavorables (Blot et al., 2003; Falagas et al., 2006a; Falagas y Rafailidis, 2007; Garnacho et al., 2003a). Sin embargo, parece estar demostrado que el aislamiento de *A. baumannii* en pacientes hospitalizados es un indicador de enfermedad grave, con una mortalidad asociada de aproximadamente del 30% (Wilson et al., 2004).

3.3.1. Modo de adquisición

Acinetobacter baumannii se asocia más a menudo con infecciones nosocomiales que comunitarias.

Infecciones comunitarias

Las infecciones por *A. baumannii* adquiridas en la comunidad (CA-AB) son clínica y epidemiológicamente distintas a las infecciones nosocomiales (Zeana et al., 2003). Son poco frecuentes, menos del 10% de todas las infecciones por *A. baumannii* (Chen et al., 2005; Falagas et al., 2007) pero las manifestaciones clínicas suelen ser más graves, con un rango de mortalidad que va desde el 30 hasta el 62% (Chen et al., 2005; Elliott et al., 2005; Falagas et al., 2007; Leung et al., 2006). Las cepas de *A. baumannii* que causan estas infecciones comunitarias son sensibles a los antimicrobianos (Leung et al., 2006; Zeana et al., 2003) y, se cree que no actúan como reservorios para infecciones nosocomiales (Zeana et al., 2003). La mayoría de las infecciones CA-AB se producen en individuos con comorbilidades subyacentes, que residen en zonas de climas tropicales y subtropicales (Falagas et al., 2007). Se han descrito en regiones del Asia Pacífico como Taiwán (Wang et al., 2002), Hong Kong (Leung et al., 2006), Singapur (Ong et al., 2009), Corea (Chong et al., 2010) y Australia (Anstey et al., 1992) y, en menor medida, en regiones no tropicales (Chen et al., 2005). *A. baumannii* es cada vez más reconocido como una causa poco común pero importante de neumonía adquirida en la comunidad. La mayoría de los casos descritos se han asociado con condiciones subyacentes, como alcoholismo, tabaquismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diabetes *mellitus*.

También se han producido infecciones asociadas a los desastres naturales y víctimas de la guerra. Un cuadro característico de *A. baumannii* es la infección de la herida asociada a desastres naturales o de origen humano, como el Terremoto de Marmara que se produjo en 1999 en Turquía, el atentado de Bali en 2002 y operaciones militares (Davis et al., 2005; Kennedy et al., 2005; Oncül et al., 2002). Se

han descrito un elevado número de infecciones de heridas profundas, infecciones de heridas por quemaduras y casos de osteomielitis asociados con víctimas repatriadas del conflicto de Irak (Davis et al., 2005). Los aislados a menudo eran resistentes a múltiples fármacos. Basándose en la idea errónea de que *A. baumannii* es ubicuo, se ha argumentado que el organismo podría haber sido inoculado en el momento de la lesión, ya sea de la piel previamente colonizada o desde el suelo contaminado. Sin embargo, datos recientes indican claramente que la contaminación del entorno de los hospitales de campaña y la transmisión de infecciones entre las instalaciones de atención sanitaria han tenido un papel importante en la adquisición de este microorganismo en estas circunstancias (Scott et al., 2007).

Infecciones nosocomiales

Las diferentes especies de *Acinetobacter* spp. son patógenos oportunistas que han sido implicados en infecciones nosocomiales que afectan principalmente a pacientes en estado crítico. Estas infecciones se atribuyen principalmente a *A. baumannii*, aunque *A. pittii* y *A. nosocomialis* también han sido implicadas. Las infecciones nosocomiales que son causadas por otras especies de *Acinetobacter*, tales como *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* y *A. ursingii*, son raras y principalmente están restringidas a bacteriemias relacionadas con el catéter (Dortet et al., 2006; Nemec et al., 2001; Nemec et al., 2003; Seifert et al., 1993b; Seifert et al., 1994a). Estas infecciones causan mortalidad mínima y su curso clínico es usualmente benigno, aunque ocasionalmente se han observado casos de sepsis muy grave (de Beaufort et al., 1999). Los brotes nosocomiales, excepcionalmente producidos por estas especies (por ejemplo, *A. junii*), se han relacionado con infusión de líquidos contaminados (de Beaufort et al., 1999).

Los múltiples factores identificados para la adquisición de infecciones nosocomiales por *Acinetobacter* incluyen enfermedad grave (Lortholary et al., 1995), infección o sepsis previa (García-Garmendia et al., 2001; Lortholary et al., 1995),

ventilación mecánica prolongada, antibioterapia previa, colonización previa por *Acinetobacter* y estancia prolongada en unidad de cuidados intensivos (Allen y Hartman, 2005; Lortholary et al., 1995; Mahgoub et al., 2002; Wisplinghof et al., 2000). La identificación de factores de riesgo es importante para la instauración de medidas de prevención de colonización e infección.

3.3.2. Tipo de infecciones

Acinetobacter baumannii puede causar una multitud de infecciones incluyendo neumonía, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de piel y tejidos blandos y meningitis (Allen y Hartman, 2005).

Neumonía

Neumonía adquirida en el hospital. En la mayoría de las instituciones, los aislamientos de *A. baumannii* proceden de las vías respiratorias de los pacientes hospitalizados. En muchas circunstancias, es muy difícil distinguir si se trata de una colonización de las vías respiratorias o de una neumonía. Sin embargo, es indiscutible, que *A. baumannii* es capaz de producir verdadera neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM). En extensos estudios de vigilancia de Estados Unidos, entre el 5 y el 10% de los casos de neumonía adquirida en la UCI se debieron a *A. baumannii* (Gaynes y Edwards, 2005). Sin embargo, es muy probable que en ciertas instituciones, la proporción de neumonía adquirida en la UCI debida a *A. baumannii* sea mucho más alta. Por lo general, los pacientes con infecciones por *A. baumannii* se encuentran ingresados durante un tiempo prolongado en UCI (Garnacho-Montero et al., 2005), si bien en situaciones de brote, puede ocurrir una adquisición temprana de la infección.

Neumonía adquirida en la comunidad. La neumonía adquirida en la comunidad por *A. baumannii* se ha descrito en las regiones tropicales de Australia y Asia (Anstey et al., 1992; Anstey et al., 2002; Bick y Semel, 1993; Gottlieb y Barnes, 1989; Leung et al.,

2006). La enfermedad ocurre más frecuentemente durante la temporada de lluvias en personas con un historial de abuso de alcohol y, a veces, puede requerir ingreso en UCI (Anstey et al., 2002). Se caracteriza por un curso clínico fulminante, bacteriemia secundaria, y una tasa de mortalidad del 40 al 60% (Anstey et al., 2002; Chen et al., 2001; Leung et al., 2006). La fuente de la infección puede ser la colonización de la garganta, que se produce hasta en el 10% de residentes de la comunidad con el consumo excesivo de alcohol (Anstey et al., 2002). Los australianos indígenas en el Territorio del Norte están sobrerrepresentados en relación con la población en general en los índices de neumonía bacteriémica extrahospitalaria causada por *A. baumannii* y otros patógenos (Anstey et al., 1992; Elliott et al., 2005).

Bacteriemia

En un amplio estudio de bacteriemia nosocomial en Estados Unidos (1995-2002), *A. baumannii* fue el décimo agente etiológico más común, siendo responsable del 1,3% de todas las bacteriemias nosocomiales monomicrobianas (0,6 bacteriemias por 10.000 admitidos) (Wisplinghoff et al., 2004). *A. baumannii* fue una de las causas más comunes de bacteriemia adquirida en la UCI comparado con las no adquiridas en esta unidad (1,6% frente a 0,9% de bacteriemias, respectivamente, en esos lugares). La mortalidad global de bacteriemia por *A. baumannii* fue del 34% al 43,4% en la UCI y del 16,3% fuera de la UCI, representando la tercera tasa de mortalidad más alta en la UCI, sólo superado por las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida* sp. Las infecciones por *A. baumannii* se adquirían tras producirse otras infecciones (después de una media de 26 días desde el momento del ingreso en el hospital) (Wisplinghoff et al., 2004). Por lo tanto, se desconoce si la alta tasa de mortalidad se debió a que los pacientes cursaban con enfermedad subyacente grave o si el microorganismo tuvo una mortalidad atribuible significativa. En el estudio mencionado no describen las fuentes de las bacteriemias, pero típicamente son atribuidas a neumonía subyacente, infección del tracto urinario o infección de herida (Seifert et al., 1995).

Infecciones del tracto urinario (ITU)

A. baumannii es una causa ocasional de ITU, siendo responsable sólo del 1,6% de las infecciones urinarias adquiridas en la UCI en un estudio realizado en Estados Unidos (Gaynes y Edwards, 2005). Normalmente, la infección por este microorganismo se asocia con la presencia de sonda o colonización. No es habitual que este organismo cause ITU no complicada en pacientes ambulatorios sanos.

Heridas traumáticas y otras heridas

A. baumannii puede causar ocasionalmente infecciones de piel y tejidos blandos. Este organismo fue el agente etiológico del 2,1% de las infecciones de piel y tejidos blandos adquiridas en la UCI, según un estudio realizado en Estados Unidos (Gaynes y Edwards, 2005). Es un patógeno bien conocido en unidades de quemados y puede ser difícil de erradicar en tales pacientes (Trottier et al., 2007). Sin embargo, su contribución a un peor pronóstico en los pacientes con quemaduras es debatida (Albrecht et al., 2006; Wisplinghoff et al., 1999). *A. baumannii* se ha aislado comúnmente de heridas de víctimas de combate de Irak o Afganistán (Johnson et al., 2007a; Murray et al., 2006; Petersen et al., 2007; Scott et al., 2007; Whitman, 2007; Yun et al., 2006). Fue el organismo más comúnmente aislado (32,5% de los casos) en una evaluación de las víctimas de combate con fracturas de tibia (Johnson et al., 2007a). Sin embargo, parece que en esta localización tiene baja patogenicidad. Tras tratamiento inicial, el organismo nunca fue aislado de cultivos de seguimiento en ninguno de los pacientes con fracturas abiertas de tibia y no parecen contribuir directamente a la persistencia de falta de unión o a la necesidad de amputación (Johnson et al., 2007a).

Meningitis

La meningitis nosocomial post-neurocirugía por *A. baumannii* es una entidad cada vez más importante. La epidemiología microbiana de la meningitis nosocomial está evolucionando para incluir más patógenos Gram-negativos (*Briggs et al., 2004; Durand et al., 1993; Palabiyikoglu et al., 2006; Siegman-Igra et al., 1993*), por lo que no sorprende que *A. baumannii* multirresistente sea uno de los patógenos implicados (*Metan et al., 2007a; Nguyen et al., 1994; Núñez et al., 1998; O'Neill et al., 2006*). Los pacientes que con más frecuencia sufren este tipo de infección son aquellos que han sido sometidos a neurocirugía y que tienen un drenaje ventricular externo (*Metan et al., 2007b*). La mortalidad puede ser alta, hasta un 70%, aunque la causa de la mortalidad es a menudo difícil de discernir (*Metan et al., 2007b*).

Otras manifestaciones

Existe un pequeño número de casos clínicos de endocarditis por *Acinetobacter* (*Menon et al., 2006; Olut y Erkek, 2005; Rizos et al., 2007; Starakis et al., 2006; Valero et al., 1999*) La mayoría de casos, pero no todos, se producen sobre válvulas protésicas. *Acinetobacter* spp. puede causar endoftalmitis o queratitis, a veces en relación con el uso de lentes de contacto o tras una cirugía ocular (*Corrigan et al., 2001; Kau et al., 2002; Levy et al., 2005; Lindbohm et al., 2005*). Sólo se ha descrito un caso de una cepa de *A. haemolyticus* productor de toxina Shiga, que se asoció con diarrea con sangre en un niño de 3 meses de edad (*Grotiuz et al., 2006*). Hay que tener en cuenta que la identificación de especies sigue siendo un problema en estos informes.

3.4. Impacto clínico

Dada la predilección de *A. baumannii* por colonizar e infectar pacientes en estado crítico, que a menudo tienen un mal pronóstico con independencia de las

complicaciones infecciosas secundarias, ha sido difícil determinar el verdadero impacto clínico de este agente patógeno y, todavía existe mucho debate en la literatura sobre este tema (*Falagas et al., 2006a; Falagas et al., 2006b; Sunenshine et al., 2007*).

Los problemas que existen para valorar el impacto clínico son:

-Diferencias metodológicas. Existe una heterogeneidad metodológica significativa entre los estudios, por lo que ha sido difícil obtener conclusiones. La mayoría de los estudios utilizan unas cohortes combinadas o estudios caso-control, pero las definiciones utilizadas para caso y grupo control son claramente diferentes entre los estudios. Por ejemplo, las definiciones de caso incluyen: pacientes solo con infección por *A. baumannii* (*Albrecht et al., 2006; Garnacho et al., 2003a; Sunenshine et al., 2007*), o incluyen infección y colonización (*Abbo et al., 2007; Loh et al., 2006; Lortholary et al., 1995; Playford et al., 2007*), o infección de un sitio (*Blot et al., 2003; Garnacho et al., 2003a; Grupper et al., 2007; Kwon et al., 2007; Wisplinghoff et al., 1999*), o infección de múltiples sitios (*Abbo et al., 2007; Albrecht et al., 2006; Sunenshine et al., 2007*). En algunos estudios también se incluyen los pacientes con infecciones polimicrobianas (*Blot et al., 2003; Wisplinghoff et al., 1999*).

-Diversidad en los controles. La heterogeneidad en los controles es lo que realmente distingue un estudio de otro. En algunos estudios los controles incluyen pacientes colonizados por *A. baumannii*, o aquellos sin infección por este microorganismo, o incluye pacientes con infección por *A. baumannii* sensible a fármacos pero no aquellos pacientes infectados por cepas de *A. baumannii* resistentes (*Blot et al., 2003; Garnacho et al., 2003a; Wisplinghoff et al., 1999*). Esta variedad de controles impide comparar los resultados obtenidos de diferentes estudios.

-Gravedad del paciente. El rigor con que se consideran los factores de gravedad de la enfermedad y las comorbilidades varía, y por lo tanto, introducen confusión al comparar los datos publicados en la literatura.

-Identificación de especie. La calidad en la identificación de especies en muchos estudios no es la óptima y también puede afectar a los resultados.

Otro tema que permanece sin resolver es la mortalidad atribuible. Por ejemplo, en un estudio realizado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, "Centers for Disease Control and Prevention"), en el que se ajustaron los factores variables y se utilizaron unas definiciones claras para la comparación de los grupos, no hubo un aumento significativo en la mortalidad entre las personas infectadas por *A. baumannii* multirresistente y las que no tenían la infección por este microorganismo (*odds ratio* [OR], 6,6; 95% intervalo de confianza [95% IC]: 0,4 a 108,3) (Sunenshine et al., 2007). Sin embargo, la estancia en el hospital y en UCI fue significativamente más larga en aquellos pacientes con infección por *A. baumannii* multirresistente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Albrecht et al., 2006; Blot et al., 2003; Loh et al., 2006; Garnacho et al., 2003a), pero contrastan con muchos otros (Abbo et al., 2007; García-Garmendia et al., 1999; Grupper et al., 2007; Kwon et al., 2007; Lortholary et al., 1995).

Curiosamente, cuando se compararon directamente los resultados de bacteriemia por *A. baumannii* con los de los pacientes que tenían bacteriemia por otros organismos Gram-negativos, incluyendo *Klebsiella pneumoniae*, se observó un aumento significativo de la mortalidad para *A. baumannii* (Jerassy et al., 2006; Robenshtok et al., 2006). Otro estudio mostró un aumento significativo de la mortalidad con la infección o colonización por *A. baumannii* en comparación con la infección o colonización por *Pseudomonas* multirresistente utilizando un análisis de Kaplan-Meier (Gkrania-Klotsas et al., 2006). Sin embargo, ninguno de estos estudios utilizó un método formal y estandarizado para ajustar por gravedad la enfermedad o comorbilidades, tales como la escala APACHE, Mc-Cabe, o la puntuación de Charlson (Charlson et al., 1987; LeGall et al., 1986). Se desconoce si las diferencias entre los estudios pueden explicarse puramente por la metodología. La mayoría de los estudios están realizados en un área geográfica determinada y, es posible, que las diferencias

de virulencia entre cepas de diferentes áreas origine la diversidad en los resultados. Esta idea concuerda con la mayor gravedad observada en pacientes infectados por *A. baumannii* procedentes de la comunidad en comparación con los de pacientes infectados en el hospital, incluyendo una alta incidencia de bacteriemia, síndrome de dificultad respiratorio agudo, coagulación intravascular diseminada, y la muerte (Leung et al., 2006).

Muchos estudios describen altas tasas de mortalidad general en pacientes con bacteriemia o neumonía por *A. baumannii* (Cisneros et al., 1996; Seifert et al., 1995). Sin embargo, *A. baumannii* afecta principalmente a pacientes con enfermedad de base grave y un mal pronóstico. Por lo tanto, se ha argumentado que la mortalidad que se observa en pacientes con infecciones por *A. baumannii* es causada por su enfermedad subyacente, más que como una consecuencia de la infección por *A. baumannii*. En un estudio de casos y controles, Blot et al. (Blot et al., 2003) estudiaron si *A. baumannii* contribuye de forma independiente a la mortalidad y concluyeron que la bacteriemia por *A. baumannii* no está asociada con un aumento significativo de la mortalidad atribuible. Se han obtenido hallazgos similares para la neumonía por *A. baumannii* por Garnacho et al. (Garnacho et al., 2003a). Por el contrario, en las últimas revisiones de cohortes y estudios de casos y controles, Falagas et al. (Falagas et al., 2006a; Falagas y Rafailidis, 2007) concluyeron que la infección por *A. baumannii* se asoció con un aumento de la mortalidad atribuible, que va desde 7,8 hasta 23%. Estas conclusiones contradictorias muestran que el debate sobre el impacto clínico de *A. baumannii* está aún por resolver.

3.5. Tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* multirresistente.

La amplia gama de determinantes de resistencia intrínsecos y adquiridos que han surgido en *A. baumannii* hace que las infecciones causadas por este microorganismo sean un grave problema de salud debido a las escasas opciones terapéuticas disponibles (Álvarez et al., 2002; Martínez et al., 2002). Según lo

determinado por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América, *A. baumannii* es uno de los patógenos "alerta roja" que amenazan en gran medida la utilidad de nuestro arsenal antibacteriano actual (Talbot et al., 2006). Antes de la década de 1970, era posible el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter* con una gran variedad de antibióticos, incluidos los aminoglucósidos, betalactámicos, y las tetraciclinas (Bergogne-Bérézín y Towner, 1996). Sin embargo, ha aparecido la resistencia a todos los antibióticos conocidos en *A. baumannii* (Falagas y Bliziotis, 2007; Landman et al., 2002), lo que provoca que la mayoría de médicos se encuentren sin opciones terapéuticas. Ni las penicilinas de amplio espectro ni las cefalosporinas se consideran efectivas para el tratamiento de infecciones graves por *A. baumannii*. Incluso si los aislados se consideran sensibles de acuerdo con los ensayos *in vitro*, sus valores de concentración mínima inhibitoria están generalmente cerca del punto de corte clínico. Las fluoroquinolonas se han mantenido activas contra las cepas esporádicas de *A. baumannii* pero ahora la resistencia está muy extendida entre las cepas epidémicas de *A. baumannii*, lo que hace que estos antimicrobianos ya no sean útiles. Los aminoglucósidos, tobramicina y, en particular, amikacina, a menudo conservan su actividad frente aislados resistentes de *A. baumannii*, sin embargo, estos compuestos rara vez se utilizan solos y generalmente se aplican en combinación con otros antibióticos.

Complica el problema el hecho de que, un gran número de empresas farmacéuticas han abandonado el descubrimiento y desarrollo de antibióticos. La escasez de antibióticos, especialmente para microorganismos Gram-negativos, ha estimulado la atención de los principales organismos de investigación y de gobierno (National Institutes of Health, 2006; Talbot et al., 2006). Desafortunadamente, en este momento, muy pocos están en proyecto terapéutico (Rice, 2006), y los nuevos agentes con actividad contra organismos Gram-negativos son modificaciones de clases existentes. Se requieren con urgencia nuevas dianas antibióticas y mecanismos de acción.

Teniendo en cuenta la situación terapéutica actual, la optimización del uso de los antimicrobianos existentes es crítica. Para lograr este objetivo, se requiere una comprensión a fondo de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que predicen la eficacia máxima del fármaco, reducir al mínimo la evolución de la resistencia a los fármacos, así como una evidencia basada en estrategias terapéuticas para las cepas muy resistentes a fármacos.

Dada la amplitud y diversidad de determinantes de resistencia en *A. baumannii*, la terapia debe basarse en los resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas adecuadamente. La selección de antibióticos para el tratamiento empírico es un reto y debe basarse en los datos de sensibilidad recientes a nivel institucional. El tiempo de inicio de una terapia eficaz afecta claramente a los resultados del paciente (*Ibrahim et al., 2000; Kollef et al., 1999*), y esto puede incluir a pacientes con infección por *A. baumannii* (*Falagas et al., 2006c; Kwon et al., 2007*). Se ha analizado el impacto clínico de la terapia empírica sobre los resultados de los pacientes con bacteriemia por *A. baumannii*. Varios estudios deducen que la administración de terapia empírica no adecuada es un factor predictivo independiente de una mayor mortalidad (*Kwon et al., 2007; Lin et al., 1998; Rodríguez-Baño et al., 2003*), mientras que otros no han podido confirmar estos hallazgos (*Albrecht et al., 2006; Choi et al., 2005; Falagas et al., 2006c; Grupper et al., 2007; Sunenshine et al., 2007*). Tales diferencias pueden relacionarse con el pequeño número de pacientes incluidos en estos estudios y la consiguiente falta de poder estadístico.

Los antibióticos actuales más activos para el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii*, mejor en combinación que monoterapia y administración temprana, son los carbapenems, sulbactam, colistina, tigeciclina, amikacina y rifampicina (*Gobernado, 2011*).

3.5.1. Carbapenems

Hasta el momento, los carbapenems por vía intravenosa son los agentes de elección para las infecciones graves por cepas de *A. baumannii* sensibles, con buena distribución en los distintos tejidos, incluyendo pulmonar y LCR. Sin embargo, aunque estos antibióticos son todavía activos contra la gran mayoría de las cepas de *A. baumannii* en todo el mundo, la utilidad clínica de esta clase de antimicrobianos está cada vez más en peligro por la aparición de mecanismos de resistencia enzimáticos y no enzimáticos, que a menudo actúan conjuntamente (Bou et al., 2000a; Quale et al., 2003). Se está describiendo un aumento de la frecuencia de cepas resistentes a carbapenems en todo el mundo, desafiando a una de las últimas líneas de defensa más potentes. Para las cepas resistentes a carbapenems, la asociación de los mismos con sulbactam ha mostrado, *in vitro* y en modelos animales experimentales, resultados sinérgicos o parcialmente sinérgicos (Kiffer et al., 2005; Ko et al., 2004).

3.5.2. Sulbactam

Sulbactam es uno de los tres inhibidores de betalactamasas disponibles comercialmente. A diferencia del ácido clavulánico y tazobactam, tiene actividad antimicrobiana intrínseca clínicamente relevante contra muchas especies de *Acinetobacter* (Brauers et al., 2005; Corbella et al., 1998; Higgins et al., 2004b; Levin, 2002; Levin et al., 2003; Obana y Nishino, 1990; Rodríguez-Hernández et al., 2001), mediada por su PBP2 (proteína de unión a la penicilina) (Noguchi y Gill, 1988). Además de inhibir las betalactamasas de espectro extendido, no causa inducción de las mismas y es bactericida frente *A. baumannii*. Su actividad es tiempo-dependiente (Rodríguez-Hernández et al., 2001). Sulbactam está comercialmente disponible en una formulación combinada con ampicilina o cefoperazona y también como agente único en Francia, Alemania y España (Brauers et al., 2005; Levin, 2002). La sensibilidad *in vitro* de las cepas de *A. baumannii* a sulbactam varía ampliamente, dependiendo de la región geográfica (Levin, 2002).

A pesar de la ausencia de ensayos clínicos aleatorizados, sulbactam ha mostrado resultados prometedores frente a las cepas de *A. baumannii* con diferentes perfiles de sensibilidad. Utilizando estudios de tiempo-mortalidad, algunos autores han demostrado una actividad bactericida contra cepas sensibles más que las de resistencia intermedia de *A. baumannii* (Obana y Nishino, 1990; Rodríguez-Hernández et al., 2001), mientras que otros han demostrado la actividad bacteriostática (Corbella et al., 1998).

Urban et al. desarrollaron un pequeño estudio que evaluaba la eficacia clínica del sulbactam durante un brote de *A. baumannii* resistentes a los carbapenems, aminoglucósidos y otros betalactámicos (Urban et al., 1993). Todos los aislamientos fueron resistentes a múltiples fármacos, pero fueron sensibles a imipenem, sulbactam y polimixinas. Como se señala en ese estudio, el uso de un régimen con sulbactam para las infecciones más leves puede ser una estrategia apropiada para limitar el uso excesivo de carbapenem. Actualmente, hay más datos disponibles que apoyan la eficacia del tratamiento con sulbactam para las infecciones graves por *A. baumannii*.

Sulbactam, administrado sólo o en combinación con ampicilina ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de las infecciones graves por ABMR, neumonías asociadas a ventilación mecánica (Urban et al., 1993; Wood et al., 2002) y, a pesar de su escasa penetración en el SNC, para meningitis hospitalarias por *A. baumannii* (Jiménez-Mejías et al., 1997). Desafortunadamente, la resistencia a sulbactam es común en ciertas áreas geográficas, y este fenotipo sin duda aumentará con el tiempo.

3.5.3. Polimixinas (Colistina)

La aparición de cepas de *A. baumannii* resistentes a todos los antimicrobianos utilizados habitualmente ha llevado a la necesidad de renacimiento de los antibióticos polipeptídicos conocidos como Polimixinas (colistina o polimixina E y polimixina B). Su mecanismo de acción ha permitido, durante más de medio siglo, que la mayoría de los

bacilos Gram-negativos patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa* y *A. baumannii*, retengan su sensibilidad al antibiótico y sea útil en infecciones causadas por ellos (Falagas y Kasiakou, 2005; Gounden et al., 2009). Hay dos formas de colistina comercialmente disponibles, colistin sulfato para la administración oral y tópica, y CMS (colistimetato sódico), también conocido como colistin metanosulfonato sódico, para uso parenteral (Li et al., 2006b). Ambas formas están disponibles para la nebulización, lo que mejora la penetración pulmonar de este fármaco y permite incrementar la evolución favorable de las neumonías por este microorganismo (Rattanaumpawan et al., 2010).

Teniendo en cuenta que las polimixinas fueron descubiertas hace 50 años, no fueron sometidas al proceso riguroso de desarrollo de fármacos, por lo tanto, los conocimientos de los parámetros farmacológicos fundamentales que regulan la dosificación para la eficacia máxima y mínima toxicidad son escasos. Como consecuencia, existe confusión entre los clínicos y en la literatura en cuanto a formulaciones, nomenclatura y dosificación (Falagas y Kasiakou, 2006; Li et al., 2006b; Li et al., 2006c). Son necesarios estudios que aporten esta información para evitar poner en peligro este valioso antimicrobiano (Antoniadou et al., 2007; Falagas y Bliziotis, 2007; Li et al., 2006a; Reis et al., 2003).

In vitro, la colistina demuestra actividad bactericida dependiente de la concentración frente a cepas de *A. baumannii* con diversos perfiles de sensibilidad (Montero et al., 2002; Owen et al., 2007; Rodríguez-Hernández et al., 2004). Sin embargo, Li et al. (Li et al., 2006a) encontraron heterorresistencia en 15 de los 16 aislados de *Acinetobacter* sensibles a la colistina estudiados *in vitro*. Pases seriados de los aislamientos en presencia de colistina hizo aumentar la proporción de subpoblaciones resistentes a la colistina. Owen et al. (Owen et al., 2007) también encontraron evidencia *in vitro* de heterorresistencia, lo que sugiere que la terapia de combinación puede ser aconsejable para evitar la aparición de la resistencia a la

colistina durante la monoterapia. Aún está por determinar si este fenómeno es clínicamente relevante.

En cuanto a la eficacia de la colistina para el tratamiento de la infección por *A. baumannii*, en general, es muy alentadora, tanto en poblaciones adultas como pediátricas, con respuestas favorables o curativas que van desde el 57 % a >80 % (Falagas et al., 2006d; Garnacho-Montero et al., 2003b; Goverman et al., 2007; Holloway et al., 2006; Kallel et al., 2006; Koomanachai et al., 2007; Levin et al., 1999; Markou et al., 2003; Michalopoulos et al., 2005a; Ouderkirk et al., 2003; Reina et al., 2005; Sobieszczyk et al., 2004) en pacientes gravemente enfermos con diversas infecciones por *A. baumannii* multirresistente (incluyendo neumonía, bacteriemia, sepsis, infección intraabdominal e infección del SNC) (Maragakis y Perl, 2008; Shirawi et al., 2006).

Muchos estudios *in vitro* y en animales apoyan el papel de la terapia combinada con colistina. En particular, la colistina en combinación con un carbapenem y/o rifampicina parece la combinación más prometedora (Giamarellos-Bourboulis et al., 2001; Hogg et al., 1998; Manikal et al., 2000; Montero et al., 2004; Pantopoulou et al., 2007; Song et al., 2007; Tascini et al., 1998; Timurkaynak et al., 2006; Yoon et al., 2004). Desafortunadamente, hay muy pocos datos en humanos disponibles para apoyar estos estudios *in vitro*. Muchos de los datos clínicos sobre la eficacia de colistina provienen de series de casos no controlados y retrospectivos, que a menudo incluyen poblaciones heterogéneas. En muchos de estos estudios, la mayoría de los pacientes además de la colistina, recibieron una mezcla de otros antimicrobianos, más comúnmente carbapenems, pero también quinolonas, aminoglucósidos, sulbactam, rifampicina y otros (Berlana et al., 2005; Falagas et al., 2006d; Koomanachai et al., 2007; Kwa et al., 2005; Markou et al., 2003; Michalopoulos et al., 2005a; Michalopoulos et al., 2005b; Ouderkirk et al., 2003; Sobieszczyk et al., 2004). En ausencia de un buen grupo de control, es difícil sacar conclusiones acerca de los beneficios potenciales de la terapia combinada (Motaouakkil et al., 2006; Petrosillo et

al., 2005; Sobieszczyk et al., 2004). La utilidad clínica de la sinergia *in vitro* sigue estando poco clara. La mayoría de resultados para la terapia combinada son comparables a las tasas de curación informadas para el tratamiento solo con colistina parenteral, y la amplia variedad de otros agentes utilizados limitan la capacidad de sacar conclusiones con respecto a la terapia combinada. Actualmente se desconoce si la terapia combinada va a proteger a la colistina de la aparición de resistencia, pero un modelo farmacodinámico *in vitro* sugiere que esto puede ser posible (*Kroeger et al., 2007*). Por lo tanto, son necesarios estudios clínicos controlados para determinar si cualquier combinación de antimicrobianos es una estrategia terapéutica útil (*Maragakis y Perl, 2008*).

Aunque la resistencia de *A. baumannii* contra las polimixinas sigue siendo rara (*Li et al., 2006a*), ya se han comunicado casos de cepas resistentes posiblemente como resultado de alteraciones en la membrana celular externa o por mecanismos de bombas de eflujo (*Falagas y Kasiakou, 2005; Gales et al., 2006; Li et al., 2006b; Maragakis y Perl, 2008; Shirawi et al., 2006; Urban et al., 2001*). Se han descrito tasas de resistencia a las polimixinas tan altas como 3,2% para las cepas de *A. baumannii* multirresistente (*Gales et al., 2006*), con las mayores tasas en Corea del Sur (*Ko et al., 2007*).

3.5.4. Tigeciclina

La tigeciclina fue el primer antibiótico gliciliciclina desarrollado y es uno de los pocos antimicrobianos nuevos que tiene actividad contra las bacterias Gram-negativas que abarca no sólo a la mayoría de *Enterobacteriaceae*, sino también - al menos *in vitro* - a *A. baumannii* multirresistente (ABMR) (*Dijkshoorn et al., 2007*). Este antimicrobiano, con actividad bacteriostática frente a especies de *Acinetobacter* multirresistente (*Pachón-Ibáñez et al., 2004; Seifert et al., 2006*), ha aportado una nueva perspectiva en el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii*. La tigeciclina bloquea la síntesis proteica de las bacterias, pero su característica única es su

capacidad para evadir los mecanismos de resistencia principales a las tetraciclinas: protección ribosomal, y los condicionados por bombas de eflujo (*Fluit et al., 2005; Petersen et al., 1999*).

El amplio espectro de la tigeciclina, junto con la posibilidad de su asociación con colistina y otros antibióticos como amikacina, ha abierto la puerta para su empleo en el tratamiento de infecciones causadas por ABMR tanto en piel como en tejidos blandos, así como en bacteriemias y neumonías asociadas a ventilación mecánica (*Jamal et al., 2009*); no obstante, como es difícil mantener concentraciones terapéuticas adecuadas en el plasma con las dosis habituales, por su rápida distribución, su utilidad tanto en neumonías como en bacteriemias es cuestionada (*Chan et al., 2010*).

Ya se han descrito resistencias de alto a nivel en algunas cepas, determinadas por la suprarregulación de bombas de eflujo codificadas cromosómicamente (*Anthony et al., 2008; Insa et al., 2007; Jones et al., 2007; Livermore, 2005; Maragakis y Perl, 2008; Navon-Venezia et al., 2007; Peleg et al., 2007a; Reid et al., 2007; Rice, 2006*). *Peleg et al.* detectaron, en enfermos con bacteriemia tratados con tigeciclina, cepas de *A. baumannii* multirresistente con disminución de sensibilidad a la misma e infecciones de brecha (*Peleg et al., 2007a*). Dos estudios documentan la sobreexpresión de una bomba de flujo multifármaco en aislados de *Acinetobacter* con disminución de la sensibilidad a tigeciclina (*Peleg et al., 2007b; Ruzin et al., 2007*). Dados estos hallazgos y la preocupación acerca de si se pueden lograr picos de concentraciones séricas adecuados, es mejor reservar el tratamiento con tigeciclina para los casos en los que no existan otras opciones terapéuticas válidas (*Peleg et al., 2007a*).

La importancia clínica de la resistencia a este compuesto en *A. baumannii* es un tema controvertido, pues no hay acuerdo en los puntos de corte a usar y, además, dependiendo del medio de cultivo empleado para determinar la sensibilidad (en

función de su concentración de manganeso) pueden obtenerse falsas resistencias (Fernández-Mazarrasa et al., 2009).

3.5.5. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos, particularmente amikacina y tobramicina, son opciones terapéuticas para la infección por cepas de *A. baumannii* sensibles, pero dadas las características farmacocinéticas y farmacodinámicas, normalmente se deben usar en combinación con otros antimicrobianos (excepto en infecciones urinarias). No obstante, hay cepas de *A. baumannii* multirresistente que muestran sensibilidad intermedia a amikacina o tobramicina, en relación con enzimas modificadoras de aminoglucósidos o mecanismos de bombas de eflujo (Maragakis y Perl, 2008; Murray y Hospenthal, 2005).

3.5.6. Rifampicina

En cuanto a la rifampicina, la mayor parte de la evidencia sobre su eficacia en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* deriva de modelos experimentales. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que rifampicina tiene el mayor poder bactericida dentro de los antibióticos testados y que en monoterapia es eficaz en el tratamiento de neumonía experimental causada por *A. baumannii* multi- y panresistente en ratones inmunocompetentes (Maragakis y Perl, 2008; Vila y Pachón, 2008). También hay estudios que demuestran que la rifampicina en asociación con imipenem, colistina y sulbactam tiene efecto sinérgico (Giamarellos-Bourboulis et al., 2001; Yoon et al., 2004).

3.5.7. Otros

Otros agentes con actividad contra organismos Gram-negativos incluyen doripenem, un nuevo carbapenem parenteral, y la nueva generación de cefalosporinas

con actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), ceftobiprole y ceftaroline. En este punto, ninguno de estos agentes parecen tener ventajas significativas sobre los antimicrobianos actuales para *A. baumannii*, pero los datos *in vitro* que se tienen para doripenem sugieren una ligera ventaja sobre meropenem (Fritsche *et al.*, 2005; Jones, 2007; Mushtaq *et al.*, 2004; Mushtaq *et al.*, 2007). Los datos clínicos aún están pendientes.

3.5.8. Terapia combinada

La terapia combinada antimicrobiana parece ser una alternativa razonable para combatir a *A. baumannii* multirresistente, convirtiéndose así en un área de gran interés (Rahal, 2006). Esta estrategia tiene como objetivo crear una combinación activa de dos agentes frente a organismos resistentes. Además de mejorar la eficacia, la terapia combinada también puede ayudar a prevenir la aparición de resistencia cuando al menos un agente es activo *in vitro* (Chait *et al.*, 2007; Pachón-Ibañez *et al.*, 2006). La falta de ensayos clínicos controlados hace difícil evaluar el papel de la sinergia o la terapia combinada en el tratamiento de la infección por *A. baumannii* multirresistente. La mayoría de los datos disponibles proceden de series de casos, modelos animales o estudios *in vitro*. Aunque existen un número considerable de estudios *in vitro*, y de estudios en animales que han utilizado un modelo murino de neumonía (Montero *et al.*, 2004; Pantopoulou *et al.*, 2007; Petrosillo *et al.*, 2005; Saballs *et al.*, 2006), diferentes estudios han demostrado resultados contradictorios para las mismas combinaciones de antibióticos (Hernández *et al.*, 2010). Los estudios de terapia combinada con sulbactam o las polimixinas constituyen el grupo principal y más prometedor. También se han estudiado otras combinaciones mediante técnicas *in vitro* y en modelos animales, incluyendo diversas combinaciones de quinolonas, betalactámicos, y/o amikacina (Bonapace *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 1995; Drago *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2004; Roussel-Delvallez *et al.*, 1996). Los resultados del tratamiento combinado con quinolonas son variados, con pérdida de eficacia cuando se usó ciprofloxacino para *A. baumannii* resistentes a este antibiótico (Ermertcan *et al.*, 2001),

así como una menor actividad de levofloxacino combinado con imipenem o amikacina en un modelo de neumonía en ratón (*Joly-Guillou et al., 2000*). Curiosamente, se observó mejora en la actividad cuando se combinó aztreonam con otro betalactámico frente a un selecto grupo de cepas de *A. baumannii* productoras de metalobetalactamasas (MBLs) (*Sader et al., 2005b*). *Montero et al.* estudiaron un modelo de neumonía por *A. baumannii* multirresistente en ratones y encontraron que las combinaciones de rifampicina con imipenem, tobramicina o colistina, tenían las mayores tasas de curación (*Montero et al., 2004*). Sin embargo, después de realizar un pequeño estudio clínico preliminar, el mismo grupo sugirió otra combinación para la infección por *A. baumannii* con un patrón de resistencia similar (*Saballs et al., 2006*). En un estudio realizado en cerdos, la combinación de imipenem y amikacina resultó peor que el imipenem en monoterapia para el tratamiento de las neumonías causadas por *Acinetobacter* resistente a imipenem, a pesar de la sinergia demostrada *in vitro* para estos dos agentes (*Bernabeu-Wittel et al., 2005*). Desafortunadamente, en algunas regiones geográficas, se requieren medidas terapéuticas desesperadas, incluyendo el uso de múltiples agentes antibacterianos que de manera aislada se prevé que tengan poca actividad frente a la infección por una cepa de *A. baumannii*, según lo determinado por pruebas estandarizadas de laboratorio (*Peleg et al., 2008*).

En conclusión, la experiencia clínica con la terapia combinada es limitada. A la luz de los pocos agentes que están actualmente disponibles para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multirresistente, se necesitan con urgencia estrategias de tratamiento alternativas (fármacos no tradicionales, terapia combinada, dosis mayores, tiempos de administración más prolongados, o diferentes vías de administración para algunas infecciones) (*Cooper et al., 2011; Neonakis et al., 2011*) y nuevos agentes, como antibióticos peptídicos de origen eucariota, (magainina, cecropina A, cecropina P1, e indolicidina, melitina, mastoparín y otros), con alta afinidad por los fosfolípidos aniónicos de la membrana citoplasmática bacteriana (bactericidas), y con acción sinérgica con antibióticos convencionales (*Vila-Farres et al., 2011*). También se está estudiando el uso potencial del aceite esencial de la planta

Artemisia dracunculus, con propiedades antifúngicas y antitumorales (Jazani et al., 2011). Otra alternativa, no antibiótica, puede ser la inmunización pasiva y activa, usando una vacuna inactivada con cuerpos celulares enteros y suero inmune, o con múltiples antígenos de superficie de la membrana bacteriana de *A. baumannii*, generando respuesta inmunitaria humoral y celular capaz de reducir la carga bacteriana postinfección, la concentración de citoquinas proinflamatorias séricas y protección de los ratones contra la infección (McConnell et al., 2011).

4. Brotes nosocomiales de *A. baumannii* MR. Epidemiología molecular

El aumento observado de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems se ha asociado casi exclusivamente a la aparición de brotes hospitalarios (Coelho et al., 2006b; Manikal et al., 2000; Marais et al., 2004). Se ha sugerido que cualquier aislado clínico de *A. baumannii* con resistencia a múltiples antibióticos puede ser un indicador de la existencia de un brote. Varios investigadores han observado que las tasas de resistencia en cepas de *A. baumannii* epidémicas son significativamente mayores que las de las cepas de *A. baumannii* esporádicas (Dijkshoorn et al., 1996; Heinemann et al., 2000; Jawad et al., 1998; Koeleman et al., 2001a). Esto contribuye a que los brotes nosocomiales causados por *A. baumannii* sean muy difíciles de controlar (Rodríguez-Baño et al., 2009; Valencia et al., 2009) y a que las opciones terapéuticas para tratar las infecciones que causan sean escasas o nulas (Kempf y Rolain, 2012; Vila y Pachón, 2008).

4.1. Brotes nosocomiales

Las infecciones por *Acinetobacter baumannii* en forma de brotes nosocomiales han experimentado un incremento a nivel mundial en los últimos 15 años (Villegas y Hartstein, 2003), especialmente en las unidades de críticos (Valencia et al., 2009).

Una vez introducido en el hospital, *Acinetobacter baumannii* tiene un patrón epidemiológico caracterizado por brotes de cepas multirresistentes, con la consecuente endemia de múltiples cepas y de cepas epidémicas predominantes en cualquier momento. Las hospitalizaciones prolongadas se encuentran entre los principales factores que contribuyen a mantener la endemia de *A. baumannii*. Los estudios epidemiológicos demuestran que *A. baumannii* se encuentra como principal patógeno causante de infecciones en hospitales de países europeos como España (Ruíz *et al.*, 2003), Italia (Gombac *et al.*, 2002) e Inglaterra (Spence *et al.*, 2004). En Estados Unidos, se describen brotes epidémicos en hospitales de Nueva York (Landman *et al.*, 2002), Pensilvania (Adams-Haduch *et al.*, 2008) y California (Valentine *et al.*, 2008); en los países asiáticos en Corea (Lee *et al.*, 2004), Taiwán (Liu *et al.*, 2006), Japón (Nishio *et al.*, 2004) y China (Yu *et al.*, 2004); también en países del Pacífico Sur (Naas *et al.*, 2005) y países de Latinoamérica como Chile (Silva *et al.*, 1999), Argentina (Barbolla *et al.*, 2003), Brasil (Levin *et al.*, 1996) y Colombia (Pinzón *et al.*, 2006; Villegas y Hartstein, 2003).

En la mayoría de los brotes producidos por *A. baumannii* multirresistente se ha aislado el microorganismo en el equipamiento sanitario (superficies, palas de laringoscopio, humidificadores o tiradores de puertas, entre otros). No es infrecuente que coexista más de un clon epidémico de *Acinetobacter* con las cepas endémicas propias, esto hace más difícil detectar y controlar la transmisión (Oteo *et al.*, 2007).

Dependiendo de las circunstancias locales, y de que cepa se trate, el patrón de un brote puede variar. Puede haber una fuente común o múltiples fuentes y algunas cepas tienen una mayor capacidad de diseminación que otras. *A. baumannii* causa desde brotes circunscritos asociados con un reservorio ambiental específico a complejas situaciones de endemia o pseudoendemia en los que la existencia de reservorios múltiples (pacientes colonizados, superficies secas, reservorios húmedos) hace muy complejo el control, que precisa de programas globales que incluyen numerosas medidas (Rodríguez-Baño *et al.*, 2009).

En una situación de brote por *Acinetobacter* multirresistente, los expertos recomiendan fundamentalmente extremar las medidas de prevención estándar y de control de infección ya existentes, como son la higiene de manos, la limpieza minuciosa de superficies, las precauciones de barrera y la concienciación por parte del personal sanitario y no sanitario de la importancia del problema. Aunque clásicamente se ha considerado a *Acinetobacter* spp. como un microorganismo poco virulento, nadie duda hoy que las infecciones producidas por *A. baumannii* multirresistente suponen una amenaza para un determinado grupo de pacientes. Los brotes epidémicos y endémicos que aparecen cada vez en más hospitales suponen un verdadero problema sanitario de difícil control y erradicación que en la mayoría de las ocasiones comportan una elevada morbimortalidad (Catalán y Aguado, 2010).

