

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* OBTENIDOS EN UN HOSPITAL DE
TERCER NIVEL EN NUEVO LEÓN.

POR:

Q.C.B. PAOLA BOCANEGRA IBARIAS

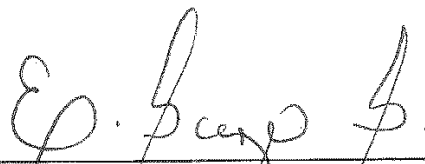
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA

MONTERREY, N.L.

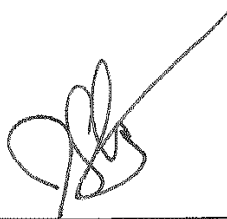
JULIO, 2013

“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* OBTENIDOS EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN NUEVO LEÓN”

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Elvira Garza González
Director de Tesis



M.S.P. Jorge Martín Llaca Díaz
Co-Director de Tesis



Dr. C. Gloria Ma. González González
Miembro de Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* OBTENIDOS EN UN HOSPITAL DE
TERCER NIVEL EN NUEVO LEÓN”

Presentado por: Q.C.B. Paola Bocanegra Ibarias

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Bacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y en el Laboratorio Central del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Elvira Garza González.

DEDICATORIA

A mi mamá, que siempre me ha apoyado en cada aventura que decido emprender y que me ha enseñado que con deseo y dedicación uno puede lograr todo lo que se proponga.

Gracias por siempre creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesora de tesis, la *Dra. Elvira Garza González* por todo su apoyo, la confianza que depositó en mí y por lo mucho que me ha enseñado a nivel profesional y personal durante este proyecto. Además quiero darles la gracias a mi co-director el *M.S.P Jorge Martín Llaca* y a la *Dra. Gloria Ma. González González* miembro de mi comisión por sus invaluable aportaciones en la revisión del presente trabajo. También gracias al Dr. Adrián Camacho Ortiz por el gran apoyo y el interés mostrado en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado y al Departamento de Patología Clínica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, por permitirme el uso de las instalaciones del Laboratorio Central para el desarrollo de este proyecto.

A *Lucy Acevedo Huerta* y *Carlos Paz Castro* por su paciencia, enseñanzas y toda la ayuda que me prestaron durante los experimentos que llevé a cabo, pero especialmente por hacer un gran ambiente de trabajo.

A toda mi familia que siempre ha estado para apoyarme aunque en ocasiones no entiendan del todo lo que hago. Gracias por su apoyo incondicional, especialmente a mis padres *Ma. Lourdes Ibarias Cruz* y *Julio César Bocanegra Oropeza*, así como a mis tíos *Roberto Alonso Ibarias Cruz* y *Griselda Ibarias Cruz* por toda la confianza que tienen en mí, por sus enseñanzas de vida, porque siempre logran ver lo mejor en mí y nunca me dejan rendirme, por alegrarse por cada uno de mis logros y compartirlos conmigo. Por enseñarme como ser una mejor persona y a comprender que con decisión y dedicación todo es posible. Muchísimas gracias por estar tan presentes en mi vida a pesar de la distancia y por siempre demostrarme lo mucho que me aman, igual que yo lo hago.

A *Claudia Álvarez Bazaldúa* y *Selene Álvarez Estrada* porque se han convertido en la mejor familia foránea que pude haber deseado, porque más que compañeras de casa las considero como mis hermanas. Por toda la paciencia que han tenido conmigo, por escucharme, apoyarme y por acompañarme en las locuras que decido emprender.

A la *Dra. Rocío Castro Ríos* y a mis amigas *Irene Rodríguez Valencia*, *Magdalena Escobar Saucedo*, *Corazón Martínez Mejía* y *Sayde Mireles Ibarra* por su valiosa amistad, por toda la paciencia y el apoyo que siempre han tenido conmigo, gracias por estar presentes en momentos complicados y por siempre demostrarme lo mucho que me aprecian y quieren.

A mis compañeros y amigos *Samantha Flores Treviño*, *Soraya Mendoza Olazarán*, *Néstor Casillas Vega* y *Perla López Salas* por todas las enseñanzas a nivel profesional y personal que me han brindado y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Sin ustedes esta experiencia no hubiera sido lo mismo. Gracias por todo su apoyo, paciencia, comprensión, diversión y cariño.

A mis compañeros de laboratorio *Jessica Gutiérrez Ferman*, *Adrián Martínez Meléndez*, *Aldo Clemente Soto*, *Juan Manuel Favela Hernández*, y *Andrés Calzada* que hicieron muy llevadero el trabajo en el laboratorio y que siempre se han portado de maravilla.

A mis compañeros de generación por compartir esta gran experiencia conmigo, porque nadie entiende mejor lo que hemos pasado que ustedes y gracias por siempre estar dispuestos a compartir grandes momentos.

Gracias a *Angel Merino Mascorro*, *Mariel Oyervides Muñoz*, *Kame Galán Huerta*, *Daniel Arellanos Soto*, *Alejandro Robles Zamora* y *Guillermo Guerrero Martínez* por los buenos momentos que hemos pasado, el apoyo, la paciencia y los consejos de vida que me han brindado. Muchas gracias por demostrarme lo excelentes amigos que son, los aprecio muchísimo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Aspectos históricos de <i>Acinetobacter baumannii</i>	1
1.2. Características microbiológicas de <i>A. baumannii</i>	2
1.3. Identificación de <i>A. baumannii</i>	2
1.4. Hábitat de <i>A. baumannii</i>	3
1.5. Persistencia y propagación intrahospitalaria de <i>A. baumannii</i>	4
1.6. Epidemiología y patologías causadas por <i>A. baumannii</i>	6
1.7. Factores de virulencia de <i>A. baumannii</i>	7
1.8. Fármaco resistencia en <i>A. baumannii</i>	9
1.8.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos	10
1.8.1.1. Clase B: Metalobetalactamasas	11
1.8.1.2. Clase D: Oxacilinasas	13
1.9. Brotes epidémicos relacionados con <i>A. baumannii</i>	15
1.10. Análisis de brotes epidémicos asociados a <i>A. baumannii</i>	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	
3.1. General	18
3.2. Específicos	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Estrategia General	19
4.2. Aislamientos	20
4.3. Pruebas de identificación fenotípicas	21
4.4. Pruebas de identificación molecular	21
4.4.1. Obtención de ADN por lisis térmica	21

4.4.2. Amplificación del gen <i>recA</i> y una región ITS	22
4.5. Detección de clonas. Electroforesis en gel de campos pulsados	24
4.6. Pruebas de susceptibilidad. Método de microdilución	27
4.6.1. Preparación del inóculo	28
4.6.2. Preparación de las placas	28
4.7. Amplificación de genes asociados a resistencia a carbapenémicos	30
4.7.1. Carbapenemasa clase B: Tipo IMP y VIM	30
4.7.2. Carbapenemasa clase D: Tipo OXA	31
4.7.3. Secuenciación de productos de PCR	33
5. RESULTADOS	
5.1. Identificación y origen de aislamientos recuperados	34
5.2. Distribución temporal de los aislamientos analizados	35
5.3. Detección de clonas	36
5.4. Perfil de susceptibilidad	40
5.5. Genes asociados a resistencias a carbapenémicos	44
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	53
8. REFERENCIAS	54
ANEXOS Y APÉNDICES	
Anexo I. Pruebas fenotípicas para identificación a nivel de género	60
Anexo II. Recopilación de resultados por aislamiento	63
Anexo III. Preparación de reactivos y soluciones	73

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Iniciadores empleados en la identificación de <i>A. baumannii</i> .	22
2. Iniciadores empleados en la amplificación de IMP y VIM	30
3. Iniciadores empleados en la amplificación de OXA	32
4. Susceptibilidad a los distintos antibióticos estudiados	41
5. Clasificación de los aislamientos en función de su perfil de resistencia los antibióticos	43
6. Frecuencia de genes asociados a resistencia a carbapenémicos	44
7. Relación de OXA-24 con el perfil de resistencia a carbapenémicos	45
8. Relación de OXA-58 con el perfil de resistencia a carbapenémicos	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Propagación intrahospitalaria de <i>A. baumannii</i>	5
2. Mecanismo de acción de las betalactamasas	11
3. Estructura de integrón de clase I	12
4. Homología de la secuencia de aminoácidos en los subgrupos de OXA	14
5. Esquema de la estrategia general experimental	20
6. Gel de identificación de <i>A. baumannii</i>	23
7. Esquema de la distribución de los antibióticos y sus concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) empleadas en la placa de microtitulación	29
8. Área hospitalaria de procedencia de los distintos aislamientos	34
9. Tipo de especímenes analizados	35
10. Distribución de los aislamientos en los años estudiados	36
11. Resultado de la detección de clonas en los aislamientos analizados.	38
12. Distribución temporal de todas las clonas encontradas	39
13. Distribución temporal de clonas predominantes	40
14. Cambios en la resistencia a carbapenémicos y colistina	42
15. Distribución temporal de aislamientos MDR vs XDR	43
16. Distribución temporal de genes tipo OXA	45

LISTA DE ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cols.	Colaboradores
g	Gramos
h	Horas
Kb	Kilobases
L	Litros
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Concentración milimolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
pMol	Concentración en picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
v	Voltios
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

Q.C.B. Paola Bocanegra Ibarias

Fecha de Graduación: Julio, 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título: “Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel en Nuevo León.”

Número de páginas: 75

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología Médica.


Área de estudio: Microbiología Médica.

Objetivos: Analizar la diversidad clonal, el fenotipo de resistencia a los antibióticos y los genes asociados a resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel.

Material y Métodos: Se analizaron 154 aislamientos clínicos obtenidos del 2007 al 2012 de diferentes áreas hospitalarias y de distintos especímenes. Se identificaron a nivel de especie mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Para la detección de clonas se utilizó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) con la enzima de restricción SmaI. Se realizó la determinación de los genes OXA (-23, -24, -51 y -58) mediante PCR múltiple y una PCR simple para los genes IMP y VIM.

Resultados: De los 154 aislamientos analizados el 79% se aislaron de la unidad de cuidados intensivos y un 56% correspondió a lavados bronquiales. Mediante PFGE se obtuvieron 56 clonas con una similitud menor al 60%. Las clonas de mayor prevalencia fueron A (23.4%), B (9.1%) y C (8.4%). Las clonas A y B persistieron durante tres años y la clona C durante un período de dos años. Los aislamientos presentaron una resistencia de 50.7% al imipenem y de 35.7% al meropenem. Se encontraron los genes OXA-51 (100%), OXA-58 (27.9%) y OXA-24 (25.3%). No se encontraron los genes OXA-23, IMP ni VIM.

Conclusiones: Los aislamientos analizados presentaron una elevada diversidad clonal. Las clonas A, B y C fueron las de mayor persistencia y prevalencia durante los seis años del estudio. Además se encontró una elevada frecuencia de los genes OXA-24 y -58 que se asocian a resistencia a carbapenémicos. Éste es el primer reporte de la presencia de estos genes en México y de OXA-24 en América Latina.



Dr. C. Elvira Garza González

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos históricos de *Acinetobacter baumannii*.

En 1911 Beijerinck aisló de muestras de suelo con alto contenido de acetato de calcio un microorganismo al cual nombró *Micrococcus calcoaceticus*, posteriormente se clasificó dentro del género *Achromobacter* y en 1957 Brisou y Prevot crearon un nuevo género para las especies inmóviles de *Achromobacter* denominado *Acinetobacter* en función del vocablo griego ακινητος (akinetos) que significa inmóvil. Fue hasta 1974 que se realizó el reconocimiento oficial de este género, el cual apareció en el manual Bergey de Bacteriología sistemática donde sólo se reconocía la especie *Acinetobacter calcoaceticus*. Los trabajos de Baumann y colaboradores incluyeron nuevas especies dentro del género *Acinetobacter*, pero concluyeron que no era posible una subclasificación a nivel de especie basados en características fenotípicas (1-3).

En 1986 mediante hibridación de ADN-ADN Bouvet y Grimont lograron identificar 12 nuevas especies incluyendo a *Acinetobacter baumannii* que corresponde al genotipo dos; le siguieron trabajos en 1989 de Bouvet y Jeanjean y de Tjernberg y Ursing, que lograron identificar cinco y tres nuevas especies, respectivamente. En este último trabajo también se encontró que las especies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* y los grupos de genotipos 3 (*Acinetobacter pittii*) y 13TU (*Acinetobacter nosocomialis*) presentan una homología del 70% en sus secuencias de ADN por lo que agruparon en el complejo

Acinetobacter baumannii- *A. calcoaceticus*. En la actualidad el género *Acinetobacter* está constituido por 35 especies de las cuales, 26 tienen nombres válidos (2, 4-7).

1.2. Características microbiológicas de *A. baumannii*.

El género *Acinetobacter* está conformado por cocobacilos Gram negativos, que pueden observarse como bacilos ensanchados en la fase exponencial de crecimiento y al ser difíciles de desteñir pueden identificarse erróneamente como Gram positivos. Son microorganismos no móviles, aerobios estrictos, no fermentadores, catalasa positiva y oxidasa negativa (2, 3).

Las especies de origen clínico crecen bien en los medios que se emplean rutinariamente en los laboratorios de microbiología. En cultivos de 24 horas a una temperatura de incubación de 37°C se observan colonias mucoides, convexas, color blanco grisáceo; las colonias que corresponden a las especies dentro del complejo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* son más grandes que las del resto de las especies de *Acinetobacter* con un diámetro que va de 1.5 a 3mm (2, 8).

1.3. Identificación de *A. baumannii*

Existe una elevada similitud a nivel fenotípico y genotípico entre las cuatro especies que integran el complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* por lo que resultan indistinguibles mediante los estudios realizados rutinariamente en el laboratorio clínico. Entre las pruebas que son inadecuadas para su identificación a nivel especie se puede mencionar el crecimiento a 44°C, oxidación de glucosa, hidrólisis de gelatina y

asimilación de múltiples fuentes de carbono así como métodos comerciales manuales y semiautomatizados entre los que se encuentran API 20NE, Vitek 2, Phoenix y Microscan. Sin embargo la identificación a nivel de especie en la práctica clínica es de gran importancia ya que el perfil de susceptibilidad y la frecuencia de brotes epidémicos son diferentes en las distintas especies que conforman al complejo (2, 9).

Se han desarrollado varios métodos moleculares que permiten la identificación a nivel especie como son: la hibridación de DNA-DNA, ribotyping, análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), secuenciación de la subunidad β de la polimerasa de ARN (*rpoB*), la amplificación de genes como 16S ARN ribosomal, el espaciador del transcrito interno (ITS) de la región 16S-23S de ARN ribosomal, *recA*, *gyrB* y OXA-51, pero este último gen puede presentar cambios en su secuencia por lo que se debe emplear con un método adicional para confirmar la identificación. El principal inconveniente con estas metodologías es su elevado costo y lo complicadas que pueden resultar para emplearse rutinariamente en los laboratorios de diagnóstico clínico (2, 10, 11).

1.4. Hábitat de *A. baumannii*

Varias especies pertenecientes al género *Acinetobacter* se han aislados de piel, garganta y vías respiratorias de pacientes hospitalizados. Berlau y colaboradores realizaron el aislamiento de *Acinetobacter* spp. en 44% de voluntarios sanos analizados. El 61% de los casos correspondieron a *Acinetobacter lwoffii*, 12.5% *Acinetobacter* genotipo 15BJ, 8% *Acinetobacter radioresistens* y sólo en un voluntario se aisló una cepa perteneciente al complejo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* (12, 13).

Estos microorganismos también se han aislado de diversos alimentos como hortalizas, en las que las especies más frecuentes fueron *A. baumannii* y *Acinetobacter* genotipo 11. En carne fresca, pescado, verduras, leche y queso *A. lwoffii* representó más de la mitad de los aislamientos, el 11% correspondieron a *Acinetobacter johnsonii* y 5% a *A. baumannii* (14).

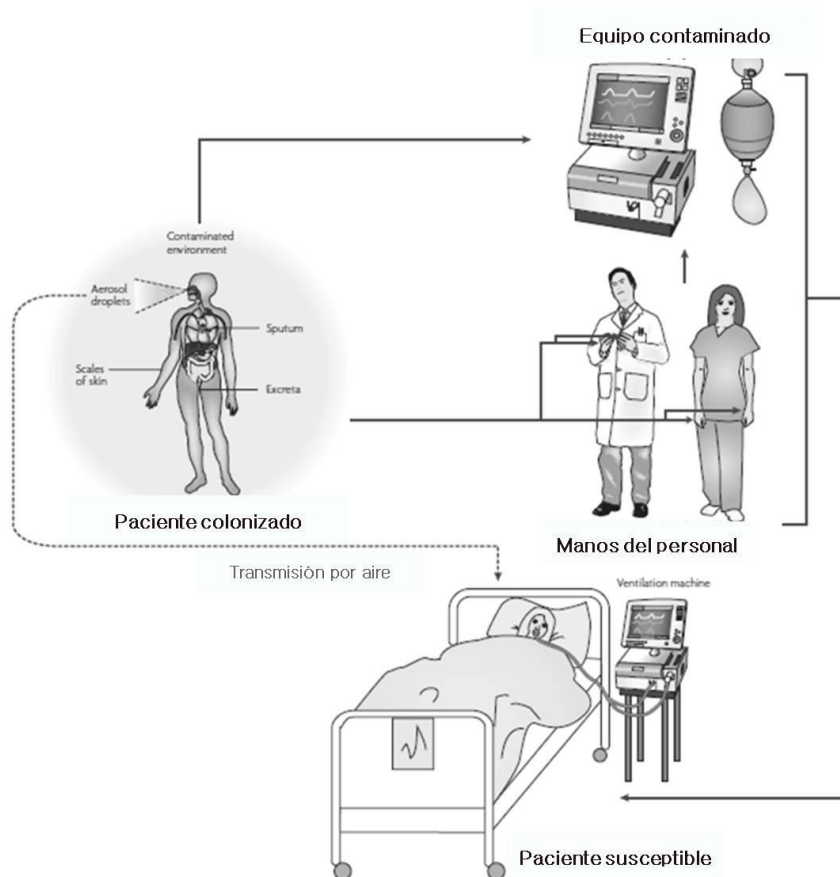
Si bien *A. baumannii* ha sido aislado en muestras de suelo, agua, alimentos, piel y animales, su presencia en la comunidad es muy baja y presenta mayor frecuencia en el ambiente hospitalario tanto en materiales, equipos médicos, personal hospitalario y en pacientes hospitalizados (2, 15).

1.5. Persistencia y propagación intrahospitalaria de *A. baumannii*.

A. baumannii tiene la capacidad de persistir en el ambiente hospitalario debido a que puede resistir a la desecación hasta 30 días; además puede sobrevivir al uso de desinfectantes como propanol, etilsulfato de mecetronio, triclosan y gluconato de clorhexidina cuando no se emplean el tiempo y en la concentración indicada por el fabricante. Otros de los factores que favorecen su supervivencia es su creciente resistencia a muchos de los antibióticos empleados en su tratamiento y la producción de biopelícula, que consiste en grupos de células bacterianas adheridas a una superficie e inmersas en una matriz extracelular auto producida comprendida de hidratos de carbono, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas. Esta biopelícula permite la persistencia en superficies abióticas como son equipos médicos, ropa de cama y muebles presentes en las distintas áreas hospitalarias o en superficies bióticas como células epiteliales humanas y en filamentos de *Candida albicans* que forma parte de la flora normal en el hombre (16-18).

A.baumannii puede llegar a las diversas salas hospitalarias a través de pacientes colonizados, portadores sanos y material o equipo contaminado. La adquisición de *A. baumannii* en pacientes susceptibles puede ocurrir a través de varias rutas como el contacto con material contaminado, un contacto con gotas de saliva o escamas de piel provenientes de pacientes colonizados o el contacto con las manos del personal del hospital con mal lavado de manos (15, 19).

Figura 1.- Propagación intrahospitalaria de *A. baumannii*.



1.6. Epidemiología y patologías causadas por *A. baumannii*.

A. baumannii es un patógeno capaz de causar tanto infecciones adquiridas en la comunidad como infecciones intrahospitalarias, siendo estas últimas las de mayor frecuencia, principalmente en la unidad de cuidados intensivos (UCI). En el 2010 el Centro para el control y prevención de enfermedades de Estados Unidos reportó que *A. baumannii* ocupó el segundo lugar de incidencia en UCI por encima de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; en caso de bacteremias y neumonía fue el primer agente causal (20).

Los tipos de infecciones producidas por este microorganismo incluyen neumonía con una mortalidad de 40 a 60%, bacteremia con mortalidad de 34 a 44%, meningitis, endocarditis, infecciones de vías urinarias, de piel y de tejidos blandos, osteomielitis, desarrollo de queratitis y endoftalmitis asociadas al uso de lentes de contacto o posteriores a intervenciones quirúrgicas. La neumonía adquirida en la comunidad es una presentación poco frecuente que sólo se ha observado en las regiones tropicales de Australia y Asia, se debe a un acarreo de microorganismos presentes en la garganta y ocurre principalmente en personas con un historial de abuso de alcohol o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Se caracteriza por un comienzo repentino y grave seguido de una infección secundaria del torrente sanguíneo (2, 15, 20).

Las infecciones intrahospitalarias se adquieren después de la exposición a *A. baumannii*, que puede estar presente en equipo o material contaminado así como en personal sanitario con malas prácticas de lavado de manos o que puede estar colonizado por este microorganismo (20).

Los factores de riesgo más importantes en infecciones intrahospitalarias por *A. baumannii* son procedimientos invasivos, como intervenciones quirúrgicas, el uso de ventilación mecánica, el empleo de catéteres venosos centrales, intravenosos o urinarios, períodos prolongados de hospitalización, inmunosupresión, quemaduras, edad avanzada y previa terapia antimicrobiana (12, 21, 22).

1.7. Factores de virulencia de *A. baumannii*

A. baumannii es generalmente considerado como un patógeno de baja virulencia, pero la secuenciación completa de su genoma muestra que esta bacteria alberga un notable número de genes putativos y elementos asociados con virulencia homóloga a los presentes en los géneros *Legionella* y *Coxiella*. Presenta varios factores determinantes de virulencia, como la formación de biopelícula, la adquisición de hierro, la adherencia y la capacidad de invadir células epiteliales, así como de provocar su muerte (20, 23).

Formación de biopelícula. Permite la adhesión de esta bacteria en superficies biológicas y abióticas. Es una característica importante de patogenicidad de muchas bacterias, ya que facilita la colonización de material, contribuye a la resistencia a los medicamentos y la evasión del sistema inmune del huésped. La formación de biopelículas implica una variedad de vías que están regulados por quórum sensing y otros sistemas. El pili, las fimbrias y la producción de la proteína asociada a la biopelícula (BAP) contribuyen a la adhesión inicial, seguido por la producción de exopolisacáridos, un constituyente importante de una biopelícula madura que se encarga de suprimir la actividad de los neutrófilos y contribuye a la resistencia ambiental y a antibióticos. (20, 24).

Sistemas de adquisición de hierro: La mayoría de las cepas de *A. baumannii* tienen la capacidad de crecer bajo condiciones limitadas de hierro, lo que ayuda en la colonización del huésped y sobrevivir en el medio ambiente. Esto es posible ya que este microorganismo presenta una diversidad de mecanismos de adquisición de hierro. Esta bacteria segrega una variedad de moléculas que participan en la adquisición de este ión, incluyendo el sideróforo o agente quelante acinetobactina y también produce un sistema de utilización de la hemina (24, 25).

Lipopolisacáridos (LPS): En *A. baumannii* esta molécula contiene una fracción de lípido A, el núcleo de hidratos de carbono y el antígeno O repetitivo. Genera una respuesta inmune innata y es un componente central en el desarrollo de sepsis. Los LPS derivados de *A. baumannii* son potentes inductores de una respuesta pro-inflamatoria y esta respuesta contribuyente de manera importante a la patogénesis de la infección debida a este microorganismo (15, 24).

Fosfolipasa D y C: La fosfolipasa D es importante para la resistencia de este microorganismo en el suero, la evasión de células epiteliales humanas y la respuesta inmune. La fosfolipasa C aumenta la toxicidad para las células epiteliales y contribuye a la adherencia del patógeno a epitelios (20).

Proteína de membrana externa (OmpA): *A. baumannii* se adhiere fácilmente a las células epiteliales bronquiales y tiene la capacidad de promover su apoptosis mediante la actividad de OmpA. Induce la liberación de las moléculas pro-apoptóticas citocromo c y el factor inductor de apoptosis, además contribuye a la capacidad de *A. baumannii* de persistir y crecer en el suero humano, ya que se ha demostrado que OmpA interactúa con los inhibidores solubles de la vía alterna del complemento y permite a las bacterias evadir

la muerte mediada por este tipo de respuesta inmune. Esta proteína también contribuye con la formación de biopelícula (2, 15, 20, 24).

Vesículas de membrana externa (OMV): Son nanovesículas esféricas con un diámetro medio de 20-200 nm y se componen de lipopolisacáridos, proteínas, lípidos y ADN o ARN y transportan toxinas o factores de virulencia específicos. Las OMV desempeñan una importante función en la patogénesis bacteriana ya que permiten la llegada de factores de virulencia sin la interacción entre la célula huésped y el patógeno (23).

1.8. Fármaco resistencia en *A. baumannii*.

A.baumannii es un patógeno oportunista que en los últimos años ha adquirido gran importancia debido a su creciente fármaco resistencia. Presenta resistencia intrínseca a varios fármacos empleados normalmente, como son las aminopenicilinas, cloranfenicol y cefalosporinas de primera y segunda generación. Además tiene la capacidad de adquirir mecanismos que le confieren resistencia a β -lactámicos de amplio espectro, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas (2, 19).

Durante la década de 1970 los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. eran generalmente susceptibles a la gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina, carbenicilina, por separado o en una terapia de combinación. Sin embargo, desde 1975 se observó un aumento en la resistencia a casi todos los grupos de fármacos. Inicialmente se conservó susceptibilidad parcial contra las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas, aminoglucósidos semi sintéticos y carbapenémicos. En 1985 se reportó el primer aislamiento resistente a imipenem, un tipo de carbapenémico. Sin embargo, a

finales de los años noventas los carbapenémicos eran la última opción para el tratamiento de infecciones por este microorganismo. En la década de 2000 se presentó un aumento en su resistencia; en el 2007 se reportó que Sudáfrica, Turquía, Portugal, Colombia y Venezuela presentaban una resistencia superior al 50% y en el 2009 se encontró una resistencia a meropenem del 47.1% y 63% a nivel mundial y en América Latina, respectivamente. En el 2010 se realizó el primer reporte en México con 59% de resistencia al meropenem (21, 26-29).

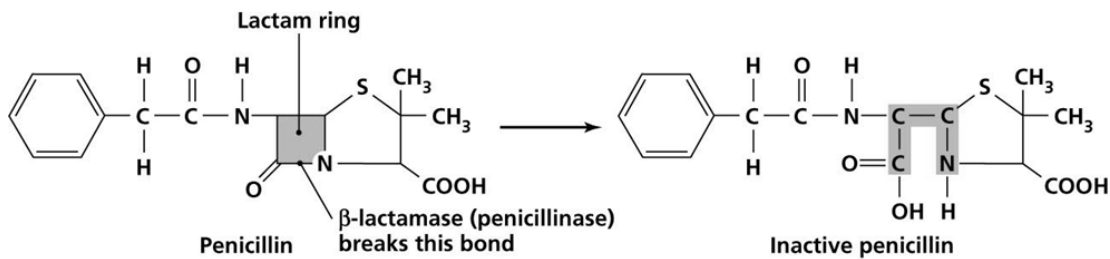
Cuando se presenta resistencia a los carbapenémicos el último recurso empleado para el tratamiento de este tipo de infecciones corresponde a la tigeciclina y la colistina. La tigeciclina es el primer antibiótico de una nueva clase de tetraciclinas modificadas que corresponden a las glicilciclinas y la colistina es un tipo de polimixina que había sido abandonada en su uso clínico debido a reportes de nefrotoxicidad y neurotoxicidad, pero en nuevos estudios la toxicidad es menos severa y frecuente de lo previamente reportado. En los últimos años se han presentado aislamientos de *A. baumannii* con resistencia a estos dos fármacos, lo que complica el tratamiento de los pacientes y la erradicación de este microorganismo del ambiente hospitalario (2, 19, 30).

1.8.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos.

Los mecanismos implicados en la resistencia a carbapenémicos se pueden agrupar en: mecanismos no enzimáticos y enzimáticos. Entre los mecanismos no enzimáticos se encuentran las proteínas de membrana exterior, las bombas de eflujo del tipo AdeABC y modificaciones en el sitio blanco. El mecanismo enzimático de mayor importancia es la producción de betalactamasas que actúan hidrolizando el anillo betalactámico provocando

la inactivación del fármaco (como se observa en la siguiente figura). Ambler clasifica a estas enzimas en cuatro clases que van de la A a la D en función de la homología de las proteínas. De estas cuatro clases, solo las clases B y D presentan actividad de carbapenemasas, es decir que tienen la capacidad de hidrolizar a los carbapenémicos (2, 26).

Figura 2.- Mecanismo de acción de las betalactamasas



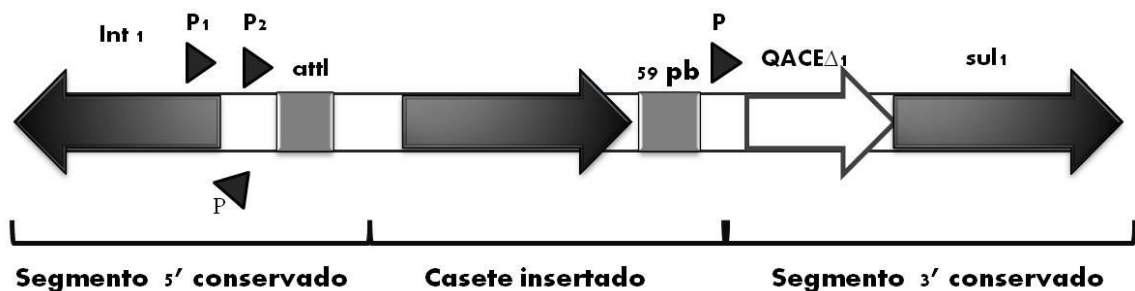
1.8.1.1. Clase B: Metalobetalactamasas

La clase B de la clasificación de Ambler corresponde a las metalobetalactamasas (MBL) que son enzimas con un ión metálico en su estructura, generalmente zinc, por lo que pueden ser inhibidas *in vitro* por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que es un agente quelante y presentan una mayor actividad lítica *in vitro* que las enzimas de clase D. Confieren un alto nivel de resistencia a los carbapenémicos y otros betalactámicos, excepto aztreonam. Existen cinco grupos de MBL pero solo dos se han identificado en *A. baumannii* las de tipo IMP y VIM, que se aislaron por vez primera en *Pseudomonas aeruginosa* a partir de aislamientos obtenidos en Japón e Italia, respectivamente. En

A. baumannii IMP se detectó por primera vez en un aislamiento proveniente del lejano oriente y VIM en Corea (2, 26).

Las metalobetalactamasas constituyen un riesgo significativo de propagación, ya que los genes que codifican para este tipo de enzimas se encuentran dentro de integrones, que son elementos genéticos móviles que pueden ser fácilmente transferidos entre distintas bacterias de la misma o diferente especie. Los integrones consisten de tres regiones: dos conservadas que corresponden a la 5' y 3' y una región variable. La región 5' se compone del gen de la integrasa (*intI*) la cual, permite la inserción o escisión del casete génico en la región variable; un sitio de recombinación adyacente (*attI*) y uno o más promotores responsables de la expresión de los casetes génicos insertados en la región variable. Basándose en la secuencia 3' se han dividido en tres clases de integrones, los de la clase I constan de un gen parcialmente deletado (*qacEΔ1*) fusionado a un gen *SulI*, que le confiere resistencia a los antisépticos y a la sulfonamida, respectivamente; los de clase II presentan un transposón Tn7 y en la clase III sólo se ha sido descrito un integrón. La mayoría de los integrones que se han encontrado en *A. baumannii* pertenecen a la clase I (31-33).

Figura 3.- Estructura de integrón de clase I



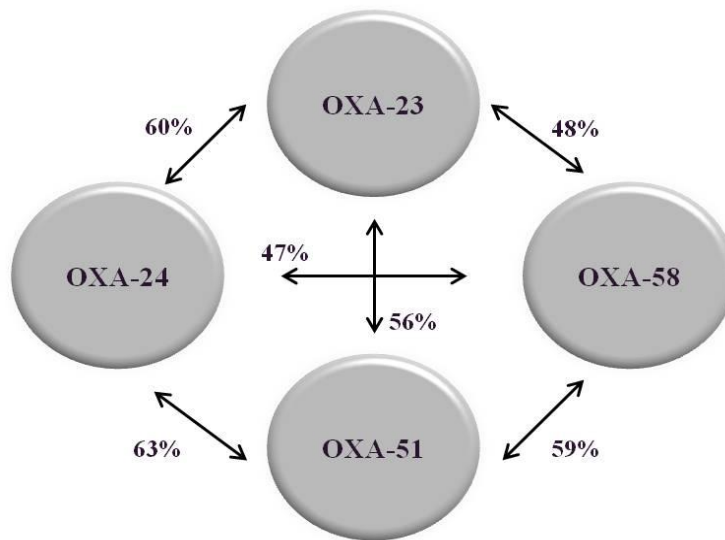
Las MBL presentan una distribución localizada y en *A. baumannii* solo se ha detectado IMP: 1, 2, 4, 5 y 6; VIM 1 y 2. IMP-1 se ha identificado en Italia, Corea del Sur, Japón; IMP-2 en Italia y Japón; IMP-4 en Hong Kong; IMP-5 en Portugal e IMP-6 en Brasil, siendo el único reporte en América. VIM-1 sólo se ha identificado en Grecia y VIM-2 en Corea del Sur (2, 21, 26, 27, 33, 34).