La contribución del laboratorio de microbiología al estudio de brotes nosocomiales causados por *A. baumannii* se centra, fundamentalmente, en actividades que son compartidas con otros servicios o unidades, como integrante de la comisión de infecciones y política de antibióticos del hospital, y del equipo de control de infección nosocomial, y en actividades específicas del laboratorio de microbiología (Fernández-Cuenca et al., 2011), que incluye la tipificación molecular.

Tanto la identificación a nivel de especie como el fenotipo de resistencia obtenido en el antibiograma pueden tener relativa utilidad como marcadores epidemiológicos para establecer la relación clonal entre las cepas implicadas en un brote, aunque esto no es lo más frecuente. A veces, la aparición de un fenotipo de (multi) resistencia que aparece o se detecta por primera vez en el laboratorio constituye un indicio o sospecha para pensar en la posibilidad de estar ante el inicio o el comienzo de un brote (Fernández-Cuenca et al., 2011).

4.2. Estudios de población de *A. baumannii*

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre una cepa del brote de otras concurrentes (*Maslow et al., 1993*).

El estudio epidemiológico de los brotes ha permitido determinar la existencia de diferentes linajes clonales, agrupados en 3 clones europeos (EC I, II y III) (*Dijkshoorn et al., 1996; Nemec et al., 2004b; van Dessel et al., 2004*), que se encuentran ampliamente distribuidos. También son denominados clones internacionales (IC), que mediante MLST (*multilocus sequence typing*) se corresponden con los complejos clonales (CC) CC1, CC2 y CC3, respectivamente (*Diancourt et al., 2010; Karah et al., 2012*). Estos clones se han analizado por diferentes métodos de tipificación genotípica, tales como el análisis AFLP, ribotipificación, análisis de macrorrestricción por electroforesis en gel de campo pulsado y, más recientemente, por la secuencia tipo obtenida mediante MLST (estos sistemas se detallaran más adelante). Las cepas que pertenecen a estos clones son, por lo general, altamente resistentes a los antibióticos, aunque dentro de un clon puede haber variación en la sensibilidad a los antibióticos. Al parecer, estos clones son cepas genéticamente estables que son particularmente exitosas en el ambiente hospitalario y evolucionan poco a poco durante su propagación. Está por determinar si estas cepas tienen factores de virulencia particulares o una capacidad mejorada para colonizar pacientes. Su amplia difusión se podría explicar por la transferencia de pacientes entre hospitales y regiones en el transcurso del tiempo, aunque en muchos casos no hay evidencia de esto. También es

posible que circulen a tasas bajas en la comunidad y sean capaces de expandirse en los hospitales bajo presión selectiva de los antibióticos.

Estos clones agrupan a la mayor parte de los aislados multirresistentes, que con frecuencia son productores de carbapenemasas de tipo OXA (OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143) y causantes de brotes nosocomiales, mientras que la población más sensible se distribuye en otras líneas no epidémicas (*Diancourt et al., 2010; Higgins et al., 2010; Karah et al., 2012*).

Adicionalmente, la tipificación y posterior comparación de las cepas epidémicas de diferentes hospitales permite determinar la transmisión interhospitalaria. Por ejemplo, durante un período de brotes en los Países Bajos que afectó a ocho hospitales, se encontró una cepa común en tres de estos hospitales y otra cepa común fue encontrada en otros dos (*van den Broek et al., 2006*). Se han descrito observaciones similares de propagación interhospitalaria de cepas resistentes a múltiples fármacos en zonas geográficas concretas como República Checa (*Nemec et al., 1999*), Reino Unido (*Turton et al., 2004*), Portugal (*Da Silva et al., 2007*) y Estados Unidos (*Quale et al., 2003*).

4.3. Epidemiología global

Como se ha mencionado anteriormente, la combinación de la capacidad de resistencia en el medio ambiente y su amplia gama de determinantes de resistencia hace que *A. baumannii* sea un patógeno nosocomial con éxito (*Nordmann, 2004*). Como tal, *A. baumannii* se perfila como una de las causas de numerosos brotes globales (*Villegas y Hartstein, 2003*), mostrando cada vez mayores tasas de resistencia (**Figura 7**). Estas cepas MDR a menudo se expanden y causan brotes a lo largo de ciudades enteras, países, y continentes. Hay informes de *A. baumannii* multirresistente de hospitales en Europa, América del Norte, Argentina, Brasil, China, Taiwán, Hong Kong, Japón y Corea y de zonas tan remotas como Tahití, en el Pacífico Sur (*Barbolla et*

al., 2003; Houang et al., 2001; Lee et al., 2004; Levin et al., 1996; Liu et al., 2006; Naas et al., 2005; Nishio et al., 2004; Quale et al., 2003; Van Looveren y Goossens, 2004; Yu et al., 2004). Se ha demostrado la importación de las cepas MDR de áreas con altas tasas de resistencia a los antimicrobianos a áreas con tasas históricamente bajas, como desde España hasta Noruega (Onarheim et al., 2000).

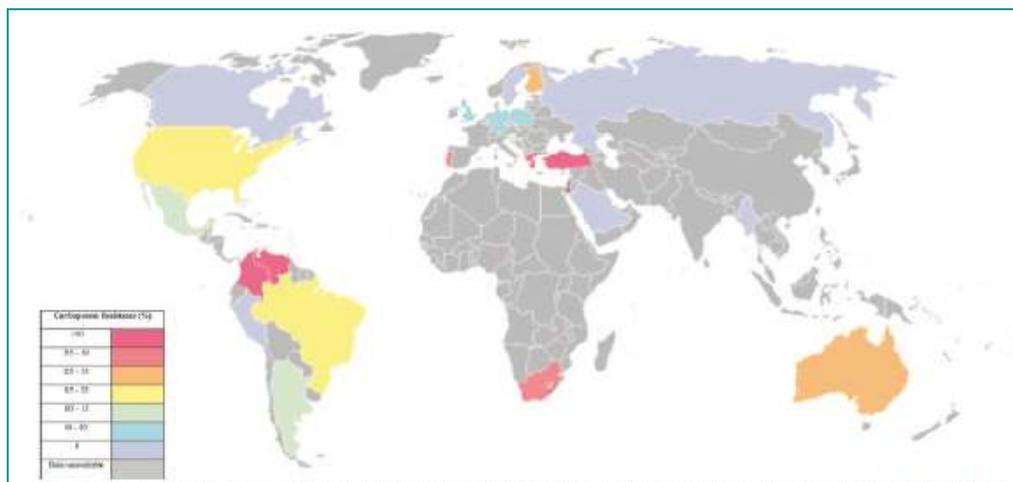


Figura 7. Aislamientos de *Acinetobacter* resistente a carbapenems (Resumen anual de datos de sensibilidad a meropenem [MYSTIC], 2004. Datos obtenidos de la base de datos MYSTIC (www.mystic-data.org) (Pérez et al., 2007).

Europa

Las infecciones por *A. baumannii* han sido un problema clínico importante en muchas partes de Europa (Van Looveren y Goossens, 2004) (**Figura 8**). Desde principios de la década de 1980, se han investigado, mediante técnicas de tipificación molecular, estos brotes de infecciones por *A. baumannii*, principalmente en Inglaterra, Francia, Alemania, Italia, España y Países Bajos (Bergogne-Bérézín y Towner, 1996; Fournier y Richet, 2006; Villegas y Hartstein, 2003). En la mayoría de los casos, se detectaron una o dos cepas epidémicas en una determinada situación epidemiológica. La transmisión de tales cepas se ha observado entre hospitales, probablemente a través de los pacientes colonizados (Da Silva et al., 2007; Turton et al., 2004; van den Broek et al.,

2006). La distribución de *A. baumannii* multirresistente no se limita a hospitales dentro de una ciudad, sino que también ocurre a escala nacional. Ejemplos de esto son la propagación de los llamados clones del Sudeste y los clones I y II de OXA-23 en el sudeste de Inglaterra (Coelho et al., 2006b; Turton et al., 2004), la difusión del clon de *A. baumannii* multirresistente en Portugal (Da Silva et al., 2007), la diseminación del clon interhospitalario de *A. baumannii* productor de BLEE-VEB-1 de un total de 55 centros médicos en el norte y sureste de Francia (Naas et al., 2006b), y la propagación de un clon de *A. baumannii* resistente a amikacina observado en nueve hospitales en diversas regiones de España (Vila et al., 1999). La transferencia internacional de los pacientes colonizados conduce a la introducción y posterior diseminación de la epidemia de cepas de *A. baumannii* multirresistentes de los países del sur de Europa a los del norte, como Bélgica y Alemania (Bogaerts et al., 2006; Schulte et al., 2005). Estos acontecimientos muestran la importancia de la detección adecuada y posible aislamiento de los pacientes transferidos de los países con altas tasas de organismos resistentes a los antibióticos.



Figura 8. Los países que han informado un brote de *A. baumannii* resistente a carbapenem. En rojo se encuentran los países con brotes notificados antes de 2006, y en amarillo los informados desde 2006 (Peleg et al., 2008).

Además de estos brotes interhospitalarios, los clones internacionales de *A. baumannii* se han descrito en hospitales de toda Europa (incluyendo hospitales de Bélgica, Dinamarca, República Checa, Francia, España, Países Bajos, Reino Unido, Italia, Grecia y Turquía) (*Dijkshoorn et al., 1996; Nemec et al., 2004b; van Dessel et al., 2004; Wroblewska et al., 2007*). Inicialmente detectados por AFLP “clustering” con un nivel de similitud superior al 80%, la relación epidemiológica de estos clones fue confirmada por ribotipificación (*Nemec et al., 2004b; van Dessel et al., 2004*), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (*van Dessel et al., 2004*), y más recientemente, mediante “multilocus sequence typing” (MLST) (*Bartual et al., 2005*). En contraste, los brotes en múltiples sitios mencionados anteriormente, sin relación ni espacial ni temporal, podrían establecerse entre los brotes de los clones europeos en diferentes centros médicos y la contribución real de estos tres clones generalizados a la carga global de la epidemia de cepas de *A. baumannii* quedaría por determinar.

4.4. Control de la infección nosocomial

Dado el tremendo desafío que plantea *A. baumannii* multirresistente y la emergencia y difusión de los mecanismos de resistencia a cualquier agente, se debe buscar exhaustivamente las soluciones existentes, más allá de la terapia antibiótica (*Courvalin, 2005*). Entre ellos, el control de las infecciones es crucial, sobre todo dada la capacidad de *A. baumannii* de causar brotes.

Cuando un brote no tiene un único foco como origen la presión de colonización, es decir, la proporción de pacientes ya colonizados o infectados por *A. baumannii* MR, puede aumentar la probabilidad de transmisiones cruzadas entre pacientes (*Bonten et al., 1998; D'Agata et al., 2000; Playford et al., 2007*). Las estrategias para el control de los brotes de *A. baumannii* multirresistente incluyen cribado de pacientes y/o personal, precauciones de aislamiento de contacto, agrupamiento de pacientes, disminución de las cargas de trabajo, cierre temporal de la unidad a nuevos ingresos y uso racional de antimicrobianos (*Chang et al., 2009*;

D'Agata et al., 2000; Enoch et al., 2008; Fierobe et al., 2001; Jamal et al., 2009; Simor et al., 2002). La caracterización genotípica de los aislados resulta fundamental en el control del brote, la identificación de la fuente de contagio y los reservorios implicados (*Villalón et al., 2011*).

Las precauciones de contacto, el lavado de manos y la descontaminación de las manos con alcohol, aunque se conocen universalmente, rara vez se aplican rigurosamente (*Boyce y Pittet, 2002; Pittet, 2004*). Se está a favor de la aplicación de la descontaminación meticulosa del medio ambiente y de los baños agresivos de clorhexidina como medidas temporales de control de brotes. Estas medidas son caras, requieren un gran trabajo, y deben probarse en ensayos prospectivos. Sin embargo, la ventaja de las medidas de control de la infección recae en la prevención de la diseminación de los clones MDR. La aplicación de herramientas moleculares, como PFGE y REP-PCR, en la investigación de brotes para establecer la clonalidad entre los aislamientos permite un desarrollo de las medidas de control de la infección más efectivas y ayuda en la identificación de fuentes ambientales (*Maragakis et al., 2004; Wilks et al., 2006*).

La restricción del uso de antibióticos, especialmente aquellos con actividad de amplio espectro y los identificados como antibióticos de en última instancia, es un complemento necesario de cualquier estrategia de control de la infección. Se ha recomendado la implementación de sistemas de monitorización de la resistencia a los antimicrobianos y la relación con su uso, así como un programa de administración de éstos. Es probable que todo esto tenga un impacto sobre *A. baumannii* multirresistente, ya que se identifican y restringen particularmente aquellos antimicrobianos específicos que favorecen la aparición y la difusión de este organismo (*Owens y Rice, 2006*).

Por todo lo comentado anteriormente, es fundamental la actuación multidisciplinar dentro del equipo de control de infecciones para detectar

precozmente los casos de brote, establecer las medidas de control para evitar su diseminación actuando tanto en los pacientes como en el personal sanitario y mantener un estrecho contacto entre los servicios implicados y la Administración. Los brotes epidémicos infecciosos en los hospitales son un problema importante por sus posibles consecuencias en términos de morbilidad y mortalidad, alteración del funcionamiento de los servicios sanitarios, cierres de salas hospitalarias, aumento de costes, y malestar y ansiedad entre los pacientes, el personal sanitario y en la comunidad en general (*Baggett et al., 2007; Hansen et al., 2007*). Por estos motivos, cuando existe un brote los recursos dedicados son elevados y no suelen existir restricciones, pero cuando lo que hay es una epidemia o un brote epidémico mantenido, existen muchas más dificultades en su control, debido a que lo que se considera «habitual» o «normal» es más complejo de combatir.

4.5. Epidemiología molecular

Como ya se ha comentado, la prevalencia de *A. baumannii* en hospitales ha aumentado en todo el mundo (*Cisneros et al., 2005; Lolans et al., 2006; Naas et al., 2006a; Nemec et al., 2008; Yong et al., 2003*), y, por lo tanto, es esencial la búsqueda de métodos de tipificación molecular adecuados para las investigaciones epidemiológicas y los estudios de control de infecciones. El proceso de tipificación es importante epidemiológicamente para el reconocimiento de brotes de infección, en la detección de la transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, en la detección de fuentes de infección y particularmente, en el reconocimiento de cepas virulentas de un microorganismo determinado (*Corvalán et al., 2003*).

La identificación a nivel de especie y el fenotipo de resistencia puede servir para establecer la relación entre los aislamientos. Sin embargo, en otros casos es necesario utilizar métodos con mayor capacidad de discriminación, basados en técnicas moleculares. Estas técnicas se deben emplear exclusivamente para el estudio de brotes bien definidos.

Los objetivos de estas técnicas son:

1. Determinar la fuente de infección y la magnitud del brote.
2. Determinar el mecanismo de transmisión de los patógenos nosocomiales.
3. Evaluar la eficacia de las medidas preventivas.
4. Monitorizar las infecciones nosocomiales en áreas de alto riesgo donde es fácil la transmisión cruzada (UCIs).

Los métodos de identificación genotípica deben ser reproducibles, sensibles, aplicables a diferentes microorganismos, baratos y de valor epidemiológico demostrado.

Actualmente, las técnicas de tipificación molecular se deben aplicar tanto a los microorganismos implicados en la infección como a los elementos móviles de transmisión horizontal (plásmidos, integrones, transposones) y genes específicos. La utilización de estas técnicas es especialmente relevante en el estudio de endemias en las que es importante reconocer grupos clonales que permitan definir problemas asociados a clones específicos o en casos de alodemias. Algunas de las técnicas de tipificación molecular más utilizadas se detallan en la **tabla 3**.

Los sistemas de tipificación molecular utilizados en *A. baumannii* son, en orden histórico, perfil de plásmidos (*Hartstein et al., 1990; Seifert et al., 1994b*); ribotipificación (*Brisse et al., 2000; Dijkshoorn et al., 1996; Gerner-Smidt, 1992; Seifert y Gerner-Smidt, 1995*); PFGE (*Bou et al., 2000c; Gouby et al., 1992; Seifert y Gerner-Smidt, 1995*); análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (*Graser et al., 1993; Grundmann et al., 1997; Koeleman et al., 1998*); “repetitive extragenic palindromic sequence-based” PCR (REP-PCR) (*Huys et al., 2005b; Snelling et al., 1996*), el análisis AFLP, un método de huella dactilar genómica de alta resolución (*Dijkshoorn et al., 1996; Janssen y Dijkshoorn, 1996; Koeleman et al., 1998*); PCR del gen de la integrasa (*Koeleman et al., 2001b*); PCR “infrequent-restriction-site” (*Yoo et al., 1999*), y más recientemente, MLST (*Bartual et al., 2005*) y multilocus PCR-ESI-MS (*Ecker et al.,*

2006). La electroforesis en campo pulsado (PFGE) todavía se considera el "gold estándar" para la tipificación de los aislamientos bacterianos (Seifert y Gerner-Smidt, 1995), pero, como veremos más adelante, presenta una serie de inconvenientes.

PRINCIPALES TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR Y SU FUNDAMENTO	
Técnica	Fundamento
Perfil plasmídico	Número y tamaño de plásmidos.
Perfil de restricción plasmídica	Tamaño de fragmentos tras digestión con enzimas de restricción.
PFGE	Comparación de perfiles de fragmentos tras digestión con enzimas de baja frecuencia de corte.
Ribotipia	RFLP + hibridación con sondas de genes de ARN ribosómico.
AP-PCR	Amplificación con cebadores arbitrarios.
REP-PCR	Amplificación de secuencias palindrómicas extragénicas repetidas.
MLST	Amplificación y comparación de polimorfismos en determinados genes.

Tabla 3. Principales técnicas de tipificación molecular.

4.5.1 Análisis de plásmidos

La mayoría de las especies de *Acinetobacter* contienen plásmidos autóctonos. El análisis plasmídico se ha utilizado con éxito para la tipificación epidemiológica de las cepas de *A. baumannii* (Hartstein et al., 1990; Nemec et al., 1999; Seifert et al., 1994b), y el perfil de plásmidos es uno de los pocos métodos que también se ha aplicado al estudio de la epidemiología de las especies de *Acinetobacter* ajenas al grupo *A. baumannii* (Seifert et al., 1994a; Seifert et al., 1994c; Seifert et al., 1997). A pesar de que el método es bastante robusto, la interpretación de los resultados debe incluir la consideración de que muchos plásmidos son fácilmente transferibles y pueden ser ganados o perdidos. Esto contribuyó a la sustitución del perfil de plásmidos por métodos moleculares más sólidos para estudios epidemiológicos de *Acinetobacter* spp.

4.5.2 Ribotipificación

La ribotipificación fue desarrollada principalmente para identificar *Acinetobacter* spp., en particular cepas del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, a nivel de especie (Gerner-Smidt, 1992). En este método se utilizan las enzimas *EcoRI*, *Clal* y *Sall* para la restricción de la ADN cromosómico purificado, seguido de electroforesis, transferencia, e hibridación con digoxigenina-11-UTP marcado con sonda de ADNc derivada del ARNr de *E. coli*. Sin embargo, el poder discriminatorio de la ribotipificación es limitado, y la PFGE (que se detalla más adelante) y otros métodos son menos laboriosos y más discriminatorios (Seifert y Gerner-Smidt, 1995; Silbert et al., 2004). Utilizando un sistema de ribotipificación automatizada (RiboPrinter; DuPont Qualicon, Wilmington, DE) (Brisse et al., 2000; Rhomberg et al., 2006; Silbert et al., 2004) se han obtenido resultados más precisos con un poder discriminatorio comparable al de PFGE. La ribotipificación automatizada genera resultados más rápidamente que la PFGE, pero es costoso y requiere un equipo especializado que está disponible sólo en unos pocos laboratorios que realizan investigaciones epidemiológicas moleculares de alto rendimiento.

4.5.3 PFGE-RFLP

La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, "pulsed-field gel electrophoresis") es considerada actualmente el "gold standard" de los métodos de tipificación molecular. Incluso frente a los métodos basados en la secuencia que ya están disponibles y que están desafiando a la PFGE como "gold estándar" para la tipificación de muchas especies bacterianas, para *Acinetobacter*, la PFGE sigue siendo el método de referencia. Es un método bastante laborioso que requiere varios días antes de generar un resultado. En este método el ADN genómico de *A. baumannii* es digerido con una enzima de restricción de corte infrecuente, generalmente se utilizan *Apal* y / o *Smal* (Bou et al., 2000c; Gouby et al., 1992; Seifert y Gerner-Smidt, 1995). Posteriormente, los fragmentos resultantes son separados en un gel de agarosa

sometido a un campo eléctrico cuya polaridad es cambiada a intervalos variables (**Figura 9**). El campo pulsado permite una separación clara de fragmentos de ADN de gran tamaño molecular (10-800 kb), los patrones resultantes de la electroforesis se comparan visualmente o utilizando programas informáticos especializados que también permiten el almacenamiento de los perfiles en una base de datos. La técnica de PFGE ha probado ser altamente discriminativa en la tipificación de muchas especies bacterianas (*Olive y Bean, 1999*), pero presenta una serie de desventajas. Al igual que con otros de los llamados sistemas de tipificación comparativos que se basan principalmente en una comparación de patrones de huellas moleculares digitales de un número limitado de cepas, la comparación entre laboratorios ha sido siempre un problema con la PFGE aunque se ha demostrado que ésta se puede alcanzar con la suficiente estandarización de los protocolos entre laboratorios (*Seifert et al., 2005*). Este enfoque permitiría el reconocimiento de las cepas epidémicas y la detección temprana de brotes multihospitalarios o en todo el país, sobre todo si los casos están separados geográficamente. Como se ha visto con otras especies, el poder discriminatorio de PFGE puede ser demasiado alto para estudios poblacionales y epidemiológicos a gran escala. Otra desventaja es que puede perder su poder discriminatorio cuando se analizan aislamientos de áreas geográficas diferentes (*Seifert et al., 2005*).

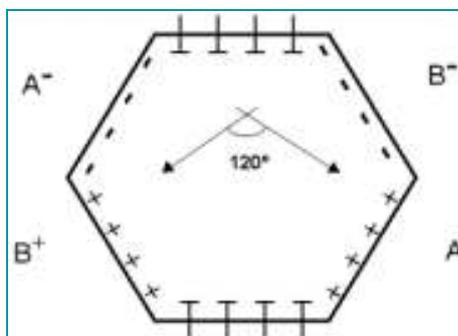


Figura 9. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B (*Cercenado y Cantón, 2005*).

Como alternativa a PFGE se han planteado numerosas técnicas de tipificación basadas en amplificación por PCR (*Arbeit, 1995; Olive y Bean, 1999*).

4.5.4 Métodos de tipificación basados en PCR

La PCR ("polymerase chain reaction") permite que determinados *loci* genéticos sean amplificados y examinados en busca de variaciones características de cada cepa. Inicialmente los *loci* son amplificados con partidores específicos, sometidos a análisis de RFLP ("restriction fragment length polymorphism") y visualizados por electroforesis. Esta metodología se ha utilizado en el análisis de diversos *loci*, los que como condición deben presentar heterogeneidad dentro de la misma especie. Sin embargo, el principal inconveniente de estos ensayos radica en la limitada región del genoma que puede ser examinada, hecho que resulta en un menor poder de discriminación en comparación con la PFGE (*Corvalán et al., 2003*).

Otro grupo de métodos basados en amplificación por PCR son los denominados RAPD ("random amplified polymorphic DNA") y Rep-PCR ("repetitive-PCR"). El **RAPD** implica la amplificación de fragmentos aleatorios de ADN genómico con pequeños cebadores (10 pb) cuya secuencia es inespecífica y no es dirigida a un *locus* genético determinado sino que, a bajas temperaturas de alineamiento, hibrida de forma arbitraria en ciertos sitios cromosómicos con suficiente afinidad para permitir la iniciación de la polimerización (*Arbeit, 1995; Olive y Bean, 1999*). De este modo, la presencia de estos sitios en dos puntos en hebras de ADN complementarias en dirección opuestas una a la otra permite la amplificación del fragmento entre estos dos puntos. El número de localizaciones de estos puntos varía según la cepa. Este ensayo ha sido utilizado con éxito para evaluar la relación entre aislamientos de *Acinetobacter* (*Graser et al., 1993*), además sirve para la tipificación de cualquier microorganismo (por ej. bacterias o levaduras). Presenta un alto poder de discriminación. Sin embargo, posee baja reproducibilidad y es de difícil interpretación.

El método **REP-PCR** (*Bou et al., 2000c; Snelling et al., 1996*) utiliza cebadores consenso para las secuencias repetitivas altamente conservadas presentes en casi todas las especies de bacterias. Con ellas hibridan estos cebadores e inician la amplificación (*van der Zee et al., 1999*). Estas secuencias repetitivas se ubican típicamente en varios sitios del genoma bacteriano. Así, cuando dos secuencias repetidas son localizadas una cerca de la otra, la región flanqueada puede ser efectivamente amplificada. Para este efecto se han utilizado principalmente secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas, identificadas en muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La misma estrategia se ha usado con otras secuencias repetitivas, como secuencias de los operones ribosomales, secuencias de inserción y secuencias *Shine Dalgarno* (sitio de fijación de ribosoma). La REP-PCR es posiblemente el método de genotipado más rápido con utilidad en estudios epidemiológicos moleculares en los que está implicado *A. baumannii*. Los patrones de bandas de ADN son también relativamente fáciles de interpretar (*Bou et al., 2000c*). La automatización posiblemente facilite este tipo de estudios, sobre todo cuando está implicado un número importante de cepas, a costa de incrementar el coste económico de la prueba (*Carretto et al., 2008*). Este método ha mostrado buena reproducibilidad, bajo costo, baja complejidad y un poder de discriminación que depende de la secuencia repetitiva analizada (*van der Zee et al., 1999*).

Ambos métodos, RAPD y REP-PCR, no requieren equipo especializado y son métodos rápidos, fáciles y de bajo costo que permiten agrupar las cepas de *A. baumannii* con diferentes grados de relación genotípica. El poder discriminatorio de estos métodos, sin embargo, es inferior al de PFGE. La reproducibilidad interlaboratorios de los patrones (huellas digitales) generados por PCR se demostró en un estudio, utilizando cuatro cebadores diferentes (DAF4, ERIC-2, M13, y REP1 más REP2) y un protocolo altamente estandarizado (*Grundmann et al., 1997*), pero estos hallazgos no pudieron ser confirmados en estudios posteriores. *Huys et al.* (*Huys et al., 2005b*) utilizaron los patrones (huellas dactilares) de REP-PCR con un primer (GTG)₅ para distinguir a los miembros del clon III de *A. baumannii* multirresistente

paneuropeo de los clones conocidos como I y II (*Dijkshoorn et al., 1996*). En general, los métodos de tipificación basados en la PCR permiten una estimación rápida de la relación epidemiológica en un entorno definido (*Wisplinghoff et al., 2000; Wroblewska et al., 2004*), pero no son adecuados para estudios epidemiológicos comparativos a gran escala. Queda por demostrar si con una estandarización más rigurosa y una automatización de REP-PCR, tales como el sistema de DiversiLab (BioMérieux), que incluye un sistema de detección basado en microfluidos, permitirá la tipificación de una cepa bacteriana con una mayor reproducibilidad interlaboratorios (*Healy et al., 2005*).

4.5.5 Análisis AFLP

El análisis AFLP se estableció en la década de 1990. Se trata de un método de toma de huellas digitales de ADN altamente sensible por el cual el ADN se digiere con enzimas de restricción, seguido por una amplificación selectiva, separación electroforética de fragmentos, y visualización. Es un método bastante engorroso y caro por lo que, en general, se lleva a cabo en un procedimiento semiautomatizado, con detección láser de fragmentos en una plataforma de secuenciación. Los complejos perfiles resultantes son digitalizados y analizados con un software apropiado. Aparte de ser una herramienta poderosa en taxonomía bacteriana (*Janssen et al., 1996; Nemec et al., 2001*), este método de toma de huellas digitales de alta resolución también se ha encontrado útil para la caracterización de las cepas de *Acinetobacter* a nivel de subespecies y para la investigación de brotes (*Dijkshoorn et al., 1996; Dobrewski et al., 2006; Janssen y Dijkshoorn, 1996; Janssen et al., 1997; Koeleman et al., 1998; van Dessel et al., 2004; Wroblewska et al., 2004*). A pesar de que el análisis de AFLP es un método relativamente robusto, se requiere un alto nivel de estandarización y una amplia experiencia en la interpretación de los patrones de bandas, aunque están disponibles programas de ordenador sofisticados para ayudar en el análisis de patrones. Por lo tanto, este método está restringido a laboratorios de referencia y no es adecuado para los análisis epidemiológicos de rutina. Además, los

datos no son fácilmente comparables entre laboratorios, principalmente debido a la falta de reproducibilidad cuando se utilizan diferentes plataformas de secuenciación. Aunque la agrupación obtenida con el análisis AFLP compara bien a los grupos derivados de PFGE en estudios a pequeña escala (*D'Agata et al., 2000; Silbert et al., 2004; van Dessel et al., 2004*), nunca se ha realizado una comparación completa y detallada de estos dos métodos de tipificación.

Como ya se comentó anteriormente en el apartado 1.3 "Características microbiológicas. Identificación de especies", algunos de los métodos genómicos, en particular la ribotipificación y AFLP, son capaces de diferenciar entre sí las especies pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* con un alto grado de discriminación (*Dijkshoorn et al., 1996; Gerner-Smidt, 1992*).

4.5.6 MLST

El último paso en el desarrollo de estrategias para tipificación ha sido el surgimiento de técnicas basadas en secuenciación de ADN, favorecidas por la aparición de técnicas de secuenciación automática (*Arbeit, 1995; Olive y Bean, 1999*). La secuenciación completa de algunos microorganismos y su posterior análisis han sentado las bases para el desarrollo de nuevos ensayos que permiten discriminar entre diferentes clones. Junto con ello, la creación de una red abierta para la comparación objetiva de secuencias de determinados genes bacterianos denominado "Multilocus sequence typing" (MLST) constituye otro avance en la tipificación de microorganismos (*Maiden et al., 1998*). El MLST, que utiliza varios genes "housekeeping", ya ha sido utilizado para tipificar muchas bacterias patógenas (*Harbottle et al., 2006; Heym et al., 2002; Johnson et al., 2007b; Tanabe et al., 2007*), incluyendo *A. baumannii* (*Bartual et al., 2005; Park et al., 2009; Wisplinghoff et al., 2008*). El esquema de MLST, que fue desarrollado para *A. baumannii* por *Bartual et al.*, se basa en la secuenciación de fragmentos de ADN de 305 a 513-pb de las regiones conservadas de los siguientes 7 genes "housekeeping" constitutivos: *gltA, gyrB, gdhB, recA, cpn60, gpi, y rpoD* (*Bartual*

et al., 2005). Con las secuencias se genera un perfil alélico que se compara en una base de datos con otros perfiles alélicos de cepas aisladas en diferentes partes del mundo.

MLST es un método de caracterización altamente discriminativo. Su poder discriminatorio es comparable al de PFGE y al del análisis de AFLP, de ahí que el MLST esté emergiendo como una alternativa a la PFGE (*Bartual et al., 2005*). MLST se utiliza principalmente para estudios epidemiológicos mundiales, pero también ha sido utilizado con éxito para la investigación a corto plazo de brotes (*Feaver et al., 1999*). Sin embargo, el MLST es caro y laborioso y por lo tanto, no es adecuado para el análisis de rutina de brotes u otros análisis a escala limitada de la epidemiología de *A. baumannii*. Queda por determinar si este esquema de tipificación es apropiado para el estudio de la estructura poblacional de *A. baumannii* y quizá otras especies de *Acinetobacter*, como se muestra con éxito cuando este método se aplicó a otros microorganismos. Hasta la fecha, el MLST es uno de los pocos sistemas llamados de tipificación de librería usados para el estudio epidemiológico de *A. baumannii*, es decir, un sistema de tipificación donde los datos de tipificación se traducen en un código numérico que puede ser obtenido de una manera idéntica en los diferentes laboratorios utilizando el mismo protocolo (**Figura 10**). Se proporciona un método portátil que puede ser adecuado para el estudio epidemiológico global y permitir el reconocimiento de clones de *A. baumannii* epidémicos, multirresistentes y virulentos y el seguimiento de su diseminación nacional e internacional. Aunque MLST tiene muchas ventajas frente a otros métodos de tipificación molecular, aún quedan muchas preguntas sin respuesta, incluyendo si se requieren varios *loci* para obtener un esquema robusto y si los criterios para la selección de los genes "housekeeping" son suficientemente fiables para revelar la estructura poblacional de las cepas analizadas.

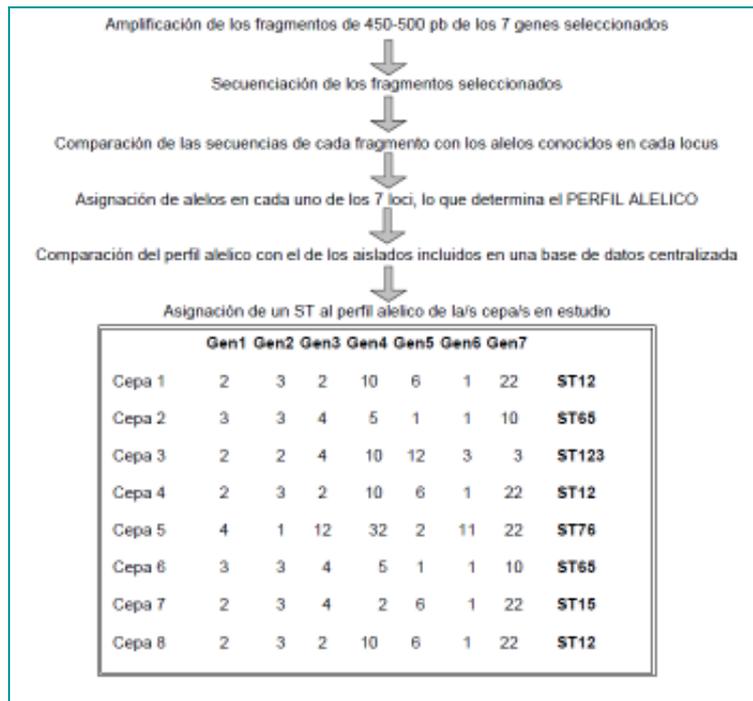


Figura 10. Análisis mediante la técnica de MLST (Cercenado y Cantón, 2005).

4.5.7. PCR-ESI-MS

PCR-ESI-MS ("Polymerase Chain Reaction-Electrospray Ionization Mass Spectrometry") es una forma de MLST de alto rendimiento que se puede utilizar para la identificación de especies de *A. baumannii*, como *Acinetobacter* genoespecie 3 y 13TU y, además, determinar la clonalidad (Ecker *et al.*, 2006). Las regiones conservadas de seis genes "housekeeping" (*trpE*, *adk*, *efp*, *mutY*, *fumC* y *ppa*) son amplificadas de cada aislamiento, los productos de la amplificación se purifican, y posteriormente son ionizados y aerosolizados hacia un espectrofotómetro de masas. Tiene una buena correlación con la tipificación por PFGE. Como ventaja importante, el método de genotipado mediante PCR-ES-MS es muy rápido (sólo 4 h), proporcionando resultados de tipificación en una escala de tiempo que no se logra con la mayoría de los sistemas.

4.5.8. Genes *bla*_{OXA-51-like}

Los genes *bla*_{OXA-51-like} son únicos para *A. baumannii* y pueden ser utilizados como marcadores para la identificación de esta especie (Héritier et al., 2005a). También han sido utilizados con éxito como uno de los tres *loci* en un sistema de tipificación basado en la PCR que es capaz de asignar los aislamientos de *A. baumannii* a grupos de secuencias (SGS, "sequence group") que parecen correlacionarse con los principales linajes epidémicos dentro de la especie (Turton et al., 2007). Esto plantea la cuestión de si los genes *bla*_{OXA-51-like} por sí mismos podrían ser utilizados en un sistema de tipificación.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Acinetobacter baumannii multirresistente está considerado en la actualidad como un patógeno emergente, ya que en los últimos años se ha incrementado de forma alarmante el número de aislamientos responsables de infecciones nosocomiales graves. Además, muchos de estos aislamientos son multirresistentes, lo que complica enormemente el tratamiento y empeora el pronóstico del paciente infectado por estos microorganismos.

Con frecuencia, *A. baumannii* multirresistente es una bacteria endémica en algunos hospitales y responsable de numerosos brotes. Su gran capacidad para sobrevivir en el ambiente y para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos los carbapenems, ha facilitado su difusión en el ambiente hospitalario dando lugar, en ocasiones, a importantes brotes nosocomiales con grave repercusión sobre la morbilidad y mortalidad de los pacientes afectados. Estos pacientes pueden adquirir la bacteria tanto desde reservorios ambientales como desde otros pacientes infectados o colonizados a través del personal sanitario. El estudio de la relación clonal de las cepas aisladas en un determinado hospital es fundamental para conocer la diseminación de éstas.

La resistencia a carbapenems en *A. baumannii* se ha incrementado sustancialmente en los últimos años llegando en la mayoría de hospitales españoles a niveles de resistencia del 90%. La mayoría de estas bacterias resistentes a carbapenems son productoras de carbapenemasas, las cuales se encuentran asociadas a integrones de clase I, frecuentemente localizados en plásmidos o transposones, por lo que la transferencia y diseminación está asegurada en el ambiente hospitalario si no se toman las medidas de control adecuadas.

Por todo esto, es importante conocer los mecanismos de resistencia a carbapenems en las cepas de un determinado hospital y realizar estudios moleculares para establecer clones y conocer la capacidad de transmisibilidad de las mismas.

El **objetivo principal** de este estudio fue determinar el mecanismo de resistencia a carbapenems, tanto por métodos fenotípicos como genotípicos, en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos durante un periodo de 2 años en dos unidades de alto riesgo del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, así como conocer la epidemiología molecular de los mismos mediante diferentes métodos de tipificación molecular. Además, se plantean los siguientes **objetivos secundarios**:

1. Determinar la sensibilidad de los aislamientos de *A. baumannii* a diferentes antimicrobianos.
2. Determinar la distribución de los diferentes clones de *A. baumannii* en las dos unidades de alto riesgo del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca en el periodo estudiado.
3. Comparar diferentes métodos de tipificación para el estudio de cepas de *A. baumannii*.
4. Comparar los métodos fenotípicos de detección de carbapenemasas en *A. baumannii* con la detección genotípica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección y obtención de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii*

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se analizaron las cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) durante un periodo de 2 años (enero 2010-diciembre 2011). Las cepas procedían de pacientes adultos (mayores de 14 años) ingresados en la Unidad de Reanimación (REA) y en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del HCUVA. El HCUVA es un hospital de tercer nivel que atiende a una población aproximada de 450.000 personas, siendo el hospital de referencia de la Comunidad Autónoma de Murcia, cuenta con 873 camas de las cuales 24 se sitúan en REA y 32 en UCI.

2. Identificación y sensibilidad antibiótica

La identificación bioquímica de los aislamientos se realizó mediante el sistema automatizado Vitek2® (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*). Se utilizó la tarjeta de Gram-negativos (ID-GN). Este sistema sólo permite la identificación del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* que incluye varias especies (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus*). Para identificar dentro de este complejo a la especie *A. baumannii*, se detectó la presencia del gen que codifica la "oxacilinasasa 51-like", carbapenemasa intrínseca únicamente en esta especie, mediante PCR (ver más adelante apartado 5). La identificación a nivel de especie de las cepas del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* en las que no se detectó el gen "oxacilinasasa 51-like", se realizó mediante el espectrofotómetro de masas MALDI-TOF Autoflex (*Bruker Daltonics, Leipzig, Germany*), que permite la identificación automática utilizando la tecnología MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight"). Esta técnica se realizó en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario de Salamanca.

El estudio de la sensibilidad antibiótica se realizó mediante el sistema Vitek2® (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*), utilizando la tarjeta AST-N114 que contiene los siguientes antibióticos: amikacina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, cotrimoxazol, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, minociclina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, tigeciclina y tobramicina. La interpretación de los resultados se realizó por el sistema experto del instrumento siguiendo las recomendaciones del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) 2010 (*CLSI, 2010*). La sensibilidad a amikacina se realizó mediante difusión con disco.

La sensibilidad en algunos aislamientos procedentes de secreciones respiratorias, infecciones de piel y partes blandas (IPPB) y de catéteres venosos se realizó mediante difusión con discos en agar Mueller-Hinton 2 (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) siguiendo las recomendaciones del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) 2010 (*CLSI, 2010*). Se testaron los siguientes antibióticos: amikacina, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, gentamicina, imipenem, piperacilina, piperacilina/tazobactam, tigeciclina y tobramicina.

Cada una de las cepas estudiadas se clasificó como "Sensible" y "Resistente" para cada uno de los antibióticos testados. En el grupo de "Resistente" se incluyeron las cepas resistentes y las cepas con sensibilidad intermedia siguiendo las normas de interpretación del CLSI (*CLSI, 2010*). A su vez, cada una de las cepas analizadas se clasificaron como multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y panresistentes (PDR) siguiendo los criterios de resistencia propuestos por Magiorakos *et al.* (*Magiorakos et al., 2012*). MDR se define como la resistencia adquirida al menos a un agente en 3 o más familias de antimicrobianos. De igual forma, las bacterias que solo fueron sensibles a uno o 2 antimicrobianos/familias se consideraron como resistencia extrema, y las que fueron resistentes a todos los antimicrobianos testados se consideraron panresistentes.

3. Tipificación molecular de los aislamientos

La tipificación molecular se realizó mediante las técnicas de REP-PCR ("Repetitive extragenic palindromic"), RFLP-PFGE ("Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis") y MLST ("Multilocus sequence typing"). Se tipificó un aislamiento de *A. baumannii* por paciente.

3.1. REP-PCR

La REP-PCR es una técnica de tipificación genotípica en la que se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias palindrómicas extragénicas altamente conservadas y que se repiten a lo largo del genoma (*Stern et al., 1984*). La técnica se basa en que este tipo de secuencias se encuentran dispersas en el cromosoma, presentando orientaciones diferentes y separadas por distancias variables. Es una técnica que se caracteriza por su simplicidad, rapidez y relativo bajo coste. Esta técnica de tipificación se realizó a todas las cepas del estudio (un aislamiento por paciente) según el protocolo de Grundman *et al.* (*Grundman et al., 1997*).

✓ Extracción del ADN

Las cepas archivadas a -80°C se descongelaron, se cultivaron en placas Mueller-Hinton 2 (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Para la extracción del ADN se utilizó una técnica basada en la centrifugación y en un proceso de choque térmico, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se resuspendieron de 3 a 4 colonias en 100 µl de agua destilada estéril contenida en un tubo *ependorf* estéril de 1,5 ml.
- A continuación, el tubo se calentó durante 15 min a 95°C en un termobloque.
- Inmediatamente, se enfrió en hielo durante 10 min.
- Después de centrifugar el tubo a 15000 rpm durante 30 segundos, se recogió el sobrenadante y se depositó en un nuevo tubo *ependorf* estéril de 1,5 ml.

- El ADN total estaba preparado para usar o conservar a -20°C para posterior estudio.

✓ Reacción de PCR

Las PCRs se realizaron en un volumen total de 25 µl, que contenía 12,5 µl de MasterMix (Promega), y 5 µl de los cebadores REP-1 y REP-2 (**Tabla 4**). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 52°C (30 s) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min).

Tabla 4. Cebadores utilizados en REP-PCR.

Cebador	Secuencia (5' → 3')
REP-1	IIIGCGCCGICATCAGGC
REP-2	ACGTCTTATCAGGCCTAC

✓ Detección y separación de los amplificados

En todas las técnicas de PCR utilizadas, los productos obtenidos tras la amplificación se separaron y detectaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa al 1,5% en TBE 0,5X. Se utilizó SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Lifetechnologies) a una concentración de 10000X como agente intercalante fluorescente entre las dos cadenas de ADN en el momento de fusión de la agarosa. Una vez solidificado el gel, se cargaron los pocillos con las muestras, constituidas por 10 µl del amplificado con tampón de carga 1X. Para determinar el tamaño del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases ("DNA ladder" 100 pb, Invitrogen®). Las condiciones de la electroforesis fueron: 100 voltios, 400 amperios durante 70 minutos. La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (U: Genius, Syngene®).

Los patrones de bandas se consideraron iguales cuando presentaron el mismo número de bandas y la misma distancia de migración. Los aislados se consideraron no relacionados genéticamente cuando se detectaron 2 o más bandas de diferencia entre estos. Las variaciones en la intensidad de las bandas o en la forma no se tuvieron en cuenta de acuerdo con Snelling *et al.* (Snelling *et al.*, 1996). Cada patrón de bandas diferente se designó con una letra mayúscula.

3.2. PFGE-RFLP

La PFGE-RFLP es la técnica de referencia en la caracterización clonal de microorganismos. Posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad (Van Belkum, 1994). El principal inconveniente de esta técnica de tipificación molecular es que es muy laboriosa y larga, ya que la mayoría de los protocolos requieren más de 4 días para poder obtener y analizar los patrones de bandas (Fernández-Cuenca, 2004).