1.8.1.2. Clase D: Oxacilinasas

La clase D de la clasificación de Ambler corresponde a las Oxacilinasas (OXA) y la primera enzima de esta clase se aisló en Edimburgo, Escocia en 1985, se nombró como ARI-1 (*Acinetobacter* resistente a imipenem); posteriormente fue secuenciada y renombrada como OXA-23. Las oxacilinasas tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas (bencilpenicilina, ampicilina, ticarcilina y piperacilina), cefalosporinas y carbapenémicos (2, 22, 26, 35).

Se dividen en ocho subgrupos filogenéticos de acuerdo a la homología de sus secuencias de aminoácidos, pero solo cuatro han sido descritos en *A. baumannii* y corresponden a: OXA-23 (incluye OXA-27 y OXA-49), OXA-24 (incluye OXA-25, OXA-26, y OXA-40), OXA-51 (incluye -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, -82) y OXA-58. Las enzimas que pertenecen al subgrupo OXA-51 son intrínsecas de *A. baumannii* y se producen en la mayoría o todas las cepas, a pesar de que su nivel de expresión es muy variable (36-38).

Figura 4.- Homología de la secuencia de aminoácidos en los subgrupos de OXA.



De las oxacilinasas los grupos de OXA-23, -24 y -58 pueden localizarse formando parte del cromosoma o encontrarse dentro de plásmidos, mientras que OXA-51 es un gen constitutivo de este microorganismo. La presencia de secuencias de inserción (IS) río arriba o abajo de los genes tipo OXA favorece a su sobreexpresión, en el caso *A. baumannii* se ha descrito principalmente IS*Aba1*, pero IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*Aba4*, IS*Aba10* e IS18 son elementos que se han encontrado precediendo a OXA-23 y OXA-58. Se ha observado que cuando IS*Aba10* está insertado entre IS*Aba1* y OXA-23 la expresión de esta enzima es mayor que cuando sólo está insertado IS*Aba1* (35, 37, 39).

Las oxacilinasas presentan una mayor distribución comparadas con las metalobetalactamasas y son las carbapenemasas de mayor importancia. OXA-23 se detectó principalmente en aislamientos de Asia, pero se informó también en Europa y en América se ha reportado en Estados Unidos, Brasil y Argentina; OXA-58 se encuentra con frecuencia en Europa, pero se ha encontrado en países americanos como Bolivia, Brasil y Argentina; OXA-24 se encuentran principalmente en la península Ibérica y Asia, pero

también se ha detectado en Irán, Bélgica, República Checa y los E.U.A. y OXA-51 al ser constitutiva se encuentra distribuido en los cinco continentes del mundo (2, 27, 37, 40-43).

1.9. Brotes epidémicos relacionados con *A. baumannii*.

Las infecciones debidas a *A. baumannii* son un problema clínico importante debido a que se trata de una bacteria frecuentemente endémica en ciertas áreas hospitalarias y es responsable de numerosos brotes intrahospitalarios alrededor del mundo. (2, 44)

Desde principios de la década de 1980, se han reportado brotes en diversos hospitales a nivel mundial. En Europa los reportes han sido principalmente en Inglaterra, Francia, Alemania, Italia, España y en Países Bajos. En Asia se han llevado a cabo reportes en China, Taiwán, Corea y Japón. En América los países en los que se han detectado brotes son Estados Unidos, Brasil, Argentina. En la mayoría de los casos se detectaron una o dos clonas epidémicas y la transmisión de éstas entre distintos hospitales se ha relacionado primordialmente con la transferencia de pacientes colonizados por esta bacteria (12, 44-56).

En Estados Unidos el brote de mayor importancia en los últimos años corresponde al relacionado con el personal militar que luchó en Irak y Afganistán. En marzo del 2003 se observó un aumento en las infecciones por *A. baumannii*, posterior a que las operaciones de combate comenzaron en Irak. La mayoría de los militares heridos fueron tratados en hospitales de campo y posteriormente fueron transferidos a Centros Médicos en Alemania y Estados Unidos. En este brote se determinó que la infección fue debida a la presencia de *A. baumannii* en superficies inanimadas en el hospital de campaña y los

aislamientos detectados en estas superficies estaban genotípicamente vinculados a los aislados de pacientes (57-59).

Además se ha descrito la propagación intercontinental de *A. baumannii* MDR, como consecuencia de los viajes en avión. Estos acontecimientos demuestran la importancia de la detección y el aislamiento de los pacientes transferidos de países con altas tasas de microorganismos resistentes a fármacos (52, 60, 61).

1.10. Análisis de brotes epidémicos asociados a *A. baumannii*.

Los brotes por transmisión de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario, principalmente en las UCI, están aumentando a nivel mundial y las investigaciones epidemiológicas requieren el uso de tipificación molecular para determinar la relación clonal y es esencial el uso de herramientas que pueden trazar rápidamente la propagación de las infecciones hospitalarias asociadas a este microorganismo (62, 63).

Existen una gran cantidad de técnicas empleadas para llevar a cabo la tipificación molecular, entre estas encontramos: perfil de plásmidos; ribotipo; electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), secuencias repetitivas palindrómicas (REP), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación por PCR del gen de la integrasa y más recientemente la tipificación multilocus de secuencia (MLST) y PCR con ionización por electrospray/espectrometría de masas (PCR-ESI-MS). Sin embargo de todas estas técnicas la electroforesis en gel de campos pulsados es considerada como el estándar de oro para la identificación molecular de clonalidad, pero cuenta con la desventaja de ser una técnica tardada y requiere una considerable experiencia para su ejecución e interpretación (2, 62).

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, *Acinetobacter baumannii* es un patógeno intrahospitalario multifármaco-resistente asociado a infecciones con altos índices de mortalidad, que en los últimos años ha presentado un aumento gradual en la resistencia a carbapenémicos.

En México no existen reportes sobre la presencia de los genes asociados a la resistencia a carbapenémicos así como de la diversidad clonal que presenta este microorganismo, por lo que resulta importante realizar una caracterización de los aislamientos circulantes en un hospital de tercer nivel en Nuevo León.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1. General

Analizar la diversidad clonal, el fenotipo de resistencia a los antibióticos y los genes asociados a resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel.

3.2. Específicos

1. Identificar aislamientos de *A. baumannii* mediante pruebas bioquímicas y técnicas moleculares.
2. Detectar la presencia de clonas mediante electroforesis en gel de campos pulsados.
3. Realizar pruebas de sensibilidad a distintos antimicrobianos.
4. Determinar la presencia de genes OXA, VIM e IMP asociados a la resistencia a carbapenémicos.

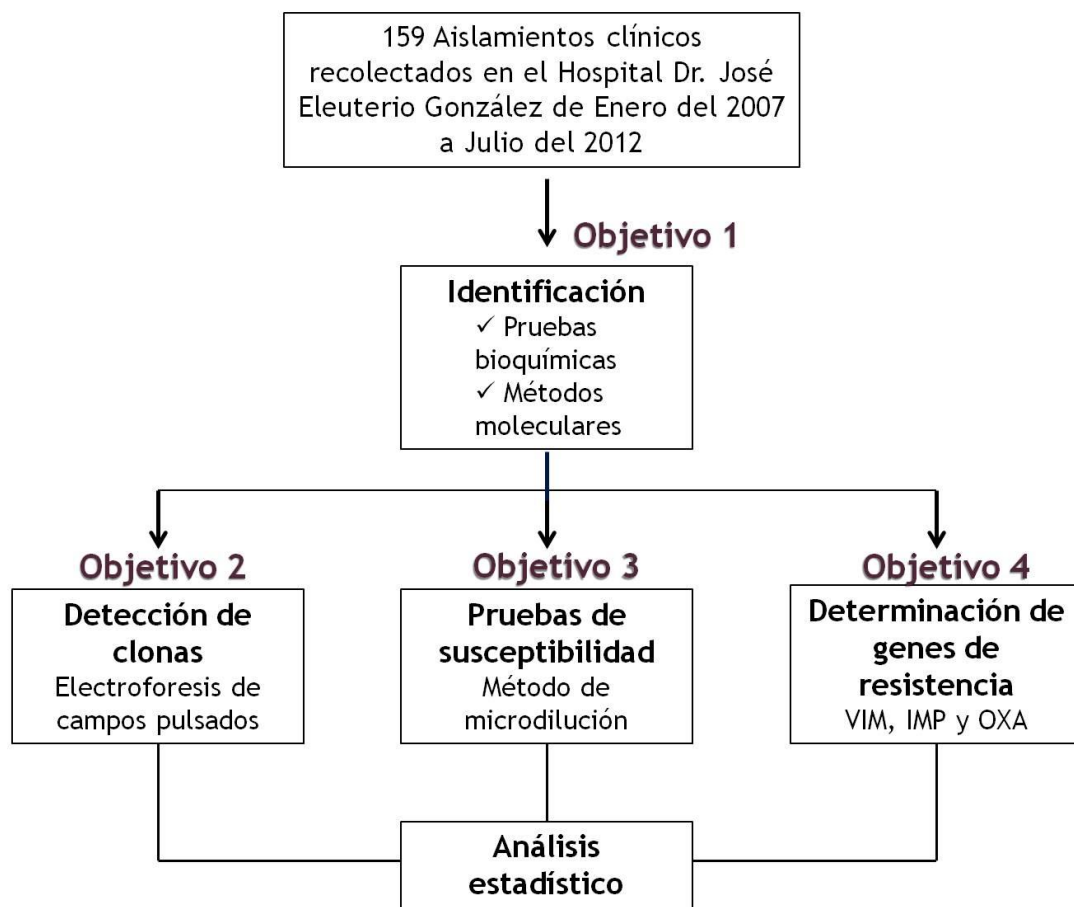
CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Estrategia general.

Se realizó la reactivación metabólica de los aislamientos seleccionados y a partir de un cultivo joven de 24 horas se realizaron pruebas bioquímicas para efectuar la identificación a nivel complejo, seguido de técnicas moleculares para llegar a la identificación a nivel de especie. En los aislamientos que fueron identificados como *A. baumannii* se realizó la detección de clonas mediante la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados. Posteriormente se determinó el perfil de susceptibilidad mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo el protocolo establecido en el documento M07-A9 del CLSI. Por último se hizo la detección de los genes asociados a resistencia a carbapenémicos. Para las de tipo OXA se llevó a cabo una PCR múltiple donde se detectó OXA-23, -24, -51 y -58 y en el caso de VIM e IMP se realizó PCR convencional. Los aislamientos que presentaron amplificación de alguno de estos genes fueron secuenciados para corroborar la identificación.

Figura 5.- Esquema de la estrategia general experimental.



4.2. Aislamientos.

Se analizaron 159 aislamientos provenientes de diferentes especímenes clínicos colectados de enero del 2007 a julio del 2012 en distintas áreas del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Se seleccionó un aislamiento por paciente y se excluyeron aquellas muestras de pacientes menores de dieciocho años.

4.3. Pruebas de identificación fenotípicas.

Cada aislamiento se sembró en agar sangre y se incubó a 37°C durante 24 h, transcurrido este tiempo se realizó el análisis de la morfología bacteriana mediante tinción de Gram, se observó el crecimiento en agar MacConkey y medio TSI, después se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa y movilidad (Ver Anexo I). Los aislamientos que se observaron como cocobacilos Gram negativos, con un crecimiento oxidativo (colonias incoloras en el agar MacConkey y sin viraje de color en el medio TSI), positivos a la producción de catalasa, oxidasa negativa e inmóviles se clasificaron dentro del género *Acinetobacter*. Posteriormente se observó el crecimiento a 42°C y los aislamientos que presentaron crecimiento se clasificaron dentro del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (64).

4.4. Pruebas de identificación molecular.

4.4.1. Obtención de ADN por lisis térmica

Para llevar a cabo la obtención del material genético de los aislamientos, éstos se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron durante 24 h a 37°C, después se preparó una suspensión bacteriana en un tubo eppendorf estéril, se tomaron de 3-4 colonias del cultivo puro y se homogenizó mediante agitación con vórtex en 100 µL de agua destilada estéril, esta suspensión se sometió a calentamiento a 95°C (Labnet Accublock Digital Dry Bath, Modelo D1200) durante 15 minutos, después la suspensión

se centrifugó por 25 segundos a 12,000 g (Microcentrífuga refrigerada, modelo Microlite RF) se descartó el precipitado y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf estéril. El DNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su utilización (65).

4.4.2. Amplificación del gen *recA* y una región ITS.

Para realizar la identificación a nivel de especie se realizó una PCR múltiple empleando los cebadores reportados por Chen y cols. en el 2007 (10). Se efectuó la amplificación de una región conservada en *Acinetobacter spp.* del gen *recA* y de un fragmento de la región del espaciador del transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés) de *A. baumannii*. Se realizó la PCR múltiple empleando el material genético obtenido por el método de lisis térmica y con los pares de iniciadores que se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 1. Iniciadores empleados en la identificación de *A. baumannii*.

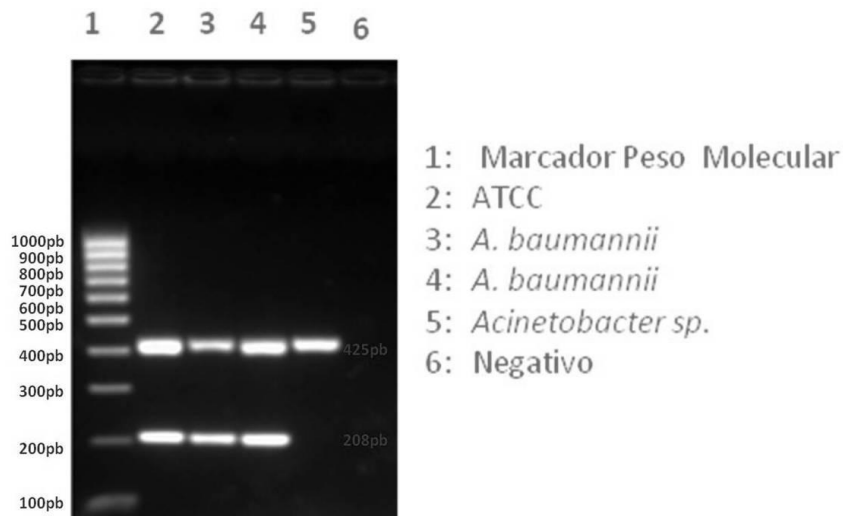
Iniciadores	Secuencia	Producto
P-rA1	5'-CCTGAATCTTCTGGTAAAAC	
P-rA2	5'-GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	425pb
P-Ab-ITSF	5'-CATTATCACGGTAATTAGTG	
P-Ab-ITSR	5'-AGAGCACTGTGCACTTAAG	208pb

Para la mezcla de PCR se añadió 1 µL de lisado a 24 µL de una mezcla de reacción compuesta por: buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), MgCl₂ 3 mM, dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a 0.2 µM (Instituto de Biotecnología, UNAM, México) y 1 U de *Taq* DNA polimerasa

(Bioline). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 30 s, elongación a 72°C por 30 s y por último 1 ciclo a 72°C por 7 min para la elongación final. (Termocicladores: “PCR Sprint, Hybaid; PxE 0.2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation y MultiGen, Labnet)

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL), el cual se sometió a 100 V por 50 min, empleando un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital. Cuando en la muestra se observaron dos bandas se identificó como *A.baumannii* y si solo se encontró la banda de 425pb se identificó como *Acinetobacter* sp. como se observa en la siguiente figura.

Figura 6. Gel de identificación de *A. baumannii*.



4.5. Detección de clonas. Electroforesis en gel de campos pulsados.

Para determinar la presencia de clonas, los aislamientos identificados como *A. baumannii* se sometieron a electroforesis en gel de campos pulsados. Se tomó como referencia la metodología sugerida para *S. aureus* (66, 67) con modificaciones recomendadas para *A. baumannii* (68). El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

A partir de un cultivo en agar soya tripticaseína se inoculó una asada de una sola colonia en 5 mL de caldo triptona soya. Se incubó hasta fase exponencial (16-18 h) a 37°C. Posteriormente se transfirieron 2 mL del cultivo líquido a tubo Eppendorf y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante sin remover la pastilla y se añadió 1 mL de PIV frío, se agitó en vórtex hasta disolver y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm (Microcentrífuga refrigerada, modelo Microlite RF), se descartó el PIV de cada tubo y se añadieron 410 µL de PIV a cada muestra y se agitó en vórtex para disolver la pastilla.