Todas las cepas estudiadas mediante REP-PCR se tipificaron mediante PFGE-RFLP en el CHEF-DRTMII (Bio-Rad) utilizando una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*ApaI*), siguiendo el protocolo descrito por Seifert *et al.* (Seifert *et al.*, 2005). La interpretación se realizó siguiendo los criterios establecidos por Tenover *et al.* (Tenover *et al.*, 1995).

✓ Extracción del ADN

Se realizó la extracción del ADN a partir de un cultivo de 18 horas en el medio de cultivo sólido agar Mueller-Hinton (MH) (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) con el siguiente protocolo:

- Se resuspendieron de 3 a 4 colonias en un tubo Falcon de pico que contenía 5 ml de tampón de lavado SE [75 mM NaCl (pH 8), 25 mM EDTA (pH 8)].
- A continuación, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 5 ml de tampón de lavado SE.

- Se repitió la centrifugación, se descartó de nuevo el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 3 ml de tampón de lavado SE.
- Finalmente, se ajustó la concentración celular bacteriana mediante espectrofotómetro, obteniendo un valor de densidad óptica entre 1,8 y 1,9 (10^7 cfu/ml aproximadamente) a una longitud de onda de 600 nm.

✓ Elaboración de bloques de agarosa

Para elaborar los bloques de agarosa se tomó 1 ml de la solución celular bacteriana ajustada a un tubo *ependorf* de 1,5 ml y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. A continuación, se retiró el sobrenadante con pipeta y se resuspendió con 500 μ l de TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA (pH 8)]. Se agitó, se añadieron 700 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 2% y se rellenaron los moldes para bloques.

✓ Lisis celular

La lisis celular se llevó a cabo en tubos Falcon de 50 ml en los que se añadieron 3 ml del tampón de lisis [50 mM de Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8), 1% Sarkosyl], los bloques y a continuación, 1 mg/ml (150 μ l) de proteinasa-K (20 mg/ml) (Promega®). Los tubos se incubaron a 55-56°C en baño durante aproximadamente 20 horas.

✓ Lavados de los bloques

Con el fin de eliminar posibles interferencias tras el proceso de lisis celular, se realizaron 5 lavados de los bloques a temperatura ambiente:

- 1º. Se retiraron los bloques de la solución de lisis.
- 2º. Se realizó un lavado 5 ml de agua destilada durante 5 min.
- 3º. A continuación se realizaron 4 lavados con 3 ml de tampón TE de lavado [10mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)] durante 45 min cada uno.

✓ Digestión del ADN con enzima de restricción

La digestión del ADN se realizó con el enzima de restricción *Apal* (Promega®), que es un enzima de baja frecuencia de corte (5'-GGGCCC-3'). Para ello, se cortó un fragmento del bloque (aproximadamente medio cm) y se añadió en un tubo *ependorf* de 1,5 ml, que contenía 300 µl del tampón a concentración 1X del enzima de restricción. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se retiró este tampón y se añadieron de nuevo 300 µl del tampón 1X. Finalmente, se añadieron 30U del enzima *Apal*.

✓ Electroforesis en campo pulsante

Se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris/Borate/EDTA) a una concentración 0,5X. Una vez solidificado, se introdujo en cada pocillo del gel el fragmento de bloque correspondiente. A continuación, se rellenó el espacio libre de cada pocillo con agarosa de sellado al 1%. Finalmente, se separaron los fragmentos digeridos por el enzima de restricción usando el sistema CHEF-DR™ II (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes:

- Temperatura: 14 °C
- Pulsos de tiempo: intervalos desde 5 a 20 s
- Voltaje: 6 V/cm
- Tiempo: 19 horas

✓ Tinción del gel y revelado

Para la tinción de los fragmentos obtenidos, se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio en tampón TBE 0,5X a una concentración de 0,5 µg/ml durante 15-20 min, a temperatura ambiente y protegido de la luz. A continuación, se lavó el gel en tampón TBE 0,5X durante 20 min y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (U: Genius, Syngene®).

✓ Lectura e interpretación de los resultados

La lectura e interpretación de los patrones de bandas obtenidos se llevó a cabo sobre la fotografía del gel según los criterios definidos por Tenover *et al.* (Tenover *et al.*, 1995). Mediante esta técnica se compara la similitud genética de una serie de cepas, de modo que comparamos cada cepa con el resto de la serie. Ninguna banda de diferencia se considera cepas iguales, una banda de diferencia se interpreta como relación clonal, dos bandas de diferencia como posiblemente relacionados y un número mayor de tres bandas distintas se interpreta como aislados no relacionados clonalmente (Tenover *et al.*, 1995). Los diferentes patrones de bandas se designaron con número romano.

3.3. MLST

Se tipificó mediante MLST dos cepas de cada uno de los dos patrones mayoritarios que se obtuvieron por PFGE-RFLP, según el protocolo descrito por Bartual *et al.* (Bartual *et al.*, 2005). La extracción de ADN se realizó mediante la técnica basada en la centrifugación y en un proceso de choque térmico descrita previamente (Apartado 3.1). Se realizó la amplificación de los fragmentos variables de 7 genes conservados: citrato sintasa (*gltA*), DNA girasa subunidad B (*gyrB*), glucosa deshidrogenasa B (*gdhB*), factor recombinante homólogo (*recA*), chaperona 60-kDa (*cpn60*), glucosa-6-fosfato isomerasa (*gpi*), RNA polimerasa factor sigma (*rpoD*), presentes en el genoma de *A. baumannii*. Los cebadores, tamaño de los amplicones y los genes se muestran en la **tabla 5**. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 94 °C (1 min), 30 ciclos a 94 °C (2 min), 55 °C (1 min) y extensión a 72 °C (2 min).

Tabla 5. Cebadores usados en MLST y genes conservados en *A. baumannii*.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Genes diana
Citrato F1 Citrato R12	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	722	<i>gltA</i>
gyrB F gyrB R	TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA	909	<i>gyrB</i>
GDHB 1F GDH SEC F GDHB 775R GDH SEC R	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C ACC ACA TGC TTT GTT ATG GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C GTT GGC GTA TGT TGT GC	775	<i>gdhB</i>
RA1 RA2	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	425	<i>recA</i>
cpn60 F cpn60 R	GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	479	<i>cpn60</i>
gpi F gpi R	GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	508	<i>gpi</i>
rpoD R rpoD F	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	492	<i>rpoD</i>

✓ Purificación de los amplificados

Tras la amplificación por PCR, permanecen en la mezcla de reacción junto con las copias del amplificado muchos restos de dNTPs y oligonucleótidos sin consumir. Todos estos restos pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación. Para evitarlo, los amplificados fueron purificados mediante un método enzimático comercial que hidroliza todos estos restos utilizando enzimas hidrolíticas, una exonucleasa y fosfatasa alcalina (Ilustra ExoStar 1- Step, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

✓ Secuenciación de los amplificados

La secuenciación de los amplificados se realizó según el método de Sanger en el secuenciador automático ABIPrism 337-DNA "sequencer" mediante electroforesis capilar y terminadores fluorescentes BigDye™ de *Applied Biosystems* en un laboratorio externo (Sistemas Genómicos®, Valencia).

El análisis de las secuencias de los 7 genes se realizó con el software Chromas Lite v.2.01 y fueron comparadas con las incluidas en la base de datos de Oxford obteniendo el correspondiente perfil alélico y secuencia tipo ST (<http://pubmlst.org/abaumannii>).

4. Detección fenotípica de carbapenemasas mediante el test de Hodge y el Etest® MBL

La detección fenotípica de carbapenemasas se realizó a un aislamiento por paciente, independientemente de que en el antibiograma se observara una expresión fenotípica compatible con la presencia de carbapenemasas (sensibilidad disminuida o resistencia a alguno de los carbapenems). Esta detección fenotípica se realizó mediante el test de Hodge y la detección de metalobetalactamasas utilizando tiras de Etest con imipenem y EDTA (Etest® MBL).

El test de Hodge se realizó siguiendo las recomendaciones del "Clinical and Laboratory Standard Institute" (CLSI) 2012 (CLSI, 2012) tanto en el procedimiento como en la interpretación de los resultados. Se realizó el test de Hodge de cada cepa por duplicado utilizando dos placas diferentes de Mueller-Hinton: Mueller-Hinton 2 (MH2) (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) y Mueller-Hinton E (MHE) (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France). Se inocularon ambas placas con una suspensión de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 sensible a carbapenems en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. Se colocó un disco de meropenem (10 µg) en el centro de cada placa y se inocularon 3-5 colonias de las cepas a estudio formando una estría radial desde 2-3 mm del disco de imipenem hacia el borde de la placa. Tras la incubación de las placas a 35±2°C durante 16-20 horas se realizó la lectura visual del test por dos observadores. Se examinó visualmente el margen del halo de inhibición en la zona adyacente a la estría y se consideró un resultado positivo ante la presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora

(*E.coli*) y un resultado negativo ante la ausencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría.

Para detectar la presencia de carbapenemasas tipo metalobetalactamasas se realizó la detección fenotípica mediante el Etest® MBL (AB Biodisk, Solna, Sweeden) que contiene imipenem (IMP) más IMP-EDTA. Se inoculó una suspensión de la cepa a estudio en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland en MH2 y MHE. Se aplicó la tira de Etest® MBL sobre el agar. Se incubaron las placas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas y se leyeron los valores de CMI de IMP e IMP-EDTA. Para la interpretación de los resultados se calculó el cociente resultante de dividir la CMI del imipenem con la CMI del imipenem-EDTA. La prueba se consideró positiva si el cociente fue 8 o si la diferencia de las CMIs fue de 3 o más diluciones.

5. Detección y caracterización genotípica de oxacilinasas mediante técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de carbapenemasas mediante métodos moleculares se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cuatro "sets" de cebadores que incluyeron las oxacilinasas más frecuentemente implicadas en la resistencia a carbapenems en *Acinetobacter sp.* (**Tabla 6**). El grupo OXA C se utilizó para la identificación de la especie *A. baumannii* dentro del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii*.

✓ Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó tal y cómo se indica en el apartado 3.1.

✓ Detección de genes codificantes de oxacilinasas

La detección de oxacilinasas se realizó a un aislamiento de cada paciente incluido en este estudio, mediante amplificación de diferentes genes (**Tabla 6**) por PCR a partir de ADN total.

Las diferentes reacciones de PCRs se realizaron en un volumen total de 25 µl, que contenía 12,5 µl de MasterMix (Promega), y 5 µl de los cebadores específicos. Las secuencias de los cebadores, las temperaturas de hibridación y los genes incluidos en cada "set" se muestran en la **tabla 6**. La amplificación se realizó en el termociclador Mastercycler eppgradient (Eppendorf) con las condiciones descritas por Hujer *et al.* (Hujer *et al.*, 2006). Las condiciones fueron: desnaturalización a 95 °C (30 s), 30 ciclos [temperatura específica de cada grupo de cebadores (1 min), y extensión a 72 °C (1 min/kb producto)].

Tabla 6. Cebadores específicos utilizados para la detección de oxacilinasas y genes diana.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Genes diana
"set A"		<i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-25} ,
OXA A FOR	ATGAAAAAATTTATACTTCC	<i>bla</i> _{OXA-26} , <i>bla</i> _{OXA-33} ,
OXA A VER	TTAAATGATTCCAAGATTTTC	<i>bla</i> _{OXA-40} , <i>bla</i> _{OXA-72}
"set B"		<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-27} ,
OXA B FOR	TCTGGTTGTACGGTTCAGC	<i>bla</i> _{OXA-49}
OXA B VER	AGTCTTCCAAAAATTTTG	
"set C"		<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-58} ,
OXA C FOR	ACAGAARTATTTAAGTGGG	<i>bla</i> _{OXA-64} , <i>bla</i> _{OXA-69} ,
OXA C VER	GGTCTACAKCCMWTCCTCCA	<i>bla</i> _{OXA-70} , <i>bla</i> _{OXA-71} ,
		<i>bla</i> _{OXA-75} , <i>bla</i> _{OXA-78}
"set OXA-58"		
OXA 58 FOR	ATGAAATTATTAATAAATATTGAGTTTAG	<i>bla</i> _{OXA-58} , <i>bla</i> _{OXA-96}
OXA 58 VER	TTATAAATAATGAAAAACACCCAAC	

En cada "set" de cebadores se incluyó un control positivo y un control negativo de la PCR. Como control positivo se utilizó una cepa de *A. baumannii* que amplifica para el "set C", ya que este contiene el grupo de genes tipo *bla*_{OXA-51-like}, oxacilinasas que se expresa de forma intrínseca en este microorganismo. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

- ✓ *Detección y separación de los amplificados en gel de agarosa. Purificación y secuenciación.*

Los productos de PCR se analizaron con geles de agarosa tal y como se ha descrito previamente en el apartado 3.1. La purificación y secuenciación también se realizó como se ha descrito previamente (apartado 3.3)

- ✓ *Interpretación de los amplificados*

La lectura e interpretación de las secuencias obtenidas se realizó con el software *Chromas Lite v.2.01*. La herramienta informática BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> se utilizó para comparar dichas secuencias con las depositadas en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sBlast.cgi> (NCBI, *Nacional Center for Biotechnology*).

La alineación de algunas de las secuencias obtenidas se realizó mediante la herramienta Clustal Omega (EMBL-EBI) versión 1.2.1.

6. Detección y caracterización genotípica de metalobetalactamasas mediante técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección genotípica de metalobetalactamasas (MBLs) se realizó a 9 aislamientos de *A. baumannii* resistente a carbapenems (se seleccionaron de forma aleatoria 2 cepas de cada patrón definido mediante PFGE). Se realizó la amplificación por PCR de los genes más frecuentes identificados en *A. baumannii* (**Tabla 7**),

clasificados en 3 grupos de cebadores. En cada grupo de cebadores se usó como control positivo una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora del gen que codifica la enzima VIM. Como control negativo se utilizó agua libre de endonucleasas. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 94 °C (5 min); 35 ciclos a 94 °C (20 s), 55 °C (45 s) y 72 °C (30 s).

Tabla 7. Cebadores específicos para la detección de MBLs, tamaño del amplicón y genes

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Genes diana
IMP-FOR IMP-REV	GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC	188	<i>bla_{IMP}</i>
VIM-FOR VIM-REV	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	<i>bla_{VIM}</i>
SIM-FOR SIM-REV	GTACAAGGGATTTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGAG	569	<i>bla_{SIM}</i>

La detección y separación de los amplificados en gel de agarosa, así como la purificación, secuenciación e interpretación de los amplificados se realizó siguiendo el protocolo del apartado anterior.

Adicionalmente, se realizó la detección de metalobetalactamasas mediante PCR a tiempo real con la técnica Xpert® Carba-R (GeneXpert, Cepheid) a 5 cepas en las que mediante PCR convencional no se detectaron los genes codificantes de las oxacilinasas OXA-23, OXA-24 y OXA-58, estudiadas en este trabajo, pero se habían obtenido resultados positivos en las pruebas fenotípicas de detección de carbapenemasas y MBL (Test de Hodge y Etest® MBL, respectivamente). Esta técnica de diagnóstico cualitativo permite la detección y la diferenciación rápida de las secuencias de los genes que codifican estas carbapenemasas: KPC, NDM, VIM, IMP-1 y OXA-48. Además de incluir los reactivos para la detección de las secuencias de estos genes, incluye un control de procesamiento de muestras (SPC) para controlar que el

procesamiento de las bacterias diana sea el adecuado y para indicar la presencia de inhibidores en la reacción PCR. El SPC también garantiza que las condiciones (temperatura y tiempo) de la reacción PCR sean adecuadas para la reacción de amplificación y que los reactivos para la PCR funcionen correctamente. Un control interno adicional, el control de comprobación de sondas (PCC) verifica la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de las sondas y la estabilidad de los colorantes.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa " Statistical Package For The Social Sciences" (v.19.0 SPSS S.L. Madrid).

El estudio de la relación o asociación de las variables bivariantes se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson, complementado con un análisis de residuos para determinar el sentido de la dependencia. Se consideró estadísticamente significativo un valor de "p" inferior a 0,05.

IV. RESULTADOS

1. Descripción de los aislamientos

1.1. Aislados de *A. baumannii*

Se estudiaron un total de 239 aislamientos de *Acinetobacter baumannii* procedentes de 101 pacientes ingresados en las Unidades de Reanimación (REA, 40 pacientes) y de Cuidados Intensivos (UCI, 61 pacientes), del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia) durante un periodo de 2 años (2010 y 2011). En 39 pacientes (38,6%) *A. baumannii* se aisló en una única muestra. En el resto se aisló hasta en 8 muestras diferentes.

El 47,7% de las cepas (114) se aislaron de los pacientes ingresados en REA y el 52,3% (125) de los pacientes ingresados en UCI.

Distribución de los pacientes según edad y sexo

La distribución de edades de los pacientes se muestra en la **figura 11**.

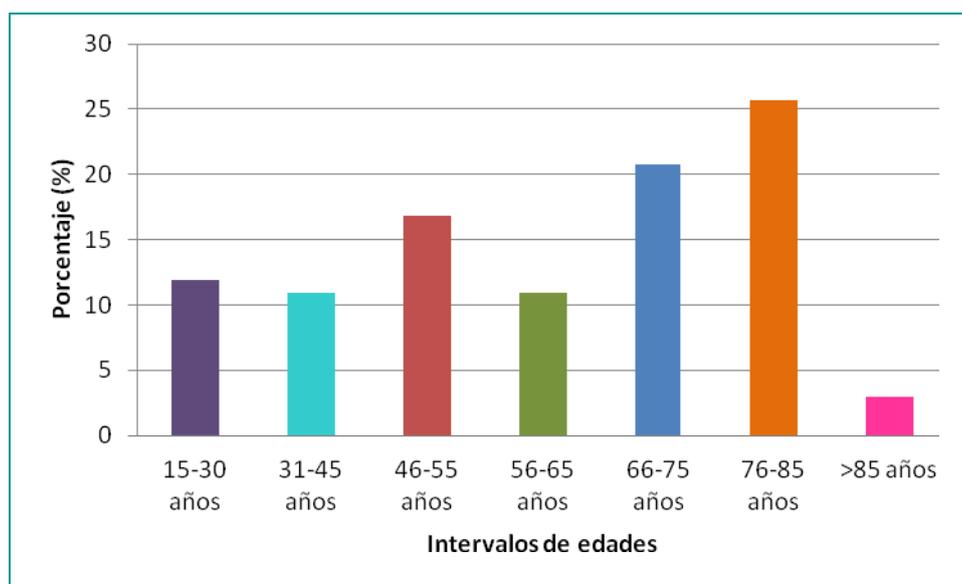


Figura 11. Distribución de edades de los pacientes incluidos en el estudio.

La media de edad de los pacientes fue de 59,8 años y la mediana de 65 años [rango: 15 - 90 años]. La mayoría de los aislados (25,7%, 26/101) procedía de pacientes con edades comprendidas entre los 76 y los 85 años. No se recibió ninguna muestra de pacientes pediátricos (menores de 14 años). El número de muestras por paciente fue aumentando con la edad del paciente, comenzando a disminuir en pacientes mayores de 85 años.

En cuanto al sexo de los pacientes, el 69,3% (70/101) eran hombres y el 30,7% (31/101) mujeres. La edad de los hombres varió de 19 a 90 años, encontrándose la mayoría de ellos (24,3%) entre los 76 y los 85 años. El número de muestras procedentes de hombres aumentó con la edad hasta los 85 años y tan solo se recogieron dos muestras en pacientes mayores de 85 años. Las muestras procedentes de mujeres correspondieron a pacientes entre 15 y 88 años, estando la mayoría de ellas en el intervalo de edades comprendidas entre los 76 y los 85 años.

La **figura 12** recoge los datos relativos a la edad de los pacientes en función del sexo.

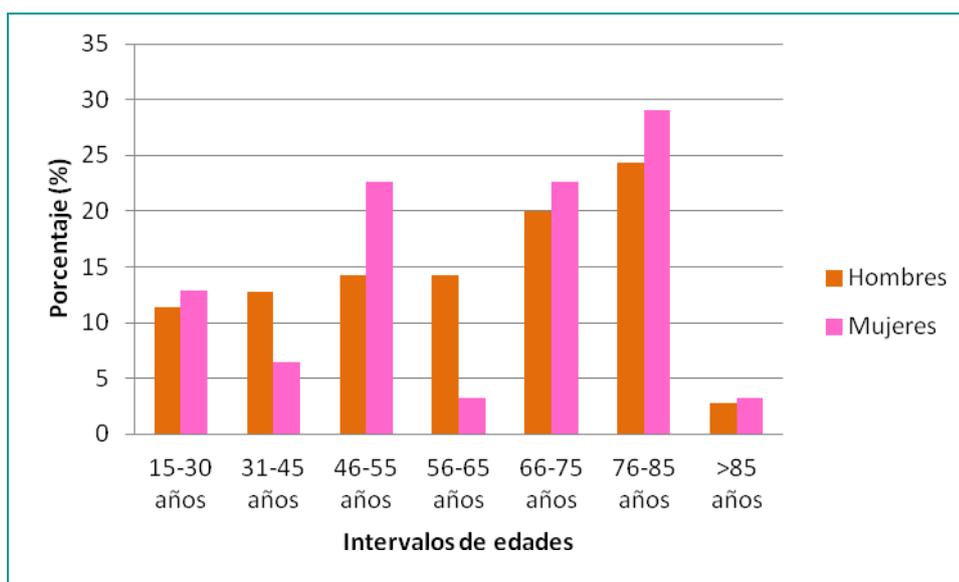


Figura 12. Distribución de los pacientes del estudio según edad y sexo (porcentaje de hombres y mujeres en cada grupo de edad).

La distribución de edades de los pacientes según el servicio de procedencia se muestra en la **Figura 13**. La edad media de los pacientes ingresados en REA y UCI fue de 69,8 (rango: 26-88) y 53,3 (rango: 15-90), respectivamente. Un 67,5% (27/40) de los pacientes ingresados en REA tenían edades comprendidas entre los 66 y 85 años (25% en el intervalo 66-75 años y un 42,5% en el intervalo 76-85 años). Sin embargo, en la UCI se observó una distribución uniforme de los pacientes en los distintos intervalos de edad. El mayor número de pacientes en esta Unidad se encontraba en el intervalo de edades entre 46 y 55 años (19,7%, 12/61).

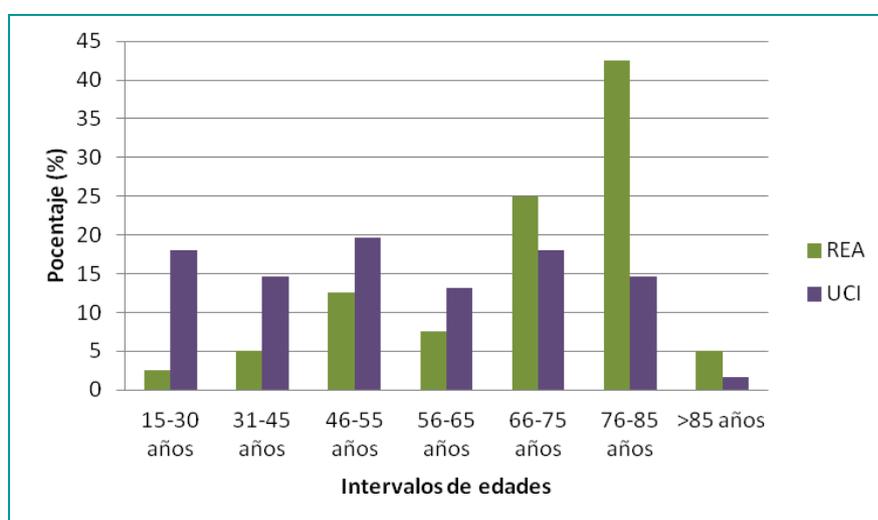


Figura 13. Distribución de los pacientes del estudio según la edad y el servicio de procedencia de las muestras. Los porcentajes están expresados como porcentaje del total de pacientes ingresados en cada Unidad.

La distribución de los pacientes según edad y sexo en los diferentes servicios estudiados se muestran en las **figuras 14 y 15**.

De los 40 pacientes ingresados en la unidad de Reanimación el mayor porcentaje de muestras, tanto de hombres como de mujeres, se observó en el intervalo de edades comprendidas entre los 76 y 85 años (22% y 20%, respectivamente). No se recibieron muestras procedentes de mujeres con edades inferiores a las comprendidas entre 46 y 55 años. El número de muestras procedentes de ambos sexos disminuyen a partir de esta edad.

Del servicio de UCI se recibieron muestras de 61 pacientes. La mayoría procedía de hombres con edades comprendidas entre los 66 y los 75 años (14,7%). El número de muestras e disminuye en pacientes a partir de los 85 años, que representaron sólo 1,6% de muestras del total. En las mujeres el intervalo de edad en el que se observó un mayor número de muestras fue de 46-55 años (9,8%), disminuyendo a un 3,3% (entre los 66-75 años), un 1,6% (entre 76-85 años) y ninguna muestra a partir de los 85 años.

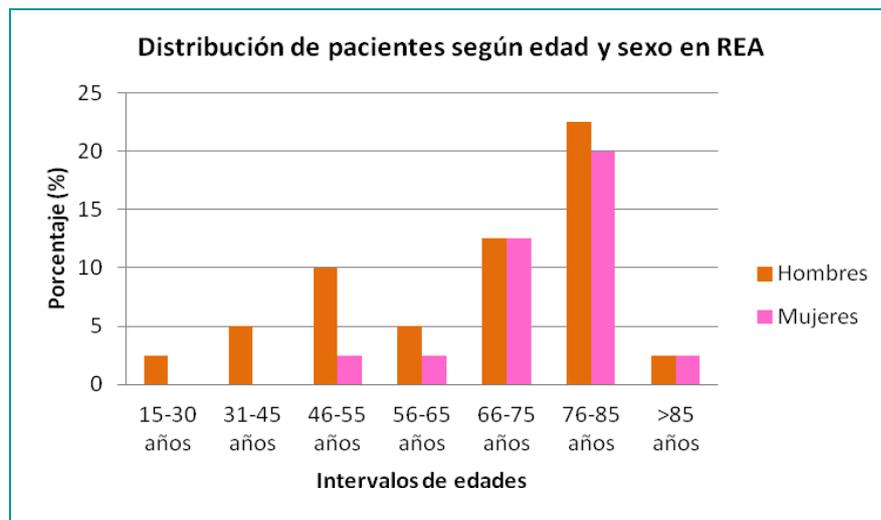


Figura 14. Distribución de pacientes según edad y sexo en REA, expresada como porcentaje del total de muestras procedentes de este servicio.

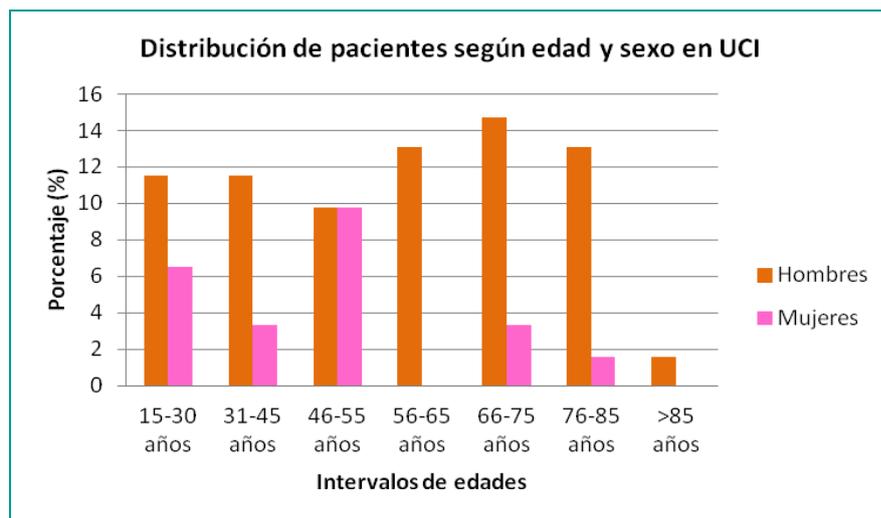


Figura 15. Distribución de pacientes según edad y sexo en UCI, expresada como porcentaje del total de muestras procedentes de este servicio.

1.2. Procedencia de los aislamientos de *A. baumannii*

De las 239 en las que se aisló *A. baumannii*, 110 se procesaron en el año 2010, 71 procedentes de pacientes ingresados en REA y 39 de pacientes en UCI. En el 2011 se aisló en 129 muestras, 43 de REA y 86 de UCI.

De la mayoría de los pacientes se recibió una única muestra (38,6%, 39/101 pacientes). Sin embargo, en 62 casos se recibió más de un aislado por paciente (**Tabla 8**). En estos 62 pacientes se aisló *A. baumannii* en un total de 200 muestras.

Tabla 8. Número de pacientes según el número de muestras con aislamiento de *A. baumannii*.

Número de muestras por paciente con aislamiento de <i>A. baumannii</i>	Número de pacientes		
	Año 2010	Año 2011	Total
1 muestra	21	18	39
2 muestras	6	21	27
3 muestras	10	4	14
4 muestras	5	4	9
5 muestras	4	3	7
6 muestras	0	3	3
7 muestras	1	0	1
8 muestras	0	1	1
Total	47	54	101

Los pacientes con más de un aislado no presentaron un intervalo de edad específico, tenían edades comprendidas entre 21 y 87 años, y procedían tanto de REA como de UCI (48,4% y 51,6%, respectivamente). Se observó que el número de pacientes que aportaron dos muestras aumentó conforme lo hizo la edad, hasta los mayores de 85 años. El resto de pacientes con más de una muestra, no mostraron una clara relación con la edad del paciente (**Figura 16**).

Las primeras muestras de estos pacientes con más de un aislado correspondieron a muestras respiratorias (20/62, 32,2%), muestras de sangre (10/62, 16,1%), infecciones de piel y partes blandas (IPPB) (9/62, 14,5%), muestras intraabdominales (5/62, 8,1%), catéteres venosos (7/62, 11,3%), muestras de colonización (5/62, 11,3%), orina (2/62, 3,2%), y líquidos estériles (2/62, 3,2%).

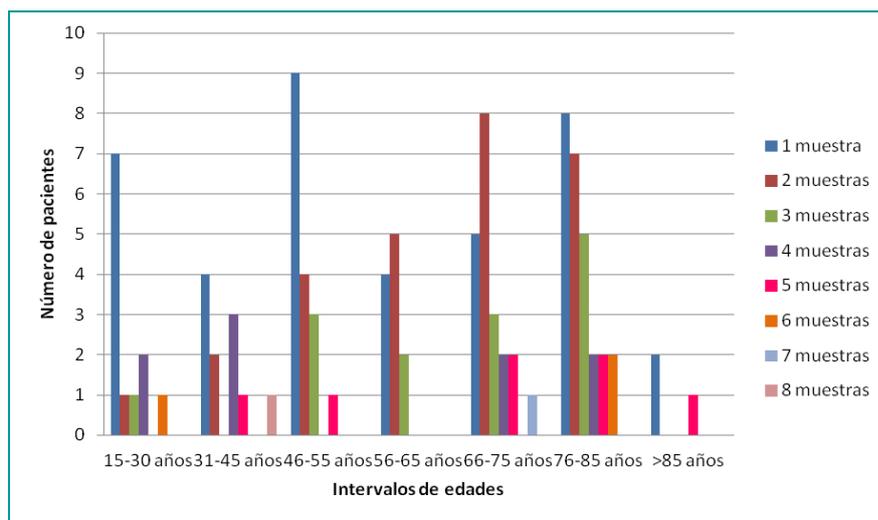


Figura 16. Número de muestras por paciente y la edad.

Un 88,7% (212 cepas) de los aislamientos de *A. baumannii* procedían de muestras clínicas. El resto 11,3% (27/239) fueron muestras de colonización (exudados rectales, axilares y faríngeos) obtenidas como parte del programa de vigilancia activa de este microorganismo multirresistente realizado en áreas de alto riesgo del hospital.

Entre los aislamientos clínicos, la mayoría procedían de muestras respiratorias (76/212, 35,8%) que incluían secreciones respiratorias, aspirados bronquiales, esputos, lavados broncoalveolares y exudados óticos; seguido, en orden decreciente, de IPPB (43/212, 20,3%), hemocultivos (34/212, 16%), catéteres venosos (29/212, 13,7%), muestras intraabdominales (15/212, 7,1%), orinas (10/212, 4,7%), y líquidos estériles (LCR y líquido pleural) (5/212, 2,4%) (**Figura 17**).

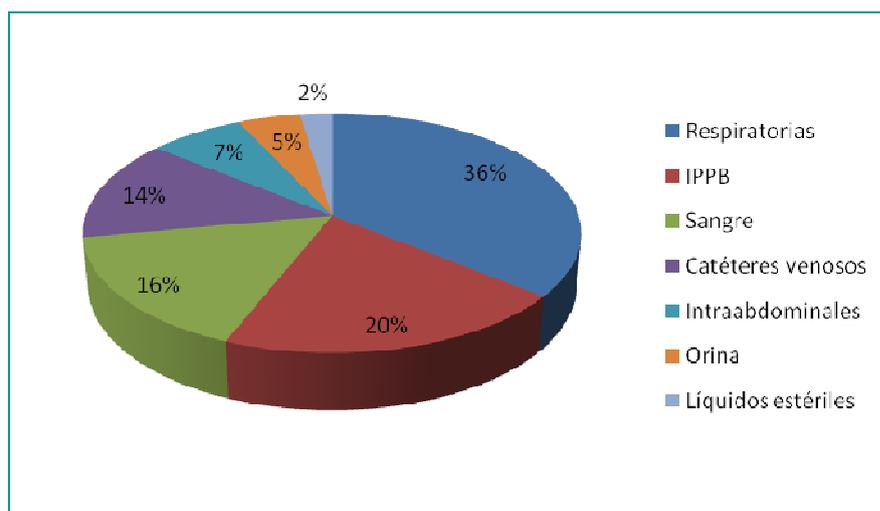


Figura 17. Procedencia de los aislamientos clínicos. IPPB: infección de piel y partes blandas. Respiratorias: muestras relacionadas con infecciones respiratorias de vías altas y bajas, excepto líquido pleural.

Se analizó el tipo de muestra recibida según el servicio de procedencia (**Figura 18**). Así, de las 114 muestras procedentes de la REA, el 28,9% (33/114) correspondieron a muestras respiratorias, el 18,4% (21/114) a catéteres venosos y el 17,5% (20/114) a IPPB. Otras muestras de este servicio fueron muestras intraabdominales, de colonización, intraabdominales, orinas y líquidos estériles. En la UCI la mayoría de las muestras fueron respiratorias (34,4%, 43/125), seguidas de hemocultivos (19,2%, 24/125) y muestras de IPPB (18,4%, 23/125).

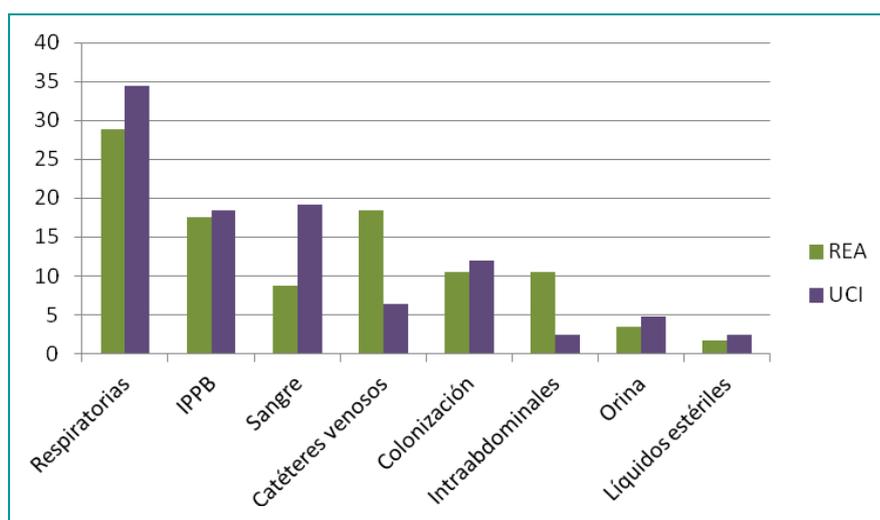


Figura 18. Distribución de los diferentes tipos de muestras recibidas por servicios. Los valores están expresados como porcentaje del total de las muestras de cada servicio.

1.3. Distribución temporal de los aislamientos de *A. baumannii*

La distribución temporal de los aislamientos a lo largo de los años 2010 y 2011 en REA y UCI queda reflejada en las **figura 19**.

El número de aislados por mes varió entre 0 y 10. Los meses con mayor número de aislamientos fueron Junio 2011, Enero 2010, Diciembre 2011, Agosto 2011 y Octubre 2011, con 10, 9, 9, 8 y 8 aislamientos de *A. baumannii*, respectivamente. En general, no existió relación entre los picos de máxima incidencia en REA y UCI. El número de aislamientos de *A. baumannii* en ambas unidades no fue en paralelo, la máxima incidencia se debió al aumento de aislados en uno de los servicios. En el año 2010, el número máximo de aislamientos de *A. baumannii* se observó en el mes de Enero en REA. Mientras que en el año 2011, fue en Junio y Agosto en UCI.

Durante el periodo de estudio no se observó un mayor número de aislados de *A. baumannii* en los meses de verano (Junio, Julio y Agosto).

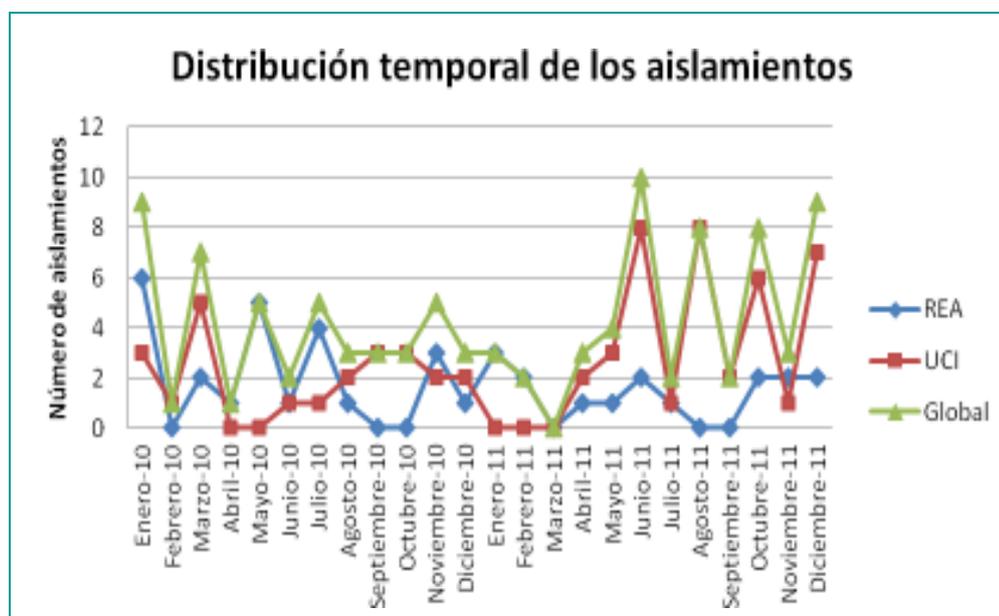


Figura 19. Distribución temporal de los aislamientos de *A. baumannii* en REA y UCI durante el año 2010 y año 2011.

1.4. Estudio de colonización-infección por *A. baumannii*

Las muestras totales enviadas al Servicio de Microbiología para el estudio de colonización fueron 44: 18 exudados axilares (40,9%), 14 exudados rectales (31,8%) y 12 exudados faríngeos (27,3%). Estas muestras procedían de 16 pacientes. En 9 de éstos, se realizó el estudio de vigilancia activa completo mediante la recogida de 3 muestras (exudado axilar, exudado faríngeo y exudado rectal). Además, a 3 de estos pacientes se les recogió un cuarto exudado. En el resto (7/16), se recogieron 1 o 2 muestras de vigilancia activa. La edad media de estos pacientes fue de 63 años (intervalo 30-79 años) y la mitad eran hombres (50%).

A. baumannii multirresistente se aisló en 27 muestras de colonización (61,4%, 27/44): 14 exudados axilares (14/18, 77,8%), 7 exudados rectales (7/14, 50%) y 6 exudados faríngeos (6/12, 50%). Todas las cepas fueron resistentes a carbapenems. Estos resultados mostraron que en nuestro estudio de vigilancia activa frente a este microorganismo multirresistente se obtuvo mayor rendimiento con los exudados axilares en comparación con los faríngeos y rectales.

En el 9,9% (10/101) de los pacientes el primer aislamiento fue obtenido de muestras de vigilancia activa. De estos pacientes, un 60% (6/10) desarrollaron más tarde infección por este microorganismo (2 infecciones respiratorias, 2 IPPB y dos bacteriemias, una de ellas de origen respiratorio). Tras la colonización, el tiempo medio de aparición de la infección fue de 14,8 días (0-58 días). Los 4 pacientes restantes (4/10) no desarrollaron posteriormente una infección, sólo estuvieron colonizados por *A. baumannii* multirresistente. La edad media de estos 4 pacientes fue de 68 años (rango: 49-79 años) y el 75% eran mujeres. Todos estos pacientes estuvieron ingresados en REA a excepción de uno ingresado en UCI.

En el resto de pacientes con aislamiento de *A. baumannii* (91/101) las primeras muestras correspondieron a muestras clínicas enviadas al Servicio de Microbiología

por sospecha de diferentes cuadros infecciosos. Estos procesos infecciosos iniciales fueron: respiratorios (35/91), sepsis (17/91), IPPB (14/91), infecciones asociadas a catéteres venosos (10/91), infecciones intraabdominales (8/91), infecciones de orina (5/91) y de líquidos estériles (2/91). El 61,5% (56/91) de las muestras procedían de pacientes de UCI, el resto (38,5%, 35/91) de REA.

En los 44 pacientes ingresados en UCI, el tiempo medio de ingreso previo al aislamiento microbiológico fue de 22,7 días.

1.5. Sensibilidad antibiótica de los aislamientos de *A. baumannii*

Sensibilidad antibiótica global

Los resultados de la sensibilidad frente a los antimicrobianos estudiados, se presentan en la **tabla 9**. Se incluyó el primer aislamiento de *A. baumannii* de cada paciente, estudiando, por tanto, un total de 101 cepas.

Los antibióticos más activos frente *A. baumannii* fueron colistina, minociclina, amikacina y cotrimoxazol, con unos porcentajes de sensibilidad del 93,1%, 60,4%, 45,5% y 44,5% respectivamente. La tigeciclina fue activa en el 19,8% de las cepas estudiadas, tobramicina en el 16,8% y ampicilina/sulbactam en el 9,9%.

La mayoría de las cepas fueron resistentes a carbapenems con porcentajes de sensibilidad a imipenem y meropenem del 3%. Tan sólo 3 cepas de todas las estudiadas fueron sensibles a este grupo de antibióticos, considerados tratamiento de elección en infecciones por *A. baumannii*. Para el resto de antibióticos también se observaron altas tasas de resistencia. Así, para piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, aztreonam, gentamicina, ciprofloxacino y levofloxacino se encontró que menos del 4% de los aislamientos fueron sensibles. Sólo hubo 3 aislamientos sensibles a todos los antibióticos testados excepto a aztreonam. Estos

procedían de secreciones respiratorias, sangre y de IPPB, de pacientes ingresados en UCI. En dos de ellos (año 2010) se consideró que la infección fue de adquisición nosocomial ya que apareció tras 48 horas del ingreso hospitalario. En el otro paciente la infección fue de origen comunitario (año 2011).

Cuando se comparan los porcentajes de sensibilidad a los diferentes antibióticos en los dos años estudiados, se observa que en el año 2011 se incrementa el porcentaje de cepas sensibles a amikacina (59,3% en 2011 vs 29,8% en 2010), colistina (94,4% vs 91,5%), tobramicina (20,4% vs 12,8%) y un menor porcentaje para ampicilina/sulbactam (7,4% vs 12,8%), gentamicina (1,8% vs 6,4%) y minociclina (51,8% vs 70,2%). Para el único antibiótico que se observó que la diferencia de sensibilidad entre los dos años estudiados era estadísticamente significativa fue para amikacina ($p < 0,05$). En el resto de antibióticos no se observaron diferencias significativas (**Tabla 9**).

Entre los aislamientos procedentes de las dos unidades estudiadas también se observaron diferencias en los porcentajes de sensibilidad. Así, en la UCI, los porcentajes de sensibilidad para colistina, minociclina, tigeciclina y tobramicina fueron del 95,1%, 70,5%, 31,1% y 22,9% respectivamente, frente a unos porcentajes del 90%, 45%, 2,5% y 7,5% de cepas sensibles observados en REA para los mismos antibióticos. Amikacina y cotrimoxazol fueron más activos frente a aislamientos de REA que frente a aquellos procedentes de UCI (50% vs 42,6% y 52,5% vs 39,3%, respectivamente). La diferencia en la sensibilidad entre las cepas de *A. baumannii* en las dos unidades de alto riesgo para tobramicina, minociclina y tigeciclina fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), siendo estos antibióticos más activos en aquellos aislamientos procedentes de UCI. En general, se observó un mayor porcentaje de resistencia antibiótica en los aislamientos de pacientes ingresados en REA, con respecto a los aislamientos de UCI (**Tabla 10**).

También se encontraron diferencias en las dos Unidades a lo largo de los dos años estudiados. En el año 2010, tigeciclina fue más activa frente a los aislamientos

clínicos procedentes de UCI que aquellos aislados en REA, siendo la diferencia entre ambas unidades estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Cuando se analizaron las diferencias en las tasas de sensibilidad de las cepas aisladas en las dos unidades estudiadas durante el año 2011, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para amikacina y cotrimoxazol, que fueron más sensibles en aquellas procedentes de REA, y minociclina y tigeciclina que presentaron más actividad en las cepas aisladas de pacientes ingresados en la UCI.

Tabla 9. Porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos durante los años 2010 y 2011.

Antibiótico	Porcentaje de cepas sensibles (nº de cepas sensibles/nº de cepas total)		
	Año 2010	Año 2011	Global
Amikacina	29,8 (14/47)	59,3 (32/54)	45,5 (46/101)
Ampicilina/sulbactam	12,8 (6/47)	7,4 (4/54)	9,9 (10/101)
Aztreonam	0 (0/47)	0 (0/54)	0 (0/101)
Cefepime	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Ceftazidima	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Ciprofloxacino	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Colistina	91,5 (43/47)	94,4 (51/54)	93,1 (94/101)
Cotrimoxazol	44,7 (21/47)	44,4 (24/54)	44,5 (45/101)
Gentamicina	6,4 (3/47)	1,8 (1/54)	4 (4/101)
Imipenem	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Levofloxacino	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Meropenem	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Minociclina	70,2 (33/47)	51,8 (28/54)	60,4 (61/101)
Piperacilina	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Piperacilina/tazobactam	4,2 (2/47)	1,8 (1/54)	3 (3/101)
Tigeciclina	21,3 (10/47)	18,5 (10/54)	19,8 (20/101)
Tobramicina	12,8 (6/47)	20,4 (11/54)	16,8 (17/101)

Tabla 10. Porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos en las unidades de REA y UCI durante el año 2010 y año 2011.

Antibiótico	Porcentaje de cepas sensibles (nº de cepas sensibles/nº de cepas total)					
	Año 2010 (n=47)		Año 2011 (n=54)		Global (n=101)	
	REA	UCI	REA	UCI	REA	UCI
Amikacina	29,2 (7/24)	30,4 (7/23)	81,2 (13/16)	50 (19/38)	50 (20/40)	42,6 (26/61)
Ampicilina/sulbactam	4,2 (1/24)	21,7 (5/23)	6,2 (1/16)	7,9 (3/38)	5 (2/40)	13,1 (8/61)
Aztreonam	0 (0/24)	0 (0/23)	0 (0/16)	0 (0/38)	0 (0/40)	0 (0/61)
Cefepime	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Ceftazidima	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Ciprofloxacino	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Colistina	87,5 (21/24)	95,6 (22/23)	93,7 (15/16)	94,7 (36/38)	90 (36/40)	95,1 (58/61)
Cotrimoxazol	41,7 (10/24)	47,8 (11/23)	68,7 (11/16)	34,2 (13/38)	52,5 (21/40)	39,3 (24/61)
Gentamicina	4,2 (1/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	2,5 (1/40)	4,9 (3/61)
Imipenem	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Levofloxacino	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Meropenem	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Minociclina	66,7 (16/24)	73,9 (17/23)	12,5 (2/16)	68,4 (26/38)	45 (18/40)	70,5 (43/61)
Piperacilina	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Piperacilina/tazobactam	0 (0/24)	8,7 (2/23)	0 (0/16)	2,6 (1/38)	0 (0/40)	4,9 (3/61)
Tigeciclina	4,2 (1/24)	39,1 (9/23)	0 (0/16)	26,3 (10/38)	2,5 (1/40)	31,1 (19/61)
Tobramicina	8,3 (2/24)	17,4 (4/23)	6,2 (1/16)	26,3 (10/38)	7,5 (3/40)	22,9 (14/61)

Patrones de resistencia a los antibióticos

Los aislamientos de *A. baumannii* se clasificaron siguiendo diferentes criterios: según el perfil de resistencia definido por Magiorakos *et al.* (Magiorakos *et al.*, 2012) y

según el número de antibióticos sin actividad, frente a las cepas de *A. baumannii*, del total de antimicrobianos estudiados.

Siguiendo los criterios de Magiorakos *et al.* (Magiorakos *et al.*, 2012), los antibióticos estudiados se agruparon en 9 categorías: carbapenems (imipenem y meropenem); aminoglucósidos (amikacina, gentamicina y tobramicina); fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino); penicilinas antipseudomónicas más inhibidor de betalactamasas (piperacilina/tazobactam); cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima y cefepime); inhibidores de la síntesis del folato (cotrimoxazol); penicilinas más inhibidor de betalactamasas (ampicilina/sulbactam); polimixinas (colistina); tetraciclinas (minociclina y tigeciclina).

Aplicando los criterios de resistencia propuestos por Magiorakos (Magiorakos *et al.*, 2012), el 97% (98/101) de los aislados de *A. baumannii* presentaron multirresistencia, de los cuales el 40,6% (41/101) fueron clasificados como cepas estrictamente MDR (MDR, “multidrug-resistant”) y el 56,4% (57/101) como extremadamente resistentes (XDR, “extensively drug-resistant”). Ningún aislamiento fue considerado como panresistente (PDR, “pandrug-resistant”). Solo 3 de los 101 aislamientos (3%) se consideraron sensibles (**Tabla 11**).

Adicionalmente, los 101 aislamientos de *A. baumannii* fueron clasificados en 8 grupos (grupos A-H) según el número de antibióticos a los que fueron resistentes del total de antibióticos estudiados (**Tabla 11**).

- Grupo A

Este grupo estuvo formado por 4 aislados resistentes a 14 de los 15 antibióticos estudiados. Todos fueron resistentes a betalactámicos, tetraciclinas, cotrimoxazol, y fluoroquinolonas. Solo hubo un aislamiento sensible a amikacina, otro a colistina y dos a minociclina.

- Grupo B

Los aislados de este grupo (n=52) fueron resistentes a 13 de los 15 antibióticos analizados. La mayoría (39/52) presentaron resistencia a todos los antimicrobianos excepto a colistina y minociclina.

- Grupo C

En este grupo (n=20), con resistencia a 12 de 15 antibióticos, predominaron los aislamientos resistentes a todos los antimicrobianos excepto a colistina, amikacina y cotrimoxazol (14/20).

- Grupo D

Los aislados incluidos en este grupo (n=10) fueron resistentes a 11 de 15 antibióticos. Estas cepas fueron sensibles a colistina y la mayoría también a cotrimoxazol y amikacina.

- Grupo E

Los aislamientos (n=9) fueron resistentes a 10 de 15 antibióticos. La mayoría presentó un perfil de sensibilidad a colistina, tigeciclina, cotrimoxazol y amikacina.

- Grupo F

Solo hubo un aislamiento en este grupo caracterizado por ser sensible a amikacina, tobramicina, colistina, minociclina, tigeciclina y cotrimoxazol, y resistente al resto de antibióticos estudiados. Resistente a 9 de los 15 antibióticos estudiados.

- Grupo G

Los 2 aislados incluidos en este grupo fueron resistentes a 8 de 15 antibióticos. Presentaron el mismo perfil que la cepa del grupo F a diferencia de ser sensibles a un antibiótico más. Un aislado fue sensible a ampicilina/sulbactam y el otro a gentamicina.

- Grupo H

Todos los aislados de este grupo (n=3) fueron sensibles a los antibióticos estudiados excepto a aztreonam.

La mayoría de los aislados (38,61%, 39/101) de *A. baumannii* presentaron el perfil de resistencia del grupo B, con sensibilidad a colistina y a minociclina, y resistencia a todos los betalactámicos, aminoglucósidos, cotrimoxazol y fluoroquinolonas. El segundo perfil más frecuente (13,86%, 14/101) se observó en el grupo C, incluía cepas con sensibilidad a colistina, cotrimoxazol y amikacina, y resistencia a betalactámicos, tetraciclinas y fluoroquinolonas (**Tabla 11**).

Dentro del grupo C observamos dos perfiles de resistencia diferentes según los criterios de Magiorakos *et al.* (Magiorakos *et al.*, 2012). De las 20 cepas pertenecientes a este grupo, una de ellas se definió como XDR, mientras que el resto fue MDR. Esto se debió a que este aislamiento fue sensible a dos antibióticos, amikacina y tobramicina, que se encuentran dentro de la misma familia antibiótica, y a minociclina, de una familia diferente, por lo tanto, se contabiliza como sensible a 2 familias siendo definido como XDR. El resto de cepas fueron sensibles a 4 antibióticos pertenecientes a familias distintas y por eso fueron definidos como MDR.

Tabla 11. Perfiles de resistencia según los criterios de Magiorakos *et al.* (Magiorakos *et al.*, 2012) y según la sensibilidad de los aislamientos a los antibióticos estudiados.

Nº de antibióticos resistentes/nº de antibióticos totales	P (ANTIPS) +INH	P+INH	CAE		CPM		AMG			PLX	TC		INH.FOL	FQ		Nº de cepas con este perfil	Perfil de resistencia
	P/T	A/S	CAZ	CEF	IMP	MEM	AK	GM	TOB	CO	MN	TG	SXT	CIP	LEV		
Grupo A	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	1	XDR
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	1	XDR
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	2	XDR
Grupo B	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	2	XDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	1	XDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	4	XDR
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	39	XDR
Grupo C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	6	XDR
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	1	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	1	XDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	2	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	14	MDR
Grupo D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	2	MDR
	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	1	MDR
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	1	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	1	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R	3	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	1	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	2	MDR
Grupo E	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	5	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	4	MDR
Grupo F	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	1	MDR
Grupo G	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	1	MDR
	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	1	MDR

P(ANTIPS+INH): penicilinas antipseudomónicas + inhibidor de betalactamasas; **P+INH:** penicilinas + inhibidor de betalactamasas; **CAE:** cefalosporinas de amplio espectro; **CPM:** carbapenems; **AMG:** Aminoglucósidos; **PLX:** polimixinas; **TC:** tetraciclinas; **INH.FOL:** inhibidores de la síntesis de folato; **FQ:** fluoroquinolonas; **P/T:** piperacilina/tazobactam; **A/S:** ampicilina/sulbactam; **CAZ:** ceftazidima; **CEF:** cefepime; **IMP:** imipenem; **MEM:** meropenem; **AZT:** aztreonam; **AK:** amikacina; **GM:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **CO:** colistina; **MN:** minociclina; **TG:** tigeciclina; **SXT:** cotrimoxazol; **CIP:** ciprofloxacino; **LEV:** levofloxacino; **R:** resistente; **S:** sensible; **MDR (multidrug-resistant):** multirresistente; **XDR (extensively drug-resistant):** extremadamente resistente.

En la tabla no se incluyen los antibióticos aztreonam y piperacilina. Todas las cepas fueron resistentes a aztreonam y presentaron el mismo perfil de sensibilidad para piperacilina que para piperacilina/tazobactam.

Sensibilidad de los aislamientos de *A. baumannii* según la localización de la infección

La **tabla 12** describe la sensibilidad de los aislamientos de *A. baumannii* según la localización de la infección. Se observó que las cepas resistentes a un mayor número de antibióticos estudiados se aíslan principalmente de líquidos estériles. Estas cepas son resistentes a todos los antibióticos excepto a amikacina, cotrimoxazol y colistina, con unas tasas de sensibilidad del 60%, 60% y 100%, respectivamente. Las cepas con mayor número de antibióticos activos se aíslan en bacteriemias, IPPB e infecciones respiratorias (sensibles a 16 de los 17 antibióticos estudiados).

Los porcentajes de sensibilidad para cada antimicrobiano varían según la localización de la infección (**Tabla 12**). Las mayores tasas de sensibilidad para amikacina, tobramicina, cotrimoxazol y tigeciclina se encuentran en las cepas aisladas de pacientes colonizados [69,6% (16/23), 52,2% (12/23), 69,6 (16/23), 21,7% (5/23), respectivamente]. La tobramicina y el cotrimoxazol fueron más activos en los aislados de muestras de colonización que en los del resto de muestras, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La colistina mostró actividad en el 100% de los aislamientos de pacientes colonizados, de líquidos estériles y de orina. Observándose la menor tasa en los aislados procedentes de infecciones respiratorias (83,6%, 61/73). Se obtuvo un valor de $p = 0,067$, con un residuo corregido de 3,4, lo que indica una tendencia de la colistina a ser más resistente en las secreciones respiratorias.

El cotrimoxazol también mostró una tendencia a ser más resistente en las secreciones respiratorias ($p = 0,082$, con un residuo corregido de 2,0).

La minociclina mostró menor actividad en los aislamientos obtenidos de colonización y de líquidos estériles ($p < 0,05$) en comparación con los aislamientos de

otras localizaciones, mientras que fue más activa en las infecciones respiratorias ($p < 0,05$).

Las cepas con mayores tasas de sensibilidad a ceftazidima, ciprofloxacino, imipenem, piperacilina y piperacilina/tazobactam se aislaron de las IPPB (5% (2/40), para cada uno de estos antibióticos); a cefepime (8,8%, 3/34), meropenem (2,9%, 1/34) y levofloxacino (2,9%, 1/34) en bacteriemias; a gentamicina (7,1%, 1/14) en las infecciones intraabdominales; y a ampicilina/sulbactam y minociclina con unos porcentajes de cepas sensibles del 20% (2/10) y 70% (7/10), respectivamente, en las infecciones de orina.

Los antibióticos que mostraron más actividad frente a *A. baumannii* en las IPPB y en bacteriemias fueron la colistina, minociclina y amikacina con porcentajes de sensibilidad del 97%, 55-57% y 55% respectivamente. También fueron los más activos en las infecciones de catéteres vasculares (91,3%, 47,4%, 48,1%, respectivamente).

En las infecciones intraabdominales la colistina (92,9%, 13/14) y cotrimoxazol (64,3%, 9/14) fueron los más activos a diferencia de aztreonam, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacino y levofloxacino que no mostraron actividad. Frente a las cepas aisladas de líquidos estériles solo mostraron actividad colistina (100%, 5/5), amikacina y cotrimoxazol, ambos con una sensibilidad del 60% (3/5).

En las infecciones urinarias las mayores tasas de sensibilidad se observaron para colistina y minociclina con el 100% (10/10) y 70% (7/10), respectivamente.

En las infecciones respiratorias se observó que los antibióticos más activos fueron la colistina y la minociclina con tasas de sensibilidad del 83,6% (61/73) y 64,3% (45/70), respectivamente.

Colistina presentó los mayores porcentajes de actividad en todas las localizaciones de las infecciones, mientras que aztreonam no mostró actividad en ninguna de ellas.

Tabla 12. Porcentaje de cepas sensibles según la localización de la infección y colonización.

Ab	Porcentaje de cepas sensibles (nº de cepas sensibles/nº de cepas total)							
	Coloniz	IPPB	Bacteriemias	Intraabdo minales	L.estéril	ITU	CV	Respi
AK	69,6 (16/23)	55 (22/40)	55,9 (19/34)	50 (7/14)	60 (3/5)	30 (3/10)	48,1 (13/27)	38,7 (29/75)
A/S	8,7 (2/23)	5,7 (2/35)	8,8 (3/34)	7,1 (1/14)	0 (0/4)	20 (2/10)	0 (0/19)	12,9 (9/70)
AZT	0 (0/23)	0 (0/35)	0 (0/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/19)	0 (0/70)
CEF	0 (0/23)	7,5 (3/40)	8,8 (3/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/27)	2,7 (2/75)
CAZ	0 (0/23)	5 (2/40)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/27)	1,3 (1/75)
CIP	0 (0/23)	5 (2/40)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/27)	1,3 (1/75)
CO	100 (23/23)	97,2 (35/36)	97,1 (33/34)	92,9 (13/14)	100 (5/5)	100 (10/10)	91,3 (21/23)	83,6 (61/73)
SXT	69,6 (16/23)	37,1 (13/35)	41,2 (14/34)	64,3 (9/14)	60 (3/5)	50 (5/10)	42,1 (8/19)	34,3 (24/70)
GM	0 (0/23)	5 (2/40)	2,9 (1/34)	7,1 (1/14)	0 (0/4)	0 (0/10)	0 (0/26)	1,3 (1/75)
IMP	0 (0/23)	5 (2/40)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/26)	1,3 (1/75)
LEV	0 (0/23)	2,9 (1/35)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/19)	1,4 (1/71)
MEM	0 (0/23)	2,9 (1/35)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/19)	1,4 (1/70)
MN	26,1 (6/23)	57,1 (20/35)	55,9 (19/34)	50 (7/14)	0 (0/4)	70 (7/10)	47,37 (9/19)	64,3 (45/70)
PIP	0 (0/23)	5 (2/40)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/4)	0 (0/10)	0 (0/27)	1,3 (1/75)
P/T	0 (0/23)	5 (2/40)	2,9 (1/34)	0 (0/14)	0 (0/5)	0 (0/10)	0 (0/27)	1,3 (1/75)
TG	21,7 (5/23)	20 (8/40)	14,7 (5/34)	7,1 (1/14)	0 (0/4)	20 (2/10)	0 (0/27)	14,7 (11/75)
TOB	52,2 (12/23)	12,5 (5/40)	11,8 (4/34)	7,1 (1/14)	0 (0/5)	10 (1/10)	7,4 (2/27)	18,7 (14/75)

Ab: antibióticos; **PIP:** piperacilina; **P/T:** piperacilina/tazobactam; **A/S:** ampicilina/sulbactam; **CAZ:** ceftazidima; **CEF:** cefepime; **IMP:** imipenem; **MEM:** meropenem; **AZT:** aztreonam; **AK:** amikacina; **GM:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **CO:** colistina; **MN:** minociclina; **TG:** tigeciclina; **SXT:** cotrimoxazol; **CIP:** ciprofloxacino; **LEV:** levofloxacino. **Coloniz:** colonización. **IPPB:** infecciones de piel y partes blandas. **ITU:** infecciones del tracto urinario. **CV:** catéteres vasculares. **Respi:** respiratorias.

Variabilidad de la sensibilidad a los antibióticos por paciente

De los 101 pacientes incluidos en este estudio, 62 de ellos tuvieron más de un aislamiento de *A. baumannii* en diferentes muestras (Tabla 8, sección 1.2. "Procedencia de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii*").

En el 40,7% (24/59) de los pacientes el fenotipo de resistencia se mantuvo entre los diferentes aislamientos. En el resto de pacientes (59,3%, 35/59) el fenotipo varió. Los antibióticos en los que se observaron con más frecuencia cambios de fenotipo de sensible (S) a resistente (R) o viceversa fueron: amikacina (en 14 de los 35 pacientes), tobramicina (en 12 de 35) y en colistina (en 12 de 35).

En 11 de los 12 pacientes en los que varió la sensibilidad de la colistina se observó el cambio de fenotipo de sensible a resistente, siendo el 72,7% (8/11) muestras respiratorias.

La variación de fenotipo de sensible a resistente o viceversa, pudo deberse a la adquisición de mecanismos de resistencia, a cambios en una dilución de la CMI del antibiótico que llevase a cambios en la interpretación del fenotipo o porque el episodio de infección estuviese causado por cepas de *A. baumannii* con diferente patrón de sensibilidad perteneciendo o no al mismo clon.

2. Epidemiología molecular de los aislamientos de *A. baumannii*

Para conocer la relación clonal entre los aislamientos de *A. baumannii* se realizaron tres métodos diferentes de tipificación molecular. Se incluyó una cepa por paciente.

2.1. Tipificación molecular mediante REP-PCR

La relación clonal entre los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* se analizó inicialmente mediante REP-PCR (**Figura 20**).

Se establecieron cuatro clones de *A. baumannii*, 2 clones mayoritarios denominados A (48/101 aislamientos, 47,5%) y B (41/101 aislamientos; 40,6%), y dos minoritarios, C (5/101 aislamientos, 4,9%) y D (4/101, 4%). Tres de las cepas presentaron patrones de bandas (patrones denominados E, F y G) diferentes entre sí y con respecto a los clones A, B, C y D. Fueron considerados como aislamientos esporádicos. Estas 3 cepas fueron sensibles a carbapenems.

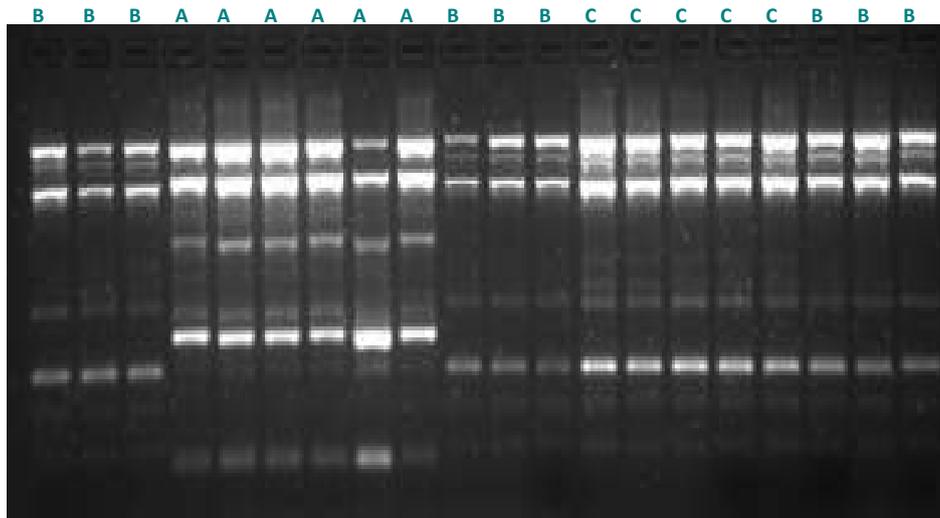


Figura 20. Patrones de bandas de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* del año 2010 obtenidos mediante REP-PCR. Calle 1-20: cepas de *A. baumannii* y clasificación en clones: A, B y C.

La distribución de los clones en las dos unidades de alto riesgo durante los dos años de estudio se muestra en la **figura 21 (A, B y C)**. Los dos clones predominantes

fueron aislados tanto de pacientes ingresados en la unidad de Reanimación (65% clon A y 35% clon B) como en la UCI (36,1% clon A y 44,3% clon B), lo que indica una dispersión de estos dos clones en el Hospital, aunque con un claro predominio del clon A en REA, y el clon B en UCI. El clon C y el clon D sólo se aislaron en UCI durante el año 2010 y el 2011, respectivamente.

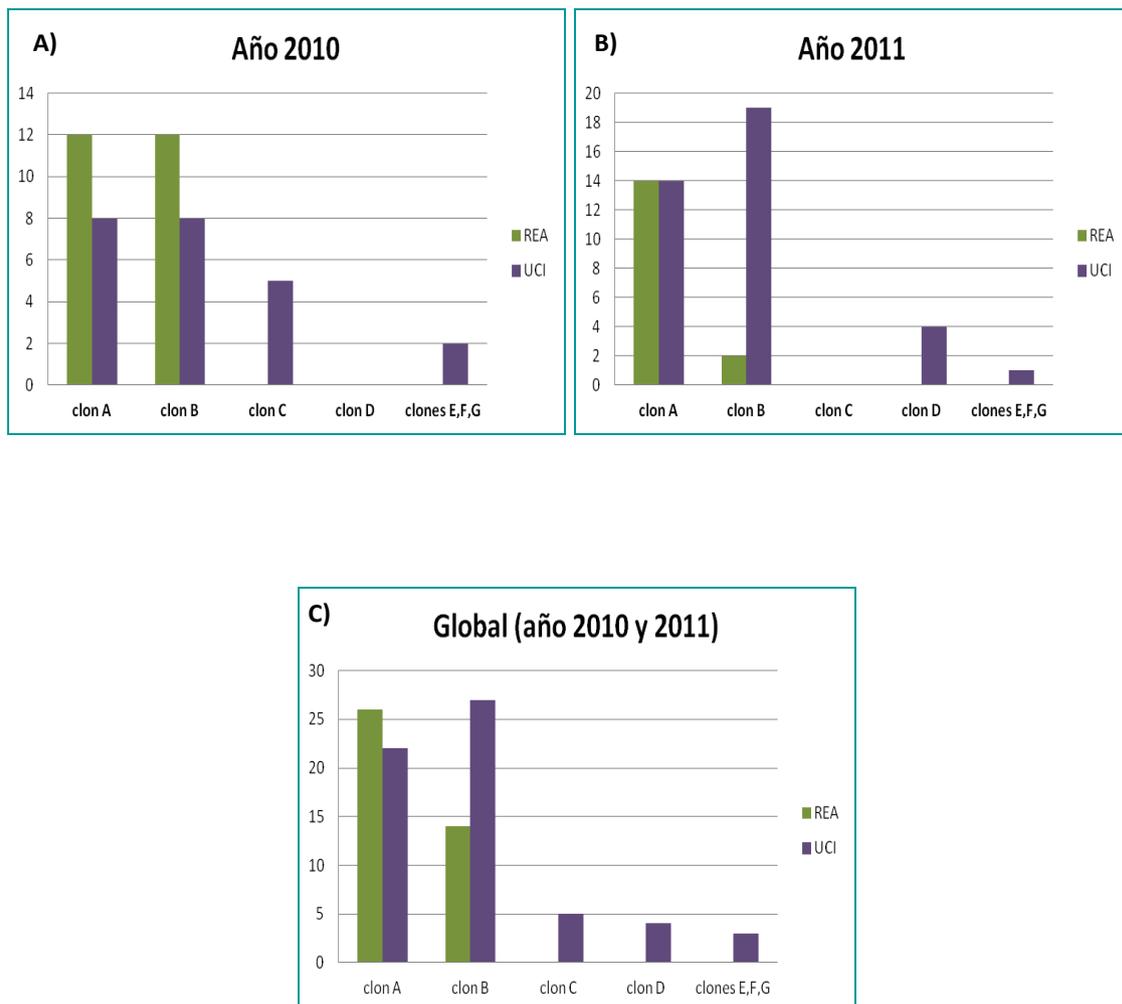


Figura 21. Distribución de los clones definidos mediante REP-PCR en las unidades de REA y UCI durante: A) año 2010, B) año 2011, y C) global (año 2010 y año 2011).

2.2. Tipificación molecular mediante RFLP-PFGE

El método de RFLP-PFGE es de referencia en la tipificación molecular de *A. baumannii*. Dado su elevado poder discriminativo, adicionalmente se utilizó esta técnica para confirmar los resultados obtenidos mediante REP-PCR.

El RFLP-PFGE nos permitió clasificar en 8 clones denominados de patrón I a patrón VIII (PI-PVIII), 99 de los 101 aislamientos (primer aislamiento de los 101 pacientes incluidos en este estudio) (**Figura 22**).

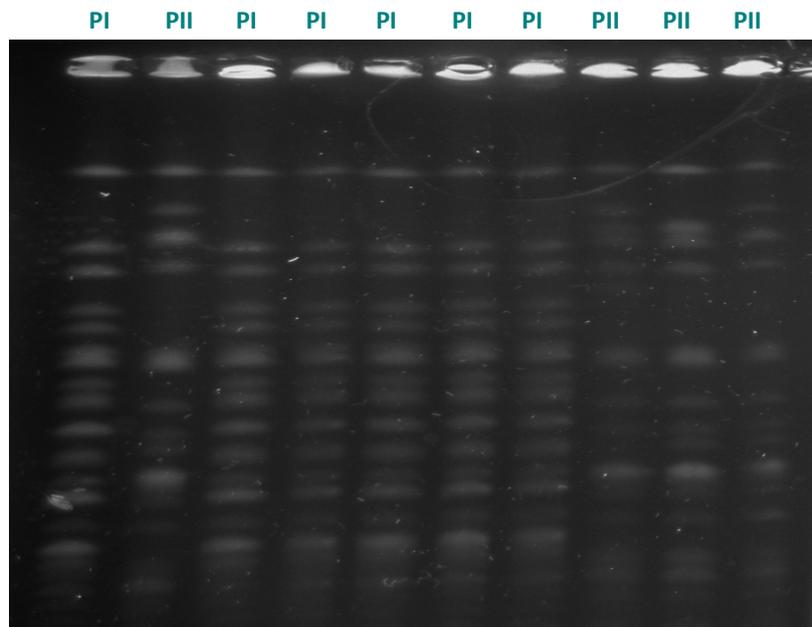


Figura 22. Patrones de bandas obtenidos mediante RFLP-PFGE para los aislamientos de *A. baumannii*. Calle 1-10: cepas de *A. baumannii*. PI: patrón 1; PII: patrón 2.

Cuando se compararon los patrones obtenidos mediante REP-PCR con los de PFGE (**Tabla 13**), se observó que de los 48 aislamientos de *A. baumannii* que mediante REP-PCR fueron denominados como clon A, 43 de ellos presentaron igual patrón de bandas en PFGE considerándose, por tanto, clonalmente relacionados (patrón I). Por

otra parte, 4 de las 48 cepas clasificadas como clon A presentaron patrones de bandas de ADN con al menos siete bandas distintas al patrón I pero iguales entre sí, de modo que, según los criterios definidos por Tenover *et al.* (Tenover *et al.*, 1995), estos aislamientos estaban relacionados entre sí (patrón III) y se consideraron diferentes al patrón I. El aislamiento restante, perteneciente al clon A, presentó un patrón de bandas diferente tanto al patrón I como al patrón III, definiéndose como patrón VIII. Por tanto, dentro del clon A definido mediante REP-PCR, se encontraron tres clones diferentes mediante PFGE.

Todos los aislamientos definidos como clon B mediante REP-PCR, presentaron el mismo patrón de bandas en PFGE, por lo tanto, estaban relacionados clonalmente y fueron denominados como patrón II. Este patrón también lo mostraron las 5 cepas clasificadas como clon C mediante REP-PCR. Por lo que dentro del patrón II definido por PFGE se incluyeron los patrones B y C de REP-PCR.

Mediante PFGE, 2 de los aislamientos del clon D que pudieron ser estudiados mediante esta técnica, fueron clasificados como un nuevo patrón, patrón VII.

El resto de los aislamientos (3/101) que mediante REP-PCR fueron clasificados en 3 clones diferentes (clon E, F y G) presentaron en PFGE al menos 7 bandas diferentes entre sí y con respecto a los patrones ya definidos, por tanto, se consideró que no estaban relacionados clonalmente y se denominaron como patrón IV, V y VI. Estas cepas fueron las únicas sensibles a todos los antibióticos analizados en este estudio excepto a aztreonam.

La concordancia entre ambos métodos de tipificación fue del 89,9% (89/99).

Tabla 13. Clasificación de los aislamientos mediante REP-PCR y RFLP-PFGE

Nº de aislamientos	Clones (REP-PCR)	Patrones (RFLP-PFGE)
43	A	PI
4	A	PIII
1	A	PVIII
41	B	PII
5	C	PII
4	D	PVII
1	E	PIV
1	F	PV
1	G	PVI

2.3. Estudio de la secuencia tipo (ST) obtenida mediante MLST

Adicionalmente, mediante MLST, se tipificaron 4 cepas de *A. baumannii* (2 de cada patrón mayoritario por PFGE, PI y PII). Los resultados obtenidos de la secuenciación de los 7 genes "housekeeping" se muestran en la **tabla 14**.

Tabla 14. Alelos de los genes "housekeeping" obtenidos para las 4 cepas de *A. baumannii* estudiadas mediante MLST y la secuencia tipo (ST) resultante.

Cepas	PFGE	Genes "housekeeping"							ST
		<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>	
Cepa 1	Patrón I	1	3	3	2	2	7	3	92
Cepa 2	Patrón I	1	3	3	2	59	7	3	ND
Cepa 3	Patrón II	1	1	1	1	1	9	6	187
Cepa 4	Patrón II	1	1	1	1	1	9	6	187

ND: no determinada.

La primera cepa estudiada del patrón I (cepa nº1) pertenecía a la ST-92. Con el análisis del segundo aislamiento de este patrón (cepa nº2) no se obtuvo ninguna secuencia tipo concreta. Los alelos obtenidos para los genes *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *gpi* y *rpoD* fueron similares a los de la cepa nº1 pero el gen *cpn60* mostró un alelo poco

frecuente, el alelo 59. Éste se diferencia del alelo 2 (obtenido para la cepa nº1) en 4 nucleótidos (**Figura 23**).

La combinación de los alelos obtenidos para los diferentes genes de la cepa nº2 no coincidió con ninguno de los STs descritos en la base de datos utilizada de *A. baumannii*.

Los aislamientos pertenecientes al patrón II (cepa nº3 y 4) se identificaron como ST-187.

```

Oxf_cpn60_2      ATGAACCCAATGGATTTAAACGCGGTATCGACATTGCAGTAAAACTGTAGTTGAAAAT
Oxf_cpn60_59    TATGACCCAATGGATTTAAACGCGGTATCGACATTGCAGTAAAACTGTAGTTGAAAAT
                  :: .*****

Oxf_cpn60_2      ATCCGTTCTATTGCTAAACCAGCTGATGATTTCAAAGCAATTGAACAAGTAGGTTCAATC
Oxf_cpn60_59    ATCCGTTCTATTGCTAAACCAGCTGATGATTTCAAAGCAATTGAACAAGTAGGTTCAATC
                  *****

Oxf_cpn60_2      TCTGCTAACTCTGATACTACTGTTGGTAAACTTATGCTCAAGCAATGGAAAAAGTAGGT
Oxf_cpn60_59    TCTGCTAACTCTGATACTACTGTTGGTAAACTTATGCTCAAGCAATGGAAAAAGTAGGT
                  *****

Oxf_cpn60_2      AAAGAAGGCGTAATCACTGTAGAAGAAGGCTCAGGCTTCGAAGACGCATTAGACGTTGTA
Oxf_cpn60_59    AAAGAAGGCGTAATCACTGTAGAAGAAGGCTCAGGCTTCGAAGACGCATTAGACGTTGTA
                  *****

Oxf_cpn60_2      GAAGGTATGCAGTTTGACCGTGGTTATATCTCTCCGTACTTTGCAAACAAACAAGATACT
Oxf_cpn60_59    GAAGGTATGCAGTTTGACCGTGGTTATATCTCTCCGTACTTTGCAAACAAACAAGATACT
                  *****

Oxf_cpn60_2      TTAAGTCTGAACTTGAAAATCCGTTTCATCCTTCTGTTGATAAAAAAATCAGCAACATT
Oxf_cpn60_59    TTAAGTCTGAACTTGAAAATCCGTTTCATCCTTCTGTTGATAAAAAAATCAGCAACATT
                  *****

Oxf_cpn60_2      CGTGAATTGATTTCTGTTTTAGAACGAGTTGCTAAAACGGTAAACCACTTCTTATCATC
Oxf_cpn60_59    CGTGAATTGATTTCTGTTTTAGAACGAGTTGCTAAAACGGTAAACCACTTCTTATCATC
                  *****

Oxf_cpn60_2      G
Oxf_cpn60_59    G
                  *

```

Figura 23. Alineamiento de las secuencias de los alelos 2 y 59 del gen "housekeeping" *cpn60*. En amarillo se marcan las diferencias de nucleótidos entre ambas secuencias.

Distribución temporal de los clones en el hospital

En la **figura 24** se representa la distribución de los clones establecidos mediante PFGE (patrones I-VIII) durante el periodo de dos años en el hospital. Cuando se inició

este estudio en Enero de 2010 el patrón I ya se encontraba establecido en el hospital, con un elevado número de aislamientos. Durante este mes y marzo de 2010 sólo se aislaron cepas pertenecientes a este patrón. Desde Abril del 2010 hasta Octubre de este mismo año únicamente se observó el patrón II. A partir de noviembre de 2010 y hasta la finalización de este estudio en Diciembre de 2011, ambos clones coexistieron en la misma proporción en el hospital, excepto a finales de este periodo donde predominó el patrón I. Durante el mes de Marzo de 2011 no se aisló *A. baumannii* en ninguna de las dos unidades de estudio.

Los patrones minoritarios (PIII-PVIII) aparecieron de forma esporádica durante el periodo de estudio.

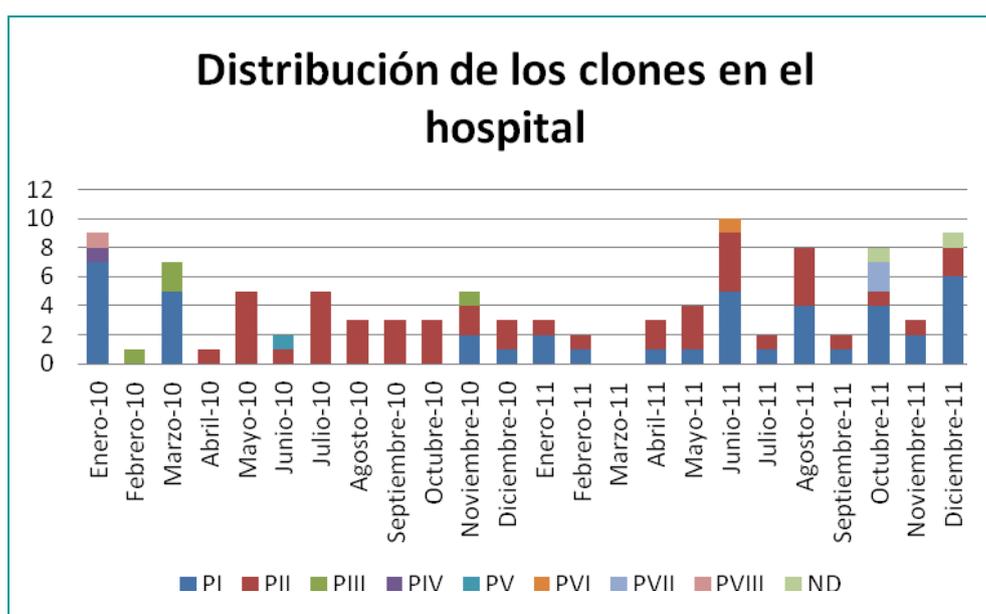


Figura 24. Distribución de los patrones de *A. baumannii* en el hospital durante el periodo de estudio. ND: no determinado.

Distribución temporal de los clones en las unidades de REA y UCI

En las **figuras 25 y 26** se muestra la distribución de los diferentes clones de *A. baumannii*, obtenidos mediante PFGE, en las unidades de REA y UCI a lo largo del periodo de estudio.

Los aislamientos de *A. baumannii* pertenecientes al patrón I ya se encontraban en REA cuando se inició el estudio, en Enero de 2010, posiblemente por ser un clon endémico en esta unidad.

Excepto en dos meses (Enero y Febrero de 2011) que coexistieron los dos patrones en REA, durante el resto del periodo estudiado hubo predominio de uno de ellos, apareciendo el patrón I al principio del periodo estudiado (Enero de 2010) y desapareciendo en Marzo de 2010. Durante el periodo comprendido entre Abril de 2010 y Agosto de 2010 solo se observó el patrón II. A partir de este mes y hasta el final del estudio en Diciembre de 2011 predominó el patrón I, a excepción de dos meses en los que coexistieron.

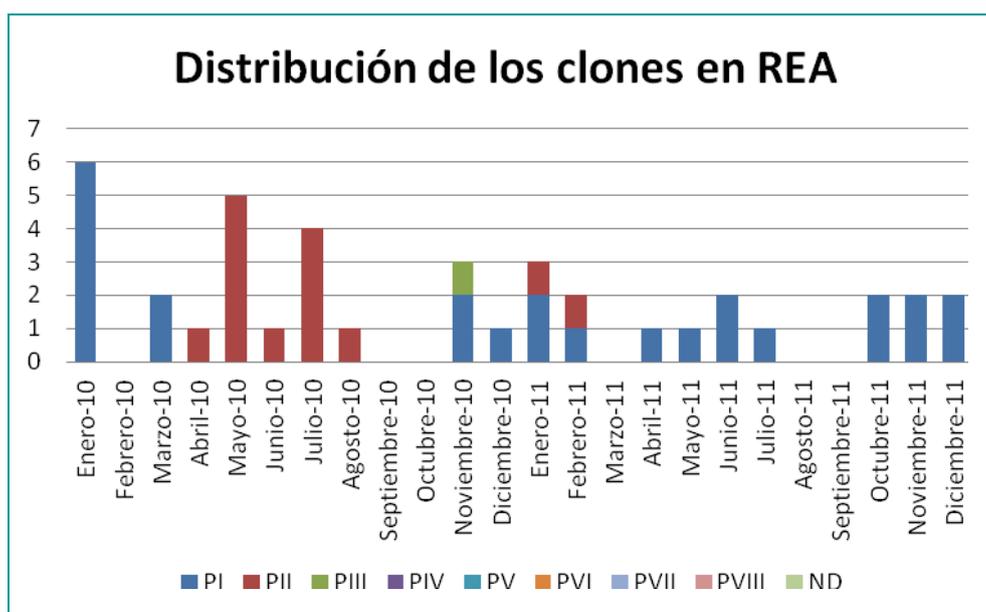


Figura 25. Evolución de los patrones de *A. baumannii* definidos mediante PFGE en la unidad de REA durante el periodo de estudio. ND: no determinado.

Cuando se inició el estudio en Enero de 2010 el patrón I ya se encontraba establecido en UCI. Este patrón predominó en Enero y Marzo de 2010. A partir de este mes predominó el patrón II, hasta Junio de 2011, el que reapareció el patrón I,

coexistiendo ambos patrones en la UCI hasta la finalización del estudio en Diciembre de 2011.

El resto de cepas pertenecientes a los patrones IV-VIII aparecieron de forma aislada en UCI durante el año 2010 y 2011.

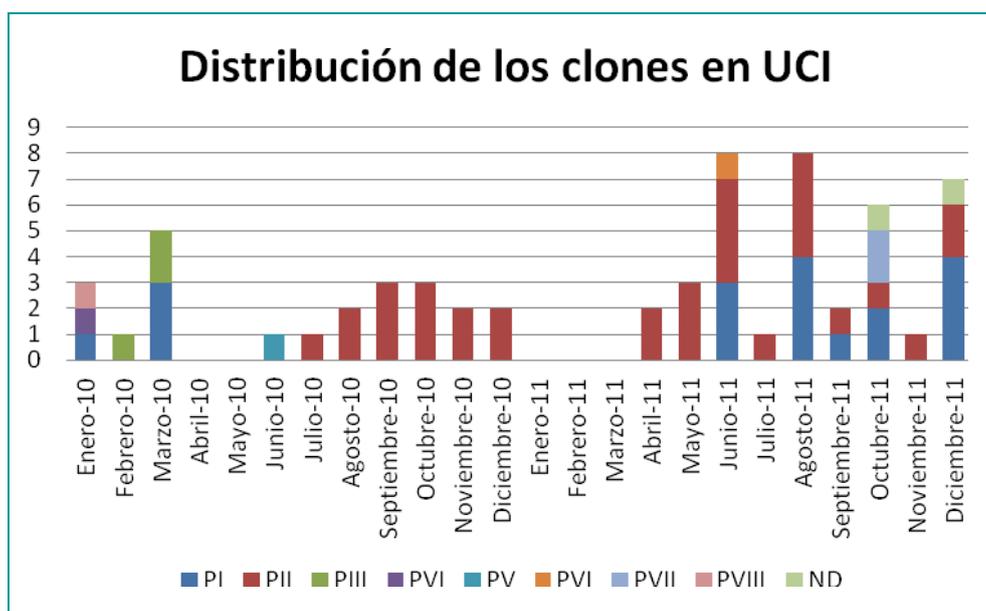


Figura 26. Evolución de los patrones de *A. baumannii* definidos mediante PFGE en la unidad de UCI durante el periodo de estudio. ND: no determinado.

Relación entre los clones obtenidos mediante PFGE con el tipo de muestra clínica y de colonización

En la **figura 27** se muestra la relación de los diferentes clones definidos mediante PFGE con las muestras de las que procedían los aislamientos estudiados. En todos los tipos de muestras estudiadas se identificaron los dos clones mayoritarios, el patrón I y el II, a excepción de los aislados procedentes de líquidos estériles que solo pertenecen al patrón II.

Los patrones IV-VI, identificados en las 3 cepas sensibles de este estudio, procedían de 3 tipos de muestras diferentes: secreciones respiratorias, sangre e IPPB.

El resto de patrones, III, VII y VIII, considerados como clones esporádicos durante el periodo de estudio, se identifican en 4 tipos de muestras.

No se observa ninguna relación importante entre el tipo de muestra y el patrón definido mediante PFGE, por lo que se concluye que no existe ningún clon con mayor predisposición a producir un tipo de síndrome infeccioso concreto.

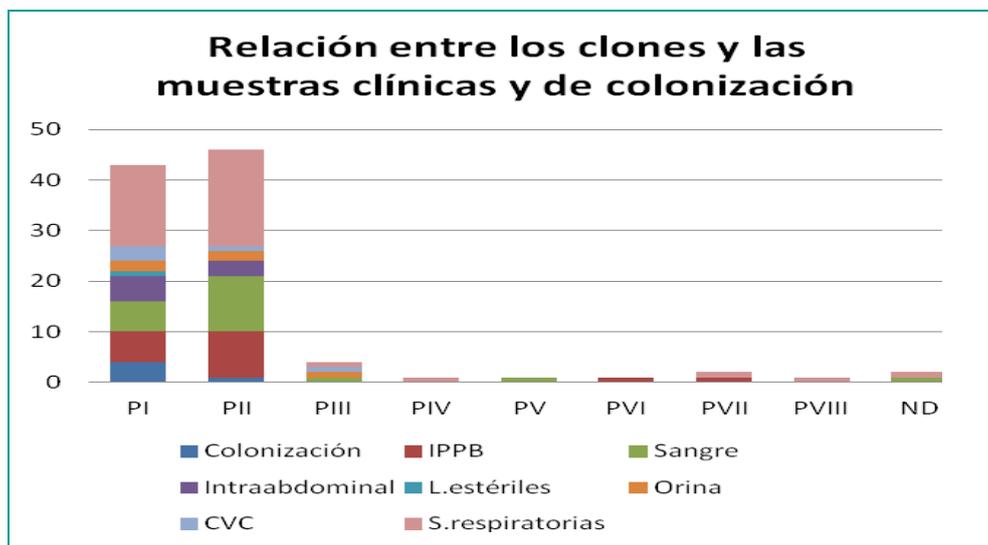


Figura 27. Distribución de los patrones obtenidos mediante PFGE según el tipo de muestra.