Se fundió agarosa al 1.5% (Agarosa Certificada para Campos Pulsados, Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) con buffer TBE 0.5X en microondas y se mantuvo entre 40-42°C mediante calentamiento en baño de agua. Se colocaron 150 µL de la agarosa fundida en cada tubo y se agitó en vórtex, esto se realizó una muestra a la vez para evitar que solidificara la agarosa. Para preparar un disco de agarosa se colocaron 35 µL de la muestra con agarosa sobre un portaobjetos estéril forrado con papel parafilm (se prepararon entre 5-7 discos por muestra) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 min y se transfirieron a un tubo Falcon estéril de 15 mL. Se preparó la solución para la lisis celular

(EC-lisis) al adicionar 0.1mg de lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá) y 10 μ L RNAsa de una concentración de 5mg/mL (Epicentre, Inc., Madison, WI, E.U.A.) al buffer EC que cambia a EC-lisis y se dejó a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de EC-lisis a cada tubo que contenía los discos y se llevaron al fondo, sin agitar en exceso para evitar su rompimiento y se incubaron por 3 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se decantó el EC-lisis empleando una gasa estéril, teniendo cuidado de no desechar los discos y se preparó una solución ESP al adicionar 1 mg de proteinasa K a 1 mL de solución ES, se añadió 1 mL de la solución ESP a cada tubo y se incubó toda la noche a 55°C (mínimo 17 h). Después la solución se filtró con una gasa estéril y se agregaron 13 mL de TE 1X a cada tubo y se agitaron por inversión durante 1 h (en un agitador Labnet Orbit LS), posteriormente se eliminó el TE 1X de cada tubo y se adicionaron nuevamente 13 mL, este paso se repitió 4 veces más; posterior a estos lavados los tubos con buffer TE 1X se almacenaron a 4°C.

Al día siguiente se transfirió con pinzas un disco a un tubo Eppendorf estéril de 2 mL y se añadieron 40 μ L de buffer de restricción (sin enzima), el cual se preparó como se indica a continuación. Los discos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para atemperar.

Reactivo	1 reacción
Buffer 10X (330 mM Tris-Ac pH 7.9, 100mM Mg-Ac, 5mM Ditiotritol y 660mM K-Ac)	4 μ L
BSA 0.1%	4 μ L
Agua estéril grado molecular	32 μ L

Se colocó el disco en las paredes del tubo Eppendorf y se sacaron los 40 μL del buffer de restricción sin enzima y posteriormente se añadieron 40 μL del buffer de restricción con la enzima SmaI (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) que se preparó como se indica en la siguiente tabla y los discos se incubaron toda la noche a 37°C.

Reactivo	1 reacción
Buffer 10X	4 μL
BSA 0.1%	4 μL
Agua estéril grado molecular	31 μL
Enzima SmaI (10 U/ μL)	1 μL

Se limpió el equipo (CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad) con agua destilada estéril y una pequeña cantidad de cloro (10 mL aproximadamente) y se dejó por 20 min, se eliminó el agua y se repitió el procedimiento solo con agua destilada estéril, después de que se tiró el agua de la cámara de electroforesis se agregaron 5 L de TBE 0.5X estéril y se dejó hasta que el equipo alcanzó 14°C. Se sacaron los discos de la incubación y se añadieron 4 μL de buffer de carga 10X que contiene: SDS 0.9%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.05% (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y se preparó un gel de agarosa al 1% con 150 mL de buffer, y se preparó un excedente de 10 mL. Se vació la agarosa a la placa, se colocó el peine, y los 10 mL excedentes de agarosa se dejaron en baño de agua a 50°C Los discos de agarosa se colocaron en el gel, el marcador de PM al principio y al final, los pocillos se cubrieron con el excedente de agarosa que estaba a 50°C. El gel se colocó en el equipo y programaron las siguientes condiciones: T inicial 0.5 s, T final 15 s, tiempo de corrida 20 h, voltaje 6 V, ángulo 120 y temperatura de 14°C.

Al concluir la corrida, se retiró el gel del equipo y se tiñó con bromuro de etidio 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 10 min y se lavó con agua destilada, por último se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm (Fotodocumentador UVP Biolumaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom).

El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual tomando en cuenta los criterios establecidos para esta técnica (69); con ello se creó una base de datos la cual fue analizada empleando el programa estadístico SPSS® versión 20, utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard y como resultado final se obtuvo un dendograma con el objetivo de establecer los porcentajes de similitud entre los patrones de restricción de los aislamientos para poder determinar la presencia de clonas.

4.6. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Método de microdilución.

Los antibióticos y las concentraciones utilizadas se seleccionaron en base a lo establecido por el CLSI en el documento M100-S23 y se siguió el protocolo establecido en el manual M07-A9 del 2013. Para la tigeciclina no existen puntos de corte establecidos por el CLSI ni por el EUCAST y por lo tanto se utilizaron los puntos de corte recomendados por la BSAC (70). Los antibióticos empleados en este estudio fueron obtenidos de Sigma Aldrich® (Toluca, Estado de México).

4.6.1. Preparación del inóculo.

Los aislamientos fueron sembrados en agar Müeller-Hinton y se incubaron por 24 h a 37°C posterior a la incubación se preparó el inóculo por suspensión de las colonias en 5 mL de solución salina que se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (1-2 x 10⁸ UFC/mL aproximadamente), enseguida se realizó una dilución 1:150 en 15 mL de caldo Müeller-Hinton. El inóculo final fue de 5 x 10⁵ UFC/mL y se utilizó inmediatamente después de su preparación.

4.6.2. Preparación de las placas.

Por cada aislamiento se preparó una placa de 96 pocillos (12 x 8) con diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar de la manera que se especifica en la figura 7. Las placas se llenaron utilizando una pipeta multicanal con 200 µL de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posteriormente se añadió un volumen de 100 µL de caldo Müeller-Hinton en todos los pocillos con excepción de los que tienen los antibióticos con la concentración más alta y las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 µL (del pocillo 2 al 3, del 3 al 4, del 4 al 5 y así sucesivamente) de una celda a la otra empleando una micropipeta y se eliminaron 100 µL de la última celda de cada antibiótico, de tal manera que antes del inóculo todas las celdas quedaran con un volumen total de 100 µL. El primer pocillo de la placa se dejó como control positivo de crecimiento (sin antibiótico) y tres pocillos en la última fila se dejaron como controles negativos (sin inóculo).

Figura 7. Esquema de la distribución de los antibióticos y sus concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) empleadas en la placa de microtitulación. CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, GEN: Gentamicina, AMK: Amikacina, CTZ: Ceftazidime, CFX: Cefotaxime, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, COL: Colistina, FOS: Fosfomicina, TET: Tetraciclina, TGC: Tigeciclina.

POSITIVO	CIP 16	CIP 8	CIP 4	CIP 2	CIP 1	CIP 0.5	CIP 0.25	LEV 32	LEV 16	LEV 8	LEV 4
LEV 2	LEV 1	LEV 0.5	GEN 64	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	AMK 128	AMK 64
AMK 32	AMK 16	AMK 8	AMK 4	AMK 2	CTZ 64	CTZ 32	CTZ 16	CTZ 8	CTZ 4	CTZ 2	CTZ 1
CFX 128	CFX 64	CFX 32	CFX 16	CFX 8	CFX 4	CFX 2	IMP 64	IMP 32	IMP 16	IMP 8	IMP 4
IMP 2	IMP 1	MER 64	MER 32	MER 16	MER 8	MER 4	MER 2	MER 1	COL 32	COL 16	COL 8
COL 4	COL 2	COL 1	COL 0.5	FOS 256	FOS 128	FOS 64	FOS 32	FOS 16	FOS 8	FOS 4	TET 64
TET 32	TET 16	TET 8	TET 4	TET 2	TET 1	TGC 32	TGC 16	TGC 8	TGC 4	TGC 2	TGC 1
TGC 0.5	TGC 0.25	NEG	NEG	NEG							

Se transfirieron con una pipeta multicanal 100 μL del inóculo a cada pocillo de la placa, con excepción de los controles negativos y las placas se incubaron a 37°C durante 20-24 horas. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se apilaron más de cuatro a cinco placas dentro de la incubadora. Después del periodo de incubación se procedió a realizar la lectura de los resultados. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhiba completamente el crecimiento del microorganismo en estudio. La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en el pocillo usado como control positivo el cual, presenta una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para la lectura se utilizó un lector con espejo en el que se reflejó la parte inferior de la placa de microtitulación. Para el control de calidad se emplearon las cepas

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

4.7. Amplificación de genes asociados a resistencia a carbapenémicos.

4.7.1. Carbapenemasa clase B: Tipo IMP y VIM

Para realizar la detección de los genes que codifican para las metalo β -lactamasas tipo IMP y VIM se llevaron a cabo dos PCRs de punto final empleando el material genético obtenido mediante lisis térmica y con los iniciadores descritos en el 2007 por Ellington y cols. para la amplificación de IMP (71) y los reportados por Nordmann y Poirel en el 2002 para VIM (72). Las secuencias de los iniciadores empleados se encuentran descritas en la siguiente tabla.

Tabla 2. Iniciadores empleados en la amplificación de IMP y VIM.

Iniciadores	Secuencia	Producto
IMP-F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	
IMP-R	5'-CCAAACYACTASGTTATCT	188pb
VIM-F	5'-ATGGTGTTTGGTCGCATATC	
VIM-R	5'-TGGGCCATTCAGCCAGATC	510pb

En el caso de IMP y VIM para la mezcla de PCR se añadieron 2 μL de ADN a 23 μL de una mezcla de reacción compuesta por: buffer 1X (NH_4 1X pH 8.8), MgCl_2 3 mM, dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a 0.2 μM y 1 U de *Taq* DNA. Las condiciones de amplificación para IMP fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 52°C por 40s, elongación a 72°C por 50 s y por último 1 ciclo a 72°C por 5 min para la elongación final y en el caso de VIM 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 25 s, alineamiento a 60°C por 40 s, elongación a 72°C por 50 s y por último 1 ciclo a 72°C por 6 min para la elongación final.

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente se sometió a 100 V por 50 min, empleando un marcador de 100-1,000 pb. Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital.

4.7.2. Carbapenemasa clase D: Tipo OXA

Para llevar a cabo la detección de los genes que codifican para las carbapenemasas tipo OXA se llevó a cabo una PCR múltiple, en la cual se amplificó OXA-23, -24, -51 y -58 empleando el material genético obtenido mediante lisis térmica y con los iniciadores

descritos por Woodford y cols. en el 2006 (36). Las secuencias de los cebadores empleados se encuentran descritas en la siguiente tabla.

Tabla 3. Iniciadores empleados en la amplificación de OXA.

Iniciadores	Secuencia	Producto
OXA-23 F	5'- GATCGGATTGGAGAACCAGA	
OXA-23 R	5'- ATTTCTGACCGCATTTCAT	501pb
OXA-24 F	5'- GGTTAGTTGGCCCCCTAAA	
OXA-24 R	5'- AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246pb
OXA-51 F	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG	
OXA-51 R	5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG	353pb
OXA-58 F	5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	
OXA-58 R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599pb

Para la mezcla de PCR se añadieron 2 μ L de ADN a 23 μ L de una mezcla de reacción compuesta por: buffer 1X (NH_4 1X pH 8.8), MgCl_2 3 mM, dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a 0.2 μ M y 1 U de *Taq* DNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 25 s, alineamiento a 58°C por 40 s, elongación a 72°C por 50 s y por último 1 ciclo a 72°C por 6 min para la elongación final.

Para verificar la presencia de los productos de PCR esperados, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (2 μ g/mL), el cual se sometió a 100 V por 50 min, empleando un marcador de 100-1,000 pb.

Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital.

4.7.3. Secuenciación de productos de PCR.

Los aislamientos que presentaron amplificación para alguno de los genes asociados a resistencia a carbapenémicos fueron secuenciados para corroborar su identificación, previo a la secuenciación se realizó la purificación del producto de PCR obtenido mediante precipitación con etanol.

Cada producto de PCR (50 µL) fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 5 µL de acetato de sodio 3 M pH 4.6 y 100 µL de etanol al 95%, se homogenizó la mezcla por agitación con vórtex y se mantuvo a -20°C durante 30-40 min. Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron por 20 min a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con 300 µL de etanol al 70% y se agitó en vórtex, posteriormente se centrifugó a 4°C por 10 min a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche y se resuspendió en 50 µL de agua estéril grado molecular.

Una vez que los productos fueron purificados, se enviaron a la Unidad de Servicios Genómicos del Centro de Investigación y de estudios avanzados (CINVESTAV) Campus Guanajuato para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias fueron alineadas e identificadas mediante la Herramienta de Búsqueda y Alineamiento Local Básico (BLAST) disponible en la plataforma del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

CAPÍTULO V

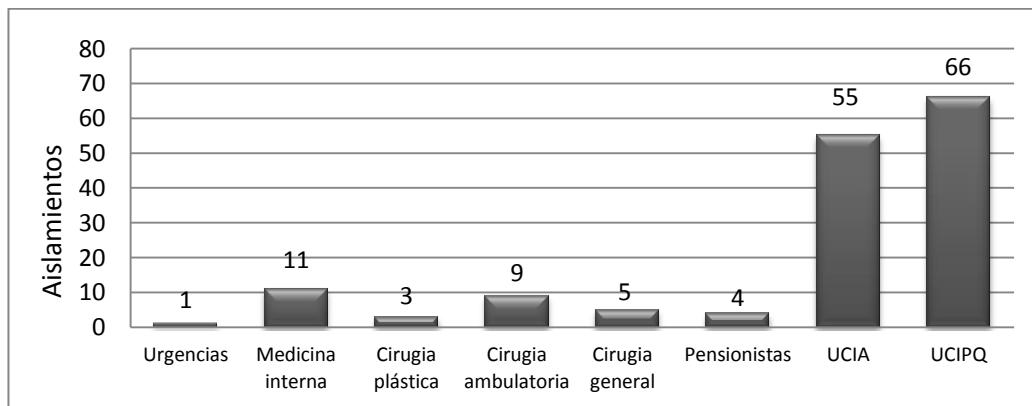
RESULTADOS

5.1. Identificación y origen de los aislamientos recuperados.

Se procesaron 159 muestras clínicas de las cuales 159 aislamientos se identificaron como del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii*. De éstos, 154 (97%) fueron identificadas a nivel molecular como *Acinetobacter baumannii* y sólo se continuó trabajando con estos 154 aislamientos.

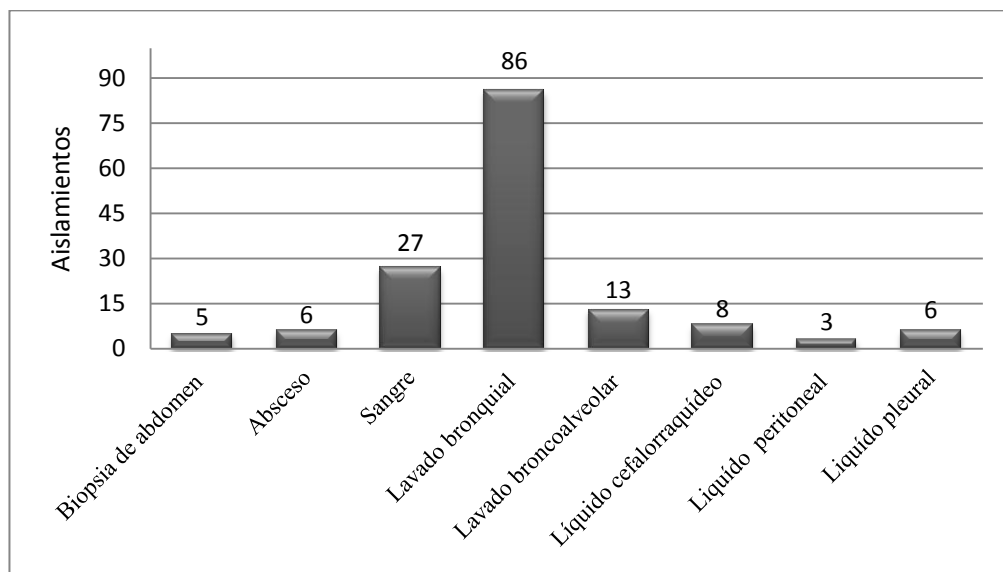
Los aislamientos identificados como *A. baumannii* se obtuvieron de ocho áreas hospitalarias distintas como se observa en la figura 8, el 79% correspondieron a aislamientos de unidades de cuidados intensivos tanto adultos como postquirúrgicos con un 36% y 43%, respectivamente. Además los aislamientos correspondieron a las siguientes áreas: medicina interna (7%), cirugía ambulatoria (6%), cirugía general (3%), cirugía plástica (2%), pensionistas (2%) y urgencias (1%).

Figura 8. Área hospitalaria de procedencia de los distintos aislamientos.



El 64% de los aislamientos analizados se obtuvieron de lavados bronquiales y broncoalveolares, seguidos de un 18% de muestras de sangre y los demás especímenes estudiados fueron: abscesos (4%), biopsias de abdomen (3%), líquidos estériles como líquido cefalorraquídeo (5%), pleural (4%) y peritoneal (2%), como se observa en la figura 9.

Figura 9. Tipo de especímenes analizados



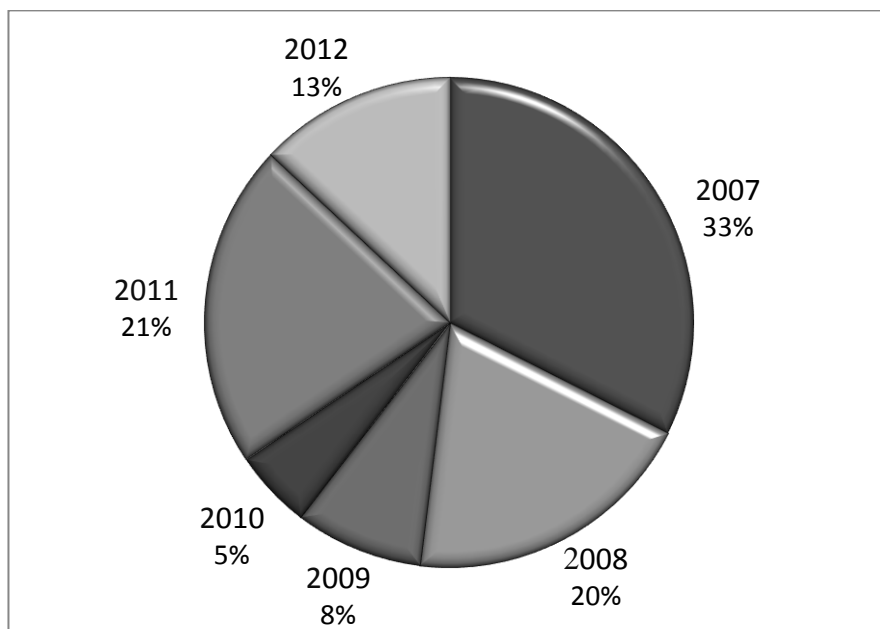
5.2. Distribución temporal de los aislamientos analizados.

La distribución de los aislamientos en los años estudiados fue heterogénea como se observa en la figura 10, la mayoría de los aislamientos que se analizaron fueron del 2007,

seguidos del 2011 y 2008; los años 2010 y 2009 fueron en los que se obtuvo una menor cantidad de aislamientos 8 y 13, respectivamente.

Esta distribución fue heterogénea debido a que no se pudo contar con aislamientos de todos los años. Además este estudio fue realizado a la par con un estudio clínico en el que se está revisando la historia clínica de los pacientes y solamente se incluyen aislamientos de los cuales se tiene el expediente clínico de los pacientes completo.

Figura 10. Distribución de los aislamientos en los años estudiados



5.3. Detección de clonas.

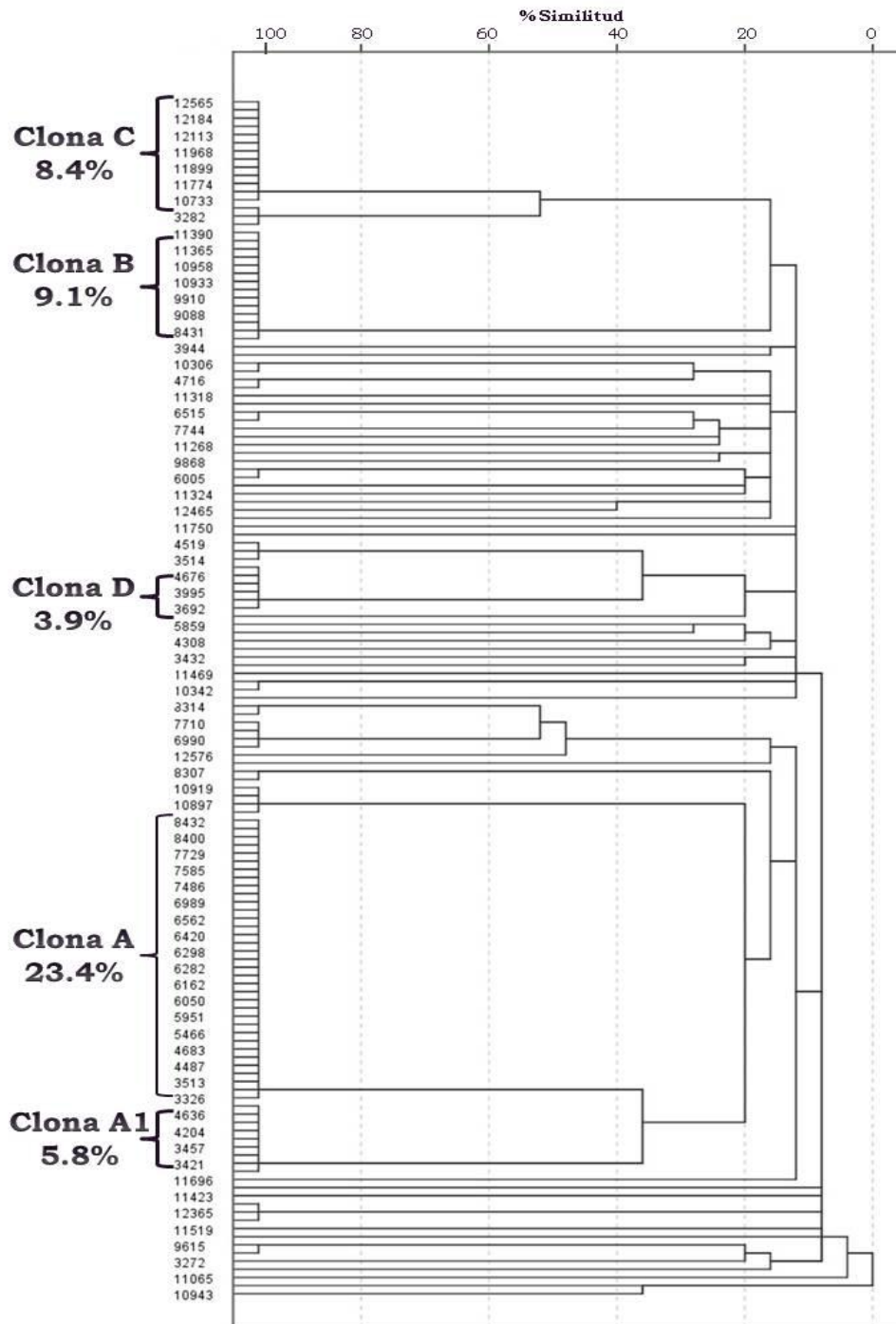
Para realizar la detección de clonas se llevó a cabo la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados empleando la enzima de restricción SmaI la cual, generó entre 14 y 20 fragmentos de restricción. De los 154 aislamientos analizados, tres fueron no

tipificables luego de cuatro intentos y en los 151 aislamientos restantes se presentaron 56 patrones de restricción diferentes con un porcentaje de similitud del 0 al 100%.

Se clasificó como clona a los aislamientos que presentaron una similitud del 100% en su patrón de restricción. Se obtuvieron 56 clones diferentes que se nombraron de la A a TT. De éstas, 18 clones presentaron más de un aislamiento y se realizó la clasificación en clones predominantes, considerando como clona predominante a aquella que presentó más de cinco aislamientos. Se obtuvieron cinco clones predominantes que corresponden a la clona A con un 23.4% de frecuencia, clona A1 con un 5.8%, clona B con un 9.1%, clona C con un 8.4% y clona D con un 3.9% de frecuencia. El porcentaje de similitud entre las 56 clones detectadas fue inferior al 60%, como puede observarse en el dendograma presentado en la figura 11.

Figura 11. Resultado de la detección de clonas en los aislamientos analizados.

A) Clasificación en clonas predominantes. B) Número de aislamiento. C) Dendograma.



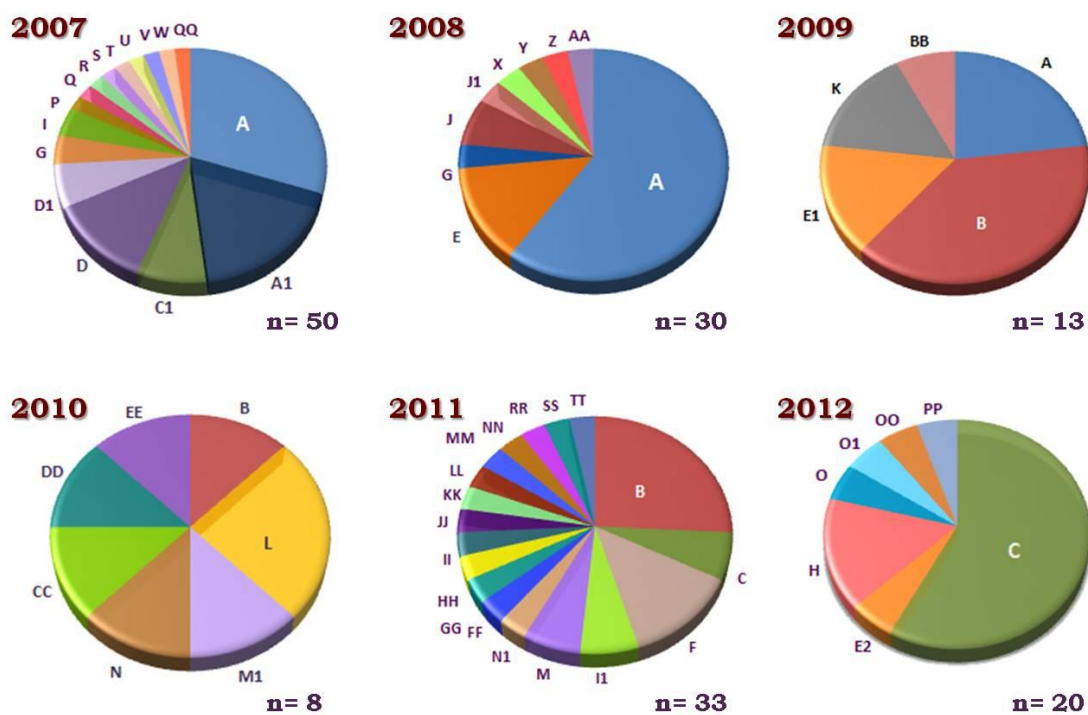
A

B

C

Las 56 clonas detectadas estuvieron distribuidas durante los seis años en los que se recolectaron las muestras y se presentó un mayor número de clonas circulantes en el año 2011 con 18 clonas, en el 2007 se presentaron 16 clonas y en el 2008 se presentaron 9 clonas como puede observarse en la figura 12.

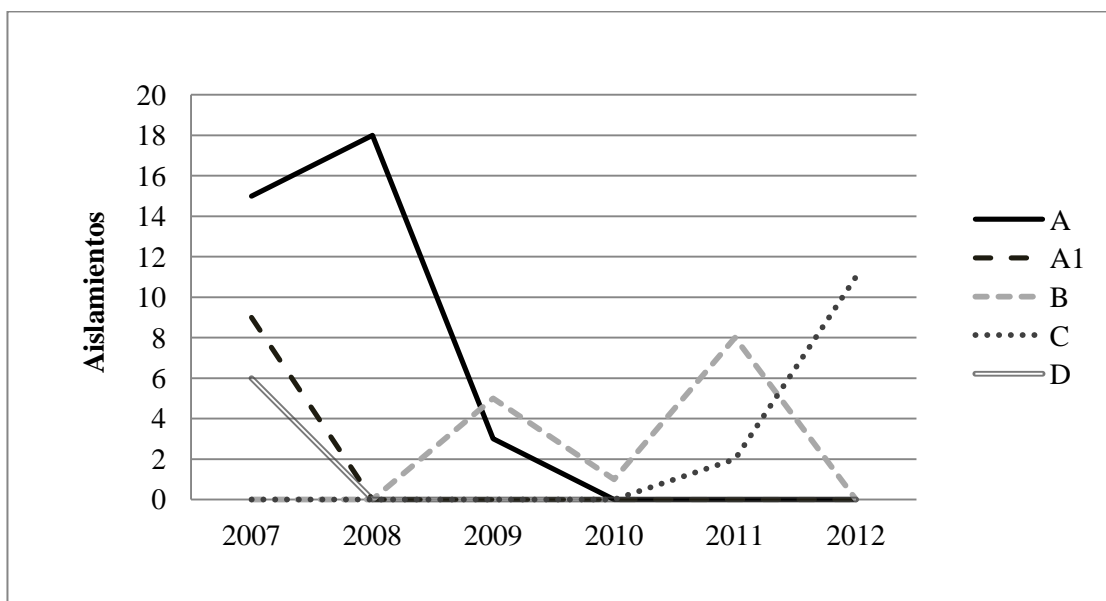
Figura 12.- Distribución temporal de todas las clonas encontradas



La clona A estuvo presente del 2007 al 2009, año en el cual fue desplazada por la clona B que estuvo presente hasta el 2011 y en ese año apareció una nueva clona que estuvo presente hasta el final del estudio y corresponde a la clona C. Además se puede

observar en la figura 13 que la clona A1 y D solo estuvieron presentes durante el año 2007.

Figura 13.- Distribución temporal de clonas predominantes



5.4. Perfil de susceptibilidad.

En la tabla 4 se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad obtenidas mediante el método de microdilución en caldo. Se presenta la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria para inhibir al 50 y 90% de aislamientos analizados y el porcentaje de aislamientos susceptibles y resistentes.

Para la ciprofloxacina y las cefalosporinas ceftazidime y cefotaxime se encontró un porcentaje de resistencia superior al 85% y para el imipenem y meropenem se detectó una resistencia del 50.7% y del 35.7% respectivamente. En el caso de la colistina y la tigeciclina, que corresponden el último recurso en el tratamiento de infecciones por

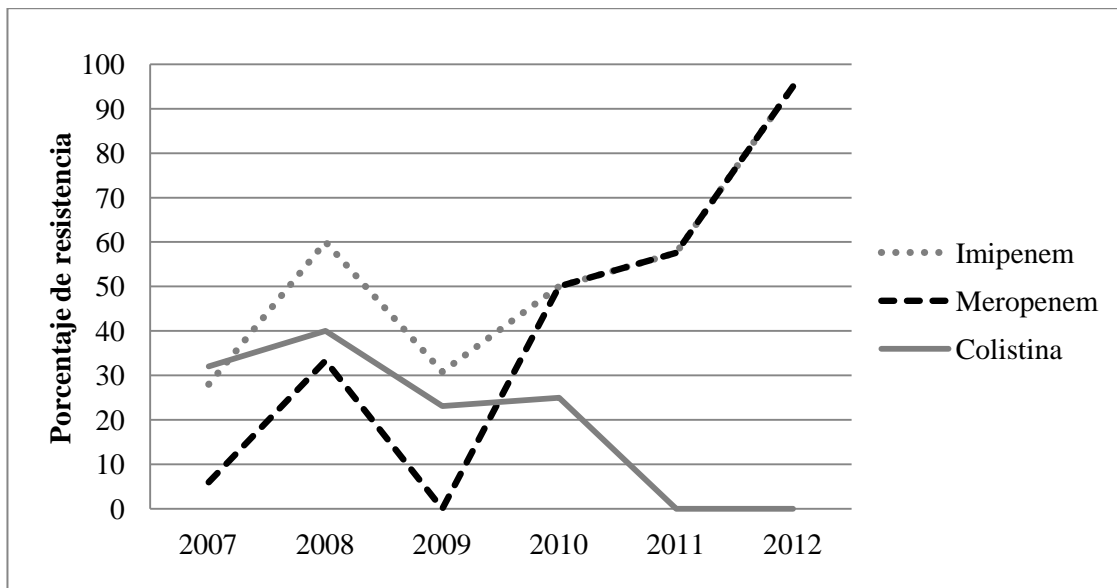
A. baumannii, se encontró una resistencia del 21.4% y 0%, respectivamente. Para la fosfomicina no se pudo efectuar la clasificación en aislamientos resistentes o susceptibles debido a que en ni el CLSI, BSAC o EUCAST establecen puntos de corte para este fármaco.