3. Caracterización fenotípica de carbapenemasas

Independientemente de la sensibilidad a carbapenems, se realizó el test de Hodge y el Etest® MBL, ambos en Mueller-Hinton E (MHE, BioMérieux, La Balme Les Grottes, France) a 101 cepas (una por paciente) incluidas en el estudio con el objeto de

evaluar la sensibilidad de estos métodos fenotípicos en la detección de carbapenemasas y metalobetalactamasas, respectivamente.

3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas mediante el Test de Hodge

El test de Hodge permitió identificar de forma preliminar a los aislados portadores de carbapenemasas. Setenta y un aislados de los 101 (70,3%) aislamientos de *Acinetobacter baumannii* analizados resultaron positivos para esta prueba al presentar crecimiento de la cepa sensible de *Escherichia coli* próximo al disco de antibiótico, en la intersección entre el halo de inhibición que genera la difusión del meropenem y la estría de las cepas de *A. baumannii* estudiadas (**Figura 28A**). Este fenómeno se produce gracias a la inactivación del meropenem por las carbapenemasas presentes en determinadas cepas. Todas estas cepas fueron resistentes a carbapenems, lo que indica la presencia de carbapenemasas como posible mecanismo de resistencia. El test de Hodge fue negativo en los 30 aislamientos restantes (29,7%) (**Figura 28B**). De estas 30 cepas, sólo 3 fueron sensibles a carbapenems. El test de Hodge negativo en las 27 cepas resistentes a carbapenems pudo deberse a la ausencia de carbapenemasas y, por tanto, la existencia de un mecanismo diferente de resistencia a carbapenems; o bien resultados falsos negativos, si posteriormente, mediante técnicas moleculares, se detecta alguna carbapenemasa en estos aislamientos. Los resultados obtenidos para los aislamientos de *A. baumannii* estudiados se muestran en la **tabla 15**.

Tabla 15. Resultados obtenidos en el test de Hodge y sensibilidad a carbapenems de los aislamientos de *A. baumannii* estudiados.

		Carbapenem	
		Resistente (n=98)	Sensible (n=3)
TEST DE HODGE	Positivo (n=71)	71	0
	Negativo (n=30)	27	3

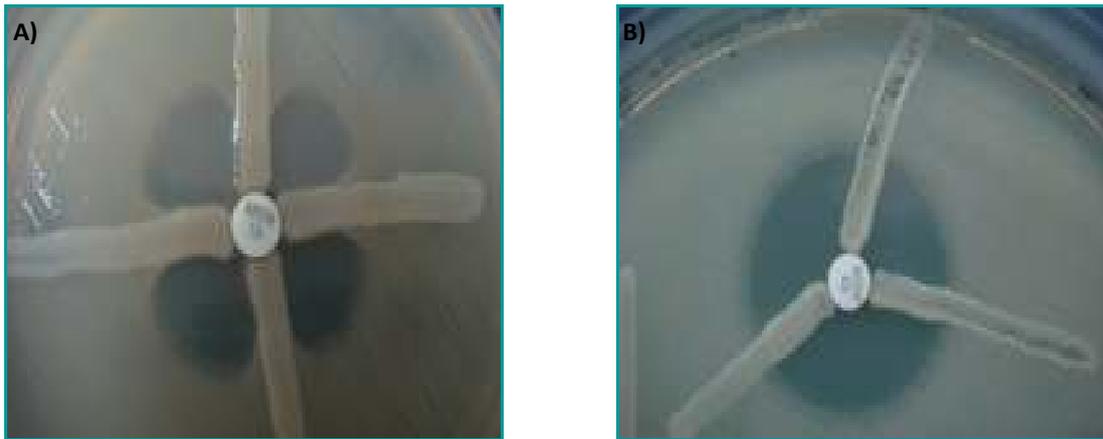


Figura 28. Resultados del Test de Hodge para los aislamientos de *A. baumannii* estudiados. **A)** Test de Hodge positivo para 4 aislados de *A. baumannii*. En la figura se observa claramente el crecimiento de *E.coli* en la zona de intersección. **B)** Test de Hodge negativo para 3 cepas de *A. baumannii*. No se observa crecimiento de *E.coli* cercano al disco de meropenem.

3.2. Detección de MBL mediante sinergismo con EDTA (Etest® MBL en Mueller-Hinton E)

La detección de metalobetalactamasas (MBL) mediante Etest® MBL se realizó a todas las cepas del estudio (98 aislamientos resistentes a carbapenems y 3 sensibles). Este test se basa en la capacidad del EDTA como agente inhibidor de MBL. La tira de Etest® utilizada está en un lado impregnada con imipenem y en el otro con una combinación de imipenem y EDTA. Para la interpretación de los resultados se calculó el cociente resultante de dividir la CMI del imipenem con la CMI del imipenem/EDTA. La prueba se consideró positiva si el cociente fue 8 o si la diferencia de las CMIs fue de 3 diluciones.

Mediante Etest® MBL se detectó la presencia de MBL en las 98 cepas resistentes a carbapenems (97%, 98/101). Estos resultados fueron claramente positivos (**Figura 29**). El Etest® MBL fue negativo en las 3 cepas sensibles a estos antibióticos (3%, 3/101) (**Tabla 16**).



Figura 29. Resultado positivo del Etest® MBL para uno de los aislamientos estudiados de *A. baumannii*. En la figura se observa claramente la diferencia de las CMI de los imipenem y el imipenem con EDTA.

Tabla 16. Resultados del Etest® MBL en MHE.

		Carbapenem	
		Resistente	Sensible
Etest® MBL	Positivo (n=98)	98	0
	Negativo (n=3)	0	3

Existió una discrepancia entre la detección de carbapenemasas mediante el test de Hodge y la presencia de MBL detectada mediante la prueba de sinergia con EDTA ya que en el 27,5% (27/98) de éstas el test de Hodge fue negativo.

3.3. Influencia del medio de cultivo en los resultados del Test de Hodge y el Etest® MBL en los medios MHE y MH2

A 47 cepas del estudio (45 resistentes a carbapenems y 2 sensibles) se les realizó la detección fenotípica de carbapenemasas (Test de Hodge y Detección de metalobetalactamasas mediante Etest® MBL) en dos medios de cultivo diferentes distribuidos por la casa comercial *BioMérieux (La Balme Les Grottes, France)*, el medio MH2 (*La Balme Les Grottes, France*) y el medio denominado MHE (*La Balme Les Grottes, France*), comparándose los resultados obtenidos. Esto se debió a que a mitad del estudio la casa comercial cambio un medio por otro, por lo que, a las 47 cepas de

A. baumannii aisladas durante el año 2010 se les realizó los test fenotípicos en ambos medios.

Los resultados obtenidos para el Test de Hodge en ambos medios coincidieron en 40 de las 47 cepas de *A. baumannii* analizadas (en 32 cepas se detectaron carbapenemasas y en 8 no se identificaron). La concordancia fue del 85,1%. Por el contrario, en el 14,9% (7/45) de las cepas los resultados fueron discordantes entre ambos medios (**Tabla 17**). Estos aislados fueron resistentes a carbapenems. En MH2, 3 cepas con resultado negativo en el test presentaron un resultado positivo cuando, posteriormente se realizó en MHE. Además, también ocurrió el caso contrario, 4 cepas con resultado positivo en MH2 fueron negativas en MHE (**Tabla 18**).

Tabla 17. Discordancias encontradas entre los resultados del test de Hodge en medio MHE y MH2.

		MHE		MH2	
		Carbapenem		Carbapenem	
		Resistente (n=45)	Sensible (n=2)	Resistente (n=45)	Sensible (n=2)
TEST DE HODGE (n=47)	Positivo	35	0	36	0
	Negativo	10	2	9	2

Tabla 18. Cepas de *A. baumannii* con resultados discordantes en el test de Hodge en MHE y

Cepas	Test de Hodge	
	MHE	MH2
165	POSITIVO	NEGATIVO
52	POSITIVO	NEGATIVO
42	POSITIVO	NEGATIVO
162	NEGATIVO	POSITIVO
164	NEGATIVO	POSITIVO
163	NEGATIVO	POSITIVO
60	NEGATIVO	POSITIVO

De forma sorprendente, las 45 cepas resistentes a carbapenems mostraron resultados negativos en el Etest® MBL en MH2, mientras que fueron claramente

positivas en el medio MHE. El test fue negativo en ambos medios en las 3 cepas sensibles.

Para confirmar la presencia de carbapenemasas se realizó la caracterización genotípica de todos los aislamientos de *A. baumannii* incluidos en el estudio mediante métodos moleculares.

4. Caracterización genotípica de carbapenemasas

4.1. Detección molecular de oxacilinasas mediante PCR

El análisis mediante PCR de las carbapenemasas de la clase D (CHDL), *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58}, permitió realizar una caracterización molecular de los 101 aislados del estudio (incluido uno por paciente) independientemente de la sensibilidad a carbapenems. Para su detección se usaron 4 grupos (o "sets") que englobaban las oxacilinasas más frecuentemente descritas en *A. baumannii* (**Tabla 6**). El número de cepas estudiadas en las que se detectó alguno de los genes que codifican las oxacilinasas incluidas en este estudio (*OXA-51-like*, *OXA-23-like*, *OXA-24-like* y *OXA-58-like*) se muestran en la **tabla 19**.

Tabla 19. Número de aislamientos de *A. baumannii* en los que se detectaron genes que codifican las oxacilinasas estudiadas en este trabajo.

Tipo de OXA	Número de aislamientos (n=101)
<i>bla</i> _{OXA-24-like} ("set A")	94
<i>bla</i> _{OXA-23-like} ("set B")	0
<i>bla</i> _{OXA-51-like} ("set C")	100
<i>bla</i> _{OXA-58-like} ("set OXA-58")	0
<i>bla</i> _{OXA-24-like} y <i>bla</i> _{OXA-51-like}	93

En el 99% (100/101) de las cepas se amplificó una oxacilinasas del "set C", que incluía las oxacilinasas codificadas por el gen *bla*_{OXA-51-like} (**Figura 30**), lo que indicó, en

principio, que todos los aislamientos, excepto uno, pertenecían a la especie *A. baumannii*. Por el patrón de sensibilidad que presentaba esta cepa (sensible a todos los antibióticos estudiados excepto aztreonam) se podría sospechar que perteneciese a una especie de *Acinetobacter* spp. diferente a *A. baumannii* (como *A. pittii* o *A. nosocomialis*), ya que estos microorganismos suelen ser sensibles a la mayoría de antibióticos. Para identificar de forma más precisa la especie a la que pertenecía esta cepa dentro del complejo *A. baumannii*, se identificó mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF (Bruker, Daltonik, Bremen, Germany), que contiene varias especies de *Acinetobacter* spp. en su base de datos y permite diferenciar entre sí las especies del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. Esta técnica identificó el aislamiento como *A. baumannii*.

En 10 aislamientos, seleccionados de forma aleatoria, de los 100 en los que había amplificado gen *bla*_{OXA-51-like} (6 pertenecientes al patrón I definido mediante PFGE y 4 del patrón II) se realizó la secuenciación del gen. Esto permitió determinar la variante del gen *bla*_{OXA-51-like} que presentaba cada uno de los aislados. Cada secuencia introducida en el programa BLAST mostraba varios resultados con una similitud igual o superior al 98% con secuencias de aminoácidos muy similares. Las principales OXA-51-like encontradas en los aislamientos de *A. baumannii* del patrón I pertenecían al subgrupo OXA-66 (OXA-65, OXA-66, OXA-480, OXA-79 y OXA-90) y los aislados del patrón II se encontraban dentro del subgrupo OXA-71 (OXA-71, OXA-241, OXA-374, OXA-314 y OXA-121). Ambos subgrupos pertenecen al grupo "OXA-51-like". La comparación de las secuencias de las variantes OXA-66 y OXA-71 se muestra en la **Figura 31**. La alineación se llevó a cabo mediante la herramienta informática Clustal Omega versión 1.2.1 (EMBL-EBI).

```

OXA-66      GGACATGACCCTAGGCGATGCCATGAAAGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGC
OXA-71      GGACATGACCCTAGGCGACGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGC
*****
OXA-66      TCGTCGTATTGGACTTGAAGCTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGC
OXA-71      TCGTCGTATTGGACTTGAAGCTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGC
*****
OXA-66      AGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGCCTTTAAAAATTACTCCTCA
OXA-71      AGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGCCTTTAAAAATTACTCCTCA
*****
OXA-66      GCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGT
OXA-71      GCAAGAGGCACAAATTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCCAAAGT
*****
OXA-66      CCAAGATGAAGTGCAATCCATGCTATTCATAGAAGAAAAGAATGGAAAATAAATATACGC
OXA-71      CCAAGATGAAGTGCAATCCATGCTATTCATAGAAGAAAAGAATGGAAAATAAATATACGC
*****
OXA-66      AAAAAGTGGTTGGGGAATGGCTGTAGACCC
OXA-71      AAAAAGTGGTTGGGGAATGGCTGTAGACCC
*****

```

Figura 31. Alineamiento de las secuencias de las variantes de la enzima OXA-51 (OXA-66 y OXA-71) obtenidas para los patrones I y II definidos por PFGE, respectivamente. En amarillo se observan los aminoácidos discordantes entre las dos variantes.

En 94 de los 101 aislamientos estudiados (93,1%) se detectó la presencia de una oxacilinasas de las incluidas en el "set A" (oxacilinasas codificadas por el gen *bla*_{OXA-24-like}) (**Figura 30**). Todas estas cepas eran resistentes a carbapenems excepto una, que era sensible a todos los antibióticos testados excepto aztreonam (en este aislamiento no se amplificó el gen *bla*_{OXA-51-like}).

De los aislamientos en los que detectó la OXA-24-like mediante el "set A" (que incluye las oxacilinasas codificadas por el gen *bla*_{OXA-24-like}), se secuenciaron 9 amplificados (5 de ellos pertenecientes a cepas del patrón I definido mediante PFGE y 4 como patrón II). Al igual que las secuencias de las oxacilinasas estudiadas pertenecientes al "set C" (gen *bla*_{OXA-51-like}), el programa BLAST mostraba, para una misma secuencia, varios resultados de variantes de OXA-24 con similitud igual o superior al 98%, por lo que no se pudieron diferenciar las variantes de OXA-24-like. La que aparecía con mayor probabilidad era OXA-24 pero la diferencia con el resto no fue suficiente para determinar si nuestros aislados presentaban esta oxacilinasas concretamente.

En 7 de las cepas estudiadas (6,9%) no se obtuvo ningún amplificado de las oxacilinasas incluidas en el "set A". De estos 7 aislamientos, dos eran sensibles a carbapenems y los 5 restantes fueron resistentes a estos antibióticos.

En el 92,1% (93/101) de los aislamientos de *A. baumannii* analizados coexistieron los genes *bla*_{OXA-51-like} y *bla*_{OXA-24-like}.

En ningún aislado de *A. baumannii* estudiado se detectaron los genes que codifican las oxacilinasas incluidas en el "set B" (incluye las enzimas codificadas por el gen *bla*_{OXA-23-like}) y en el "set OXA-58" (oxacilinasas codificadas por el gen *bla*_{OXA-58-like}).



Figura 30. Detección genotípica de oxacilinasas. Calle 1: PM (peso molecular); Calle 2-6: "set A"; calle 7-11; "set C"; calle 12-16: "set B"; calle 17-21: "set OXA-58".

4.2. Detección de los genes que codifican MBL

4.2.1. Detección molecular de MBL (VIM, SIM e IMP) mediante PCR

El estudio de las metalobetalactamasas VIM, SIM e IMP se realizó mediante PCR. La detección de los genes que codifican estas enzimas (bla_{VIM} , bla_{SIM} y bla_{IMP}) se llevó a cabo en 9 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenems (se seleccionaron de forma aleatoria, 2 cepas de los patrones I, II, III y VII; y la única cepa del patrón VIII, definidos mediante PFGE). En todos estos aislados se detectó una oxacilinasasa del grupo OXA-24-like excepto en las dos cepas pertenecientes al patrón VII. En la **figura 32** se puede observar la ausencia de amplificado en la detección de la enzima VIM en los 9 aislados estudiados.

Mediante el análisis molecular de metalobetalactamasas no se detectó ningún gen codificante de las enzimas incluidas en el estudio. Estos resultados indican la ausencia de MBL como mecanismo de resistencia a carbapenems en estos aislamientos o bien, la presencia en estas cepas de alguna MBL no incluida en este estudio.

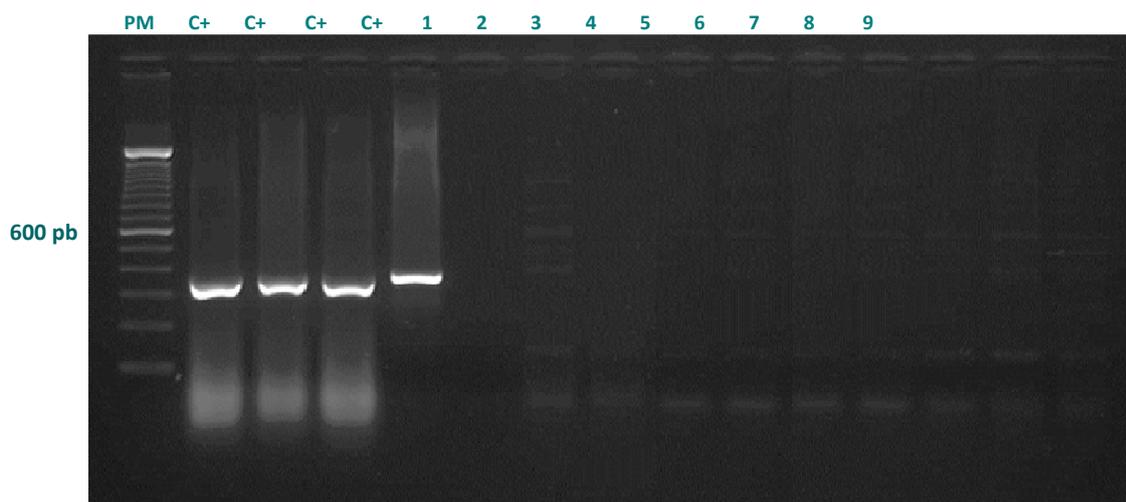


Figura 32. Detección genotípica mediante PCR de la enzima VIM en 9 aislamientos de *A. baumannii*. Calle 1: PM (peso molecular); calle 2-5; C+ (controles positivos de VIM); calle 6-14: cepas de *A. baumannii*.

4.2.2. Detección molecular de oxacilinasas y MBL mediante PCR a tiempo real: Xpert Carba-R

Adicionalmente, se realizó la detección molecular de carbapenemasas mediante un sistema de PCR a tiempo real, Xpert®Carba-R (GeneXpert). Este permite la identificación de las enzimas KPC, NDM, VIM, IMP-1 y OXA-48. Se analizaron 5 aislamientos de *A. baumannii* en los que mediante PCR convencional no se detectaron los genes codificantes de las oxacilinasas OXA-23, OXA-24 y OXA-58, estudiadas en este trabajo, pero se habían obtenido resultados positivos en las pruebas fenotípicas de detección de carbapenemasas y MBL (Test de Hodge y Etest® MBL, respectivamente).

Mediante esta PCR a tiempo real no se detectó ninguna carbapenemasa de las incluidas en Xpert®Carba-R (KPC, NDM, VIM, IMP-1 y OXA-48) (**Figura 33**).

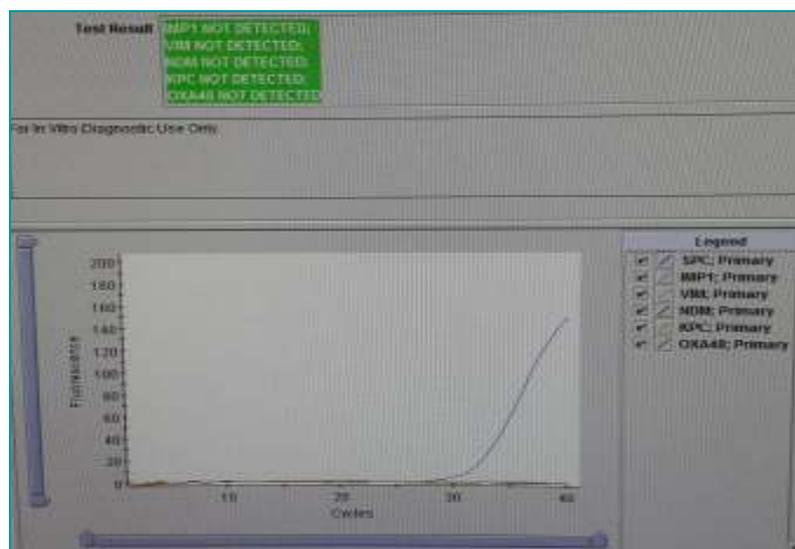


Figura 33. Resultado negativo de una cepa de *A. baumannii* en la detección de carbapenemasas mediante Xpert-Carba-R (PCR a tiempo real).

Los resultados obtenidos en la detección de metalobetalactamasas mediante ambas pruebas moleculares (PCR convencional y PCR a tiempo real) coinciden, ya que no se detectaron genes codificantes de estas enzimas por ninguna de las dos técnicas.

Relación entre la detección genotípica de carbapenemasas y el test de Hodge

Todas las carbapenemasas detectadas mediante el test de Hodge (n=71) se confirmaron mediante PCR, en todos estos aislamientos se identificó el gen *bla*_{OXA-51-like} y en el 93% (66/71) se identificó el gen *bla*_{OXA-24-like}. Por lo que, en estos casos, concuerdan los resultados obtenidos mediante la técnica fenotípica y la genotípica (**Tabla 20**).

El test de Hodge fue negativo en 30 de las 101 cepas de *A. baumannii* estudiadas. En los 27 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenems en los que no se detectaron carbapenemasas mediante el esta prueba fenotípica, se identificaron los genes que codifican las oxacilinasas OXA-51-like y OXA-24-like mediante PCR. En una de las 3 cepas sensibles a carbapenems con resultado negativo en el test de Hodge se detectó el gen *bla*_{OXA-24-like} pero no se identificó la oxacilinasas OXA-51-like. Las dos cepas restantes solo presentaron la oxacilinasas intrínseca de *A. baumannii* de las enzimas estudiadas en este trabajo.

Hubo 5 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenems en los que no se identificó ninguna oxacilinasas adquirida de las incluidas en este trabajo (OXA-23-like, OXA-24-like y OXA-58-like) pero se detectaron carbapenemasas mediante el test de Hodge. La diferencia entre la detección genotípica y fenotípica de carbapenemasas en estas cepas podría indicar la presencia en estos aislados de una carbapenemasas diferente a las incluidas en este estudio o una fuerte actividad enzimática de la OXA-51-like presente en estos aislados.

Tabla 20. Número de aislados de *A. baumannii* en los que se detectaron carbapenemasas mediante el test de Hodge y mediante métodos moleculares.

	Nº de aislados	OXA-51-like	OXA-24-like
Test de Hodge POSITIVO	71	71	66
Test de Hodge NEGATIVO	30	29	28

Como ya se describió en el apartado 3.3, el test de Hodge se realizó a 47 aislamientos de *A. baumannii* en dos medios de Mueller-Hinton diferentes (MH2 y MHE). La concordancia en los resultados obtenidos en ambos medios fue del 85,1% observándose diferencias en 7 cepas. Mediante la realización de PCR para la detección de las oxacilinasas, OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24-like y OXA-58-like, identificamos en estos 7 aislados la presencia de los genes *bla*_{OXA-24-like} y *bla*_{OXA-51-like} (Tabla 21) por lo que mediante el test de Hodge realizado en MH2 se obtuvieron 3 resultados falsos negativos y 4 falsos negativos cuando se realizó en MHE.

Tabla 21. Aislamientos de *A. baumannii* con resultados discordantes obtenidos en el test de Hodge en dos medios diferentes y detección molecular de carbapenemasas en estos aislados.

Cepas	Test de Hodge		Oxacilinasas	
	MHE	MH2	OXA-24-like	OXA-51-like
165	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
52	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
42	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
162	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
164	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
163	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
60	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Relación entre los clones definidos mediante PFGE y la distribución de carbapenemasas

En la siguiente tabla (**Tabla 22**) se muestran los patrones definidos mediante PFGE y el número de aislamientos de *A. baumannii* en los que se detectó el gen *bla*_{OXA-51-like} y el gen *bla*_{OXA-24-like} en cada uno de ellos.

Tabla 22. Número de aislamientos de *A. baumannii* en los que se detectó el gen *bla*_{OXA-51-like} y gen *bla*_{OXA-24-like} en cada patrón definido por PFGE.

Patrón de PFGE	Número de aislados de <i>A. baumannii</i> con oxacilinasas "OXA-51-like"	Número de aislados de <i>A. baumannii</i> con oxacilinasas "OXA-24-like"
I (n=43)	43	42
II (n=46)	46	46
III (n=4)	4	4
IV (n=1)	1	0
V (n=1)	0	1
VI (n=1)	1	0
VII (n=2)	2	0
VIII (n=1)	1	1

En todos los aislamientos pertenecientes a los patrones II, III, V y VIII se detectaron oxacilinasas pertenecientes al grupo OXA-24-like. Hay que destacar que el único aislado del patrón V en el que se identificó esta enzima fue una cepa sensible a carbapenems. En el 97,7% (42/43) de los aislamientos clasificados como patrón I también se identificó esta oxacilinasas.

El gen que codifica la OXA-51-like se observó en todos los patrones excepto en el aislamiento perteneciente al patrón V.

Relación entre la detección fenotípica de MBL mediante sinergismo con EDTA (Etest® MBL) y la detección genotípica

La detección fenotípica de MBL llevada a cabo mediante el Etest® MBL (en MHE) en los aislados de *A. baumannii* no coincide con la detección genotípica mediante PCR. La prueba de sinergismo con EDTA fue positiva en todos los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenems, pero no se detectó ningún gen codificante de las MBLs estudiadas en este trabajo (VIM, SIM e IMP) en los aislados analizados. Esta diferencia entre ambos métodos pudo ser por la presencia en estos aislamientos de MBLs no incluidas en este estudio o bien, porque los resultados obtenidos en la prueba fenotípica fueran falsos positivos.

5. Relación entre los perfiles de resistencia a los antibióticos con los clones definidos mediante PFGE y la detección de carbapenemasas

La relación entre los grupos A-H establecidos en función del perfil de resistencia de los aislamientos de *A. baumannii* con los clones definidos mediante PFGE y la detección fenotípica y genotípica de carbapenemasas se muestran en la **tabla 23**.

La mayoría de los aislamientos de *A. baumannii* estudiados (46/101) presentaron el patrón II definido mediante PFGE. Un 86,9% (40/46) de las cepas incluidas en este patrón pertenecían al grupo B. Dentro del patrón II mediante el test de Hodge se detectaron carbapenemasas en el 47,8% (22/46) de las cepas pertenecientes al patrón II, y el Etest® MBL fue positivo en el 100% (46/46) de los aislamientos. En todos los aislados se identificaron los genes *bla*_{OXA-51-like} y *bla*_{OXA-24-like}, lo que indicó que el test de Hodge dio resultados falsos negativos (24/46). En este patrón no se detectaron los genes *bla*_{OXA-23-like} ni *bla*_{OXA-58-like}.

El segundo patrón mayoritario definido mediante PFGE fue el patrón I (43/101). Un 37,2% (16/43) de los aislamientos pertenecientes a este patrón se clasificaron dentro del grupo C y un 23,2% (10/43) se incluyeron en el grupo B. El resto de aislados se identificaron en los grupos A, D, E, F y G. El test de Hodge fue positivo en el 93% (40/43) de las cepas y el Etest® MBL en el 100%. El gen *bla*_{OXA-51-like} se detectó en todas las cepas mientras que el gen *bla*_{OXA-24-like} se identificó en el 97,7% (42/43).

Los aislamientos clasificados como patrón III (n=4) pertenecieron a los grupos B, C, D y E según el perfil de resistencia antibiótica. El 100% de las cepas de este patrón mostró resultados positivos tanto para el test de Hodge como para el Etest® MBL. También se identificaron los genes *bla*_{OXA-51-like} y *bla*_{OXA-24-like} en todas ellas. No se detectaron los genes que codifican las oxacilinasas OXA-23-like y OXA-58-like.

Los aislados pertenecientes a los patrones IV, V y VI presentaron perfiles de resistencia similares, sensibles a todos los antibióticos testados excepto aztreonam y fueron incluidos dentro del grupo H. En las cepas del patrón IV y el patrón VI no se detectaron carbapenemasas ni MBL por métodos fenotípicos y genotípicos. Se identificó el gen *bla*_{OXA-51-like} en todos los aislamientos, lo que confirma la identificación de *A. baumannii* dentro del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*.

El aislamiento del patrón V mostró resultados discordantes entre los métodos fenotípicos y genotípicos. Tanto el test de Hodge como el Etest® MBL fueron negativos pero, mediante técnicas moleculares, se detectó el gen *bla*_{OXA-24-like}. En cambio, no se detectó el gen *bla*_{OXA-51-like} utilizado en este estudio para la identificación de la especie *A. baumannii* dentro del complejo. Para conocer a que especie pertenecía este aislamiento se le realizó el MALDI-TOF, que la identificó como *A. baumannii*.

Cada uno de los aislamientos definidos dentro del patrón VII (n=2) se clasificó en un grupo diferente según el perfil de resistencia. Uno se incluyó en el grupo A y el otro en el B. En ambas cepas se detectaron carbapenemasas y MBL mediante las

pruebas fenotípicas pero no se identificaron los genes que codifican las oxacilinasas OXA-24-like, OXA-23-like y OXA-58-like, analizadas en este estudio. Estos resultados podrían deberse a la presencia en estos aislamientos de algún grupo de oxacilinasas no incluidas en este estudio o un fallo en el test de Hodge. Los dos aislados fueron identificados como *A. baumannii* mediante la detección del gen *bla*_{OXA-51-like}.

La única cepa del patrón VIII perteneció al grupo D según su perfil de resistencia. Mediante el test de Hodge y el Etest® MBL se detectaron carbapenemasas y MBL, respectivamente. Además, en estos aislados se amplificaron los genes que codifican las oxacilinasas OXA-24-like y OXA-51-like.

Tabla 23. Relación entre los grupos establecidos según el perfil de resistencia con la detección fenotípica y genotípica de carbapenemasas.

PFGE	Grupo definido por nº de antibióticos resistentes	Nº de aislamientos en el grupo	OXA ^{-24-like} POSITIVO	OXA ^{-51-like} POSITIVO	Test de Hodge POSITIVO
PI (n=43)	Grupo A	1	1	1	1
	Grupo B	10	10	10	9
	Grupo C	16	16	16	14
	Grupo D	5	5	5	5
	Grupo E	8	7	8	8
	Grupo F	1	1	1	1
	Grupo G	2	2	2	2
PII (n=46)	Grupo A	2	2	2	1
	Grupo B	40	40	40	18
	Grupo C	2	2	2	2
	Grupo D	2	2	2	1
PIII (n=4)	Grupo B	1	1	1	1
	Grupo C	1	1	1	1
	Grupo D	1	1	1	1
	Grupo E	1	1	1	1
PIV(n=1)	Grupo H	1	0	1	0
PV(n=1)	Grupo H	1	1	0	0
PVI(n=1)	Grupo H	1	0	1	0
PVII (n=2)	Grupo A	1	0	1	1
	Grupo B	1	0	1	1
PVIII(n=1)	Grupo D	1	1	1	1

V. DISCUSIÓN

Acinetobacter baumannii es una bacteria que se ha adaptado eficazmente al ambiente hospitalario (Peleg et al., 2008). A pesar de considerarse un microorganismo poco virulento es capaz de producir infecciones, particularmente en pacientes que tienen una enfermedad de base grave (Antunes et al., 2011; Visca et al., 2011). Actualmente, está considerado un patógeno emergente ya que en los últimos años se ha incrementado, de forma alarmante, el número de aislamientos responsables de infecciones nosocomiales graves, sobre todo en unidades de alto riesgo como en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (Bergogne-Bérézin et al., 1996; Nordmann et al., 2008) y Reanimación (REA) (Hernández et al., 2010). El éxito de *A. baumannii* como patógeno nosocomial se atribuye a su capacidad para persistir en el ambiente hospitalario durante largos períodos de tiempo, probablemente asociado con la producción de "biofilms" (Espinal et al., 2012a), soportando condiciones adversas de temperatura y humedad, y a la facilidad que tiene para desarrollar resistencia a los antimicrobianos (Kempf y Rolain, 2012; Pérez et al., 2007).

Muchos de los aislamientos hospitalarios son multirresistentes, lo que complica enormemente el tratamiento y empeora el pronóstico del paciente infectado (Nordmann et al., 2002). Los carbapenems constituyen el tratamiento de elección en la mayoría de centros pero, las tasas de resistencia a estos antimicrobianos han aumentado considerablemente en la última década y las cepas resistentes se están extendiendo por todo el mundo (Brown et al., 2005B). La adquisición de resistencia a carbapenems es muy preocupante ya que limita drásticamente las alternativas terapéuticas (Kempf y Rolain, 2012; Vila et al., 2008), quedando la colistina, y quizá la tigeciclina, como únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii* multirresistente (Poirel y Nordmann, 2006a). El problema se agrava aún más por la carencia de métodos fenotípicos estandarizados que permitan detectar los mecanismos de resistencia específicos.

Aunque en la resistencia a carbapenems pueden estar implicados mecanismos de resistencia como la alteración en las proteínas de unión a penicilinas (PBP) o en las

proteínas de la membrana externa, en los últimos años está aumentando la descripción de cepas que producen carbapenemasas, siendo éste uno de los mecanismos más estudiados (*Nordmann et al., 2002*). La mayoría de estas enzimas descritas hasta el momento son del tipo OXA pertenecientes a la clase molecular D (*Afzal-Shah et al., 2001; Bou et al., 2000a; Donald et al., 2000; López-Otsoa et al., 2002*), pero también se han identificado metalobetalactamasas del tipo IMP o VIM (*Da Silva et al., 2002; Riccio et al., 2000*).

Durante el periodo de estudio se recogieron los aislamientos de *A. baumannii* de pacientes ingresados en dos unidades de alto riesgo del hospital, REA y UCI. Se estudiaron un total de 101 pacientes. El 69,3% fueron hombres y el 30,7% mujeres. Este es un hecho ya descrito en otros estudios, en los que incluso llegan a definir el sexo masculino como un factor predictivo de infección por *A. baumannii* multirresistente (*Hernández-Torres et al., 2010*)

En nuestro estudio se observó que el número de pacientes con aislados de *A. baumannii* aumentó con la edad, la mayoría de ellos tenían edades comprendidas entre los 76 y los 85 años. Algunos estudios describen que, con frecuencia, los pacientes de mayor edad presentan estancias hospitalarias más prolongadas y mayores comorbilidades, factores que se encuentran relacionados con la colonización y posterior desarrollo de una infección por *A. baumannii* (*Fernández-Cuenca et al., 2012*). Otros trabajos destacan que, tener una edad mayor de 60 años, es un factor de riesgo independiente para desarrollar una infección por esta bacteria (*Cardoso et al., 2012*). La mayoría de los pacientes con edades incluidas en este intervalo en el que se observó un mayor número de aislados fueron hombres (65,4%).

En general *A. baumannii* fue aislado de una única muestra clínica por paciente, aunque hubo casos en los que se aisló en más de una muestra. Se observó que el número de pacientes en los que se aisló en dos muestras aumentó conforme lo hizo la

edad. Esto puede estar relacionado con el hecho de que las estancias hospitalarias son más prolongadas en los pacientes con más edad.

La mayor parte de los aislados procedían de muestras respiratorias (35,8%), seguido de infecciones de piel y partes blandas (IPPB) (20,3%), sangre (16%), catéteres venosos (CV) (13,7%) y de otras muestras (14,2%). Otros estudios han descrito resultados similares a los nuestros, como Fernández-Cuenca *et al.*, que obtuvieron el 44% de los aislados de muestras respiratorias, el 23% de exudados de herida, el 8% de hemocultivos y el 15% de otras muestras de pacientes con sospecha de infección o colonización por *Acinetobacter* spp. (Fernández-Cuenca *et al.*, 2013). Nuestros porcentajes también concuerdan con los publicados por Papa *et al.* en Grecia (Papa *et al.*, 2009), por Abbo *et al.* (Abbo *et al.*, 2005) y Villalón *et al.* (Villalón *et al.*, 2011)

El porcentaje de muestras procedente de REA y UCI en las que se aisló *A. baumannii* fue similar suponiendo un 47,7% y un 52,3% del total de muestras, respectivamente. Cuando se analizó el tipo de muestra según el servicio se observó que, en ambas unidades la mayoría de los aislados procedían de muestras respiratorias (28,9% en REA y 34,4% en UCI),

En nuestro hospital no se observó una variación estacional similar a la descrita en otros centros (Rodríguez *et al.*, 2003; Seifert *et al.*, 1995), en los que la incidencia de aislamientos de *A. baumannii* era mayor en los meses de verano. Esto coincide con el estudio realizado por Hernández-Torres *et al.* (Hernández-Torres *et al.*, 2010) en nuestro mismo centro y puede ser debido a las características climatológicas de nuestra región (alta humedad y temperatura media elevada durante todo el año) o las condiciones de climatización del propio hospital.

Acinetobacter baumannii multirresistente es un microorganismo importante relacionado con brotes epidémicos de infecciones nosocomiales en UCIs debido a su capacidad de transmisión y los problemas que genera para su control. Estos brotes se

han asociado a contaminación de las superficies ambientales, de los equipos ya colonización de los pacientes o del personal sanitario (*Villegas y Hartstein, 2003*).

Además, la proporción de pacientes ya colonizados o infectados por *A. baumannii* multirresistente, puede aumentar la probabilidad de transmisiones cruzadas entre pacientes (*Bonten et al., 1998; D'Agata et al., 2000; Playford et al., 2007*).

Teniendo en cuenta la prevalencia de este microorganismo, se deben distinguir las infecciones causadas por *A. baumannii* de la colonización. Las infecciones reales muchas veces son difíciles de tratar porque suelen ocurrir en pacientes graves y porque esta bacteria suele ser resistente a muchos de los antimicrobianos usados habitualmente, por lo que representa un problema terapéutico serio (*Ozgen et al., 2008*).

De los 101 pacientes incluidos, en 9,9% los primeros aislamientos fueron muestras de colonización obtenidas como parte del programa de vigilancia activa realizado en estas Unidades. De éstos, el 60% desarrollaron posteriormente una infección en un tiempo medio de 14,8 días. En el resto de pacientes la primera muestra correspondía a una muestra clínica. En cuanto al foco de origen de las infecciones en estos pacientes, los aislamientos respiratorios (38,5%) fueron los más frecuentes, al igual que en otras series de la literatura médica consultadas (*Asensio et al., 2008; Cisneros et al., 1996; Rodríguez-Baño et al., 2003; Seifert et al., 1995*). Los resultados fueron muy similares a los descritos por *Hernández-Torres et al.* (*Hernández-Torres et al., 2010*), cuyos porcentajes para el foco de infección respiratorio, IPPB, intraabdominal y del tracto urinario fueron del 42,86%, 12,99%, 10,39% y 3,89%, respectivamente. En nuestra serie los aislados procedentes de las infecciones relacionadas con CV fue algo superior (11% vs 5,19%).

El estudio de colonización mostró un buen rendimiento de los exudados axilares respecto a los faríngeos o los rectales. Esto concuerda con los datos publicados en un estudio español sobre detección de *A. baumannii* en distintas muestras de vigilancia en pacientes de UCI. Se identificó el microorganismo en el 75% de las muestras axilares o faríngeas y en el 77% de los frotis rectales; la combinación de muestras axilar-faríngea y axilar-rectal permitió la identificación en un 90% de los pacientes, cifra que alcanzó el 96% para la combinación de muestra faríngea-rectal (Cercenado y Cantón, 2007).

Por el contrario, nuestros porcentajes de muestras de vigilancia activa positivas para *A. baumannii* multirresistente fueron discordantes a los obtenidos en dos estudios llevados a cabo en nuestro hospital. En el trabajo de Martínez-Pellús *et al.* (Martínez-Pellús *et al.*, 2002), los aislamientos más comunes fueron el broncoaspirado simple, con el 44% de muestras positivas, faringe (34%), recto (34%) y piel (28%). En el otro estudio, realizado por Salvador *et al.* (Salvador *et al.*, 2015), obtuvieron un mayor rendimiento con los exudados rectales (11'6%), seguido por los exudados faríngeos (7,5%) y los exudados de piel (5,2%). Las diferencias entre nuestros resultados y los de estos dos trabajos pudieron deberse a que en éstos analizan un mayor número de muestras de vigilancia activa en comparación con las 44 muestras incluidas en nuestro trabajo.

La diferenciación a nivel de especie en el género *Acinetobacter* spp. y en particular las especies incluidas en el complejo *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* (*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* y *A. calcoaceticus*) es relevante desde el punto de vista clínico ya que no poseen la misma patogenicidad, epidemiología y sensibilidad antibiótica (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2011c; Wisplinghoff *et al.*, 2012).

Las especies que forman el complejo *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* son altamente similares y difíciles de distinguir mediante pruebas microbiológicas y

bioquímicas tradicionales, como los sistemas de identificación comerciales de los que disponen la mayoría de los laboratorios [API® (BioMérieux), Vitek2® (BioMérieux), Phoenix® (Becton Dickinson)] y frecuentemente se informan como complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Chang *et al.*, 2005; Gundi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011a; Tien *et al.*, 2012), o son identificadas como *A. baumannii* sin realmente serlo. Su diferenciación suele requerir métodos moleculares y, recientemente, también se ha descrito la utilidad de las técnicas de proteómica mediante espectrometría de masas como el MALDI-TOF ("matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight") (Espinal *et al.*, 2012b). Los métodos moleculares suelen ser más complejos, presentan un coste elevado y precisan además de personal especialmente entrenado para realizarlas. De este modo, no resulta una opción asequible en la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica y sólo disponen de ellas los centros especializados.

En nuestro estudio se realizó la identificación de la especie dentro del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* mediante la detección del gen *bla*_{OXA-51-like}, gen intrínseco de esta especie (Feizabadi *et al.*, 2008; Héritier *et al.*, 2005a; Héritier *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2008; Turton *et al.*, 2006a). Mediante la detección de este gen se identificaron como *A. baumannii* el 99% de los aislados. La única cepa en la que no amplificó este gen fue identificada mediante MALDI-TOF como perteneciente a la especie *A. baumannii*. La ausencia del gen *bla*_{OXA-51} en este aislamiento pudo deberse a la presencia de una variante de este gen no incluida en la PCR utilizada en este estudio.

Aunque los genes *bla*_{OXA-51-like} están en la gran mayoría de los aislados de *A. baumannii* (Brown *et al.*, 2005) existe cierto debate acerca de si están presentes en todas las cepas de esta especie (Brown y Amyes, 2006). Además, algunos autores han detectado la presencia de este gen en otras especies (Lee *et al.*, 2009b).

Otra posible limitación en la identificación de *A. baumannii* mediante la realización de PCR para la detección del este gen es que no se puedan detectar todas

las variantes descritas del gen *bla*_{OXA-51-like} [hasta el momento se han descrito más de 70 variantes (Poirel *et al.*, 2010)]. Un problema adicional es que estos genes a veces están asociados con el elemento *ISAbal* (Turton *et al.*, 2006b), lo que puede hacerlos móviles.

Nuestros resultados son similares a los encontrados por Turton *et al.* (Turton *et al.*, 2006a). En su estudio identifican la especie dentro del complejo mediante la detección del gen *bla*_{OXA-51-like} y la compararan con una de las técnicas de referencia, el análisis de restricción del gen ARNr amplificado (ARDRA). Los resultados de otros autores también concuerdan con los de nuestro trabajo. En el de Ferreira *et al.* (Ferreira *et al.*, 2011) detectan el gen *bla*_{OXA-51-like} en todos los aislados de *A. baumannii* estudiados.

Como este gen se encuentra constitutivamente en *A. baumannii*, su detección proporciona un método menos laborioso, menos costoso y conveniente de identificación que es más fácil de llevar a cabo que los métodos definitivos, tales como ARDRA (Peleg *et al.*, 2008; Vanechoutte *et al.*, 1995), y sería más fiable que la identificación bioquímica (por ejemplo, por API®), que se utiliza más comúnmente.

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia del gen *bla*_{OXA-51-like} se puede utilizar como una manera sencilla y fiable de identificar *A. baumannii*, tal y como han mencionado otros trabajos (Turton *et al.*, 2006a).