Tabla 4. Susceptibilidad a los distintos antibióticos estudiados

Antibiótico	CMI₅₀	CMI₉₀	Rango	Susceptibles	Resistentes
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	n (%)	n (%)
Ciprofloxacina	> 16	>16	<0.25 - >16	15 (9.7)	137 (89)
Levofloxacina	4	8	<0.5 - 32	33 (21.4)	37 (24)
Gentamicina	16	> 64	<1 - >64	65 (42.2)	77 (50)
Amikacina	64	> 128	<2 - >128	51 (33.1)	78 (50.7)
Ceftazidime	> 64	> 64	4 - >64	2 (1.3)	138 (89.6)
Cefotaxime	> 128	> 128	<2 - >128	5 (3.3)	134 (87)
Imipenem	16	> 64	<1 - >64	73 (47.4)	78 (50.7)
Meropenem	8	> 64	<1 - >64	77 (50)	55 (35.7)
Colistina	1	4	< 0.5 - 32	121 (78.6)	33 (21.4)
Fosfomicina	256	> 256	64 - >256	-	-
Tetraciclina	32	> 64	< 1 - >64	48 (31.2)	105 (68.2)
Tigeciclina	< 0.25	0.5	< 0.25 - 2	151 (98)	0 (0)

Como puede observarse en la figura 14 a partir del 2010 ocurrió un aumento en los porcentajes de resistencia a imipenem y meropenem. Además, se presentó una disminución en el porcentaje de resistencia a colistina y a partir del 2011 no se ha presentado ningún aislamiento resistente a este fármaco.

Figura 14.- Cambios en la resistencia a carbapenémicos y colistina.



Según lo señalado por Peleg y Manchada (2, 27) se realizó la clasificación de los aislamientos en multifarmacorresistente (MDR) a aquellos que fueron resistentes a tres o más de los siguientes tipos de fármacos: fluoroquinolonas, aminoglucósidos, cefalosporinas y tetraciclinas. Se clasificó como extesofarmacorresistente (XDR) a los aislamientos MDR que además presentaron resistencia a algún carbapenémico y en Panresistente (PDR) a los aislamientos XDR con resistencia a la colistina y a la tigeciclina.

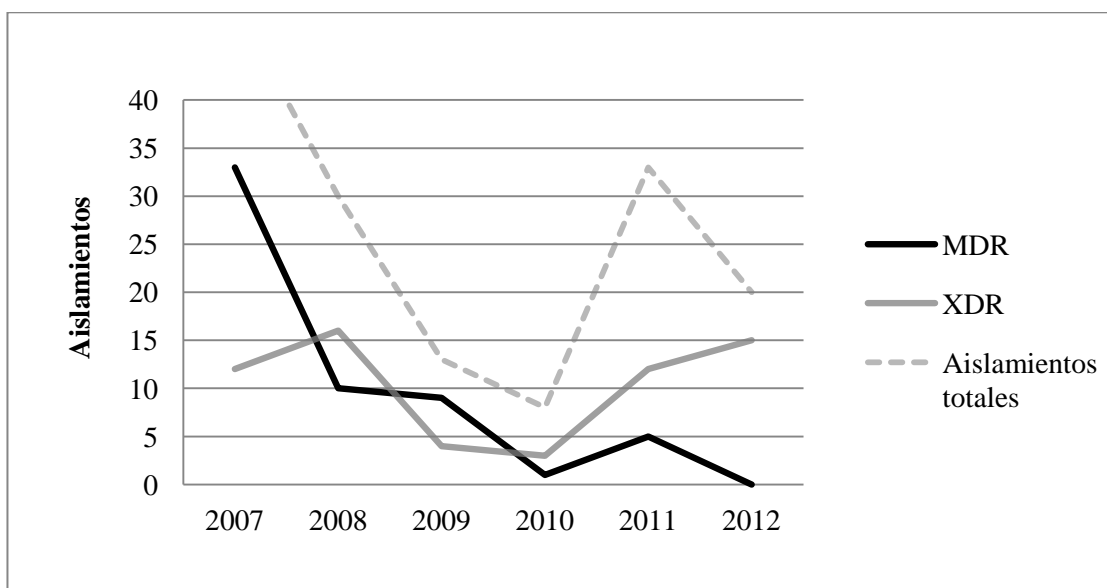
De los 154 aislamientos analizados, el 37.7% fueron MDR, el 40.3% XDR y ninguno fue PDR, como puede observarse en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de los aislamientos en función de su perfil de resistencia a los antibióticos.

Frecuencia n (%)	
MDR	58 (37.7)
XDR	62 (40.3)
PDR	0 (0)

A partir del 2010 ocurrió una disminución de los aislamientos MDR y un aumento de los aislamientos XDR y en el 2012 todos los aislamientos que presentaron resistencia fueron XDR (Figura 15).

Figura 15.- Distribución temporal de aislamientos MDR vs XDR



5.5. Genes asociados a resistencia a carbapenémicos.

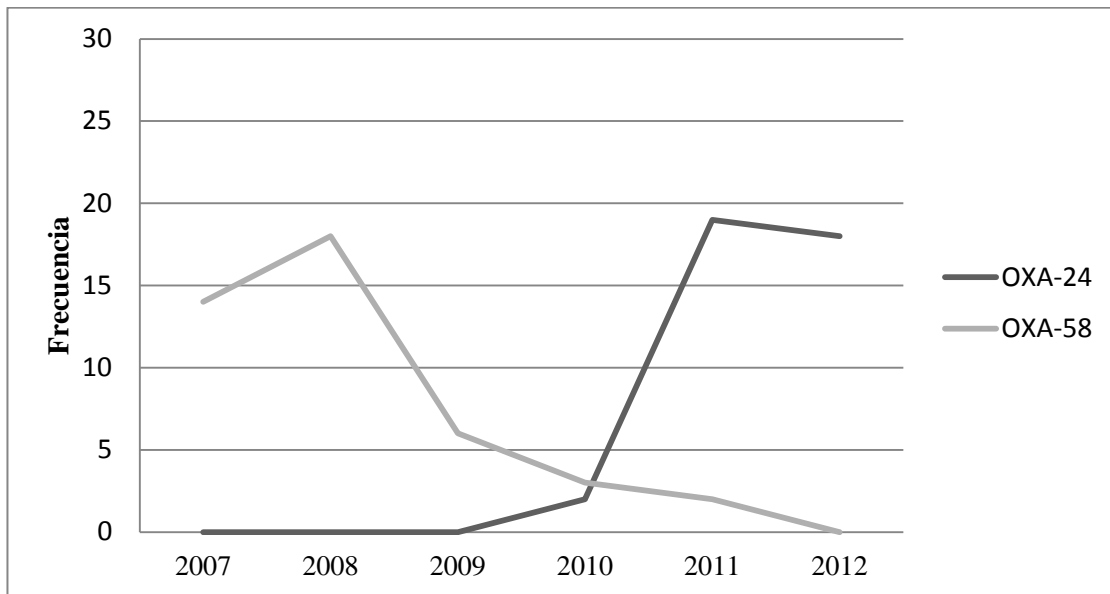
Se realizó la detección de los genes asociados a resistencia a carbapenémicos de la clase B (Tipo IMP y VIM) y de la clase D (Tipo OXA). En todos los aislamientos analizados se encontró el gen constitutivo OXA-51 y además se encontró OXA-24 con un 25.3% de frecuencia y OXA-58 en un 27.9%, como se observa en la tabla 6. No se detectó la presencia de los genes OXA-23, IMP ni VIM.

Tabla 6. Frecuencia de genes asociados a resistencia a carbapenémicos.

Genes	Frecuencia n (%)
Tipo Serina OXA	OXA-23 0 (0)
	OXA-24 39 (25.3)
	OXA-51 154 (100)
	OXA-58 43 (27.9)
Metalobetalactamasas	VIM 0 (0)
	IMP 0 (0)

El gen OXA-58 estuvo presente en los aislamientos del 2007 al 2011 y en el 2010 se detectaron los primeros aislamientos que presentaban OXA 24 el cual, desplazó a OXA-58 y estuvo presente hasta el final de este estudio como puede observarse en la figura 16.

Figura 16.- Distribución temporal de genes tipo OXA



Se analizó la relación entre la presencia de los genes OXA-24 y -58 con el perfil de resistencia obtenido para ambos carbapenémicos estudiados y se encontró que la presencia de OXA-24 favorece la resistencia a imipenem y meropenem como se describe en la tabla 7, en cambio la presencia de OXA-58 solo favorece a la resistencia a imipenem como se observa en la tabla 8. Además puede observarse que la concentración mínima inhibitoria 50 y 90 para el imipenem es mayor cuando está presente OXA-24 comparado con la presencia de OXA-58.

Tabla 7.- Relación de OXA-24 con el perfil de resistencia a carbapenémicos

Antimicrobiano	Con bla _{OXA-24}			Sin bla _{OXA-24}			P
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Resistencia n(%)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Resistencia n (%)	
Imipenem	> 64	> 64	39(100)	2	32	39 (34)	< 0.0001
Meropenem	> 64	> 64	39 (100)	< 1	16	16 (14)	< 0.0001

Tabla 8.- Relación de OXA-58 con el perfil de resistencia a carbapenémicos

Antimicrobiano	Con bla _{OXA-58}			Sin bla _{OXA-58}			P
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Resistencia n(%)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Resistencia n (%)	
Imipenem	32	32	38 (88)	2	> 64	40 (36)	< 0.0001
Meropenem	8	16	15 (35)	2	> 64	40 (36)	0.8935

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista de gran importancia en el ambiente hospitalario debido a su persistencia y a su creciente resistencia a los fármacos empleados en su tratamiento. En la última década ha ocurrido un aumento en la incidencia de cepas resistentes a carbapénemicos, que constituyen de los últimos fármacos empleados para tratar infecciones por este microorganismo. Esta creciente resistencia ha provocado un aumento en el estudio de los mecanismos asociados a la resistencia a este tipo de antibióticos, principalmente en las carbapenemasas y los genes que las codifican. Por lo anterior ha sido importante realizar un análisis del comportamiento de esta bacteria en un hospital de tercer nivel de Monterrey, Nuevo León, una de las ciudades más pobladas de México.

La totalidad de los aislamientos analizados se clasificaron como parte del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* y la mayoría (97%) se identificaron como *A. baumannii*, esto concuerda con lo señalado en diversas fuentes (2, 10, 64), ya que del género *Acinetobacter* esta especie es la que se aísla con mayor frecuencia en el medio hospitalario. Las principales áreas hospitalarias de las cuales se obtuvieron los aislamientos fueron las unidades de cuidados intensivos y predominaron especímenes de lavados bronquiales y broncoalveolares asociados a un cuadro de neumonía, esto también corresponde a lo previamente descrito por otros autores ya que la neumonía es la principal patología con la que se asocia este microorganismo (2, 31, 73).

Para analizar la diversidad clonal de los aislamientos se optó por la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados, que se considera el estándar de oro para tipificación epidemiológica y se decidió utilizar la enzima de restricción SmaI como lo reportado por Bou y colaboradores en el 2000 (68). En los 151 aislamientos que pudieron ser tipificados se detectaron 56 clones diferentes, lo que indicó una elevada clonalidad y concuerda con lo reportado anteriormente para este microorganismo (48, 74). El porcentaje de similitud observado para los aislamientos fue entre 0 y 100% y todos los aislamientos que no presentaron una homología del 100% tuvieron una similitud inferior al 60%, esto indica que estos aislamientos no se encuentran relacionados según lo señalado por Tenover (69) y además sugiere que la transmisión de este microorganismo entre los pacientes infectados ocurrió de manera exógena, lo que favoreció su diseminación por las diversas áreas que comprenden al hospital.

De las 56 clones detectadas se obtuvieron cinco clones predominantes que se consideran como clones endémicas. La clona A1 y D solo estuvieron presentes durante un año, mientras que las clones A, B y C tuvieron la capacidad de persistir hasta tres años en el ambiente hospitalario. Esta persistencia es similar a lo reportado en el 2011 por Villalón (48) que encontró que una de las clones detectadas estuvo presente en las diferentes áreas y hospitales estudiados durante once años. Esto se ve favorecido por la capacidad que presenta este microorganismo de resistir a la desecación y a diversos fármacos y por su capacidad de formar biopelícula en superficies abióticas.

Para obtener el perfil de susceptibilidad se siguió el protocolo y se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI para el método de microdilución en caldo. Se obtuvo una elevada resistencia a varios de los antibióticos estudiados y el porcentaje de

aislamientos resistentes para la ciprofloxacina (89%), ceftazidime (89.6%) y gentamicina (50%) fue similar a lo reportado por el Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY en el 2012 en aislamientos obtenidos en América Latina (75) donde obtuvieron una resistencia de 87.2% para la ciprofloxacina, 81.7% para el ceftazidime y de 53.3% para la gentamicina. Además SENTRY reportó porcentajes de resistencia de 67.8% para el imipenem y 66.1% para el meropenem, estos valores son mayores a los obtenidos en nuestro estudio en el cual, se encontró 50.7% de resistencia al imipenem y de 35.7% para el meropenem. Se observó que el porcentaje de resistencia para ambos carbapenémicos aumentó gradualmente, en los primeros años era mayor la resistencia para el imipenem que para el meropenem y a partir del 2010 el porcentaje de resistencia para ambos fármacos se igualó; esto puede deberse al aumento de la exposición de este microorganismo al meropenem.

En el caso de la fosfomicina no fue posible realizar la clasificación en aislamientos susceptibles y resistentes debido a que no existen puntos de corte establecidos por el CLSI, EUCAST, FDA ni la BSAC; sin embargo el resultado obtenido en este estudio es superior a lo reportado por Lu y colaboradores en el 2011 (76), que encontraron que el 29% de los aislamientos estudiados presentó una CMI ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ y en los aislamientos analizados en este estudio el 86.4% presentó una CMI $\geq 256\mu\text{g/mL}$.

La colistina y la tigeciclina corresponden al último recurso empleado en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* MDR y en este análisis ninguno de los aislamientos presentó resistencia a la tigeciclina y la susceptibilidad detectada fue del 98%. En cambio para la colistina se presentó una resistencia del 21.4% que es un valor superior al reportado por el SENTRY (1.2%), pero es similar al reportado por Arroyo en

el 2005 de 19.1% (77). Los aislamientos obtenidos del 2007 al 2010 presentaron resistencia a la colistina y a partir del 2011 ningún aislamiento fue resistente a este fármaco. La disminución en la resistencia a la colistina puede deberse a una mejora en el empleo de este fármaco en el tratamiento de pacientes infectados o que este antibiótico dejó de emplearse en la práctica clínica habitual, lo que contribuyó a que no se llevara a cabo la selección de los microorganismos resistentes y favoreciera la persistencia de éstos en el hospital (30).

En los aislamientos estudiados se realizó la determinación de los genes OXA (-23, -24, -51 y -58), VIM e IMP y sólo se detectó OXA-24, OXA-51 y OXA-58. El resultado obtenido para OXA-51 era el esperado ya que corresponde a un gen constitutivo de esta especie. OXA-58 se ha encontrado con mayor frecuencia en Europa, mientras que OXA-24 ha sido aislado esporádicamente (21). En América OXA-24 y OXA-58 también han sido reportados previamente, OXA-24 se encontró en el 2011 en Estados Unidos (40), mientras que OXA-58 se ha reportado en Bolivia, Brasil y Argentina (41-43). Lo encontrado en nuestro estudio corresponde al primer reporte de ambos genes en México y al primer reporte de OXA-24 en América Latina. Además la elevada frecuencia de estos genes y su presencia en varias de las clonas detectadas sugiere que se encuentran localizados en plásmidos, lo que permitió su transmisión horizontal.

La frecuencia de los genes OXA-24 y OXA-58 fue de 25.3% y 27.9%, respectivamente y ambos genes estuvieron presentes en varias de las clonas detectadas; lo que sugiere que se encuentran localizados en plásmidos y esto permitió que ocurriera una transmisión horizontal de estos genes de resistencia.

Se analizó la distribución temporal de ambos genes y se observó que el primer gen que estuvo presente fue OXA-58 pero en el 2012 fue desplazado en su totalidad por OXA-24. Se encontró que la clona A, que fue la de mayor persistencia y prevalencia sólo presentó OXA-58, mientras que la clona B que la desplazó presentó aislamientos que contenían OXA-58 y otros con OXA-24 y la clona C sólo presentó OXA-24. Además se analizó la relación entre la presencia de ambos genes y el perfil de resistencia a carbapenémicos obtenido y se encontró que la presencia de OXA-24 favorece la resistencia a ambos carbapenémicos, mientras que la presencia de OXA-58 solo favorece la resistencia para el imipenem y no para el meropenem ($P= 0.8502$), además la CMI_{50} y la CMI_{90} detectadas son mayores para ambos fármacos cuando está presente OXA-24. Esto coincide con lo previamente observado, ya que se ha detectado que la presencia de OXA-24 produce valores de CMI superiores que cuando está presente el gen OXA-58 (2). Sin embargo estos valores superiores podrían deberse realmente a la presencia de *ISAbal* río arriba del gen OXA-24 y no a una mayor actividad enzimática por parte de la enzima codificada (78).