Actualmente se están realizando muchos esfuerzos para la correcta identificación de las distintas especies del género *Acinetobacter* permitiendo así conocer a fondo y caracterizar mejor la epidemiología de este género.

En este contexto, se están abriendo camino nuevas técnicas de identificación en el campo de la microbiología clínica tanto por la rapidez con la que se obtienen los resultados como por la fiabilidad de los mismos. Es el caso de la espectrometría de

masas MALDI-TOF. Esta técnica permite la correcta identificación de un gran número de microorganismos como *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., o bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (van Veen et al., 2010). Estudios recientes muestran que ofrece una forma rápida, reproducible, fácil de usar, coste-efectiva y de alto rendimiento en la identificación de bacterias a nivel de género y especie (Dubois et al., 2012; Espinal et al., 2012b; Manji et al., 2014; Vanechoutte et al., 1995; van Veen et al., 2010; Seng et al., 2009), por lo que tiene potencial para reemplazar los métodos convencionales de identificación de la mayoría de las bacterias aisladas en los laboratorios de microbiología clínica (Jamal et al., 2014). Pero aún tiene limitaciones. El número de estudios de bacilos Gram-negativos no fermentadores, como es el caso de *Acinetobacter*, es todavía escaso (Jacquier et al., 2011) y se han descrito problemas de identificación incorrecta atribuidos en gran medida a la limitación en el número de perfiles de *Acinetobacter* incluidos en las bases de datos (Spanu et al., 2011). Espinal et al. también han publicado un estudio en el que encuentran identificaciones incorrectas con especies como *A. pittii* o *A. nosocomialis* (Espinal et al., 2012b).

Recientemente varios autores han validado la técnica MALDI-TOF para la detección de resistencias antibióticas (Burckhardt y Zimmermann, 2011; Hrabak et al., 2011; Hrabak et al., 2012; Kempf et al., 2012; Sparbier et al., 2012). Muchos de estos estudios se han centrado en los antibióticos betalactámicos, mayoritariamente en carbapenems.

Además de la importancia que tiene la identificación de la especie de *Acinetobacter* implicada en el proceso infeccioso para el control y tratamiento correcto de las infecciones producidas por estos microorganismos, también es fundamental la caracterización del perfil de sensibilidad a distintos antibióticos. Esto resulta de gran importancia en el entorno clínico donde lo que se persigue es establecer un tratamiento apropiado y dirigido tanto al tipo de infección como al microorganismo causal, siempre ajustado al perfil de cada paciente. Por otro lado, conocer la epidemiología local y caracterizar las cepas circulantes en un ambiente determinado

permite también establecer protocolos de tratamiento empírico bien fundamentado y ajustado.

En el caso de *A. baumannii* esto resulta aún más importante debido al perfil de multirresistencia que a menudo presentan los aislados de este microorganismo limitando considerablemente el número de opciones terapéuticas disponibles.

A nivel global se está produciendo un aumento preocupante en la resistencia de *A. baumannii* a los antimicrobianos (*Gales et al., 2011; Miyakis et al., 2011; Rhomberg et al., 2009; Rodloff et al., 2008; Turner et al., 2009*). En algunos países europeos y del continente asiático la situación actual es alarmante debido a la circulación de clones de *A. baumannii* panresistentes o extremadamente resistentes que producen infecciones para las que no hay opciones o alternativas terapéuticas eficaces (*Chen et al., 2011; Park et al., 2010*).

En España, después de realizarse el primer estudio nacional multicéntrico (GEIH-Ab 2000) para determinar la sensibilidad antimicrobiana en *A. baumannii* (*Fernández-Cuenca et al., 2004*), sólo se han realizado algunos estudios en los que se ha analizado la actividad antimicrobiana o la situación de la resistencia antimicrobiana desde una perspectiva global (*Fernández-Cuenca et al., 2013; Gimeno et al., 2010; Guembre et al., 2008; Picazo et al., 2006; Villalón et al., 2011*).

Ya, el estudio realizado por Fernández-Cuenca *et al.* en el año 2000 puso de manifiesto que nuestro país no escapaba a la tendencia observada en otros trabajos que evidenciaban la presencia de aislados de *A. baumannii* con elevada resistencia a los antimicrobianos, aunque se observó una dispersión geográfica muy variable cuando se comparaban diferentes hospitales (*Fernández-Cuenca et al., 2004*). Cuando se analizaron los resultados obtenidos en el año 2000 con los de Fernández-Cuenca *et al.* del año 2010 (*Fernández-Cuenca et al., 2013*) se pudo concluir que la resistencia a carbapenems había aumentado significativamente entre 2000 y 2010, habiéndose

observado también incrementos en las tasas de resistencia a ceftazidima, piperacilina, sulbactam y colistina, mientras que, para los aminoglucósidos, tetraciclina y rifampicina las resistencias habían disminuido, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Colistina continuaba siendo el antimicrobiano con mayor actividad. En el año 2010, el 94% de los aislados eran multirresistentes y el 86% presentaron resistencia extrema, resultando preocupante que el 2% de los aislados eran ya panresistentes (no se identificó ninguno en 2000) (Fernández-Cuenca *et al.*, 2004; Fernández-Cuenca *et al.*, 2013).

Cuando comparamos nuestros resultados con los del estudio multicéntrico realizado en el año 2010 por Fernández-Cuenca *et al.* (Fernández-Cuenca *et al.*, 2013), se observaron tasas de resistencia similares para piperacilina, ceftazidima y ciprofloxacino (>94%) pero encontramos mayores tasas de resistencia para el resto de antibióticos estudiados, destacando la gran diferencia en las tasas de resistencia en gentamicina (>96% vs 70%), tobramicina (83,2% vs 60%), carbapenems (97% vs 82-83%), tigeciclina (80,2% vs 24%) y colistina (6,9% vs 3%). El aumento en las resistencias a los carbapenems pudo estar relacionado con un mayor consumo de carbapenems y cefalosporinas (Peleg *et al.*, 2006c; Rodríguez *et al.*, 2003).

Los porcentajes de multirresistencia en *A. baumannii* en nuestro estudio concuerdan con los obtenidos por Fernández-Cuenca *et al.* (Fernández-Cuenca *et al.*, 2013) (97% vs 94%, respectivamente), considerando los criterios de resistencia propuestos por Magiorakos *et al.* (Magiorakos *et al.*, 2012), aunque encontramos un 56,4% de aislados "extensively drug-resistant" (XDR) frente a su 86%. Además no identificamos ningún aislamiento "pandrug-resistant" (PDR) frente a su 2%.

En el año 2011 se publicó un estudio en el que se analizó la sensibilidad de 814 aislamientos de *A. baumannii* recogidos de 19 hospitales españoles entre 1997 y 2007 (Villalón *et al.*, 2011). Todos los aislamientos fueron completamente resistentes a ticarcilina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima,

gentamicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol. Los porcentajes de sensibilidad de estas cepas fueron: sulbactam (20,3%), cefepime (1,7%), imipenem (25,4%), meropenem (6,8%), amikacina (10,2%), tobramicina (5,1%), minociclina (55,9%), doxiciclina (49,2%) y tigeciclina (1,7%). Todas las cepas fueron sensibles a colistina. Nuestros resultados de sensibilidad fueron similares para piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, aztreonam, gentamicina y ciprofloxacino (<4%). Obtuvimos aislamientos más sensibles a amikacina, tobramicina, minociclina y tigeciclina pero nuestras cepas fueron menos sensibles a los carbapenems, sobre todo a imipenem (3% vs 25,4%) y colistina (93,1% vs 100%).

Las diferencias observadas en las tasas de resistencia, sobre todo a carbapenems y colistina (superiores en comparación con los trabajos realizados por Fernández-Cuenca *et al.* y Villalón *et al.*), pueden ser debidas diferencias geográficas (Gales *et al.*, 2011; Miyakis *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2007; Rhomberg *et al.*, 2009; Rodloff *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2009). También a la diferencia en el diseño de los trabajos. En los estudios de Fernández-Cuenca *et al.* y Villalón *et al.* se incluyen un mayor número de aislamientos recogidos de 43 y 19 hospitales españoles, respectivamente (no especifican de que servicios hospitalarios) mientras que nosotros solo estudiamos las cepas procedentes de REA y UCI de un hospital. Las tasas de resistencia en los pacientes ingresados en UCIs/REAs son superiores a las del resto de áreas del hospital. Este fenómeno es conocido, puesto que los factores de riesgo comúnmente asociados a *A. baumannii* multirresistente (gravidad de la enfermedad, dispositivos invasivos, ventilación mecánica, tratamientos antibióticos previos, nutrición enteral, hospitalizaciones prolongadas) son más frecuentes en esta población de pacientes que en la de otras áreas del hospital (Fournier *et al.*, 2006). Aún así nuestra cifra de resistencia a carbapenems (97%) fue superior a las encontradas en estudios españoles realizados en UCIs (Álvarez-Lerma *et al.*, 2005; Asensio *et al.*, 2008). Pero además, son mucho mayores que las encontradas en UCI de Estados Unidos (20%) y de otros países europeos (Gaynes *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004).

En el trabajo de Hernández-Torres *et al.* analizaron 101 casos de colonización/infección por *A. baumannii* multirresistente (incluyendo la resistencia a carbapenems) aislados durante Enero de 2007 y Junio de 2008 en nuestro mismo centro hospitalario. Los porcentajes de sensibilidad a piperacilina/tazobactam, cefalosporinas, aztreonam, fluoroquinolonas y carbapenems fueron inferiores al 4% coincidiendo con nuestros datos. Sin embargo, las cifras de aislados sensibles a amikacina, tobramicina, gentamicina, colistina y tigeciclina, en nuestro estudio, fueron particularmente preocupantes, al ser muy inferiores a las observadas por Hernández-Torres *et al.* tan sólo dos años antes (45,5% vs 79,2%; 16,8% vs 59,4%; <4% vs 30,6%; 93,1% vs 100%; 19,8% vs 87,13%, respectivamente). Estas altas tasas de resistencias podrían deberse a que en este trabajo sólo incluimos aislamientos de *A. baumannii* procedentes de REA y UCI, dos unidades en las que existen los factores de riesgo asociados a la aparición de microorganismos multirresistentes, como la presión antibiótica, ya comentados anteriormente, mientras que Hernández-Torres *et al.* incluyeron todos los servicios del hospital excepto Pediatría y Ginecología-Obstetricia.

Cuando se analizó la actividad de los diferentes antibióticos en función de la localización de la infección se comprobó que colistina y cotrimoxazol tendían a ser menos activos en cepas aisladas de secreciones respiratorias. En la literatura se ha descrito esta misma circunstancia para los carbapenems (Friedland *et al.*, 2003). Se desconocen las causas de esta tendencia, pero podría estar en relación con un mayor inóculo bacteriano y con la mayor probabilidad de selección de variantes resistentes. En parte, también podría estar explicada por la mayor frecuencia de las infecciones respiratorias asociadas a dispositivos en pacientes en UCI, donde las tasas de *A. baumannii* multirresistente son superiores.

Una limitación de nuestro estudio, común a los estudios de prevalencia, es que los pacientes con estancias más largas están sobrerrepresentados y la estimación de la tasa de resistencia se ve afectada además por la duración de la infección. En la medida en que la duración de la estancia, o de la infección, sea inferior en los pacientes con

infección por *A. baumannii* sensible que en los pacientes con infección por *A.baumannii* resistente a carbapenems, la tasa de resistencia a estos antibióticos estará sobreestimada.

En conclusión, los antimicrobianos con mayor actividad antimicrobiana frente a los aislados de *A. baumannii* analizados fueron colistina, minociclina, amikacina y cotrimoxazol.

Los carbapenems, considerados tratamiento de elección frente *A. baumannii*, mostraron muy poca actividad antimicrobiana (solo el 3% de los aislados fueron sensibles), como ocurre en muchos otros países (*Gales et al., 2011; Miyakis et al., 2011; Reinert et al., 2007; Rhomberg et al., 2009; Rodloff et al., 2008; Turner et al., 2009*), siendo en algunos de ellos la resistencia a los carbapenems un problema endémico (*Miyakis et al., 2011*). Nuestras tasas de sensibilidad fueron diferentes a las de otros hospitales de España (*Cisneros et al., 1996; Rodríguez et al., 2003*), donde las resistencias de *A. baumannii* a carbapenems oscilaron entre un 19-28%, aunque en un estudio multicéntrico el porcentaje se elevó al 47% (*Cisneros et al., 2005*). En el año 2008 la resistencia a carbapenems se situaba en torno al 30% (*Asensio et al., 2008*), aunque en el período estudiado en nuestro hospital el 97% de las cepas aisladas eran resistentes.

Las diferencias en las tasas de resistencia a carbapenems pueden deberse al momento en el que se realizaron estos trabajos, años antes que el nuestro, años en los que los aislados de *A. baumannii* presentaban bajas tasas de resistencia a carbapenems. En los últimos años la resistencia a estos antibióticos ha aumentado a nivel mundial lo que explica el mayor porcentaje de cepas resistentes observado en nuestro trabajo en comparación con el resto de estudios españoles. Nuestras tasas de resistencia a carbapenems son más parecidas a las publicadas en el último estudio realizado en España, en el que incluyen cepas aisladas en el año 2010, y en el que un 82-83% de éstas son resistentes a estos antibióticos (*Fernández-Cuenca et al., 2013*).

En nuestra institución el nivel de consumo de carbapenems o de piperacilina/tazobactam es elevado, lo que podría relacionarse con las altas tasas de resistencia a estos antibióticos (*Peleg et al., 2006c*). No obstante, existen estudios, como el de *Fillaux et al. (Fillaux et al., 2006)*, en los que no se ha encontrado relación entre el mayor consumo de carbapenems y la disminución de la sensibilidad frente a esta familia de antibióticos, lo que nos indica que se precisan más estudios al respecto (*Richet et al., 2006*). No se observaron diferencias en la actividad de los dos carbapenems evaluados, imipenem y meropenem, lo que concuerda con los resultados publicados por *Gimeno et al.* en un estudio previo realizado en España (*Gimeno et al., 2010*). La escasa actividad de los carbapenems frente a *A. baumannii* hace muy difícil la selección de un tratamiento empírico eficaz en las infecciones graves.

La colistina fue, con diferencia, el antimicrobiano que mostró mayor actividad antimicrobiana. La mayoría de los aislados de *A. baumannii* fueron sensibles, como ocurre en otros países de Europa, Norteamérica, América latina o Asia (*Gales et al., 2011*). Solo el 6,9% de los aislados eran resistentes a este antibiótico. Desafortunadamente, la resistencia a colistina en *A. baumannii* se ha descrito en todo el mundo, con tasas de resistencia que van desde <7% en la mayoría de los informes a cifras de 30,6% y 40,7% en estudios realizados en Corea y España, respectivamente (*Cai et al., 2012*).

La prevalencia de aislados de *A. baumannii* PDR en España no es todavía tan preocupante como sucede en otros países (*Ko et al., 2007; Miyakis et al., 2011; Park et al., 2010*) (no aislamos ninguna cepa de *A. baumannii* panresistente) aunque es de destacar el elevado porcentaje de aislados "multidrug-resistant" (MDR) y de aislados XDR.

La aparición de estos patógenos resistentes, en ocasiones derivados de la presión selectiva que ejercen antimicrobianos empíricos inapropiados que eliminan las poblaciones sensibles y seleccionan las resistente, no solo limita el uso de terapias

efectivas, sino que permite la diseminación de estos microorganismos en los hospitales creando situaciones de endemia difíciles de controlar (*Woodford et al., 2011*).

Los resultados de este estudio ofrecen un panorama de preocupación en nuestro hospital. Debemos, por tanto, seguir prestando atención a este microorganismo con el objetivo de establecer las mejores opciones terapéuticas y medidas epidemiológicas de contención, sobre todo de los aislados con resistencia extrema y panresistentes.

Una de las medidas epidemiológicas para el control de las cepas de *A. baumannii* multirresistente consiste en la tipificación molecular de los aislados, que permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, y evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones. Se realizó la tipificación molecular de todos los aislamientos mediante "Repetitive element sequence-based PCR" (REP-PCR) y electroforesis en campo de pulsos (PFGE). La tipificación mediante PFGE, técnica considerada "gold estándar" permitió clasificar nuestras cepas en 8 patrones diferentes (patrón I-VIII). Dos de ellos, el patrón I y el II, fueron mayoritarios y se aislaron de pacientes ingresados tanto en REA como en UCI.

El estudio de los patrones de resistencia de los clones de *A. baumannii* definidos mediante PFGE indicó que el análisis de los patrones de resistencia tiene escaso valor para diferenciar o discriminar clones de *A. baumannii*. La presencia de un mismo clon con diferentes patrones de resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno que está muy extendido en la mayoría de los hospitales españoles, y que podría estar relacionado con la presencia de alteraciones o mutaciones puntuales en los genes de resistencia que no pueden diferenciarse mediante electroforesis en campo de pulsos (PFGE) (*Fernández-Cuenca et al., 2004*). La gran mayoría de los clones estudiados presentan más de un patrón de sensibilidad. Esto también se ha descrito por otros autores (*Fernández-Cuenca et al., 2004*).

Caracterización de los mecanismos de resistencia de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii*

La resistencia a carbapenems en este microorganismo está mediada por varios mecanismos. El más frecuente es la presencia de carbapenemasas tipo oxacilinasas (OXAs) ("carbapenem-hydrolyzing classD oxacillinases", CHDLs) (Afzal-Shah et al., 2001) y, con menor frecuencia, carbapenemasas tipo metalobetalactamasas (MBL) (Poirel y Nordmann, 2006a). El número de cepas portadoras de estas carbapenemasas está aumentando notablemente en los últimos años, por ello resulta de gran interés disponer de técnicas rápidas que permitan su identificación. La detección mediante métodos moleculares ofrece resultados de gran fiabilidad, pero ha de tenerse en cuenta que la aplicación diaria de estas técnicas en los laboratorios de microbiología clínica es limitada, debido a que son técnicas más complejas, que requieren de personal especializado y su coste (Kim et al., 2007; Noyal et al., 2009). Las pruebas fenotípicas como el test de Hodge para la detección de carbapenemasas y la sinergia con EDTA para la detección de metalobetalactamasas (Etest® MBL, BioMérieux), suponen una herramienta rápida y sencilla, que permiten proporcionar un resultado preliminar, aunque tan solo ofrecen una aproximación al no permitir identificar la enzima concreta responsable de la resistencia.

En nuestro estudio evaluamos ambos métodos fenotípicos, y los comparamos con técnicas moleculares de detección de resistencias.

En todos los aislamientos en los que se amplificó una carbapenemasa mediante PCR, el test de Hodge fue positivo. Sin embargo, hubo falsos negativos en el test de Hodge en cepas en las que se detectaron genes que codifican carbapenemasas. De las 93 cepas resistentes a carbapenems en las que se detectaron los genes *bla*_{OXA-24-like} y *bla*_{OXA-51-like}, en el 29% (27/93) el test de Hodge fue negativo. Se han observado resultados falsos negativos por la baja expresión de la carbapenemasa, sobre todo en cepas con metalobetalactamasas y oxacilinasas (Corvec et al., 2007; Orquídea et al.,

2006). El test es menos útil en cepas productoras de oxacilinasas en comparación con las productoras de MBLs o las KPC ya que la hidrólisis de los carbapenems es más débil con las OXAs. En el caso de las MBLs, los falsos negativos pueden evitarse añadiendo sulfato de zinc al medio que incrementa la expresión del enzima.

Obtuvimos 5 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenems en los que el test de Hodge fue positivo pero no se detectó genóticamente ninguna carbapenemasas de las incluidas en este estudio lo que puede indicar que la resistencia a carbapenems en estas cepas podría estar ocasionada por la existencia de otros tipos de carbapenemasas no estudiadas (*Livermore et al., 2006; Marqué et al., 2005*), sin olvidar, que en todas estas cepas se identificó el gen *bla*_{OXA-51-like}. Es preciso señalar que la asociación de este gen con secuencias promotoras IS*Aba* 1 ocasiona un aumento en la expresión de esta enzima, convirtiendo a OXA-51 en un posible determinante de resistencia a carbapenems (*Lu et al., 2008; Turton et al., 2006b*), aunque en este estudio no se evaluó la presencia de secuencias de inserción asociadas a las oxacilinasas. También se han comunicado falsos positivos con cepas productoras de CTX-M-15 y pérdida de porinas, y con las cepas hiperproductoras de AmpC.

Para la detección fenotípica de MBLs usamos el Etest[®] MBL. La elección del medio usado para la realización de esta prueba es muy importante para maximizar la sensibilidad (*Timothy et al., 2002*). En un trabajo realizado por *Walsh et al. (Walsh et al., 2002)* compararon los resultados obtenidos en diferentes medios de cultivo. La mayor sensibilidad y especificidad la obtuvieron con el medio Mueller-Hinton, de varias marcas comerciales, seguramente por la mayor concentración de zinc de este medio en comparación con los otros evaluados en el estudio.

En nuestro trabajo las diferencias observadas entre los resultados del Etest[®] MBL realizado en MH2 y MHE fueron del 100%. Todos los resultados negativos obtenidos en MH2 fueron positivos en MHE. Mediante técnicas moleculares no se detectó ninguna de las MBL estudiadas (VIM, IMP y SIM), por lo que, los resultados

negativos obtenidos en el Etest® MBL en MH2 tienen mayor correlación con la detección genotípica de las carbapenemasas, a excepción de que nuestras cepas fueran productoras de alguna MBLs no incluida en este estudio, tal y como ocurre en otros estudios (*Uma et al., 2009*). Teniendo en cuenta la baja prevalencia de estas enzimas en nuestro entorno, y que en este estudio se detectaron las MBLs más frecuentes en *A. baumannii*, la opción más probable es que los resultados positivos obtenidos para todos los aislamientos en el Etest® MBL en MHE, fuesen falsos positivos, y estos se debieran a un cambio en la composición del medio MH. No fue posible conocer la composición específica de cada uno de estos medios que permitieran explicar los resultados discrepantes en esta prueba fenotípica.

Aunque la diferencia en la composición de ambos medios pudo ser la responsable de los diferentes resultados existen otras posibles causas. En el trabajo de *Villalón et al. (Villalón et al., 2013)* describen un 67,8% de aislados positivos con el Etest® MBL en los que no se amplifican genes codificantes de estas enzimas. Estos resultados pueden deberse a la presencia de oxacilinasas que hidrolizan carbapenems. En presencia de EDTA, las oxacilinasas pasan a un estado menos activo, produciendo una drástica reducción de la CMI (*Danel et al., 2001; Segal y Elisha, 2005*). Se observó que el efecto del EDTA fue mínimo en los aislamientos que solo tenían el gen *bla*_{OXA-51-like}, moderada en los que se detectó el gen *bla*_{OXA-58-like} y alta en aquellos con el gen *bla*_{OXA-40-like} (*Villalón et al., 2013*). Esto podría explicar el hecho de que obtuviéramos resultados positivos en el Etest® MBL y negativos en los métodos moleculares de detección de estas enzimas, en aquellas cepas en las que detectamos la *OXA-24-like* (del mismo grupo que *OXA-40*). La descripción de casos similares de falsos positivos debido a la presencia de oxacilinasas también se ha descrito en otros trabajos (*Lee et al., 2003b; Loli et al., 2008; Rémy et al., 2012; Segal y Elisha, 2005; Villalón et al., 2013; Walsh et al., 2005*).

Un factor importante a tener en cuenta en la realización del Etest® MBL es que algunas cepas de *Acinetobacter* pueden perder los genes que codifican MBLs, parcial o

totalmente, a temperatura ambiente (*Lee et al., 2005a*) dando resultados falsos negativos (*Lee et al., 2003b*). Esto indica la importancia de realizar simultáneamente las pruebas fenotípicas y genotípicas para la detección de MBLs.

Muchos estudios se han centrado en desarrollar protocolos optimizados para la detección de MBLs de una manera rápida lo que supone uno de los mayores retos en la actualidad (*Bonnin et al., 2012; Lee et al., 2001*). No obstante en todos estos trabajos se han observado limitaciones sobre todo con los bacilos Gram-negativos no fermentadores. El alto nivel de resistencia a los antibióticos de los aislamientos de *A. baumannii* portadores de estas enzimas complica también la interpretación de los mismos ya que, en ese mismo aislado pueden haber otros mecanismos de resistencia que también produzcan un fenotipo de multirresistencia.

Ante los diferentes resultados en los diferentes medios de cultivo en la detección fenotípica de metalobetalactamasas no pudimos determinar la capacidad del test de Hodge en la detección de carbapenemasas tipo MLB.

En la literatura se han descrito casos de falsos negativos en el test de Hodge en presencia de MBLs. En un trabajo realizado por *Bonnin et al. (Bonnin et al., 2012)* se evaluó la técnica del test de Hodge para la detección de las enzimas NDM. Esta prueba dio resultados negativos para todas las cepas de *A. baumannii* productoras de NDM. VIM, IMP y algunos productores de carbapenemasas tipo OXA produjeron imágenes sinérgicas débiles. Esta prueba fue, por lo tanto, poco sensible y específica para la detección de la actividad carbapenemasas. La detección de la actividad carbapenemasa utilizando la prueba modificada de Hodge probablemente falle en la detección de *A. baumannii* productor de NDM, mientras que esta detección es eficaz con los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La diferencia en la capacidad de detección de carbapenemasas entre *A. baumannii* y *Enterobacteriaceae* podría ser explicada por la producción débil de enzimas en *A. baumannii*, probablemente relacionada con la localización cromosómica (una sola copia) del gen *bla_{NDM}*.

Un problema añadido en el test de Hodge es la dificultad en la interpretación de los resultados, lo que podría explicar las diferencias observadas cuando esta prueba se realizó en los dos medios de MH diferentes.

A pesar de la sencillez, el test de Hodge tiene detractores por las limitaciones que acabamos de describir.

En este sentido, las técnicas moleculares permiten caracterizar con detalle los aislados presentes en un entorno determinado. Esta caracterización facilita además información epidemiológica de interés y, dado que *A. baumannii* se considera un microorganismo nosocomial capaz de producir brotes nosocomiales en determinados servicios hospitalarios, ayuda a comprender la evolución de los distintos clones en el tiempo.

Así, en este estudio, se emplearon técnicas moleculares (PCR y secuenciación) para confirmar los test fenotípicos, conocer las principales enzimas implicadas en la resistencia a carbapenems y determinar los clones predominantes en nuestro entorno.

El primer paso para la caracterización molecular de los aislados y su relación genética se llevó a cabo mediante la amplificación y posterior secuenciación del gen *bla*_{OXA-51-like}. Este gen, además de ser una herramienta útil para la identificación de *A. baumannii*, se emplea habitualmente en estudios epidemiológicos y de tipado y es uno de los tres *loci* analizados para la identificación de los distintos clones globales.

En el 99% de nuestros aislamientos se detectó el gen *bla*_{OXA-51-like}. La secuenciación de este gen en 10 aislamientos de *A. baumannii* reveló que algunas de sus variantes se aíslan en mayor medida en nuestro hospital (grupo OXA-66 y grupo OXA-71). Las oxacilinasas del grupo de la OXA-66 se detectaron en los aislamientos del clon I mientras que las del grupo de la OXA-71 se identificaron en las cepas del clon II. En un estudio de Merkier *et al.* (Merkier *et al.*, 2008) también describieron que las

variantes del gen *bla*_{OXA-51-like} se podían encontrar en diferentes clones de PGFE, ya sean sensibles o resistentes a los carbapenems (*Merkier et al., 2006*).

La mayor presencia de OXA-66 también se ha descrito en otros estudios españoles (*Higgins et al., 2013; Villalón et al., 2013; Zander et al., 2012*).

Según nuestros resultados, las variantes en la OXA-51-like permiten clasificar los aislados en grupos muy similares a los que se obtienen por PFGE. Hay que tener en cuenta que la OXA-51-like se encuentra en el cromosoma por lo que las variaciones de la misma pueden traducirse en distintos patrones de bandas en PFGE, independientemente de los elementos móviles que presente cada aislado.

Dentro de los patrones I y II, en los que se identificaron los grupos OXA-66 y OXA-71, respectivamente, no se encontraron diferencias específicas en sus patrones de sensibilidad, pero todos los aislamientos fueron resistentes a los carbapenems. Esta resistencia podría explicarse por la presencia de secuencias de inserción de tipo IS*Aba*, aguas arriba de los genes codificantes de oxacilinasas, insertadas en promotores de estos genes, lo que resultaría en un aumento de la expresión y la resistencia concomitante a carbapenems (*Queenan y Bush, 2007*) o bien por la existencia de alguna carbapenemasa adquirida tipo OXA-23, OXA-24 u OXA-58, siempre que estén asociados a secuencias de inserción de promotores fuertes, ya que tienen una actividad hidrolítica escasa. No obstante, debe considerarse la posibilidad de que existan otros mecanismos de resistencia, enzimáticos o no.

La única oxacilinasas adquirida detectada en este estudio fue la OXA-24, en el 93,1% de nuestros aislamientos. Esta enzima y sus variantes (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72, OXA-160), aparecen ampliamente distribuidas en la Península Ibérica, que está considerada una región endémica (*Afzal-Shah et al., 2001; Costa et al., 2011; Da Silva et al., 2004; López-Otsoa et al., 2002; Martínez-Lamas et al., 2014*). También se ha descrito en países como Bélgica, Francia y Estados Unidos.

La secuenciación del gen *bla*_{OXA-24-like} reveló la alta similitud existente entre todas las variantes de este grupo, ya que no proporcionó una única variante como resultado final. Los aislados en los que se detectó OXA-24-like estaban incluidos en clones diferentes mediante PFGE. Se observó en el 100% de las cepas pertenecientes a los patrones II, III, VIII; en el 97,7% de las cepas del patrón I; y en la única cepa del patrón V, que, de forma sorprendente, fue sensible a los carbapenems. El hecho de que esta oxacilinasasa esté presente en clones diferentes ya ha sido descrito por otros autores, que han argumentado que diferentes mecanismos, tanto de transferencia horizontal como de diseminación clonal, deben desempeñar un papel en la propagación de OXA-24 en el ambiente hospitalario (Lu et al., 2009). También hay que destacar que 2 de las 5 cepas en las que no se detectó este tipo de oxacilinasasa, pertenecían a un patrón diferente, el patrón VII. A otras 2 cepas de éstas en las que no se detectó el gen *bla*_{OXA-24-like} no se les pudo realizar la PFGE por problemas técnicos pero probablemente perteneciesen al mismo pulsotipo (patrón VII) ya que presentaron el mismo perfil de bandas mediante REP-PCR.

La presencia de la secuencia tipo XerC/XerD flanqueando el gen *bla*_{OXA-24-like} podría explicar en gran medida la diseminación de este gen. Estas secuencias repetidas invertidas y conservadas (IRs) se encuentran separadas 6pb de la región variable y comparten una gran homología con los dominios de unión. Éstos actúan como dianas para la recombinación específica de sitio mediada por las recombinasas XerC y XerD. Este mecanismo es responsable de la movilización de fragmentos de ADN discretos en el genoma de *Acinetobacter* spp, entre ellos el gen *bla*_{OXA-24-like} (D'Andrea et al., 2009; Merino et al., 2010; Tian et al., 2011). Otro de los mecanismos posiblemente involucrados en la transmisión horizontal de esa enzima son las vesículas. Como es conocido, los bacilos Gram-negativos secretan vesículas al medio portadoras de distintas moléculas implicadas con frecuencia en procesos de virulencia. Se ha descrito que las vesículas de *A. baumannii* pueden incluir en su interior el gen *bla*_{OXA-24-like} actuando como un mecanismo de dispersión de resistencia (Rumbo et al., 2011).

El aislamiento de *A. baumannii* sensible a carbapenems que no presentaba el gen *bla*_{OXA-51-like}, amplificó el gen codificante de OXA-24-like. La presencia de esta carbapenemasa en una cepa sensible a carbapenems puede deberse a que las enzimas tipo OXA muestran una actividad hidrolítica débil de carbapenems y por ello no siempre muestran perfiles de resistencia, pero cuando se encuentran asociadas a elementos de inserción, pueden aumentar su expresión y ser resistentes a carbapenems (Higgins et al., 2010). Otros autores han obtenido estos resultados, como Ferreira et al. (Ferreira et al., 2011) que en su estudio describen 8 cepas sensibles a carbapenems en presencia de los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-51}.

La coexistencia de varias oxacilinasas en la misma cepa de *A. baumannii* se ha observado previamente en varias regiones geográficas, incluso la coexistencia de este tipo de enzimas con MBLs (Karthikeyan et al., 2010; Koh et al., 2007; Mendes et al., 2009; Peleg et al., 2008; Sung et al., 2008). En nuestro trabajo coexistieron OXA-51-like y OXA-24-like en el 92,1% de los aislamientos, al igual que en un estudio reciente publicado en España en el que coexisten estas dos oxacilinasas en el 100% de las cepas analizadas (Martínez-Lamas et al., 2014).

Una de las carbapenemasas adquiridas con mayor repercusión mundial y la que con más frecuencia se identifica en *A. baumannii* resistente a carbapenems es la OXA-23-like (Andriamanantena et al., 2010; Koh et al., 2007; Mostachio et al., 2009). Esta enzima ha sido documentada en países de Sudamérica (Fernández et al., 2009; Merkier et al., 2008; Villegas et al., 2007), Reino Unido y el sudeste asiático. Su localización puede ser tanto cromosómica como plasmídica. En nuestro estudio no detectamos OXA-23-like en ninguno de los aislamientos. Esto puede deberse a que, a pesar de ser un gen con gran capacidad de dispersión, su presencia en España se describió por primera vez una cepa de *A. baumannii* aislada en el año 2010 (Espinal et al., 2013). Hasta ese año las oxacilinasas con actividad carbapenemasa descritas en España estaban relacionadas principalmente con OXA-24.

Tampoco identificamos cepas con OXA-58. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida entre los aislados de *A. baumannii* resistentes a carbapenems en el sur de Europa (Marqué et al., 2005) causando brotes en Francia, Grecia, Bélgica, Italia, España, y Turquía (Bogaerts et al., 2006; Kulah et al., 2010; Poiriel et al., 2006; Pournaras et al., 2006; Zarrilli et al., 2007) y en otros países como Austria, Reino Unido, Argentina, Kuwait (Coelho et al., 2006a).

La distribución de las distintas oxacilinasas encontradas en este trabajo se ajusta a lo descrito en los distintos estudios de nuestro entorno. Sin embargo, dada la descripción cada vez más frecuente de metalobetalactamasas, aunque menos frecuentes que las oxacilinasas, se analizó también la posible presencia de estas enzimas, detectando aquellas MBLs más frecuentes en *A. baumannii* y con una distribución geográfica más amplia (IMP, VIM y SIM).

La prevalencia de las distintas MBLs en España es baja (Cornaglia et al., 2011), lo que puede explicar la ausencia de estas enzimas en los aislamientos de *A. baumannii* analizados en nuestro estudio. También puede que nuestros aislados presentaran alguna de las MBLs no incluidas en este trabajo.

Nuestros resultados en la detección de carbapenemasas y MBLs concuerdan con los observados por otros autores en España (Martínez-Lamas et al., 2014; Vila et al., 2010; Villalón et al., 2013).

En conclusión, aunque no se ha estudiado la presencia de otros mecanismos adicionales de resistencia en nuestros aislamientos, ni la presencia de secuencias de inserción, este estudio demuestra la alta prevalencia de oxacilinasas con actividad carbapenemasa en *A. baumannii* en nuestro hospital.

Epidemiología molecular de los aislamientos de Acinetobacter baumannii

El análisis de los perfiles de sensibilidad y las enzimas presentes permite caracterizar las distintas cepas de *A. baumannii* que predominan en nuestro medio. Sin embargo, para poder determinar con mayor exactitud los clones circulantes es necesario completar esta información con otros tipos de estudios. Desde una perspectiva epidemiológica, es importante determinar la relación (clonalidad) de estos microorganismos, especialmente en situación de endemia y en brotes epidémicos. Si estas cepas están clonalmente relacionadas, será necesario un mejor cumplimiento de las medidas de control de la infección (*Markogiannakis et al., 2008; Peleg et al., 2008; Wilks et al., 2006*). La tipificación de los aislamientos de *A. baumannii* es útil para estudiar los casos de infecciones cruzadas o para identificar las posibles fuentes o modos de propagación de esta bacteria.

Como sucede con muchos otros bacilos Gram-negativos, la electroforesis en campo pulsado (PFGE) es una de las técnicas de tipificación con mayor poder discriminatorio para *A. baumannii* y todavía hoy es considerada la técnica de referencia (*Bou et al., 2000a; Bou et al., 2000c; Seifert et al., 2005; Seifert y Gerner-Smidt, 1995*). En nuestro estudio comparamos esta técnica con REP-PCR, y con MLST. Gracias a estos métodos se pudo determinar la relación genética entre nuestros aislados. La mayoría de los clones definidos mediante REP-PCR se confirmaron mediante la técnica de referencia, con una concordancia del 90,1%. Estos resultados contrastan con los de varios trabajos publicados en los que llegan a la conclusión de que con REP-PCR se obtienen resultados similares a los de la técnica de referencia (*Bou et al., 2000c; Martínez-Lamas et al., 2014; Saeed et al., 2006*).

Por tanto, a pesar de que la REP-PCR tenga un alto poder discriminatorio (*Snelling et al., 1996*) y además presente ventajas con respecto a la PFGE, como la rapidez, patrones de bandas de ADN relativamente fáciles de interpretar (*Bou et al., 2000c*), su posible automatización que facilita este tipo de técnica, sobre todo cuando

está implicado un número importante de cepas (a costa de incrementar el coste económico de la prueba) (*Carretto et al., 2008*) y el hecho de ser asequible a un mayor número de laboratorios, nuestros resultados ponen de manifiesto el mayor poder discriminatorio de la PFGE frente a esta técnica.

Mediante PFGE se pudieron observar diferentes clones de *A. baumannii*. en nuestro hospital. La variabilidad de clones, aunque no es muy frecuente (*Dijkshoorn et al., 1996; Vila et al., 1999*), se ha descrito por otros autores (*Abbo et al., 2005; Fernández-Cuenca et al., 2004; Hsueh et al., 2002; Monterrubio-Villar et al., 2009; Rodríguez-Baño et al., 1999; Villari et al., 1999*), y podría explicarse por la coexistencia de clones epidémicos y endémicos (*Villers et al., 1998*). Dentro de esta variabilidad en nuestro centro existen dos clones que predominan sobre el resto y ambos presentan oscilaciones reapareciendo tras un determinado periodo. Esto sugiere que son clones que se instauran como endémicos en nuestro entorno, como ha sido descrito con anterioridad (*Villalón et al., 2011*), y que coexisten con otros clones esporádicos (*Martínez-Martínez et al., 2010*). En nuestro hospital, aunque los dos clones mayoritarios se aislaron en ambas Unidades de alto riesgo, el clon I predominó en REA mientras que el clon II lo hizo en UCI. La dispersión de un clon predominante se considera el patrón de transmisión más común en los brotes.

La electroforesis en campo de pulsos sigue siendo el "gold estándar" para la tipificación de *A. baumannii* pero presenta ciertas limitaciones como el tiempo requerido para la obtención de resultados, su laboriosidad y la falta de reproducibilidad entre diferentes laboratorios. Es por esto que estas técnicas basadas en la comparación de patrones de fragmentos de ADN visualizados en geles son adecuadas para el estudio de brotes a nivel local (*Bartual et al., 2005*), pero para un análisis epidemiológico global, se requiere la comparación de los resultados obtenidos de diferentes laboratorios. Para solventar el problema de la falta de reproducibilidad inter-laboratorios se han propuesto otras técnicas. Entre ellas está el MLST. Este método es altamente discriminatorio y se basa directamente en la comparación de las

secuencias de fragmentos internos de los genes "housekeeping", muy conservados en *A. baumannii* (Bartual et al., 2005; Wisplinghoff et al., 2008). Se supone que las mutaciones en estos genes, que codifican proteínas con funciones vitales, son neutrales. El MLST permite transferir resultados de tipificación de laboratorio a laboratorio o comparar resultados vía internet (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk>), siendo así una herramienta poderosa para estudios de epidemiología global.

La tipificación molecular realizada mediante MLST en varias localizaciones de Europa ha mostrado la existencia de 3 linajes diferentes conocidos como clones europeos ("European clone", EU-I-III) (Diancourt et al., 2010; Dijkshoorn et al., 1996; Dijkshoorn et al., 2007), también denominados clones internacionales (Diancourt et al., 2010; Higgins et al., 2010; Peleg et al., 2008) y nombrados como ST1, ST2 y ST3, respectivamente, según MLST (Diancourt et al., 2010). Éstos presentan un comportamiento epidémico, aunque se han descrito brotes policlonales en los que coexisten cepas epidémicas y cepas esporádicas (Higgins et al., 2010; Rodríguez-Baño et al., 2009; Valenzuela et al., 2007; Van den Broek et al., 2009). El clon I se ha aislado en España, Polonia y Reino Unido; el clon II en Italia, España, Portugal, Francia, Grecia, Reino Unido y Turquía (D'Arezzo et al., 2009; Da Silva et al., 2007; Iacono et al., 2008); y el tercer clon europeo, se ha descrito en Francia, Países Bajos y España (van Dessel et al., 2004).

Se realizó MLST a dos aislados de cada uno de los clones predominantes en nuestro hospital. Dentro del clon I, uno de los aislamientos fue clasificado como ST92.

Recientemente se ha publicado un trabajo llevado a cabo en un hospital de España en el que los 16 aislamientos de *A. baumannii* tipificados mediante MLST pertenecían a ST92. Previamente, esta secuencia tipo se asoció con una amplia diseminación de *A. baumannii* resistente a carbapenems en varios países europeos, del este de Asia y Australia (Endo et al., 2012; Lee et al., 2011c; Mugnier et al., 2010; Nigro y Hall, 2012; Park et al., 2013; Runnegar et al., 2010). De hecho, ST92 está reconocida

como causante de gran parte de la epidemia mundial de *A.baumannii* MR (Adams-Haduch et al., 2011) y se corresponde con el EU2 (Mugnier et al., 2010; Runnegar et al., 2010).

En el otro aislamiento no se pudo determinar la ST, ya que se obtuvo el alelo 59 en el gen *cpn60*, un alelo presente en un número muy limitado de secuencias tipo (ST1096 y ST1159) y la combinación de este alelo con el resto de alelos de los diferentes genes "housekeeping" no coincidió con ninguna de STs descrita hasta el momento.

Las cepas pertenecientes al clon II se clasificaron como ST187. Esta secuencia tipo difiere de ST1 en un único alelo (*gpi-9*), incluyéndose dentro del clon europeo I (EC I). Recientemente se ha descrito como responsable de un brote en España (Martínez-Lamas et al., 2014). Se trata de un ST identificado solo de forma esporádica en Alemania y Portugal, y hasta la publicación del trabajo realizado por Martínez-Lamas et al. no se encontraba asociado a brotes nosocomiales. En estudios previos sobre la diversidad clonal de aislamientos epidémicos de *A. baumannii* en los países mediterráneos y en España, el clon prevalente fue el ST2, perteneciente al EC II. Los aislados pertenecientes al EC I, aunque menos prevalentes, ya se perfilaban como clones emergentes en proceso de expansión y asociados a multirresistencia (Di Popolo et al., 2011; Villalón et al., 2011)

Los resultados obtenidos mediante PFGE y MLST para las dos cepas del patrón II concuerdan entre sí. Son muchos los trabajos en los que demuestra la similitud en los resultados entre ambas técnicas (Bartual et al., 2005). Aunque también hay publicaciones en las que se describen diferentes perfiles de PFGE dentro de una misma secuencia tipo (Alvargonzalez et al., 2014; Villalón et al., 2013) que podrían ser explicados por los cambios genéticos que ocurren durante la evolución de este microorganismo.

Debido al número limitado de aislamientos estudiados mediante MLST en este trabajo, no pudimos analizar a fondo la concordancia entre ambos métodos.

La literatura consultada demuestra que estas técnicas son complementarias para estudios de clonalidad y que ambas tienen una buena capacidad discriminadora (Bartual *et al.*, 2005; Giannouli *et al.*, 2010; Villalón *et al.*, 2011). La tipificación mediante MLST proporciona un nivel elevado de resolución y es una herramienta excelente para el estudio de la estructura poblacional y de la epidemiología global a lo largo del tiempo de *A. baumannii* (Bartual *et al.*, 2005). Permite el reconocimiento de clones epidémicos, multirresistentes y virulentos, y la monitorización de su diseminación internacional.

Aunque el sistema MLST posee ciertas ventajas en comparación con otros métodos de tipificación, como su utilidad para la investigación de la prevalencia de las cepas de *A. baumannii* a escala global (Bartual, 2005; Fantana, 2008; Landman, 2008; Nemeč, 2008; Seok-Mo, 2008; Shelburne, 2008), existen ciertas cuestiones que aún siguen sin respuesta, incluyendo la duda de si se requieren varios *loci* para obtener un esquema fiable y robusto, así como si los criterios de selección de los genes "housekeeping" son lo suficientemente fiables para mostrar la estructura poblacional de las cepas analizadas (Hamouda, 2010; Konstantinos, 2006).