El aumento en la resistencia a carbapenémicos debido a la presencia de OXA-24 puede ser el factor principal que favoreció el desplazamiento de la clona A y B por la clona C que presentó aislamientos más resistentes a ambos carbapenémicos. Esto se ve apoyado por la poca persistencia que se observó en las clonas A1 y D, que no presentaron ningún gen de resistencia y además mostraron un fenotipo susceptible a carbapenémicos.

En 153 de las cepas estudiadas se encontró correlación entre el perfil genotípico y el fenotípico detectado y sólo una cepa (12465) mostró un perfil fenotípico que no concordó con su perfil genotípico, debido a que presentó resistencia para imipenem y

meropenem y solo se detectó OXA-51 que se ha reportado confiere poca o nula resistencia a carbapenémicos (2); sin embargo la presencia de *ISAbal* río arriba del gen de OXA-51 favorece su expresión y la resistencia a este grupo de antibióticos. (52) Es por ello que se considera que *ISAbal* puede estar presente en este aislamientos favoreciendo la resistencia para imipenem y meropenem. De no estar presente esta secuencia de inserción la resistencia a estos fármacos podría deberse a la presencia de otro gen que codifique para una carbapenemasa como NDM, que recientemente se ha reportado en esta especie (79). Este aislamiento resulta de gran interés para analizar cuál es el mecanismo de resistencia a carbapenémicos que está involucrado.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- Los aislamientos analizados presentaron alta clonalidad.
- Se identificaron 56 clonas con una similitud del 0 al 100%.
- Se observó la prevalencia de tres clonas durante los seis años de estudio.
- Los aislamientos presentaron alta resistencia a ciprofloxacina, ceftazidime, cefotaxime (>85%) e imipenem (50.7%).
- Se detectó una elevada frecuencia de los genes tipo OXA-24 y OXA-58.
- Éste es el primer reporte de la presencia de estos genes en México y de OXA-24 en América Latina.
- No se encontraron los genes OXA-23, IMP ni VIM.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS

1. Henriksen SD. Moraxella, Acinetobacter, and the Mimeae. Bacteriological reviews. 1973;37(4):522-61. Epub 1973/12/01.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clinical microbiology reviews. 2008;21(3):538-82. Epub 2008/07/16.
3. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). Journal of bacteriology. 1968;95(5):1520-41. Epub 1968/05/01.
4. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus Acinetobacter. Research in microbiology. 1989;140(4-5):291-9. Epub 1989/05/01.
5. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 1989;97(7):595-605. Epub 1989/07/01.
6. Yang YS, Lee YT, Huang TW, Sun JR, Kuo SC, Yang CH, et al. Acinetobacter baumannii nosocomial pneumonia: is the outcome more favorable in non-ventilated than ventilated patients? BMC infectious diseases. 2013;13:142. Epub 2013/03/21.
7. Di Nocera PP, Rocco F, Giannouli M, Triassi M, Zarrilli R. Genome organization of epidemic Acinetobacter baumannii strains. BMC microbiology. 2011;11:224. Epub 2011/10/12.
8. 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. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2003;53(Pt 5):1563-7. Epub 2003/09/18.
9. Chiang MC, Kuo SC, Chen SJ, Yang SP, Lee YT, Chen TL, et al. Clinical characteristics and outcomes of bacteremia due to different genomic species of Acinetobacter baumannii complex in patients with solid tumors. Infection. 2012;40(1):19-26. Epub 2011/09/03.
10. Chen TL, Siu LK, Wu RC, Shiao MF, Huang LY, Fung CP, et al. Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of Acinetobacter baumannii. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007;13(8):801-6. Epub 2007/05/10.
11. Zander E, Higgins PG, Fernandez-Gonzalez A, Seifert H. Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of Acinetobacter baumannii. International journal of medical microbiology : IJMM. 2013;303(2):88-9. Epub 2013/02/05.
12. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2006;42(5):692-9. Epub 2006/02/01.
13. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1999;18(3):179-83. Epub 1999/06/05.

14. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *The Journal of hospital infection*. 1999;42(3):201-4. Epub 1999/08/10.
15. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*. 2013;37(2):130-55. Epub 2012/05/10.
16. 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. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(12):2881-7. Epub 1996/12/01.
17. Wisplinghoff H, Schmitt R, Wohrmann A, Stefanik D, Seifert H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of hospital infection*. 2007;66(2):174-81. Epub 2007/05/15.
18. Sanchez CJ, Jr., Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC infectious diseases*. 2013;13:47. Epub 2013/01/30.
19. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(12):939-51. Epub 2007/11/17.
20. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012;3(3):243-50. Epub 2012/05/02.
21. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(2):105-14. Epub 2011/11/25.
22. Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, Martin M, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Critical care nurse*. 2008;28(1):15-25; quiz 6. Epub 2008/02/02.
23. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PloS one*. 2011;6(2):e17027. Epub 2011/03/10.
24. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(3):219-26. Epub 2010/01/06.
25. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC genomics*. 2011;12:126. Epub 2011/02/24.
26. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(10):3471-84. Epub 2007/07/25.
27. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *acinetobacter*. *Journal of global infectious diseases*. 2010;2(3):291-304. Epub 2010/10/12.
28. Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. *Clinical therapeutics*. 2012;34(1):101-12. Epub 2011/12/20.
29. Garza-Gonzalez E, Llaca-Diaz JM, Bosques-Padilla FJ, Gonzalez GM. Prevalence of multidrug-resistant bacteria at a tertiary-care teaching hospital in Mexico: special focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*. 2010;56(4):275-9. Epub 2010/08/10.

30. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1607-15. Epub 2012/03/24.
31. Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(1):8-13. Epub 2001/01/04.
32. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(4):1382-90. Epub 2003/03/26.
33. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(2):306-25. Epub 2005/04/16.
34. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;43 Suppl 2:S49-56. Epub 2006/08/09.
35. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei medical journal*. 2011;52(6):879-91. Epub 2011/10/27.
36. 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. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(4):351-3. Epub 2006/03/28.
37. 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. *Journal of infection in developing countries*. 2009;3(5):335-41. Epub 2009/09/18.
38. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenemase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iranian journal of microbiology*. 2011;3(2):68-74. Epub 2012/02/22.
39. Lee Y, Kim CK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(1):361-3. Epub 2010/10/13.
40. Markelz AE, Mende K, Murray CK, Yu X, Zera WC, Hospenthal DR, et al. Carbapenem susceptibility testing errors using three automated systems, disk diffusion, Etest, and broth microdilution and carbapenem resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(10):4707-11. Epub 2011/08/03.
41. Sevillano E, Fernandez E, Bustamante Z, Zabalaga S, Rosales I, Umaran A, et al. Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolivia. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(Pt 1):80-4. Epub 2011/08/30.
42. Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonca-Souza CR, Teixeira LM, et al. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):368-70. Epub 2011/06/10.
43. Stietz MS, Ramirez MS, Vilacoba E, Merkier AK, Limansky AS, Centron D, et al. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular*

- epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2013;14:294-301. Epub 2013/01/15.
44. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*. 1996;9(2):148-65. Epub 1996/04/01.
 45. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2003;24(4):284-95. Epub 2003/05/03.
 46. Da Silva G, 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. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007;13(2):190-5. Epub 2007/03/03.
 47. 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. *The Journal of hospital infection*. 2004;58(3):170-9. Epub 2004/10/27.
 48. Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(3):875-82. Epub 2010/12/24.
 49. Ansaldi F, Canepa P, Bassetti M, Zancolli M, Molinari MP, Talamini A, et al. Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. *The Journal of hospital infection*. 2011;79(2):134-40. Epub 2011/08/09.
 50. Chen Z, Liu W, Zhang Y, Li Y, Jian Z, Deng H, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from XiangYa Hospital, in Hunan Province, China. *Journal of basic microbiology*. 2013;53(2):121-7. Epub 2012/05/15.
 51. Lee YT, Fung CP, Wang FD, Chen CP, Chen TL, Cho WL. Outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex harboring different carbapenemase gene-associated genetic structures in an intensive care unit. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2012;45(1):43-51. Epub 2011/12/16.
 52. Chaulagain BP, Jang SJ, Ahn GY, Ryu SY, Kim DM, Park G, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb1-bla(OXA-51-like) genes in a Korean hospital. *Japanese journal of infectious diseases*. 2012;65(2):162-6. Epub 2012/03/27.
 53. Yuji K, Oiso G, Matsumura T, Murashige N, Kami M. Police investigation into multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in Japan. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(3):422. Epub 2011/01/11.
 54. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Archives of internal medicine*. 2002;162(13):1515-20. Epub 2002/07/02.
 55. Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb1 upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiology and infection*. 2012:1-4. Epub 2012/06/22.
 56. Ratto P, Sordelli DO, Abeleira E, Torrero M, Catalano M. Molecular typing of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex isolates from endemic and epidemic nosocomial infections. *Epidemiology and infection*. 1995;114(1):123-32. Epub 1995/02/01.

57. Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, et al. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(7):2630-4. Epub 2006/07/11.
58. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten 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. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(12):1577-84. Epub 2007/05/23.
59. Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Dooley DP, Wenner K, Hammock J, et al. Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Military medicine*. 2006;171(9):826-9. Epub 2006/10/14.
60. Naas T, Kernbaum S, Allali S, Nordmann P. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(4):669-71. Epub 2007/06/15.
61. Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P. Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;57(4):794-5. Epub 2006/02/16.
62. Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, Massire C, Della-Latta P, Wu F, et al. Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* clone in a US hospital outbreak by multilocus polymerase chain reaction/electrospray-ionization mass spectrometry. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;72(1):14-9. Epub 2011/10/22.
63. Carretto E, Barbarini D, Farina C, Grosini A, Nicoletti P, Manso E. Use of the DiversiLab semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008;60(1):1-7. Epub 2007/09/25.
64. 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. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(12):4471-8. Epub 2006/10/20.
65. 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. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(12):3071-7. Epub 1997/12/17.
66. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*. 2000;6(3):189-98. Epub 2001/01/06.
67. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(4):1574-85. Epub 2003/04/19.
68. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran 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*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000;6(12):635-43. Epub 2001/04/04.

69. 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. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233-9. Epub 1995/09/01.
70. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;64(3):454-89. Epub 2009/07/10.
71. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(2):321-2. Epub 2006/12/23.
72. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8(6):321-31. Epub 2002/06/27.
73. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB life*. 2011;63(12):1055-60. Epub 2011/10/13.
74. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(5):1402-7. Epub 1995/05/01.
75. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;73(4):354-60. Epub 2012/06/05.
76. Lu CL, Liu CY, Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Turnidge JD, et al. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomycin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(9):4295-301. Epub 2011/06/15.
77. Arroyo LA, Garcia-Curiel A, Pachon-Ibanez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachon J, et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(2):903-5. Epub 2005/02/08.
78. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*. 2006;258(1):72-7. Epub 2006/04/25.
79. Decousser J, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin R, Anais L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013;18(31). Epub 2013/08/10.

ANEXO I

Pruebas fenotípicas para identificación a nivel de género

Tinción de Gram

Sobre un portaobjetos limpio y seco se colocó una gota de solución salina estéril, posteriormente con un asa bacteriológica se transfirió una colonia a la solución salina y se homogenizó el inóculo, se extendió y se dejó secar. La preparación se fijó por calor y después se cubrió con cristal violeta durante un minuto, se enjuagó con agua, después se aplicó lugol, se dejó por un minuto y se enjuagó con agua, se decoloró con una mezcla de alcohol-acetona 70:30 por 5 segundos, se enjuagó con agua y se agregó safranina durante 1 minuto, se enjuagó con agua, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se observó al microscopio con los objetivos de 40X y 100X.

Crecimiento en Agar MacConkey y medio TSI

Se partió de un cultivo puro de 24 horas para realizar una resiembra en Agar MacConkey resembrando en tres zonas empleando un asa de platino y además se inoculó un medio de TSI, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C y transcurrido este tiempo se observó el crecimiento y se realizó la interpretación de la siguiente manera:

- Agar MacConkey.
 - Los microorganismos fermentadores forman colonias de color rosa.
 - Los microorganismos oxidativos forman colonias incoloras o de color muy claro.

➤ Medio TSI.

- En los microorganismos fermentadores se observa un cambio en la coloración del medio de rojizo a amarillo en el fondo o por completo.
- En los microorganismos oxidativos se observa el medio sin cambio de color, es decir permanece de color rojizo.

Prueba de catalasa. Prueba en portaobjetos

Sobre un portaobjeto limpio u seco se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30%, con un asa bacteriológica se transfirió una pequeña cantidad del crecimiento de una colonia a la gota del peróxido de hidrógeno y se observó para comprobar el desarrollo de burbujas de oxígeno. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- **Positivo:** Producción de una gran cantidad de burbujas.
- **Negativo:** Ausencia de burbujas o muy poca cantidad.

Prueba de oxidasa. Método de Kovac

Se humedeció un papel filtro con 2-3 gotas de dihidroclorhidrato de tetra-metil-*p*-fenilendiamina al 1% y en este se colocó y extendió una colonia de no más de 24 horas, empleando un palillo de madera, durante los siguientes 10 segundos se observó en busca de un cambio de color. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- **Positivo:** Desarrollo de color violeta oscuro dentro de 10 segundos
- **Negativo:** Ausencia de color

Movilidad

Se partió de un cultivo puro de 24 horas para realizar una resiembra por punción profunda utilizando un asa bacteriológica en punta en el medio semisólido de SIM, se inoculó el centro del tubo y la punción abarcó aproximadamente dos tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie, el medio se incubó de 18 a 24 hr a 37°C. La interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera:

- **Positivo:** Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- **Negativo:** Crecimiento solamente en la línea de siembra.

Tabla 2. Recopilación de resultados de los aislamientos analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especímen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad											Clasificación			OXA					
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58					
3759	690286-2	Cirugía plástica	Lavado bronquial	20/04/2007	A	R	I	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
3813	698833-0	UCIPQ	Sangre	30/04/2007	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	Neg	Pos	Neg
3944	431692-9	UCIPQ	Lavado Bronquial	18/05/2007	S	R	I	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	Neg	Pos	Pos
3945	699863-5	UCIPQ	Lavado Bronquial	18/05/2007	D	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
3995	706621-9	UCIA	Lavado Bronquial	22/05/2007	D	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4046	708466-6	UCIPQ	Lavado Bronquial	28/05/2007	A1	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4204	712557-7	UCIA	Lavado Bronquial	18/06/2007	A1	R	I	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4285	079382-5	Cirugia ambulatoria	Abdomen	27/06/2007	A1	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4308	710602-0	UCIPQ	Lavado Bronquial	28/06/2007	T	R	R	S	R	I	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Pos
4363	715967-1	UCIPQ	Lavado Bronquial	03/07/2007	A1	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4393	717035-4	UCIA	Lavado broncoalveolar	05/07/2007	D	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4396	716685-5	UCIPQ	Absceso	05/07/2007	D	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4487	711215-1	Medicina Interna	Lavado broncoalveolar	11/07/2007	A	R	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4519	712710-1	UCIA	Lavado bronquial	13/07/2007	D1	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	XDR	Neg	Pos	Pos
4542	0717195-0	UCIA	Lavado broncoalveolar	16/07/2007	A	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Pos

Tabla 3. Recopilación de resultados de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especimen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad											Clasificación			OXA		
						CIP	LEV	GEN	AMIK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58		
4572	0475042-0	Pensionistas	Lavado broncoalveolar	18/07/2007	U	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S	>256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
4573	0717839-2	UCIPQ	Lavado bronquial	18/07/2007	D1	R	I	R	R	R	S	S	S	R	>256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg	
4636	0675766-1	Medicina Interna	Lavado broncoalveolar	24/07/2007	A1	S	S	S	S	I	I	S	S	R	>256	S	S	-	Neg	Pos	Neg	
4676	0719768-4	UCIA	Lavado bronquial	25/07/2007	D	R	S	R	R	R	S	S	S	S	>256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg	
4683	0720992-5	UCIPQ	Abdomen	26/07/2007	A	R	I	S	R	R	R	I	S	S	>256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
4687	0721823-9	UCIPQ	Lavado bronquial	26/07/2007	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg	
4716	0720754-0	UCIPQ	Lavado broncoalveolar	27/07/2007	I	R	I	R	R	R	R	S	S	S	>256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
4958	725067-3	UCIA	Lavado bronquial	16/08/2007	I	R	I	R	R	R	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg	
5087	0727220-4	UCIPQ	Lavado bronquial	24/08/2007	A	R	I	S	I	R	R	I	R	R	>256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
5466	0731063-6	UCIPQ	Abdomen	26/09/2007	A	R	R	S	R	R	R	I	S	S	>256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
5768	0520287-5	UCIA	Lavado bronquial	31/10/2007	A	R	I	S	I	R	R	I	S	S	128	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
5859	0743141-5	UCIPQ	Lavado bronquial	08/11/2007	QQ	R	S	R	R	R	S	S	S	R	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg	
5934	0738833-6	UCIPQ	Lavado broncoalveolar	21/11/2007	W	R	I	S	S	R	R	R	S	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
5951	0054682-6	UCIPQ	Sangre	22/11/2007	A	R	S	S	R	R	R	I	S	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos	
5952	0605577-5	UCIA	Lavado bronquial	22/11/2007	G	R	I	R	S	R	R	S	S	R	128	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg	