Hasta ahora hay disponibles dos sistemas de MLST para *Acinetobacter* que permiten tipificar tanto *A. baumannii* como especies diferentes a ésta. Se denominan PubMLST (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) y la base de datos de MLST de Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>) (Bartual *et al.*, 2005; Diancourt *et al.*, 2010; Wisplinghoff *et al.*, 2008), con solo tres *loci* en común. El esquema PubMLST fue originalmente descrito por Bartual *et al.* (Bartual *et al.*, 2005) y posteriormente modificado por Wisplinghoff *et al.* (Wisplinghoff *et al.*, 2008) provocando cambios en los alelos y en la designación de los perfiles de la base de datos, que actualmente incluye 1285 perfiles de *A. baumannii*. Sin embargo, son

muchos menos que los depositados en esta base de datos para otras bacterias. El esquema de MLST de Pasteur (*Diancourt et al., 2010*), aunque se ha descrito más recientemente, solo incluye 836 perfiles de *A. baumannii*.

Otra limitación del MLST es que, en una publicación reciente, demuestran que en dos de los *loci* utilizados en el esquema PubMLST, *gyrB* y *gpi*, ocurre una recombinación, resultando en un fallo en la obtención de la secuencia tipo en algunos aislados (*Hamouda, 2010*).

Para la vigilancia epidemiológica de *A. baumannii* y de sus resistencias sería necesaria la creación de un grupo de laboratorios de referencia en países diferentes que se encargaran de la vigilancia de *A. baumannii* MR así como de la unificación de los métodos de tipificación. Esta iniciativa generaría una imagen más completa de la epidemiología global y permitiría una mejor comprensión de la importancia de la diseminación internacional de los clones multirresistentes de este microorganismo.

Actualmente, el gen *bla*_{OXA-51-like}, además de ser una herramienta útil para la identificación de *A. baumannii*, se emplea en estudios epidemiológicos y de tipado, y es uno de los tres *loci* analizados para la identificación de los distintos clones globales. Dentro del grupo de las enzimas OXA-51-like, hay subgrupos asociados a ciertos linajes epidémicos (*Figueiredo, 2010*). Se ha estudiado la correlación entre las variantes OXA-69, OXA-66 y OXA-71 con los ECI-III, respectivamente (*Turton et al., 2007*).

La secuenciación de las oxacilinasas del grupo OXA-51-like detectadas en nuestros dos clones mayoritarios mostró que nuestros aislamientos presentaban las variantes pertenecientes al subgrupo OXA-66, en el caso del patrón I, y al subgrupo OXA-71, en el caso del patrón II. La OXA-66 es característica del clon internacional II (IC2) (*Higgins et al., 2013; Zander et al., 2012*), el linaje de *A. baumannii* más extendido (*Higgins et al., 2010; Turton et al., 2007*). Este grupo de enzimas se ha asociado tanto a

un clon europeo ("European clone", también denominado internacional) como a cepas de Sudamérica y Asia (Zander *et al.*, 2012).

En otros estudios, como el trabajo realizado por Higgins *et al.* (Higgins *et al.*, 2013), también identifican OXA-66 en la mayoría de sus aislados.

Las enzimas pertenecientes al subgrupo OXA-71 se han asociado al clon europeo III (Evans *et al.*, 2008; Turton *et al.*, 2007; Zander *et al.*, 2012), por lo que parte de nuestros aislados pertenecen a este linaje.

Nuestros resultados concuerdan con un trabajo publicado recientemente en España (Villalón *et al.*, 2013).

Sería interesante investigar más a fondo las variantes de OXA-51 presentes en todos nuestros aislados de *A. baumannii* para conocer mejor la correlación entre la tipificación basada en la secuencia del gen *bla*_{OXA-51-like} con otros métodos de tipificación.

En el trabajo realizado por Zander *et al.* (Zander *et al.*, 2012) estudiaron la asociación entre las variantes del gen que codifica OXA-51-like con el sistema de tipificación DiversiLab REP-PCR. Sugirieron que la coevolución de las secuencias de las variantes de este gen ocurre de manera similar a otras partes del genoma de *A. baumannii*, observándose como patrones de REP-PCR diferentes. Por lo que los resultados obtenidos mediante REP-PCR no siempre coinciden con la secuenciación de las variantes de OXA-51. La falta de correlación entre ambos métodos pudo deberse a que las secuencias repetidas amplificadas mediante REP-PCR pueden sufrir cambios rápidos por recombinación. Aún así, observaron buena correlación entre las variantes y los complejos clonales definidos por REP-PCR por lo que concluyen que la secuenciación de los genes *bla*_{OXA-51-like} permite identificar los linajes clonales a nivel mundial (Zander *et al.*, 2012).

La concordancia entre la tipificación mediante la secuenciación del gen *bla*_{OXA-51-like} con MLST se demostró en el estudio de Hamouda *et al.* (Hamouda *et al.*, 2010). Sus datos mostraban que todos los aislamientos que presentaban las variantes principales del gen *bla*_{OXA-51-like} (OXA-69, OXA-66 y OXA-71) pertenecían a los 3 linajes clonales europeos más importantes. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, es este estudio tampoco hubo concordancia entre los resultados obtenidos mediante MLST y PFGE. Concluyen que para la identificación de los principales linajes epidémicos de *A. baumannii*, los resultados obtenidos mediante la secuenciación de este gen son comparables a los del análisis MLST, con la ventaja de un menor coste en la secuenciación y menor tiempo necesario para su realización.

VI. CONCLUSIONES

1. La media de edad de los pacientes con aislamiento de *Acinetobacter baumannii* fue de 59,8 años y la mediana de 65 años [rango: 15 - 90 años]. El 69,3% eran hombres y el 30,7% mujeres.
2. La infección respiratoria así como la infección de piel y partes blandas son las principales patologías en las que se encuentra implicado *A. baumannii* como agente causal.
3. En el 10% de los pacientes el primer aislamiento fue obtenido de muestras de vigilancia activa. De estos pacientes, un 60% desarrollaron más tarde infección por este microorganismo, en un tiempo medio de 14,8 días (0-58 días).
4. La resistencia antibiótica en los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* del estudio resultó muy elevada. Un 97% de los aislamientos fueron resistentes a carbapenems considerados el tratamiento de elección, lo que obliga a plantear otras alternativas terapéuticas.
5. Los antibióticos más activos frente *A. baumannii* fueron colistina, minociclina, amikacina y cotrimoxazol, con unos porcentajes de sensibilidad del 93,1%, 60,4%, 45,5% y 44,5%, respectivamente.
6. El 97% de los aislados de *A. baumannii* presentaron multirresistencia, de los cuales el 40,6% fueron clasificados como cepas estrictamente MDR y el 56,4% como extremadamente resistentes. Ningún aislamiento fue panresistente.
7. Los test fenotípicos para la detección de carbapenemasas y metalobetalactamasas tuvieron un valor limitado en nuestro estudio, estando los resultados muy influenciados por el medio de cultivo utilizado.

8. La OXA-24-*like* fue la oxacilinasas adquirida identificada con más frecuencia en los aislamientos de *A. baumannii* (93%). No se detectaron las oxacilinasas OXA-23-*like* y OXA-58-*like*. En las cepas de *A. baumannii* no se identificó ninguna MBLs de las incluidas en este estudio.

9. La presencia en todos los aislamientos, excepto uno, de oxacilinasas del grupo OXA-51-*like* nos permite concluir que estas cepas pertenecen a la especie *A. baumannii*.

10. La secuenciación de algunas de las enzimas OXA-51-*like* detectadas mostró que las variantes OXA-66 y OXA-71 son las más prevalentes en nuestro estudio. La secuenciación de estas enzimas codificadas por el gen *bla*_{OXA-51-*like*} puede usarse como método de tipificación.

11. Se detectaron 2 clones mayoritarios de *A.baumannii* en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca durante los dos años de estudio, distribuidos tanto en REA como en UCI sin predominio estacional. Los resultados obtenidos por REP-PCR mostraron una concordancia del 89,9% con los resultados obtenidos por PFGE-RFLP.

12. Se observaron diferentes patrones de resistencia a antimicrobianos dentro de un mismo clon definido mediante PFGE lo que indica que el antibiograma tiene escaso valor para diferenciar o discriminar clones de *A. baumannii*.

13. Las secuencias tipo obtenidas en este estudio en las cepas analizadas fueron la ST92 y ST187. Estas STs se han descrito previamente en España.

VII. RESUMEN

Objetivos: El principal objetivo de este estudio fue determinar el mecanismo de resistencia a carbapenems mediante métodos fenotípicos y genotípicos, en aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, así como conocer la epidemiología molecular de estas cepas mediante diferentes técnicas de tipificación molecular.

Metodología: Se realizó el estudio de 239 aislamientos de *A. baumannii* procedentes de 101 pacientes ingresados en la unidad de Reanimación (REA) y en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca durante un periodo de dos años (2010 y 2011). La identificación y la sensibilidad de *A. baumannii* se realizó con el sistema automatizado Vitek2®, y la confirmación de la especie dentro del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* se determinó mediante la detección genotípica del gen *bla*_{OXA-51-like}. La detección fenotípica de carbapenemasas se llevó a cabo con el test de Hodge y el Etest® MBL. Los resultados obtenidos por estos métodos se comprobaron mediante la realización de PCR. La relación clonal entre los aislamientos de *A. baumannii* se evaluó con diferentes técnicas: REP-PCR y RFLP-PFGE. Adicionalmente algunas cepas fueron tipificadas usando MLST.

Resultados: La mayoría de las cepas fueron multirresistentes con porcentajes de sensibilidad a carbapenems del 3%. Tan solo 3 de las cepas estudiadas fueron sensibles a este grupo de antibióticos. Los antibióticos más activos fueron colistina y minociclina, con el 93,1% y 60,4% de cepas sensibles, respectivamente.

El test de Hodge fue negativo en el 29,7% (30/101) de las cepas de *A. baumannii*. Tan solo 3 de estas cepas fueron sensibles a carbapenems. Los resultados obtenidos en el Etest® MBL en MH2 y MHE fueron discrepantes en todos los aislamientos de *A. baumannii*.

En un 99% de los aislamientos se detectó el gen que codifica la OXA-51-like y en el 93,1% se identificó la OXA-24-like. No hubo ningún aislamiento que presentara la OXA-23-like ni OXA-58. No se identificó ninguna MBLs de las estudiadas en este trabajo.

La tipificación molecular mediante REP-PCR permitió diferenciar 4 clones, dos de ellos mayoritarios, el clon A y el clon B con el 47,5% y 40,6% de aislamientos, respectivamente. Ambos clones se aislaron de las dos unidades de alto riesgo estudiadas lo que indica una dispersión de estos en el hospital. Los resultados de RFLP-PFGE también mostraron dos patrones mayoritarios denominados patrón I y patrón II. La concordancia entre ambos métodos fue del 89,9%. La secuencia tipo de la cepa del patrón I tipificada mediante MLST correspondió a la ST92 y los aislamientos del patrón II con la ST187.

Conclusiones: La resistencia antibiótica en los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* del estudio resultó muy elevada. Un 97% de los aislamientos fueron resistentes a carbapenems considerados el tratamiento de elección. Los antibióticos más activos frente *A. baumannii* fueron colistina, minociclina, amikacina y cotrimoxazol.

Los test fenotípicos, para la detección de carbapenemasas y metalobetalactamasas, tuvieron un valor limitado en nuestro estudio.

La OXA-24-like fue la oxacilinasas adquirida identificada con más frecuencia en los aislamientos de *A. baumannii*. No se detectaron las oxacilinasas OXA-23-like y OXA-58-like. Tampoco se identificó ninguna MBLs.

La presencia en todos los aislamientos, excepto uno, de oxacilinasas del grupo OXA-51-like nos permite concluir que estas cepas pertenecen a la especie *A. baumannii*.

Se detectaron 2 clones mayoritarios de *A.baumannii* en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca durante los dos años de estudio, distribuidos tanto en REA como en UCI. Los resultados obtenidos por REP-PCR mostraron una concordancia del 89,9% con los resultados obtenidos por PFGE-RFLP.

Las secuencias tipo obtenidas en este estudio fueron la ST92 y ST187. Estas STs se han descrito en España.

VIII. SUMMARY

Objectives: The main objectives of this study were to determine the mechanism of resistance to carbapenems by phenotypic and genotypic methods in *Acinetobacter baumannii* isolates and to know the molecular epidemiology of these strains by different molecular typing techniques.

Methods: We studied 239 *A. baumannii* strains isolated from 101 patients hospitalized in Reanimation Unit and Critical Care Unit in the Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca during 2 years (2010 and 2011). Identification and susceptibility of *A. baumannii* were processed with automated system Vitek2® and the species confirmation within *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex was determined by genotypic detection *bla*_{OXA-51-like} gene. Phenotypic carbapenemases detection was performed by Hodge Test and MBL Etest®. The results obtained by these methods were tested by performed PCR. Clonal relationship between *A. baumannii* isolates was evaluated by different techniques: REP-PCR and RFLP-PFGE. Additionally some strains were typed by MLST.

Results: Most stains were multi-resistant with percentage of susceptibility to carbapenems of 3%. Only 3 of the studied strains were susceptible to this group of antibiotics. The most active antibiotics were colistin and minocycline with 93,1% and 60,4% of susceptible strains respectively.

Hodge test was negative in 29,7% (30/101) of *A. baumannii* strains. Only 3 of these strains were susceptible to carbapenems. The results obtained in the MBL Etest® MH2 and MHE were discrepant in all isolates of *A. baumannii*.

In 99% of the isolates the gene encoding OXA-51-like was detected and OXA-24-like carbapenemases was identified in 93,1%. PCR analysis revealed absence of OXA-23-like or OXA-58-like carbapenemases. Any MBLs studied in this study were identified.

Molecular typing by REP-PCR allowed to differentiate 4 clones. Two were prevalent, clone A and clone B with 47,5% and 40,6% of isolates, respectively. Both clones were isolated from the two Critical Care Units studied indicating a dispersion of these in the hospital. The RFLP-PFGE results also showed two major patterns called

pattern I and pattern II. The agreement between both methods was 89,9%.

The strain belonging to clone I corresponded to ST92 by MLST, and two *A. baumannii* isolates belonging to clone II were ST187.

Conclusions: Antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates in the study was very high. 97% of the isolates were resistant to carbapenems considered the treatment of choice. The most active antibiotics against *A. baumannii* were colistin, minocycline, amikacin and cotrimoxazole.

Phenotypic test for the detection of carbapenemases and metalloβ-lactamase had limited value in our study.

The OXA-24-like was the most frequently identified Oxacillinase acquired in *A. baumannii* isolates.

The presence in all isolates, except one, of oxacillinases that belong to the group OXA-51-like allows us to conclude that these strains belong to the species *A. baumannii*.

Two majority clones of *A. baumannii* were detected in Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca during the two years of study, distributed both Reanimation Unit and Critical Care Unit. The results obtained by REP-PCR showed 89,9% concordance with the results obtained by PFGE-RFLP.

The type sequences obtained in this study were ST92 and ST187. These STs have been described in Spain

IX. LISTA DE FIGURAS

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Tinción de Gram de <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
Figura 2. Métodos genotípicos para la identificación de <i>Acinetobacter</i> . A) AFLP, B) ARDRA (Dijkshoorn et al., 2007).....	16
Figura 3. Visión general de la dinámica entre pacientes, bacterias y ambiente hospitalario (Dijkshoorn et al., 2007).....	23
Figura 4. Esquema de integrón de clase I (León et al., 2010).....	29
Figura 5. Representación esquemática de la bomba multidroga AdeABC de <i>A. baumannii</i> (Opazo et al., 2009).....	46
Figura 6. Factores que contribuyen a la permanencia de <i>A. baumannii</i> en el ambiente, infección y colonización (Dijkshoorn et al., 2007).....	52
Figura 7. Aislamientos de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenems (Resumen anual de datos de sensibilidad a meropenem (MYSTIC), 2004. Datos obtenidos de la base de datos MYSTIC (www.mystic-data-org)(Pérez et al., 2007).....	82
Figura 8. Los países que han informado un brote de <i>A. baumannii</i> resistente a carbapenems. En rojo se encuentran los países con brotes notificados antes de 2006, y en amarillo los informados desde 2006 (Peleg et al., 2008).....	83
Figura 9. Esquema de la distribución de los electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B (Cercenado y Cantón, 2005).....	90
Figura 10. Análisis mediante la técnica MLST (Cercenado y Cantón, 2005).....	96

IV. RESULTADOS

Figura 11. Distribución de edades de los pacientes incluidos en el estudio.....	123
Figura 12. Distribución de los pacientes del estudio según edad y sexo (porcentaje de hombres y mujeres en cada grupo de edad).....	124
Figura 13. Distribución de los pacientes del estudio según la edad y el servicio de procedencia de las muestras. Los porcentajes están expresados como porcentaje del total de pacientes ingresados en cada Unidad.....	125
Figura 14. Distribución de pacientes según edad y sexo en REA, expresada como porcentaje del total de muestras procedentes de este servicio.....	126
Figura 15. Distribución de pacientes según edad y sexo en UCI, expresada como porcentaje del total de muestras procedentes de este servicio.....	126
Figura 16. Número de muestras por paciente y la edad.....	128
Figura 17. Procedencia de los aislamientos clínicos. IPPB: infección de piel y partes blandas. Respiratorias: muestras relacionadas con infecciones respiratorias de vías altas y bajas, excepto líquido pleural.....	129
Figura 18. Distribución de los diferentes tipos de muestras recibidas por servicios. Los valores están expresados como porcentaje del total de las muestras de cada servicio.....	129

Figura 19. Distribución temporal de los aislamientos de <i>A. baumannii</i> en REA y UCI durante el año 2010 y año 2011.....	130
Figura 20. Patrones de bandas de los aislamientos de <i>Acinetobacter baumannii</i> del año 2010 obtenidos mediante REP-PCR. Calle 1-20: cepas de <i>A. baumannii</i> y clasificación en clones: A, B y C.....	144
Figura 21. Distribución de los clones definidos mediante REP-PCR en las unidades de REA y UCI durante: A) año 2010, B) año 2011, y C) global (año 2010 y año 2011).....	145
Figura 22. Patrones de bandas obtenidos mediante RFLP-PFGE para los aislamientos de <i>A. baumannii</i> . Calle 1-10: cepas de <i>A. baumannii</i> . PI: patrón 1; PII: patrón 2.....	146
Figura 23. Alineamiento de las secuencias de los alelos 2 y 59 del gen "housekeeping" <i>cpn60</i> . En amarillo se marcan las diferencias de nucleótidos entre ambas secuencias.....	149
Figura 24. Distribución de los patrones de <i>A. baumannii</i> en el hospital durante el periodo de estudio. ND: no determinado.....	150
Figura 25. Evolución de los patrones de <i>A. baumannii</i> definidos mediante PFGE en la unidad de REA durante el periodo de estudio. ND: no determinado.....	151
Figura 26. Evolución de los patrones de <i>A. baumannii</i> definidos mediante PFGE en la unidad de UCI durante el periodo de estudio. ND: no determinado.....	152
Figura 27. Distribución de los patrones obtenidos mediante PFGE según el tipo de muestra.....	153
Figura 28. Resultados del Test de Hodge para los aislamientos de <i>A. baumannii</i> estudiados. A) Test de Hodge positivo para 4 aislados de <i>A. baumannii</i> . En la figura se observa claramente el crecimiento de <i>E.coli</i> en la zona de intersección. B) Test de Hodge negativo para 3 cepas de <i>A. baumannii</i> . No se observa crecimiento de <i>E.coli</i> cercano al disco de meropenem.....	155
Figura 29. Resultado positivo del Etest® MBL para uno de los aislamientos estudiados de <i>A. baumannii</i> . En la figura se observa claramente la diferencia de las CMI's entre el imipenem y el imipenem con EDTA.....	156
Figura 30. Detección genotípica de oxacilinasas. Calle 1: PM (peso molecular); Calle 2-6: "set A"; calle 7-11; "set C"; calle 12-16: "set B"; calle 17-21: "set OXA-58".....	161
Figura 31. Alineamiento de las secuencias de las variantes de la enzima OXA-51 (OXA-66 y OXA-71) obtenidas para los patrones I y II definidos por PFGE, respectivamente. En amarillo se observan los aminoácidos discordantes entre las dos variantes.....	160
Figura 32. Detección genotípica mediante PCR de la enzima VIM en 9 aislamientos de <i>A. baumannii</i> . Calle 1: PM (peso molecular); calle 2-5; C+ (controles positivos de VIM); calle 6-14: cepas de <i>A. baumannii</i>	162
Figura 33. Resultado negativo de una cepa de <i>A. baumannii</i> en la detección de carbapenemasas mediante Xpert-Carba-R (PCR a tiempo real).....	163

X. LISTA DE TABLAS

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en <i>Acinetobacter baumannii</i> (modificado de Vila y Marco, 2010).....	30
Tabla 2. Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos en <i>Acinetobacter baumannii</i> (modificado de Vila y Marco, 2010).....	47
Tabla 3. Principales técnicas de tipificación molecular.....	88

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4. Cebadores utilizados en REP-PCR.....	108
Tabla 5. Cebadores usados en MLST y genes conservados en <i>A. baumannii</i>	113
Tabla 6. Cebadores específicos utilizados para la detección de oxacilinasas y genes diana.....	116
Tabla 7. Cebadores específicos para la detección de MBLs, tamaño del amplicón y genes diana.....	118

IV. RESULTADOS

Tabla 8. Número de pacientes según el número de muestras con aislamiento de <i>A. baumannii</i>	127
Tabla 9. Porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos durante los años 2010 y 2011.....	134
Tabla 10. Porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos en las unidades de REA y UCI durante el año 2010 y año 2011.....	135
Tabla 11. Perfiles de resistencia según los criterios de Magiorakos <i>et al.</i> (Magiorakos <i>et al.</i> , 2012) y según la sensibilidad de los aislamientos a los antibióticos estudiados.....	138
Tabla 12. Porcentaje de cepas sensibles según la localización de la infección y colonización.....	142
Tabla 13. Clasificación de los aislamientos mediante REP-PCR y RFLP-PFGE.....	148
Tabla 14. Alelos de los genes "housekeeping" obtenidos para las 4 cepas de <i>A. baumannii</i> estudiadas mediante MLST y la secuencia tipo (ST) resultante.....	148
Tabla 15. Resultados obtenidos en el test de Hodge y sensibilidad a carbapenems de los aislamientos de <i>A. baumannii</i> estudiados.....	154
Tabla 16. Resultados del Etest® MBL en MHE.....	156
Tabla 17. Discordancias encontradas entre los resultados del test de Hodge en medio MHE y MH2.....	157
Tabla 18. Cepas de <i>A. baumannii</i> con resultados discordantes en el test de Hodge en MHE y MH2.....	157
Tabla 19. Número de aislamientos de <i>A. baumannii</i> en los que se detectaron genes que codifican las oxacilinasas estudiadas en este trabajo.....	158
Tabla 20. Número de aislados de <i>A. baumannii</i> en los que se detectaron carbapenemasas mediante el test de Hodge y mediante métodos moleculares.....	165

Tabla 21. Aislamientos de <i>A. baumannii</i> con resultados discordantes obtenidos en el test de Hodge en dos medios diferentes y detección molecular de carbapenemasas en estos aislados.....	165
Tabla 22. Número de aislamientos de <i>A. baumannii</i> en los que se detectó el gen <i>bla</i> _{OXA-51-like} y gen <i>bla</i> _{OXA-24-like} en cada patrón definido por PFGE.....	166
Tabla 23. Relación entre los grupos establecidos según el perfil de resistencia con la detección fenotípica y genotípica de carbapenemasas.....	170

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbo A, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Siegman-Igra Y, Schwaber MJ.** Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 793-800.
- Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 22-9.
- Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR et al.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1064–1067
- Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM et al.** Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3849-54.
- Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA et al.** Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Ant Agents Chem* 2008; 52: 3837-43.
- Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore D.** Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 583-8.
- Al Naiemi N, Duim B, Savelkoul PH, Spanjaard L, de Jonge E, Bart A et al.** Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4862-4.
- Albrecht MC, Griffith ME, Murray CK, Chung KK, Horvath EE, Ward JA et al.** Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg* 2006; 203: 546-50.
- Allen DM, Hartman BJ.** *Acinetobacter* Species. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.) *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. 2632-5.
- Allen KD, Green HT.** Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect* 1987; 9: 110-9.
- Álvarez-Lerma F, Montserrat Gasulla G, Abad Peruga V, Pueyo Pont MJ, Tarragó Eixarch E.** Efectividad del aislamiento de contacto en el control de bacterias multirresistentes en un servicio de medicina intensiva. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 57-63.
- Álvarez-Lerma F, Palomar M, Insausti J, Olaechea P, Cerda E, Castillo F et al.** Infections caused by *Acinetobacter* spp. in critically ill ICU patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 533-9.
- Alvargonzalez JJ, Vindel Hernando A, Martín MD, Casas CM, Iglesias JO, Marín MF et al.** Sequential outbreaks in a Spanish hospital caused by multiresistant OXA-58 producing *Acinetobacter baumannii* ST92. *J Med Microbiol* 2014; 63(8): 1093-8.
- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M et al.** A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991; 276: 269-70.
- Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321-31.

- Anderson SD, Gums JG.** Ceftobiprole: an extended-spectrum anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin. *Ann Pharmacother* 2008; **42**: 806-16.
- Andriamanantena TS, Ratsima E, Rakotonirina HC, Randrianirina F, Ramparany L, Carod JF et al.** Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; **9**: 17.
- Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H.** Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 685-6.
- Anstey NM, Currie BJ, Withnall KM.** Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in the Northern Territory of Australia. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 83-91.
- Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E.** Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 567-70.
- Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E et al.** Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 786-90.
- Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P.** Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* 2011. **6**(8): e22674.
- Arbeit RD.** Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds.). *Manual of clinical Microbiology*. 6ª ed. Washington D.C. American Society for Microbiology; 1995. 190-208.
- Asensio A, Cantón R, Vaqué J, Calbo-Torrecillas F, Herruzo R, Arribas JL et al.** Prevalencia de infecciones por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemas en España (1999-2005). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; **26**(4): 199-204.
- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Léotard S, Pagès JM, Nordmann P.** Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1615-20.
- Audureau A.** Etude du genre *Moraxella*. *Ann Inst Pasteur* 1940. **64**: 126-66.
- Baggett HC, Duchin JS, Shelton W, Zerr DM, Heath J, Ortega-Sanchez IR et al.** Two nosocomial pertussis outbreaks and their associated costs-King County, Washington, 2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 537-43.
- Barbolla RE, Centron D, Di Martino A, Maimone S, Salgueira C, Famiglietti A et al.** Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **45**: 261-64.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F.** Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4382-90.

- Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY.** A study of the *Moraxella* group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* 1968a. 95: 1520-41.
- Baumann P.** Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol* 1968b. 96: 39-42.
- Beijerinck, M.** Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam* 1911. 19: 1092-103.
- Bergey DH, Earle Buchanan R; N E Gibbons NE.** *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 8^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co; 1974.
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996. 9: 148-65.
- Berlana D, Llop JM, Fort E, Badia MB, Jodar R.** Use of colistin in the treatment of multiple-drug-resistant gram-negative infections. *Am J Health Syst Pharm* 2005. 62: 39-47.
- Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T.** Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999b. 18: 179-83.
- Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL.** Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: Implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* 1999a. 42: 201-4.
- Bernabeu-Wittel M, Pichardo C, García-Curiel A, Pachón-Ibáñez ME, Ibáñez-Martínez J, Jiménez-Mejías ME et al.** Pharmacokinetic/ pharmacodynamic assessment of the in-vivo efficacy of Imipenem alone or in combination with amikacina for the treatment of experimental multiresistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 319-25.
- Bernards AT, Dijkshoorn L, Van der Toorn J, Bochner BR, Van Boven CP.** Phenotypic characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridisation groups by means of the biolog system. *J Med Microbiol* 1995; 42: 113-9.
- Bernards AT, Frenay HM, Lim BT, Hendriks WD, Dijkshoorn L, van Boven CP.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*: an unexpected difference in epidemiologic behavior. *Am J Infect Control* 1998; 26: 544-51.
- Bernards AT, van der Toorn J, van Boven CP, Dijkshoorn L.** Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 303-8.
- Bertini A, Giordano A, Varesi P, Villa L, Mancini C, Carattoli A.** First report of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2268-9.
- Bick JA, Semel JD.** Fulminant community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in a healthy woman. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 820-1.
- Blot S, Vandewoude K, Colardyn F.** Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive Care Med* 2003; 29: 471-5.
- Boerlin P, Eugster S, Gaschen F, Straub R, Schawalder P.** Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol* 2001; 82: 347-359.

- Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Pierard D et al.** Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4189-92.
- Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA.** Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 43-50.
- Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G.** Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 529-44.
- Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C et al.** Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2004-6.
- Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-beta-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1419-21.
- Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Phenotypic, Biochemical, and Molecular Techniques for Detection of Metallo- β -Lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2012; 50(4): 1419-21.
- Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L.** Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 349-54.
- Bonomo RA, Szabo D.** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl. 2): S49-56.
- Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, Van Voorhis J, Nathan C, et al.** The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin resistant enterococci: An important infection control variable. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1127-32.
- Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J.** PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000c; 6: 635-43.
- Bou G, Cerveró G, Dominguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J.** 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* 2000a; 38: 3299-305.
- Bou G, Martínez-Beltrán J.** Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 428-32.
- Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán A.** OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000b; 44: 1556-61.
- Bouvet PJ, Grimont PA.** Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138: 569-78.

- Bouvet PJ, Grimont PA.** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36: 228-40.
- Bouvet PJ, Jeanjean S.** Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* 1989; 140: 291-99.
- Boyce JM, Pittet D.** Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: S3-40.
- Brade H, Galanos C.** Biological activities of the lipopolysaccharide and lipid A from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Med Microbiol* 1983; 16: 211-4.
- Brauers J, Frank U, Kresken M, Rodloff AC, Seifert H.** Activities of various β -lactams and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 24-30.
- Briggs S, Ellis-Pegler R, Raymond N, Thomas M, Wilkinson L.** Gram-negative bacillary meningitis after cranial surgery or trauma in adults. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 165-73.
- Brisou J, Prevot AR.** Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1954; 86: 722-8.
- Brisou J.** Essay on the system of the genus *Achromobacter*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1953; 84: 812-4.
- Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Kusters K, Toelstra A, Verhoef J et al.** Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. using automated ribotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3636-45.
- Brown S, Amyes SG.** The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 326-9.
- Brown S, Amyes SGB.** OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: The story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1-3.
- Brown S, Young HK, Amyes SG.** Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 15-23.
- Burckhardt I, Zimmermann S.** Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3321-4.
- Bush K, Jacoby G, Medeiros A.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation to molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
- Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N.** Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(7): 1607-15.
- Canduela M J, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, Calvo F, Pérez J.** Evolution of

multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1220-2.

Cantón R, Ruíz-Garbajosa P. *Acinetobacter baumannii*: ¿debemos seguir prestando atención? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31(1): 1-3.

Cardoso T, Ribeiro O, Aragao IC, Costa-Pereira A, Sarmiento AE. Additional risk factors for infection by multidrug-resistant pathogens in healthcare-associated infection: A large cohort study. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 375.

Carr E, Eason H, Feng S, Hoogenraad A, Croome R, Soddell J et al. RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* isolates from activated sludge systems designed to remove phosphorus microbiologically. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 309-19.

Carr EL, Kampf P, Patel BK, Gurtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 953-63.

Carretto E, Barbarini D, Farina C, Grosini A, Nicoletti P, Manso E et al. Use of the DiversiLab semiautomated repetitive sequence based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 1-7.

Castanheira M, Wanger A, Kruzel M, Deshpande LM, Jones RN. Emergence and clonal dissemination of OXA-24-and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3179-80.

Catalán M, Aguado JM. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto universal. *Med Clin (Barc)* 2010; 135(9): 406-7.

Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, Di Martino A, Maimone SM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *J Hosp Infect* 1999; 42: 27-35.

Celenza G, Pellegrini C, Cascamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{PER-2} beta-lactamase genes in clinic isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 975-8.

Cercenado E, Cantón R. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2007. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>

Cercenado E, Cantón R. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005. <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>

Chait R, Craney A, Kishony R. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature* 2007; 446: 668-71.

Chan JD, Graves JA, Dellit TH. Antimicrobial treatment and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-

associated pneumonia. *J Intensive Care Med* 2010; 25: 343-8.

Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vanechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1632-9.

Chang HL, Tang CH, Hsu YM, Wan L, Chang YF, Lin CT et al. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30: 34-8.

Chang SC, Chen YC, Luh KT, Hsieh WC. In vitro activities of antimicrobial agents, alone and in combination, against *Acinetobacter baumannii* isolated from blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 23: 105-10.

Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40: 373-83.

Chen CH, Young TG, Huang CC. Predictive biomarkers for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with *bla* (TEM-1), AmpC-type *bla* and integrase 1 genotypes. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 372-9.

Chen HP, Chen TL, Lai CH, Fung CP, Wong WW, Yu KW, Liu CY. Predictors of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38: 127-36.

Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Luh KT. Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 2001; 120: 1072-7.

Chen T, Siu L, Lee Y, Chen C, Huang L, Wu RC et al. *Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic Infection. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2938-44.

Chen Z, Qiu S, Wang Y, Wang Y, Liu S, Wang Z et al. Coexistence of *bla*_{NDM-1} with the prevalent *bla*_{OXA23} and *bla*_{IMP} in pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 692-3.

Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol* 2007; 10(2): 309-19.

Choi JY, Park YS, Kim CO, Park YS, Yoon HJ, Shin SY et al. Mortality risk factors of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. *Intern Med J* 2005; 35: 599-603.

Chong YP, Jung KS, Lee KH, Kim MN, Moon SM, Park S et al. The bacterial etiology of community-acquired pneumonia in Korea: a nationwide prospective multicenter study. *Infect Chemother* 2010; 42: 397-403.

Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710-4.

Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY et al. Skin carriage of *Acinetobacter* in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2962-7.

Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 352-60.

Cisneros JM, Reyes MJ, Pachón J, Becerril B, Caballero FJ, García-Garmendía JL et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1026-32.

Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A et al. Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 874-9.

Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 245-51.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2012.

Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 2006a; 50: 756-8.

Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol* 2006b; 44: 3623-7.

Cooper TW, Pass SE, Brouse SD, Hall RG. Can pharmacokinetic and pharmacodynamic principles be applied to the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter*? *Ann Pharmacother* 2011; 45: 229-40.

Corbella X, Ariza J, Ardanuy C, Vuelta M, Tubau F, Sora M et al. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 793-802.

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: A last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 381-93.

Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899-900.

Corrigan KM, Harmis NY, Willcox MD. Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea* 2001; 20: 463-6.

Corvalán A, Aguayo F, Lévicán J, Corvalán I. Biología molecular en Infectología. Parte II: Diagnóstico molecular de agentes infecciosos. *Rev Chil Infect* 2003; 20(1): 26-38.

Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 629-35.

Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect* 2008; 68: 73-82.

- Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P.** Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1530-3.
- Costa SF, Woodcock J, Gill M, Wise R, Barone AA, Caiaffa H et al.** Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13: 175-82.
- Courvalin P.** Antimicrobial drug resistance: "prediction is very difficult, especially about the future." *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1503-6.
- D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W.** An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 588-91.
- D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, GRAB, Ballardini M et al.** Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 347-57.
- Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitao R et al.** Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 33-9.
- Da Silva GJ, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A.** Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 190-5.
- Da Silva GJ, Quinteira S, Bertolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A et al.** Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 255-8.
- Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL et al.** Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3403-6.
- Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P.** AdelJK, a resistance-nodulation cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(2): 557-62.
- D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P et al.** Characterization of PAbva01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3528-33.
- Danel F, Paetzel M, Strynadka NC, Page MG.** Effect of divalent metal cations on the dimerization of OXA-10 and -14 class D β -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 2001; 40: 9412-20.
- Danel F, Page MG, Livermore DM.** Class D beta-lactamases. En: R. A. Bonomo y M. E. Tolmasky (eds.). *Enzyme-mediated Resistance To Antibiotics: Mechanisms, Dissemination, And Prospects For Inhibition*. Washington, DC: ASM Press; 2007. 163-94
- Danes C, Navia MM, Ruíz J, Marco F, Jurado A, Jiménez de Anta MT et al.** Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) in the MICs of different beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 261-3.

- Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ.** Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1218-24.
- De Beaufort AJ, Bernards AT, Dijkshoorn L, van Boven CP.** *Acinetobacter junii* causes lifethreatening sepsis in preterm infants. *Acta Paediatr* 1999; 88: 772-5.
- DeBord G.** Descriptions of Mimeae trib. nov. with three genera and three species and two new species of Neisseria from conjunctivitis and vaginitis. *Iowa State Coll J Sci* 1942; 16: 471-80.
- DeBord G.** Organisms invalidating the diagnosis of gonorrhoeae by the smear method. *J Bacteriol* 1939; 38: 119-20.
- del Mar TM, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R et al.** Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5172-5.
- Devaud M, Kayser FH, Bachi B.** Transposon mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 323-9.
- Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R.** Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 197-201.
- Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S.** The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5(4): e10034.
- Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J et al.** Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1519-25.
- Dijkshoorn L, Aucken HM, Gerner-Smidt P, Kaufmann ME, Ursing J, Pitt TL.** Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 702-5.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H.** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 939-51.
- Dijkshoorn L, Van Aken E, Shunburne L, Van der Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A et al.** Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 329-32.
- Dijkshoorn L, Van Vianen W, Degener JE, Michel MF.** Typing of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated from hospital patients by cell envelope protein profiles. *Epidemiol Infect* 1987; 99: 659-67.
- Dijkshoorn L, Wubbels JL, Beunders AJ, Degener JE, Boks AL, Michel MF.** Use of protein profiles to identify *Acinetobacter calcoaceticus* in a respiratory care unit. *J Clin Pathol* 1989; 42: 853-7.
- Diomedi A.** Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil Infect* 2005; 22(4): 298-320.
- Dobrewski R, Savov E, Bernards AT, van den Barselaar M, Nordmann P, van den Broek PJ et al.** Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter*

baumannii isolates in a Bulgarian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1135-7.

Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4209-10.

Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 88-94.

Doi Y, Wachino J, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Shibayama K et al. Spread of novel aminoglycoside resistance gene *aac(6')*-Iad among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2075-80.

Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenicspacer sequences. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1108-13.

Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 196-9.

Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4188-93.

Dortet L, Legrand P, Soussy CJ, Cattoir V. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4471-8.

Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Colombo A, Guerra A, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemotherapy* 2004; 50: 202-10.

Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of beta-Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 160-201.

Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2568-76.

Dupont M, Pages JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 2005; 4: 2386-90.

Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS Jr et al. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993; 328: 21-8.

Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella TT, Agasino Ivy C et al. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2921-32.

Ehrenstein B, Bernardis AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2414-20.

Elliott JH, Anstey NM, Jacups SP, Fisher DA, Currie BJ. Community acquired pneumonia in northern Australia: low mortality in a tropical region using locally-

developed treatment guidelines. *Int J Infect Dis* 2005; 9: 15-20.

Endemiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, Hujer KM et al. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2211-4.

Endo S, Yano H, Hirakata Y, Arai K, Kanamori H, Ogawa M et al. Molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67, 1623-6.

Enoch DA, Summers C, Brown NM, Moore L, Gillham MI, Burnstein RM et al. Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. *J Hosp Infect* 2008; 70: 109-18.

Ermertcan S, Hosgor M, Tunger O, Cosar G. Investigation of synergism of meropenem and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains isolated from intensive care unit infections. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 818-21.

Eser OK, Ergin A, Tunçkanat F, Haşçelik G. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. *New Microbiol* 2008; 31: 535-42.

Espinal P, Macia MD, Roca I, Gato E, Ruíz E, Fernández-Cuenca F et al. First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to tn2006 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 589-91.

Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter*

baumannii on dry surfaces. *J Hosp Infect* 2012a; 80: 56-60.

Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* group by MALDI TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 2012b; 18: 1097-103.

Esterly JS, Griffith M, Qi C, Malczynski M, Postelnick MJ, Scheetz MH. Impact of carbapenem resistance and receipt of active antimicrobial therapy on clinical outcomes of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4844-9.

Evans BA, Brown S, Hamouda A, Findlay J, Amyes SG. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1137-8.

Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 268-75.

Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care* 2006a; 10(2): 48.

Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 630-6.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1121-2.

- Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T.** Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur J Clin Microbiol* 2007; 26: 857-68.
- Falagas ME, Kasiakou SK, Kofteridis DP, Ruditakis G, Samonis G.** Effectiveness and nephrotoxicity of intravenous colistin for treatment of patients with infections due to polymyxin-only-susceptible (POS) gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006d; 25: 596-9.
- Falagas ME, Kasiakou SK, Rafailidis PI, Zouglikis G, Morfou P.** Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy. *J Antimicrob Chemother* 2006c 57: 1251-4.
- Falagas ME, Kasiakou SK.** Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1333-41.
- Falagas ME, Kasiakou SK.** Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2274-5.
- Falagas ME, Kofteridis P, Siempos II.** Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. *Clin Infect Dis* 2006b; 43: 389.
- Falagas ME, Rafailidis PI.** Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care* 2007; 11: 134.
- Fantana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Testore GP, Leonardis F et al.** *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. *BMC Infect Dis* 2008; 79: 1-9.
- Feaver IM, Gray SJ, Urwin R, Russel JE, Bygraves JA, Kaczmarek EB et al.** Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3883-7.
- Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M et al.** Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla_{OXA}* genes among *Acinetobacter* spp. isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 274-8.
- Fernández E, Bustamante Z, Zamora J, Zabalaga S, Pinto J, Funes F et al.** Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínico de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba. *Biofarbo* 2009; 17: 30-8.
- Fernández-Cuenca F, Gómez-Sánchez M, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Vila J, Bou G et al.** Epidemiological and clinical features associated with colonisation/infection by *Acinetobacter baumannii* with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 235-8.
- Fernández-Cuenca F, López-Cortés LE, Rodríguez-Baño J.** Contribución del laboratorio de microbiología en la vigilancia y el control de brotes nosocomiales producidos por bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(Supl 3): 40-6.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A.** Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the

activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 565-74.

Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM et al. Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 267-71.

Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J et al. Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31(1): 4-9.

Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(6): 355-60.

Fernández-Mazarrasa C, Mazarrasa O, Calvo J, Del Arco A, Martínez-Martínez L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 827-9.

Ferreira AE, Marchetti DP, da Cunha GR, Moreira de Oliveira L, Fuentesfria DB, Dall Bello AG et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(6): 725-30.

Fierobe L, Lucet JC, Decré D, Muller-Serieys C, Deleuze A, Joly-Guillou ML et al. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 35-40.

Figueiredo S, Poirel L, Croizé J, Recule C, Nordmann P. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAbal-mediated overexpression of the natural *bla*_{OXA-66} oxacillinase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009a; 53: 2657-9.

Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of the naturally occurring *bla*_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAbal9. *Antimicrob Agents Chemother* 2009b; 53(9): 4045-7.

Figueiredo S, Poirel L, Seifert H, Mugnier P, Benhamou D, Nordmann P. OXA-134, a naturally occurring carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5372-5.

Fillaux J, Dubouis A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. Retrospective analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated during a 4-year period in a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 647-53.

Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1636-8.

Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 692-9.

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

- Francey T, Gaschen F, Nicolet J, Burnens AP.** The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 177-83.
- Friedland I, Stinson L, Ikaiddi M, Harm S, Woods GL.** Phenotypic antimicrobial resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*: results of a Multicenter Intensive Care Unit Surveillance Study, 1995-2000. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 245-50.
- Fritsche TR, Stilwell MG, Jones RN.** Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report (2003). *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 974-84.
- Gales AC, Jones RN, Sader HS.** Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2070-4.
- Gales AC, Jones RN, Sader HS.** Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54.731 clinical isolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 315-21.
- Gales AC, Reis AO, Jones RN.** Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 183-90.
- Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS.** Emergence of an IMP-like metallo enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 77-9.
- García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M.** Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit Care Med* 1999; 27: 1794-9.
- García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez FJ, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar AE et al.** Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 939-46.
- Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J.** Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med* 2003a; 31: 2478-82.
- Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R.** Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 332-9.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA et al.** *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med* 2005; 31: 649-55.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM et al.** Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis* 2003b; 36: 1111-8.

- Gaynes R, Edwards JR.** Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 848-54.
- Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W.** Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991; 37: 405-12.
- Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J.** Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 277-82.
- Gerner-Smidt P, Tjernberg I.** *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS* 1993; 101: 826-32.
- Gerner-Smidt P.** Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2680-5.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H.** Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 117-20.
- Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F et al.** Molecular Epidemiology of MultidrugResistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care Hospital in Naples, Italy, Shows the Emergence of a Novel Epidemic Clone. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1223-30.
- Gimeno C, Cantón R, García A, Gobernado M.** Actividad comparativa de doripenem, meropenem e imipenem en aislados recientes obtenidos durante el estudio de vigilancia epidemiológica Compact-España. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23: 144-52.
- Giordano A, Varesi P, Bertini A, Villa L, Dionisi AM, Venditti M et al.** Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb Drug Resist* 2007; 13: 37-43.
- Girlich D, Naas T, Nordmann P.** Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2043-8.
- Gkrania-Klotsas E, Hershov RC.** Colonization or infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* may be an independent risk factor for increased mortality. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1224-5.
- Gobernado M.** *Acinetobacter baumannii*. ¿Un oportunista fuera de lugar? *Med Clin (Barc)* 2011; 138(5): 204-6.
- Gombac F, Riccio ML, Rossolini GM, Lagatolla C, Tonin E, Monti-Bragadin C et al.** Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3665-8.
- González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez M.** Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 619-26.
- Göttig S, Pfeifer Y, Wichelhaus TA, Zacharowski K, Bingold T, Averhoff B et al.** Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 828-9.
- Gottlieb T, Barnes DJ.** Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia. *Aust N Z J Med* 1989; 19: 259-60.

- Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ.** Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1588-91.
- Gounden R, Bamford C, van Zyl-Smit R, Cohen K, Maartens G.** Safety and effectiveness of colistin compared with tobramycin for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 26.
- Goverman J, Weber JM, Keane TJ, Sheridan RL.** Intravenous colistin for the treatment of multi-drug resistant, gram-negative infection in the pediatric burn population. *J Burn Care Res* 2007; 28: 421-6.
- Graser Y, Klare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi HD et al.** Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2417-20.
- Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ.** Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2003; 47: 434-43.
- Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G, Schelotto F.** Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3838-41.
- Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H et al.** Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3071-7.
- Grupper M, Sprecher H, Mashiach T, Finkelstein R.** Attributable mortality of nosocomial *Acinetobacter* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 293-8.
- Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S et al.** Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 241-3.
- Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A.** Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* 2000; 49: 929-36.
- Guembe M, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Insa R, Bouza E.** Evolution of antimicrobial susceptibility patterns of aerobic and facultative gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections: results from the SMART studies 2003-2007. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21: 166-73.
- Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B.** Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 2009; 155: 2333-41.
- Hamouda A, Amyes SG.** Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 695-6.
- Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG.** Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2476-83.

- Hansen S, Stamm-Balderjahn S, Zuschneid I, Behnke M, Rüden H, Vonberg RP et al.** Closure of medical departments during nosocomial outbreaks: data from a systematic analysis of the literature. *J Hosp Infect* 2007; 65: 348-53.
- Harbottle H, White DG, McDermott PF, Walker RD, Zhao S.** Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2449-57.
- Hartstein AI, Morthland VH, Rourke JW Jr, Freeman J, Garber S, Sykes R et al.** Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* from intubated and mechanically ventilated patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990; 11: 531-8.
- Haseley SR, Pantophlet R, Brade L, Holst O, Brade H.** Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter junii* strain 65. *Eur J Biochem* 1997; 245: 477-81.
- Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S et al.** Microbial DNA typing by automated repetitive sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 199-207.
- Heinemann B, Wisplinghoff H, Edmond M, Seifert H.** Comparative activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against epidemiologically defined *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2211-3.
- Henriksen SD.** *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol Rev* 1973; 37: 522-61.
- Heo SM, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA.** Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1562-70.
- Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P.** A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother* 2005c. 55: 115-8.
- Héritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P.** Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 268-73.
- Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Clavier JM, Raoult D, Nordmann P.** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a. 49(10): 4174-9.
- Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P.** Contribution of acquired carbapenem-hydrolysing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005b; 49: 3198-202.
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P.** Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS_{Aba1} in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 123-30.
- Hernández-Torres A, García E, Yagüe G, Gómez J.** *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23(1): 12-9.

Heym B, Le Moal M, Armand-Lefevre L, Nicolas-Chanoine MH. Multilocus sequence typing (MLST) shows that 'Iberian' clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 323-9.

Higgins P, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 233-8.

Higgins P, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5035-8.

Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a Novel Class D β -Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(5): 2121-6.

Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1199-201.

Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004b; 48: 1586-92.

Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2004a; 54: 821-3.

Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 494-5.

Holloway KP, Roupael NG, Wells JB, King MD, Blumberg HM. Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. *Ann Pharmacother* 2006; 40: 1939-45.

Horrevorts A, Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1567-72.

Houang ET, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC et al. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 228-34.

Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo-beta-lactamase (*bla_{IMP-4}*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1382-90.

Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2441-3.

Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3222-7.

- Hsueh PR, Kuo LC, Chang TC, Lee TF, Teng SH, Chuang YC et al.** Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Blood Isolates of *Acinetobacter* Species. *J Clin Microbiol* 2014; 52(8): 3095-100.
- Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, Chen WH, Yu CJ, Ho SW et al.** Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 827-32.
- Hu WS, Yao SM, Fung CP, Hsieh YP, Liu CP, Lin JF.** An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3844-52.
- Huang L, Sun L, Xu G, Xia T.** Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62: 326-32.
- Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR et al.** Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2941-8.
- Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ et al.** Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4114-23.
- Huys G, Cnockaert M, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S, Vaneechoutte M et al.** Repetitive-DNA-element PCR fingerprinting and antibiotic resistance of pan-European multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clone III strains. *J Med Microbiol* 2005b; 54: 851-6.
- Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, Woodford N, Nemec A, Dijkshoorn L et al.** Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res Microbiol* 2005a. 156: 348-55.
- Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ et al.** Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2616-25.
- Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH.** The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118: 146-55.
- Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P et al.** Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*_{VIM-1} metallo-beta-lactamase gene. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5344-7.
- Insa R, Cercenado E, Goyanes MJ, Morente A, Bouza E.** In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 583-5.
- Jacquier H, Carbonnelle E, Corvec S, Illiaquer M, Le Monnier A, Bille E et al.** Revisited distribution of nonfermenting gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(12): 1579-86

- Jamal W, Albert MJ, Rotimi VO.** Real time comparative evaluation of bioMerieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laserdesorption ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for Identification of Clinically significant bacteria. *BMC Microbio* 2014; 30; 14: 289.
- Jamal W, Salama M, Dehrab N, Al Hashem G, Shahin M, Rotimi VO.** Role of tigecycline in the control of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2009; 72: 234-42.
- Jankowski S, Grzybek-Hryniewicz K, Fleischer M, Walczuk M.** Susceptibility of isolates of *Acinetobacter anitratus* and *Acinetobacter Iwoffii* to the bactericidal activity of normal human serum. *FEMS Microbiol Immunol* 1992; 4: 255-60.
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P et al.** Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 1996; 142: 1881-93.
- Janssen P, Dijkshoorn L.** High resolution DNA fingerprinting of *Acinetobacter* outbreak strains. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 142: 191-4.
- Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K et al.** Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 1179-87.
- Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM.** Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2353-8.
- Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM.** Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2881-7.
- Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM.** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 1938-41.
- Jazani NH, Zartoshti M, Babazadeh H, Ali-daiee N.** Antibacterial effects of Artemisia dracunculus essential oil on multi-drug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Bacteriol J* 2011; 1: 31-6.
- Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ et al.** Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *J Microbiol* 2006; 44: 423-31.
- Jerassy Z, Yinnon AM, Mazouz-Cohen S, Benenson S, Schlesinger Y, Rudensky B et al.** Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. *J Hosp Infect* 2006; 62: 230-6.
- Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Becerril B, Palomino-Nicas J, Rodríguez-Cobacho A, Revuelta M.** Treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 932-5.
- Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK.** Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis* 2007a; 45: 409-15.
- Johnson KJ, Arduino SM, Stine OC, Johnson JA, Harris AD.** Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2007b; 45: 3707-12.

- Joly-Guillou ML, Wolff M, Farinotti R, Bryskier A, Carbon C.** In vivo activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 827-30.
- Joly-Guillou ML.** Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 868-73.
- Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP.** Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit. A European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3: 14.
- Jones ME.** In-vitro profile of a new beta-lactam, ceftobiprole, with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(2): 17-24.
- Jones RN, Ferraro MJ, Reller LB, Schreckenberger PC, Swenson JM, Sader HS.** Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 227-30.
- Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL et al.** Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3589-96.
- Jung R, Husain M, Choi MK, Fish DN.** Synergistic activities of moxifloxacin combined with piperacillin-tazobactam or cefepime against *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1055-7.
- Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L.** NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother* 2011. 66: 1260-2.
- Kallel H, Bahloul M, Hergafi L, Akrouf M, Ketata W, Chelly H et al.** Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 366-9.
- Karageorgopoulos DE, Falagas ME.** Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 751-62.
- Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø.** Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 738-44.
- Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø.** Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 2012; 15: 237-47.
- Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P.** Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2253-4.
- Kau HC, Tsai CC, Kao SC, Hsu WM, Liu JH.** Corneal ulcer of the side port after phacoemulsification induced by *Acinetobacter baumannii*. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 895-7.
- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M et al.** Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-

assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012; 7:e31676.

Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 105-14.

Kennedy PJ, Haertsch PA, Maitz PK. The Bali burn disaster: implications and lessons learned. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 125-31.

Kiffer CR, Sampaio JL, Sinto S, Oplustil CP, Koga PC, Arruda AC et al. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 317-22.

Kim D, Baik KS, Kim MS, Park SC, Kim SS, Rhee MS, et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J Microbiol* 2008b; 46: 396-401.

Kim JW, Heo ST, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23}, *bla*_{PER-1} and *armA* in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008a; 14: 716-8.

Kim SY, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2798-801.

Kluytmans-Vandenberg MFQ, Kluytmans JAJW, Voss A. Dutch guideline for preventing nosocomial transmission of highly resistant microorganisms (HRMO). *Infection* 2005; 33(5-6): 309-13.

Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine

Acinetobacter pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 122-9.

Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1163-7.

Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL et al. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 393-5.

Ko WC, Lee NY, Su SC, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Wang LR, et al. Oligonucleotide array-based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2052-9.

Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandebroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2522-9.

Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandebroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J Clin Microbiol* 2001b; 39: 8-13.

Koeleman JG, van der Bijl MW, Stoof J, Vandebroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001a; 22: 284-8.

- Koh TH, Sng L, Yeng Wang G, Hsu L, Zhao Y.** IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 627-32.
- Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ.** Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115: 462-74.
- Konstantinos TK, Alban R, James TM.** Toward a more robust assessment of intraspecies diversity using fewer genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 7286-93.
- Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V.** Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 402-6.
- Kroeger LA, Hovde LB, Mitropoulos IF, Schafer J, Rotschafer JC.** Colistin methanesulfonate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3431-3.
- Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N et al.** Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 114-8.
- Kwa AL, Loh C, Low JG, Kurup A, Tam VH.** Nebulized colistin in the treatment of pneumonia due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 754-7.
- Kwon KT, Oh WS, Song JH, Chang HH, Jung SI, Kim SW et al.** Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 525-30.
- La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D.** Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 827-832.
- Landman D, Butnarius M, Bratu S, Quale J.** Genetic relatedness of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Epidemiol Infect* 2008; 137: 174 80.
- Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J et al.** Citywide clonal outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. The preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1515-20.
- Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K et al.** Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 305-12.
- Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M et al.** Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol* 2005b; 157: 360-6.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.** Modified hodge and edta-disk synergy tests to screen metallo beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7: 88-91.
- Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ et al.** Metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean

Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 51-8.

Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH et al. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009a; 33: 520-4.

Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003a; 9: 868-71.

Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y et al. Evaluation of the hodge test and the imipenem-edta double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003b; 41: 4623-9.

Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J* 2011b; 52: 879-91.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a; 49: 4485-91.

Lee SY, Shin JH, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based VITEK MS System for the Identification of *Acinetobacter* Species from Blood Cultures: Comparison with VITEK 2 and MicroScan Systems. *Ann Lab Med* 2015; 35: 62-8.

Lee SY, Shin JH, Park KH, Kim JH, Shin MG, Suh SP et al. Identification, genotypic relation, and clinical features of colistin-resistant isolates of *Acinetobacter* genomic species 13BJ/14TU from bloodstreams of patients in a university hospital. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 931-9.

Lee Y, Lee J, Jeong SH, Lee J, Bae IK, Lee K. Carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* of sequence type 92 or its single-locus variants with a G428T substitution in zone 2 of the *rpoB* gene. *J Antimicrob Chemother* 2011c; 66: 66-72.

Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Lee PI et al. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *J Antimicrob Chemother* 2011a; 66: 1839-46.

Lee YT, Turton JF, Chen TL, Wu RC, Chang WC, Fung CP et al. First identification of *bla*_{OXA-51-like} in non *baumannii* *Acinetobacter* spp. *J Chemother* 2009b; 21: 514-20.

LeGall JR, Loirat P, Alperovitch A. APACHE II-a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1986; 14: 754-5.

Lemoigne M, Girard H, Jacobelli G. Soil bacteria easily utilizing 2-3, butanediol. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1952; 82: 389-98.

Léon G, Quiroga C, Centrón D, Roy PH. Diversity and strength of internal outward-oriented promoters in group IIC-attC introns. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(22): 8196-8207.

Lessel EF. Subcommittee on nomenclature of *Moraxella* and allied bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1971; 21: 213-4.

Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a

distinct clinical syndrome. *Chest* 2006; 129: 102-9.

Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1008-11.

Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 58-62.

Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CR, Rodriguez E et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 366-8.

Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 144-53.

Levy J, Oshry T, Rabinowitz R, Lifshitz T. *Acinetobacter* corneal graft ulcer and endophthalmitis: report of two cases. *Can J Ophthalmol* 2005; 40: 79-82.

Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 11-25.

Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006b; 6: 589-601.

Li J, Nation RL, Turnidge JD. Defining the dosage units for colistin methanesulfonate: urgent need for international harmonization. *Antimicrob Agents Chemother* 2006c; 50: 4231.

Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006a; 50: 2946-50.

Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 902-5.

Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4776-8.

Lin SY, Wong WW, Fung CP, Liu CE, Liu CY. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex bacteremia: analysis of 82 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 1998; 31: 119-24.

Lindbohm N, Moilanen JA, Vesaluoma MH, Tervo TM. *Acinetobacter* and *Staphylococcus aureus* ulcerative keratitis after laser in situ keratomileusis treated with antibiotics and phototherapeutic keratectomy. *J Refract Surg* 2005; 21: 404-6.

Liu SY, Lin JY, Chu C, Su LH, Lin TY, Chiu CH. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 81-4.

Livermore D, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006; 14: 413-8.

- Livermore DM.** Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 611-4.
- Loh LC, Yii CT, Lai KK, Seevaunnamtum SP, Pushparasah G, Tong JM.** *Acinetobacter baumannii* respiratory isolates in ventilated patients are associated with prolonged hospital stay. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 597-8.
- Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP.** Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2941-5.
- Loli A, Tzouveleki LS, Gianneli D, Tzelepi E, Miriagou V.** Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem-EDTA synergy tests. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1894-6.
- López-Cerero L.** Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32(7): 459-64.
- López-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM.** Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a Hospital in Northern Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4741-3.
- Lortholary O, Fagon JY, Hoi AB, Slama MA, Pierre J, Giral P et al.** Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 790-6.
- Lu P, Huang L, Lian S, Chang K, Lin C, Hwang I et al.** How carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* established in a newly constructed hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 463-6.
- Lu PL, Doumith M, Livermore D, Chen TP, Woodford N.** Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 641-7.
- Luo L, Jiang X, Wu Q, Wei L, Li J, Ying C.** Efflux pump overexpression in conjunction with alternation of outer membrane protein may induce *Acinetobacter baumannii* resistant to imipenem. *Chemotherapy* 2011; 57: 77-84.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(3): 268-81.
- Magnet S, Courvalin P, Lambert T.** Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3375-80.
- Mahgoub S, Ahmed J, Glatt AE.** Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. *Am J Infect Control* 2002; 30: 386-90.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R et al.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3140-5.
- Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J.** Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide

prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 101-6.

Manji R, Bythrow M, Branda JA, Burnham CA, Ferraro MJ, Garner OB et al. Multi-center evaluation of the VITEK® MS system for mass spectrometric identification of non *Enterobacteriaceae* Gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 337-46.

Mannheim W, Stenzel W. Zur Systematik der obligat aeroben gram-negativen Diplo bakterien des Menschen. *Zentralbl. Bakteriol* 1962; 198: 55-83.

Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P. Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2008; 14: 289-92.

Maragakis LL, Cosgrove SE, Song X, Kim D, Rosenbaum P, Ciesla N et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *JAMA* 2004; 292: 3006-11.

Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1254-63.

Marais E, de Jong G, Ferraz V, Maloba B, Duse AG. Interhospital transfer of pan-resistant *Acinetobacter* strains in Johannesburg, South Africa. *Am J Infect Control* 2004; 32: 278-81.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system.

Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3298-304.

Markogiannakis A, Fildis G, Tsiplakou S, Ikonomidis A, Koutsoukou A, Pournaras S et al. Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29(5): 410-7.

Markou N, Apostolakis H, Koumoudiou C, Athanasiou M, Koutsoukou A, Alamanos I et al. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care* 2003; 7: R78-R83.

Marqué S, Poirel L, Héritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R et al. Regional occurrence of plasmid mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4885-8.

Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Rodríguez-Baño J, Bou G et al. Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(2): 77-80.

Martí S, Sánchez-Céspedes J, Blasco MD, Espinal P, Ruíz M, Alba V et al. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008b; 61: 468-70.

Martí S, Sánchez-Céspedes J, Blasco MD, Ruíz M, Espinal P, Alba V et al. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* genospecies 3 clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008a; 52: 2966-8.

- Martínez-Lamas L, Constenla-Caramés L, Otero-Fernández S, Álvarez-Fernández M.** Nuevo clon de *Acinetobacter baumannii* ST187 responsable de un brote en una unidad de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32(4): 242-5.
- Martínez-Martínez L, Calvo J.** El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(Supl 2): 25-31
- Martínez-Pellús A, Ruíz J, Sánchez FJ, Simarro E, Fernández JA.** Incidencia de colonización e infección de *Acinetobacter baumannii* en una UCI con situación de epidemia. Análisis de factores de riesgo mediante un estudio de vigilancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 194-9.
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD.** Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 153-64.
- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW.** The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-78.
- McConnell MJ, Domínguez-Herrera J, Smani Y, López-Rojas R, Docobo-Pérez F, Pachón J.** Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 2011; 79: 518-26.
- McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR.** Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1133-7.
- Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN.** Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: Report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 55-9.
- Menon T, Shanmugasundaram S, Nandhakumar B, Nalina K, Balasubramaniam.** Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex-a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 2006; 49: 576-8.
- Meric M, Kasap M, Gacar G, Budak F, Dundar D, Kolayli F et al.** Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 282: 214-8.
- Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F et al.** OXA-24 carbapenemase gene flanked by Xerc/Xerd-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(6): 2724-7.
- Merkier A, Catalano M, Ramirez M, Quiroga C, Orman B, Ratier L et al.** Polyclonal spread of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Developing Countries* 2008; 2(3): 235-40.
- Merkier AK, Centrón D.** *bla*_{OXA-51}-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 110-3.
- Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B.** *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* 2007b; 60: 197-9.

- Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B.** Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. *Int J Antimicrob Agents* 2007a; 29: 112-3.
- Michalopoulos A, Kasiakou SK, Mastora Z, Rellos K, Kapaskelis AM, Falagas ME.** Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Crit Care* 2005b; 9: R53-R59.
- Michalopoulos AS, Tsiodras S, Rellos K, Mentzelopoulos S, Falagas ME.** Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 2005a; 11: 115-21.
- Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A.** The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 177-84.
- Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J 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.
- Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J et al.** Efficacy of colistin versus betalactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1946-52.
- Monterrubio-Villar J, González-Velasco C, Valdezate-Ramos S, Córdoba-López A, Villalón-Panzano P, Saéz-Nieto JA.** Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: Clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1281-4.
- Mostachio AK, Heidjen IV, Rossi F, Levin AS, Costa SF.** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding OXA and metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1552-4.
- Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, Nejmi H, Benslama A, Elmdaghri N et al.** Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect* 2006; 53: 274-8.
- Mugnier P, Poirel L, Pitout M, Nordmann P.** Carbapenem resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 879-82.
- Mugnier PD, Bindayna KM, Poirel L, Nordmann P.** Diversity of plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Kingdom of Bahrain. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1071-3.
- Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 35-40.
- Mulvey MR, Boyd DA, Baker L, Mykytczuk O, Reis EM, Asensi MD et al.** Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase (*bla*_{OXA-53}) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac*(6')-I30]. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 354-9.

- Murray CK, Hospenthal DR.** Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter*. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 502-6.
- Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Dooley DP, Wenner K, Hammock J et al.** Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Mil Med* 2006; 171: 826-9.
- Musa EK, Desai N, Casewell MW.** The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J Hosp Infect* 1990; 15: 219-27.
- Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM.** Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. With characterized beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1313-9.
- Mushtaq S, Warner M, Ge Y, Kaniga K, Livermore DM.** In vitro activity of ceftaroline (PPI-0903M, T-91825) against bacteria with defined resistance mechanisms and phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 300-11.
- Mussi MA, Limansky AS, Viale AM.** Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1432-40.
- Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Delgheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P.** Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006a; 58: 178-82.
- Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C et al.** VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* 2006b; 12: 1214-22.
- Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P.** Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4826-9.
- Naas T, Namdari F, Réglie-Poupet H, Poyart C, Nordmann P.** Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York city. *J Antimicrob Chemother* 2007b; 60: 1174-6.
- Naas T, Nordmann P, Heidt A.** Inter-country transfer or PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. *Inter J Antimicrob Agents* 2007a; 29: 226-8.
- Naas T, Nordmann P.** OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 865-79.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl. 1): 42-52.
- Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y.** Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3978-84.
- National Institutes of Health.** Partnerships to improve diagnosis and treatment of selected drug-resistant healthcare-associated infections (U01). RFA-AI-06-036. National Institutes of Health, Bethesda, MD. 2006.
- Navia MM, Ruíz J, Vila J.** Characterization of an integron carrying a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter*

baumannii. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 261-5.

Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 772-4.

Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vanechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1891-9.

Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJ et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 1563-7.

Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2004b; 53: 147-53.

Nemec A, Dolzani L, Brisse S, Van Den BP, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004a; 53: 1233-40.

Nemec A, Janda L, Melter O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 1999; 48: 287-96.

Nemec A, Krízová L, Maixnerová M, Diancourt L, van der Reijden TJK, Brisse S et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European

clone II. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 484-9.

Nemec A, Krízová L, Maixnerová M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* 2011; 162: 393-404.

Nemec A, Maixnerová M, van der Reijden TJ, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 483-9.

Nemec A, Musílek M, Maixnerová M, De Baere T, van der Reijden TJ, Vanechoutte M et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59: 118-24.

Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37: 102-9.

Nguyen MH, Harris SP, Muder RR, Pasculle AW. Antibiotic-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients. *Neurosurgery* 1994; 35: 851-5.

Nigro SJ, Hall, R. M. Tn6167, an antibiotic resistance island in an Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* GC2, ST92 isolate. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1342-6.

Nishimura Y, Ino T, Iizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int J Syst Bacteriol* 1988; 38: 209-11.

- Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T et al.** Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5256-63.
- Noguchi JK, Gill MA.** Sulbactam: a beta-lactamase inhibitor. *Clin Pharm* 1988; 7: 37-51.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L.** Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791-8.
- Nordmann P, Poirel L.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-31.
- Nordmann, P.** *Acinetobacter baumannii*, the nosocomial pathogen par excellence. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52: 301-3.
- Nowak P, Paluchowska P, Budak A.** Distribution of *bla*_{OXA} genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol* 2012; 35: 317-25.
- Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC.** Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative gram-negative bacteria. *Indian J Med Res* 2009; 129: 707-12.
- Núñez ML, Martínez-Toldos MC, Bru M, Simarro E, Segovia M, Ruíz J.** Appearance of resistance to meropenem during the treatment of a patient with meningitis by *Acinetobacter*. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 421-3.
- O'Neill E, Humphreys H, Phillips J, Smyth EG.** Third generation cephalosporin resistance among gram-negative bacilli causing meningitis in neurosurgical patients: significant challenges in ensuring effective antibiotic therapy. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 356-9.
- Obana Y, Nishino T.** In-vitro and in-vivo activities of sulbactam and YTR830H against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 677-82.
- Obara M, Nakae T.** Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 791-800.
- Okabe S, Oshiki M, Kamagata Y, Yamaguchi N, Toyofuku M, Yawata Y et al.** A great leap forward in microbial ecology. *Microbes Environ* 2010; 25: 230-40.
- Olive D M, Bean P.** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-9.
- Olut AI, Erkek E.** Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 919-21.
- Omair M, Usman J, Kaleem F, Hassan A, Khalid A, Fahim Q.** Evaluation of combined disc method for the detection of metallo-beta-lactamase producing Gram negative bacilli. *Malays J Microbiol* 2012; 8: 21-5.
- Onarheim H, Hoivik T, Harthug S, Digraanes A, Mylvaganam H, Vindenes HA.** Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2000; 120: 1028-33.
- Oncül O, Keskin O, Acar HV, Küçükardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM et al.** Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect* 2002; 51: 47-51.

- Ong CW, Lye DC, Khoo KL, Chua GS, Yeoh SF, Leo YS et al.** Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: An emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. *Respirology* 2009; 14: 1200-5.
- Opazo A, Mella S, Domínguez M, Bello H, González G.** Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Rev Chil Infect* 2009; 26: 499-503.
- Orquídea J, Montilla R, Valenzuela E, Fernández F, Álvarez C, Osorio E.** Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio* 2006; 10: 71-8.
- Oteo J, García-Estébanez C, Migueláñez S, Campos J, Martí S, Vila J et al.** Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *J Infect* 2007; 55: 260-6.
- Ouderkirk JP, Nord JA, Turett GS, Kislak JW.** Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2659-62.
- Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D.** In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 473-7.
- Owens RC Jr, Rice L.** Hospital-based strategies for combating resistance. *Clin Infect Dis* 2006; 42(Suppl. 4): S173-81.
- Pachón-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Docobo-Pérez F, Pachón J, Pascual A.** Prevention of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 689-92.
- Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachón J.** Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4479-81.
- Palabiyikoglu I, Tekeli E, Cokca F, Akan O, Unal N, Erberktas I et al.** Nosocomial meningitis in a university hospital between 1993 and 2002. *J Hosp Infect* 2006; 62: 94-7.
- Palmen R, Hellingwerf KJ.** Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*-a review. *Gene* 1997; 192: 179-90.
- Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M, Tsaganos T, Dontas I, Koutoukas P et al.** Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 51-5.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr.** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1): 1-34.
- Papa A, Koulourida V, Souliou E.** Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek Hospital. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 257-60.
- Park S, Kim HS, Lee KM, Yoo JS, Yoo JI, Lee YS, Chung GT.** Molecular and epidemiological characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in non-tertiary Korean hospitals. *Yonsei Med J* 2013; 54(1): 177-82.
- Park YK, Jung S, Park K, Cheong HS, Peck KR, Song J et al.** Independent emergence

of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 43-52.

Park YS, Lee H, Lee KS, Hwang SS, Cho YK, Kim HY et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases—a multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 430-5.

Pasterán F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3222-4.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.

Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB. ARI-1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; 2: 81-8.

Paul G, Joly-Guillou ML, Bergogne-Bérézin E, Nénot P, Philippon A. Novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. anitratus. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 59: 45-50.

Peixe L. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2109-10.

Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007b; 51: 2065-9.

Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P. Inter-country transfer of gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58

carbapenem-hydrolyzing enzymes. *J Antimicrob Chemother* 2006b; 57: 794-5.

Peleg AY, Franklin C, Bell J, Spelman DW. Emergent of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* recovered from blood cultures in Australia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006c; 27: 759-61.

Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006a; 50: 399-400.

Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Robert C, Moellering RC Jr et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2605-9.

Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother* 2007a; 59: 128-31.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 538-82.

Pérez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3471-84.

Perilli M, Felici A, Oratore A, Cornaglia G, Bonfiglio G, Rossolini GM et al. Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 715-9.

Petersen K, Riddle MS, Danko JR, Blazes DL, Hayden R, Tasker SA et al. Trauma-related infections in battlefield casualties from Iraq. *Ann Surg* 2007; 245: 803-11.

Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT. In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylicline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 738-44.

Petrosillo N, Chinello P, Proietti MF, Cecchini L, Masala M, Franchi C et al. Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 682-3.

Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M, López F. Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: estudio VIRA 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 617-28.

Piechaud D, Piechaud M, Second L. Etude de 26 souches de *Moraxella lwoffii*. *Ann Inst Pasteur* 1951; 80: 97-9.

Pinzón JO, Mantilla JR, Valenzuela EM. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infect* 2006; 10: 78-85.

Pittet D. The Lowbury lecture: behaviour in infection control. *J Hosp Infect* 2004; 58: 1-13.

Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect* 2007; 65: 204-11.

Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase *bla*_{PER-1} gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005b; 49: 1708-13.

Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Nordmann P. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007a; 51: 2179-84.

Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2008a; 52: 1252-6.

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15-22.

Poirel L, Lebessi E, Héritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1138-41.

Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother* 2008b; 52: 1613-7.

Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a; 49: 202-8.

- Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P.** Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3542-7.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 24-38.
- Poirel L, Nordmann P.** Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3: 117-27.
- Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006a; 12: 826-36.
- Poirel L, Nordmann P.** Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006b; 50: 1442-8.
- Poirel L, Pitout JD, Nordmann P.** Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007b; 2: 501-12.
- Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN et al.** Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(3): 557-61.
- Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH.** Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1106-9.
- Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R.** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 214-20.
- Queenan A, Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.
- Queenan AM, Shang W, Kania M, Page MG, Bush K.** Interactions of ceftobiprole with beta-lactamases from molecular classes A to D. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3089-95.
- Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L.** Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3465-6.
- Rahal JJ.** Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl. 2): S95-9.
- Rattanaumpawan P, Lorsutthitham J, Ungprasert P, Angkasekwinai N, Thamlikitkul V.** Randomized controlled trial of nebulized colistimethate sodium as adjunctive therapy of ventilator-associated pneumonia caused by Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2645-9.
- Reid GE, Grim SA, Aldeza CA, Janda WM, Clark NM.** Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy* 2007; 27: 1198-201.
- Reina R, Estenssoro E, Saenz G, Canales HS, Gonzalvo R, Vidal G et al.** Safety and efficacy of colistin in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* infections: a prospective

cohort study. *Intensive Care Med* 2005; 31: 1058-65.

Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1018-29.

Reis AO, Luz DA, Tognim MC, Sader HS, Gales AC. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1025-7.

Rhomberg PR, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. Clonal occurrences of multidrug-resistant gram-negative bacilli: report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Surveillance Program in the United States (2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 249-57.

Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 414-26.

Ribera A, Roca I, Ruíz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the *tet(A)* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003a; 52: 477-80.

Ribera A, Ruíz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 697-8.

Ribera A, Ruíz J, Vila J. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003b; 47: 2310-2.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R et al. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC- 54/97 reveals the existence of *bla_{IMP}* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1229-35.

Rice LB. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl. 2): 100-5.

Richet H, Fournier PE. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: A major threat worldwide. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 645-6.

Richet HM, Mohammed J, McDonald LC, Jarvis WR. Building communication networks: international network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 319-22.

Rizos I, Tsiodras S, Papathanasiou S, Rigopoulos A, Barbetseas J, Stefanadis C. Prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter* spp: a rare case and literature review. *Am J Med Sci* 2007; 333: 197-9.

Robenshtok E, Paul M, Leibovici L, Fraser A, Pitlik S, Ostfeld I et al. The significance of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia compared with *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: risk factors and outcomes. *J Hosp Infect* 2006; 64: 282-7.

Robledo I, Aquino E, Sante M, Santana J, Otero D, Leon C et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1354-7.

- Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J.** The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol* 2012; 3: 148.
- Rodloff AC, Leclercq R, Debbia EA, Cantón R, Oppenheim BA, Dowzicky MJ.** Comparative analysis of antimicrobial susceptibility among organisms from France, Germany, Italy, Spain and the UK as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 307-14.
- Rodríguez-Baño J, García L, Ramírez E, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Fernández-Cuenca F et al.** Long term control of hospital wide endemic multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive “bundle” approach. *Am J Infect Control* 2009; 37: 715-22.
- Rodríguez-Baño J, Pascual A, Galvez J, Muniain MA, Rios MJ, Martínez-Martínez L et al.** *Acinetobacter baumannii* bacteremia: clinical and prognostic features. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 242-7.
- Rodríguez-Baño J.** Nosocomial bacteriemia due to *Acinetobacter baumannii*. *Rev Med Microbiol* 1999; 10: 67-77.
- Rodríguez-Hernández MJ, Cuberos L, Pichardo C, Caballero FJ, Moreno I, Jiménez-Mejías ME et al.** Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 479-82.
- Rodríguez-Hernández MJ, Jiménez-Mejías ME, Pichardo C, Cuberos L, García-Curiel A, Pachón J.** Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 581-4.
- Rossau R, van Landschoot A, Gillis M, de Ley J.** Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 310-9.
- Roussel-Delvallez M, Wallet F, Delpierre F, Courcol RJ.** In vitro bactericidal effect of a beta-lactam+aminoglycoside combination against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother* 1996; 8: 365-8.
- Ruiz J, Navia MM, Casals C, Sierra JM, Jiménez de Anta MT, Vila J.** Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 907-11.
- Ruiz M, Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascua I A, Vila J.** High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and un-related *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2007b; 13: 1192-8.
- Ruiz M, Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascua IA, Vila J.** Prevalence of IS*Aba1* in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2007a; 274: 63-6.
- Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC et al.** Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3084-90.
- Runnegar N, Sidjabat H, Sharon Goh HM, Nimmo GR, Schembri MA, Paterson DL.** Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a

Single Institution over a 10-Year Period. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11): 4051-6.

Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1001-4.

Saballs M, Pujol M, Tubau F, Peña C, Montero A, Domínguez MA et al. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 697-700.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005a; 25: 57-61.

Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. In vitro activity of beta-lactam antimicrobial agents in combination with aztreonam tested against metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother* 2005b; 17: 622-7.

Saeed S, Fakhri MG, Riederer K, Shah AR, Khatib R. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 981-3.

Salvador C, Yagüe G, Blázquez A, García-Palenciano C, Andreu E, Roig M et al. Colonization and infection of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Comunicación presentada en Congreso Europeo de Microbiología Clínica y

Enfermedades Infecciosas. 25-28 Abril 2015. Copenhagen, Dinamarca.

Savov E, Chankova D, Vatcheva R, Dinev N. In vitro investigation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens to ampicillin/sulbactam alone and in combination with amikacin. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 390-2.

Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 585-6.

Schaub IG, Hauber FD. A biochemical and serological study of a group of identical unidentifiable gram-negative bacilli from human sources. *J Bacteriol* 1948; 56: 379-85.

Schulte B, Goerke C, Weyrich P, Grobner S, Bahrs C, Wolz C et al. Clonal spread of meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in hospitals in the Mediterranean region and transmission to south-west Germany. *J Hosp Infect* 2005; 61: 356-7.

Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulsten E et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-*calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1577-84.

Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 598.

Segal H, Garry S, Elisha BG. Is IS_{ABA-1} customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243: 425-9.

- Segal H, Nelson EC, Elisha BG.** Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 612-4.
- Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G.** Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993a; 37: 750-3.
- Seifert H, Boullion B, Schulze A, Pulverer G.** Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994b; 15: 520-8.
- Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vanechoutte M.** Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2819-25.
- Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Reijden T, Strijen B, Stefanik D et al.** Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4328-35.
- Seifert H, Gerner-Smidt P.** Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1402-7.
- Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G.** Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1994c; 32: 82-6.
- Seifert H, Stefanik D, Wisplinghoff H.** Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically defined multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1099-100.
- Seifert H, Strate A, Pulverer G.** Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 1995; 74: 340-9.
- Seifert H, Strate A, Schulze A, Pulverer G.** Bacteremia due to *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *Infection* 1994a; 22: 379-85.
- Seifert H, Strate A, Schulze A, Pulverer G.** Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): report of 13 cases. *Clin Infect Dis* 1993b; 17: 632-6.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM et al.** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 543-51.
- Severino P, Magalhaes VD.** Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 156-62.
- Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM.** First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57: 493-5.
- Seward RJ, Lambert T, Towner KJ.** Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 1998; 47: 455-62.
- Seward RJ, Towner KJ.** Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: 248-54.

- Seward RJ.** Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 308-18.
- Shelburne SA, Singh KV, Clinton-White A, Byrne L, Carmer A, Austin C et al.** Sequential outbreaks of infections by distinct *Acinetobacter baumannii* strains in a public teaching hospital in Houston, Texas. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 198-205.
- Sheng WH, Liao CH, Lauderdale TL, Ko WC, Chen YS, Liu JW et al.** A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect Dis* 2010; 14(9): e764-9.
- Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K et al.** PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407-13.
- Shirawi NA, Memish ZA, Cherfan A, Shimemeri AA.** Post-neurosurgical meningitis due to multidrug resistant *Acinetobacter* treated with intratecal colistina: case report and review of the literature. *J Chemother* 2006; 18: 554-8.
- Siegmán-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A, Avram J.** Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 843-9.
- Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS.** Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gramnegative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 847-51.
- Silva J, Carmen A, Avello C, Matamoro F, Villagra L, Rojas et al.** Resistencia a antimicrobianos en diferentes biotipos de *Acinetobacter baumannii* aislados en el norte de Chile. *Rev Med Chile* 1999; 127: 1-6.
- Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gómez M et al.** An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 261-7.
- Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Van Dorselaer A et al.** Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res* 2006; 5: 3385-98.
- Siroy A, Molle V, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ et al.** Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4876-83.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA.** Approved list of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420.
- Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M et al.** New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 2007; 21: 601-14.
- Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C et al.** Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the

investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1193-202.

Sobieszczyk ME, Furuya EY, Hay CM, Pancholi P, Della-Latta P, Hammer SM et al. Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant gram-negative respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 566-9.

Song JY, Kee SY, Hwang IS, Seo YB, Jeong HW, Kim WJ et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 317-22.

Spanu T, De Carolis E, Fiori B, Sanguinetti M, D'Inzeo T, Fadda G et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to *rpoB* gene sequencing for species identification of bloodstream infection *Staphylococcal* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 44-9.

Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against betalactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 927-37.

Spence RP, Van der Reijden TJK, Dijkshoorn L, Towner KJ. Comparison of *Acinetobacter baumannii* Isolates from United Kingdom Hospitals with Predominant Northern European Genotypes by Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 832-4.

Starakis I, Blikas A, Siagris D, Marangos M, Karatza C, Bassaris H. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter lwoffii*: a case report and review. *Cardiol Rev* 2006; 14: 45-9.

Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 1984; 37: 1015-26.

Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H. Clonal spread of carbapenem resistant OXA 23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 723-7.

Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4362-4.

Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis LL, Harris AD, Song X, Hebden J et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 97-103.

Sung JY, Kwon KC, Park JW, Kim YS, Kim JM, Shin KS et al. Dissemination of IMP-1 and OXA Type beta-Lactamase in Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Lab Med* 2008; 28: 16-23.

Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunoda M, Iyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 526-9.

Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 657-68.

Tanabe Y, Kasai F, Watanabe MM. Multilocus sequence typing reveals high

genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology* 2007; 153: 3695-703.

Tankovic J, Legrand P, De GG, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2677-81.

Tascini C, Menichetti F, Bozza S, Del Favero A, Bistoni F. Evaluation of the activities of two-drug combinations of rifampicin, polymyxin B and ampicillin/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 270-1.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.

Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 518-24.

Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Pasculle AW, Quinn JP, Wang HN et al. Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 429-32.

Tien N, You BJ, Chang HL, Lin HS, Lee CY, Chung TC et al. Comparison of genospecies and antimicrobial resistance profiles of isolates in the *Acinetobacter calcoaceticus Acinetobacter baumannii* complex from various clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 6267-71.

Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 224-8.

Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989; 97: 595-605.

Tognim MC, Gales AC, Penteadó AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 742-7.

Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003; 149: 3473-84.

Torres HA, Vázquez EG, Yagüe G, Gómez JG. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23(1): 12-9.

Towner K. The genus *Acinetobacter*. *Prok* 2006; 6: 746-58.

Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *J Burn Care Res* 2007; 28: 248-54.

Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Spanakis N, Markogiannakis A. Carriage of OXA-58 but not of OXA-51 beta-lactamase gene correlates with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2006b; 58: 1097-9.

- Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki LS, Sofianou D, Legakis NJ et al.** VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006a; 12: 981-3.
- Turner PJ, Greenhalgh JM.** The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 563-7.
- Turner PJ.** MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 217-22.
- Turton J, Ward M, Woodford N, Kaufmann M, Pike R, Livermore D et al.** The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006b; 258: 72-7.
- Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL.** Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineage of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 807-15.
- Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R et al.** Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3074-82.
- Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, van der Reijden T et al.** A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J Hosp Infect* 2004; 58: 170-9.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL.** Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006a; 44: 2974-6.
- Uma Karthika R, Srinivasa Rao R, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K.** Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. *J Med Microbiol* 2009; 58: 430-5.
- Urban C, Go E, Mariano N, Berger BJ, Avraham Y, Rubin D et al.** Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. *J Infect Dis* 1993; 167: 448-51.
- Urban C, Mariano N, Rahal JJ, Tay E, Ponio C, Koprivnjak T et al.** Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI and cecepripin P1. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 994-5.
- Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A et al.** High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 537-42.
- Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A et al.** Wide spread detection of PER-1-type extended spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nation wide multi-center study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-9.
- Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F et al.** Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in

a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30: 257-63.

Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles county, California. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2499-507.

Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 453-60.

Valero C, Farinas MC, García D, Mazarrasa JC, González J. Endocarditis due to *Acinetobacter lwoffii* on native mitral valve. *Int J Cardiol* 1999; 69: 97-9.

Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 174-8.

van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999–2001. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 837-43.

Van den Broek PJ, Van der Reijden TJ, Van Strijen E, Helmig-Schurter AV, Bernards AT, Dijkshoorn L. Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8 year survey. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3593-9.

van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M et al. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of a novel

epidemicity marker. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 342-9.

van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004; 155: 105-12.

Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 684-704.

Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 900-7.

Vanechoutte M, De Baere T, Nemec A, Musílek M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. Reclassification of *Acinetobacter grimontii* Carr et al. 2003 as a later synonym of *Acinetobacter junii* Bouvet and Grimont 1986. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58: 937-40.

Vanechoutte M, Devriese LA, Dijkshoorn L, Lamote B, Deprez P, Verschraegen G et al. *Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4280-1.

Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 11-5.

Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no

fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(10): 726-36.

Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R et al. 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* 1993; 37: 138-41.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1210-5.

Vila J, Navia M, Ruíz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997a; 41: 2757-9.

Vila J, Pachón J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 587-99.

Vila J, Ruíz J, Goni P, Jiménez de AT. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997b; 39: 757-62.

Vila J, Ruíz J, Goni P, Marcos A, Jiménez de AT. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1201-3.

Vila J, Ruíz J, Navia M, Becerril B, García I, Perea S et al. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 758-61.

Vila-Farres X, García de la María C, López-Rojas R, Pachón J, Giralt E, Vila J. In vitro activity of several antimicrobial peptides

against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2011; 18: 383-7.

Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 550-3.

Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 875-82.

Villari P, Iacuzio L, Vozzella EA, Bosco U. Unusual genetic heterogeneity of *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Italy. *Am J Infect Control* 1999; 27: 247-53.

Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 284-95.

Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2001-4.

Villers D, Espace E, Coste-Burel M, Gianffret F, Ninin E, Nicolas F et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med* 1998; 129: 182-9.

Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection—an emerging threat to human health. *IUBMB Life* 2011; 63: 1048-54.

- Von Lingelsheim W.** Beiträge zur Epidemiologie der epidemischen Genickstarre nach den Ergebnissen der letzten Jahre. *Z Hyg Infektkrankh* 1908; 59: 457-60.
- Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, Gales A.** Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8): 2755-9
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel J, Nordmann P.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
- Walther-Rasmussen J, Høiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 373-83.
- Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M et al.** Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4022-8.
- Wang JT, McDonald LC, Chang SC, Ho M.** Community-acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia in adult patients in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1526-9.
- Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ.** Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 614-22.
- Weldhagen GF.** Integrons and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 556-62.
- Whitman TJ.** Infection control challenges related to war wound infections in the ICU setting. *J Trauma* 2007; 62: S53.
- Wilks M, Wilson A, Warwick S, Price E, Kennedy D, Ely A et al.** Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 654-8.
- Wilson SJ, Knipe CJ, Zieger MJ, Gabehart KM, Goodman JE, Volk HM et al.** Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *Am J Infect Control* 2004; 32: 342-4.
- Wisplinghoff FH, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H.** Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 690-7.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.
- Wisplinghoff H, Hippler C, Bartual SG, Haefs C, Stefanik D, Higgins PG et al.** Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 708-15.
- Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB et al.** Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect* 2012; 64: 282-90.
- Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H.** Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*:

a case-control study of adult burn patients. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 59-66.

Wisplinghoff H, Schmitt R, Wohrmann A, Stefanik D, Seifert H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect* 2007; 66: 174-81.

Wood GC, Hanes SD, Fabian TC, Boucher BA. Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastin for the treatment of *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1425-30.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 351-3.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35(5): 736-55.

Wroblewska MM, Dijkshoorn L, Marchel H, van den Barselaar M, Swoboda-Kopec E, van den Broek PJ et al. Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* 2004; 57: 300-7.

Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 490-6.

Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 951-3.

Ye JJ, Huang CT, Shie SS, Huang PY, Su LH, Chiu CH et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for appearance of imipenem resistant strains on patients formerly with susceptible strains. *PLoS One* 2010; 5(4): e9947.

Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K et al. High prevalence of PER-1 extended spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1749-51.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-54.

Yoo JH, Choi JH, Shin WS, Huh DH, Cho YK, Kim KM et al. Application of infrequent-restriction-site PCR to clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3108-12.

Yoon J, Urban C, Tercian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 753-7.

Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* 2004; 53: 653-6.

Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM et al. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from

Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 837-40.

Yun HC, Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Gourdine E, Dooley DP. Bacteria recovered from patients admitted to a deployed U.S. military hospital in Baghdad, Iraq. *Mil Med* 2006; 171: 821-5.

Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG. Association between beta-lactamase encoding *bla*_{OXA-51} variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1900-4.

Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 481-9.

Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of

carbapenem resistance. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 946-53.

Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3: 335-41.

Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Does the community represent a reservoir? *Infect Cont Hosp Epidemiol* 2003; 24: 275-9.

Zhou H, Pi BR, Yang Q, Yu YS, Chen YG, Li LJ et al. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the IS*Aba1* *bla*_{OXA-23} genes in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1076-80.

Zong Z, Lü X, Valenzuela JK, Partridge SR, Iredell J. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 50-4.