Tabla 4. Recopilación de resultados de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especimen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad												Clasificación			OXA			
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58				
6005	0742836-3	UCIA	Lavado bronquial	30/11/2007	G	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	>256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
6015	0748880-6	UCIPQ	Lavado bronquial	03/12/2007	A	R	I	S	I	R	R	R	I	S	R	I	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6050	0745673-0	Pensionistas	Líquido peritoneal	05/12/2007	A	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	>256	S	S	-	Neg	Pos	Neg
6125	0750384-6	UCIA	Lavado bronquial	12/12/2007	A	R	S	R	R	R	R	R	I	S	R	I	S	128	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6162	0740704-2	Cirugía ambulatoria	Abdomen	14/12/2007	A	R	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6257	0753904-9	Cirugía ambulatoria	Absceso	31/01/2008	G	R	I	R	I	R	R	R	S	R	R	S	R	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
6258	0758536-6	UCIPQ	Lavado bronquial	31/01/2008	A	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6282	0505873-4	Medicina Interna	Lavado bronquial	07/02/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	I	S	R	I	S	>256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6297	0644971-6	UCIPQ	Lavado bronquial	08/02/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6298	0760569-3	UCIPQ	Lavado bronquial	08/02/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Pos
6364	0760836-6	Medicina Interna	Lavado bronquial	19/02/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	I	S	R	I	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6420	0733272-8	Cirugía.gral	Líquido cefalorraquídeo	27/02/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6453	0120197-6	UCIA	Lavado bronquial	03/03/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6515	0765032-9	UCIA	Lavado bronquial	07/03/2008	J	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	>256	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
6516	0765091-4	UCIA	Lavado bronquial	07/03/2008	X	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg
6545	0765897-7	UCIPQ	Lavado bronquial	12/03/2008	Y	R	I	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	128	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg

Tabla 5. Recopilación de resultados de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especímen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad												Clasificación			OXA			
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58				
6562	0759998-6	UCIA	Lavado broncoalveolar	13/03/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	128	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6563	0127593-9	UCIA	Lavado bronquial	13/03/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6564	0527197-4	UCIPIQ	Lavado bronquial	13/03/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6859	0776484-8	Cirugía ambulatoria	Absceso	06/05/2008	E	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
6989	0776787-0	UCIA	Lavado bronquial	19/05/2008	A	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
6990	0780935-1	Medicina Interna	Lavado bronquial	19/05/2008	E	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
7260	784583-2	UCIA	Lavado bronquial	06/06/2008	A	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
7449	0786421-8	Pensionistas	Lavado bronquial	27/06/2008	J	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	256	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
7486	0786946-3	Medicina Interna	Lavado bronquial	02/07/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	256	S	S	-	Neg	Pos	Pos
7514	0791552-9	Medicina Interna	Lavado bronquial	04/07/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
7585	0454046-2	UCIA	Lavado bronquial	10/07/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
7679	796143-7	Medicina Interna	Lavado bronquial	28/07/2008	Z	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg
7710	790768-7	Urgencias	Líquido pleural	31/07/2008	E	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
7712	0795047-4	UCIPIQ	Lavado bronquial	31/07/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
7729	0796707-6	UCIA	Lavado bronquial	05/08/2008	A	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
7739	0758578-2	Cirugía gral	Líquido cefalorraquídeo	06/08/2008	A	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos

Tabla 6. Recopilación de resultados de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especímen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad												OXA				
						CIP	LEV	GEN	AMIK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	Classificación	24	51	58	
7744	795887-5	UCIPQ	Lavado bronquial	07/08/2008	J1	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	256	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
7885	0817229-8	UCIPQ	Lavado broncoalveolar	14/11/2008	E	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
7921	0820339-4	Medicina Interna	Lavado bronquial	05/12/2008	AA	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	256	R	I	MDR	Neg	Pos	Neg
8307	602443-1	UCIPQ	Lavado bronquial	20/07/2009	K	R	R	R	R	I	R	I	R	I	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
8314	862297-9	Medicina Interna	Lavado bronquial	21/07/2009	E1	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
8343	861265-4	UCIPQ	Lavado bronquial	24/07/2009	B	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	256	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
8366	864819-2	UCIPQ	Lavado broncoalveolar	30/07/2009	K	R	I	R	S	I	R	I	R	I	S	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
8400	0684357-5	UCIPQ	Sangre	05/08/2009	A	R	R	I	R	R	R	S	S	R	R	256	S	S	MDR	Neg	Pos	Pos
8422	865754-2	UCIPQ	Lavado bronquial	07/08/2009	E1	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
8431	781846-9	UCIPQ	Lavado bronquial	11/08/2009	B	R	I	S	R	R	R	R	I	S	S	256	S	S	XDR	Neg	Pos	Pos
8432	865788-8	UCIPQ	Lavado bronquial	11/08/2009	A	R	S	R	I	I	I	S	S	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Pos
8461	866464-5	UCIA	Lavado bronquial	17/08/2009	BB	R	R	R	R	R	R	I	I	S	S	256	R	S	MDR	Neg	Pos	Neg
8496	867294-2	UCIA	Lavado bronquial	21/08/2009	A	R	I	S	R	R	R	R	I	R	R	256	R	S	XDR	Neg	Pos	Pos
8519	869056-4	UCIA	Lavado bronquial	26/08/2009	B	R	I	I	R	R	R	S	S	S	64	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
9088	888521-0	UCIPQ	Lavado bronquial	07/12/2009	B	R	R	R	R	R	R	S	S	S	256	S	S	S	MDR	Neg	Pos	Neg
9089	0889954-1	UCIA	Lavado bronquial	07/12/2009	B	R	R	R	R	R	R	S	S	S	128	S	I	S	MDR	Neg	Pos	Neg

Tabla 7. Recopilación de resultados de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especimen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad												Clasificación			OXA		
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58			
9320	893848-7	UCIPQ	Líquido cefalorraquídeo	18/08/2010	CC	S	S	S	S	R	I	S	S	R	> 256	S	S	Neg	Pos	Neg			
9615	180655-5	Cirugía ambulatoria	Abdomen	07/10/2010	L	R	R	S	R	R	R	R	R	R	256	R	S	Neg	Pos	Pos			
9700	946078-9	UCIPQ	sangre	20/10/2010	L	R	R	S	R	R	R	R	R	S	128	S	S	Neg	Pos	Pos			
9765	945189-7	UCIPQ	Lavado bronquial	04/11/2010	N	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S	Pos	Pos	Neg			
9847	872177-3	UCIA	Lavado bronquial	19/11/2010	M1	S	S	R	S	I	S	S	S	S	64	S	S	Neg	Pos	Pos			
9864	952453-8	UCIA	Lavado bronquial	23/11/2010	DD	R	I	I	R	R	R	S	S	S	128	S	S	Neg	Pos	Neg			
9868	951600-8	UCIA	Lavado bronquial	23/11/2010	EE	S	S	S	S	R	I	S	S	S	256	R	S	Neg	Pos	Neg			
9910	951772-4	Medicina Interna	Lavado broncoalveolar	02/12/2010	B	R	I	I	S	R	R	R	R	S	256	S	S	Pos	Pos	Neg			
10306	613550-7	UCIA	Líquido pleural	30/03/2011	I1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S	Pos	Pos	Neg			
10307	967184-6	UCIA	Líquido pleural	30/03/2011	I1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S	Pos	Pos	Neg			
10321	960937-2	UCIPQ	Sangre	31/03/2011	M	R	S	S	S	R	R	I	S	S	256	R	S	Neg	Pos	Pos			
10342	934463-0	UCIPQ	Lavado bronquial	01/04/2011	M	R	I	S	S	R	R	S	S	S	> 256	R	S	Neg	Pos	Pos			
10374	968876-9	Cirugía plástica	Líquido peritoneal	06/04/2011	F	R	I	R	I	R	R	R	R	S	256	S	S	Pos	Pos	Neg			
10733	986023-3	UCIPQ	Lavado bronquial	07/07/2011	C	R	I	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S	Pos	Pos	Neg			
10897	995456-2	UCIPQ	Lavado bronquial	23/07/2011	F	R	I	R	R	R	R	R	R	S	256	S	S	Pos	Pos	Neg			
10919	997917-2	UCIA	Sangre	25/07/2011	F	R	I	R	S	R	R	R	R	S	256	S	S	Pos	Pos	Neg			

Tabla 8. Recopilación de resultados de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especímen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad											Clasificación			OXA		
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC				24	51
10932	0620048-6	UCIPQ	Sangre	27/07/2011	B	R	I	I	R	R	R	R	R	S	256	S	I	XDR	Pos	Pos	Neg	
10933	997919-7	UCIA	Lavado bronquial	27/07/2011	B	R	I	S	I	R	R	S	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg	
10943	995038-7	UCIA	Lavado bronquial	28/07/2011	N1	R	R	R	R	R	R	R	S	>256	R	S	XDR	Pos	Pos	Neg		
10952	997107-8	UCIPQ	Lavado broncoalveolar	29/07/2011	B	R	I	I	S	R	R	R	S	>256	S	S	-	Pos	Pos	Neg		
10958	478647-3	UCIPQ	Sangre	01/08/2011	B	R	I	I	I	R	R	R	S	256	S	S	-	Pos	Pos	Neg		
11065	1004486-4	UCIA	Sangre	27/08/2011	RR	S	S	S	S	I	S	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg		
11067	1004201-4	UCIA	Sangre	27/08/2011	SS	R	I	R	R	R	R	R	S	256	R	S	XDR	Pos	Pos	Neg		
11213	1006554-3	UCIA	Sangre	09/11/2011	No tipificable	S	S	S	S	I	I	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg		
11245	1009037-0	UCIPQ	Sangre	21/09/2011	B	R	I	I	S	R	R	R	S	256	S	S	-	Pos	Pos	Neg		
11268	1011271-5	UCIA	Líquido cefalorraquídeo	03/10/2011	TT	S	S	S	S	I	I	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg		
11318	105587-3	UCIA	Lavado bronquial	19/10/2011	FF	R	I	S	I	R	R	R	S	256	S	S	-	Pos	Pos	Neg		
11324	1015004-4	UCIA	Sangre	21/10/2011	GG	S	S	S	S	I	I	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg		
11325	1012712-6	UCIPQ	Lavado bronquial	21/10/2011	F	R	I	S	S	R	R	R	S	>256	S	S	-	Pos	Pos	Neg		
11365	1015064-1	Pensionistas	Sangre	27/10/2011	B	R	I	S	I	R	R	S	S	>256	S	S	-	Neg	Pos	Neg		
11390	1017596-2	UCIPQ	Lavado bronquial	03/11/2011	B	R	I	S	I	R	R	S	S	256	S	S	-	Neg	Pos	Neg		

Tabla 9. Recopilación de resultados de los aislamientos analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área	Especímen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad												Clasificación			OXA				
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58					
11391	1018195-9	UCIPQ	Sangre	03/11/2011	B	R	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
11423	1016940-8	UCIA	Sangre	17/11/2011	HH	R	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	S	S		Pos	Pos	Neg
11437	1021932-0	UCIA	Lavado broncoalveolar	22/11/2011	No tipificable	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	256	S	S		Neg	Pos	Neg
11469	1020460-6	UCIPQ	Lavado bronquial	25/11/2011	II	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
11489	1021697-9	UCIA	Líquido cefalorraquídeo	29/11/2011	JJ	R	R	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	256	S	S		Neg	Pos	Neg
11509	1020323-2	UCIPQ	Lavado bronquial	01/12/2011	KK	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	256	S	S		Neg	Pos	Neg
11519	1020464-5	UCIA	Líquido cefalorraquídeo	05/12/2011	LL	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
11696	1025037-7	UCIA	Lavado bronquial	13/12/2011	MM	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	256	R	S		Neg	Pos	Neg
11719	1026394-7	UCIA	Absceso	06/12/2011	NN	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
11720	1027032-7	UCIPQ	Sangre	06/12/2011	C	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S	>256	S	S	S		Neg	Pos	Neg
11750	947309-1	UCIPQ	Sangre	18/01/2012	OO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
11774	1031081-2	UCIPQ	Sangre	26/01/2012	C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S		Pos	Pos	Neg
11888	1034436-0	UCIPQ	Lavado bronquial	20/02/2012	C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S		Pos	Pos	Neg
11899	1031367-6	UCIA	Lavado bronquial	21/02/2012	C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
11913	1035612-6	Cirugía ambulatoria	Sangre	22/02/2012	C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg

Tabla 10. Recopilación de resultados de los aislamientos analizados (Continuación)

Cepa	Número de expediente	Área ¹	Especímen	Fecha	Clona	Perfil de susceptibilidad ²										Clasificación ³			OXA ⁴					
						CIP	LEV	GEN	AMK	CTZ	CFX	IMP	MER	COL	FOS	TET	TGC	24	51	58				
11968	1035356-6	Cirugía ambulatoria	Líquido pleural	29/02/2012	C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S		Pos	Pos	Neg
12025	0969128-9	UCIA	Sangre	12/03/2012	C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
12113	1043696-7	UCIPQ	Sangre	26/03/2012	C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
12135	1042427-0	UCIPQ	Lavado bronquial	28/03/2012	C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	>256	R	S		Pos	Pos	Neg
12163	1047987-2	UCIA	Lavado bronquial	23/04/2012	No tipificable	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	256	S	S		Neg	Pos	Neg
12184	1025591-4	Cirugía gral	Líquido cefalorraquídeo	26/04/2012	C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
12228	1051120-5	UCIPQ	Sangre	30/04/2012	H	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	256	S	S		Pos	Pos	Neg
12267	0220483-5	UCIPQ	Sangre	04/05/2012	H	S	S	S	S	I	I	R	R	R	R	S	S	256	S	S		Pos	Pos	Neg
12365	1043149-3	UCIPQ	Líquido pleural	17/05/2012	H	I	S	S	S	I	I	R	R	R	R	S	S	256	S	S		Pos	Pos	Neg
12464	1057685-3	UCIA	Sangre	01/06/2012	O	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg
12465	1057685-1	UCIPQ	Sangre	04/06/2012	O1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	256	R	S		Neg	Pos	Neg
12516	1051266-4	Cirugía plástica	Absceso	14/06/2012	PP	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	>256	S	S		Pos	Pos	Neg
12565	1054705-7	Cirugía ambulatoria	Absceso	19/06/2012	C	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S		Pos	Pos	Neg
12576	1060797-2	UCIPQ	Lavado bronquial	19/06/2012	E2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	128	R	S		Pos	Pos	Neg
12666	0980364-4	Cirugía gral	Líquido peritoneal	28/06/2012	C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	256	R	S		Pos	Pos	Neg

¹ UCIA: Unidad de cuidados intensivos adultos; UCIPQ: Unidad de cuidados intensivos post quirúrgicos; ² CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, GEN: Gentamicina, AMK: Amikacina,

CTZ: Cefazidime, CFX: Cefotaxime, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, COL: Colistina, FOS: Fosfomicina, TET: Tetraciclina, TGC: Tigeciclina, R: Resistente, S: Susceptible;

³ MDR: Multifarmacorresistente, XDR: Extensofarmacorresistente ⁴ Pos: Positivo, Neg: Negativo.

*Todos los aislamientos fueron negativos a la presencia de los genes OXA-23, IMP y VIM.

ANEXO III.

Preparación de reactivos y soluciones.

Bromuro de etidio, 0.5 mg/mL (Solución stock).

Diluir 25mg de bromuro de etidio en 40mL de agua ultrapura. Aforar a 50mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio, 2 µg/mL.

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1mL de la solución stock y 249mL de agua ultrapura). Almacenarse en la oscuridad.

Buffer de fosfatos 0.01M pH 7.2

Disolver 0.4267g de K₂HPO₄, 0.3470g de KH₂PO₄ en agua destilada, ajustar pH 7.2 y aforar a 500mL.

EC

Disolver 29.2g de NaCl, 1g de deoxicolato de sodio, 2.5g de laurilsarcosina de sodio, 2.5g de brij 58, 5mL de Tris-base 1M pH 8, 100mL EDTA 0.5M pH 8 en agua destilada. Aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

EC-lisis

Disolver 0.1mg de lisozima, 10µL de RNAsa 5mg/mL en 1mL de EC.

EDTA 500mM.

Disolver 18.62g de EDTA en 100mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.

ES.

Disolver 93.1g de EDTA en 400mL de agua destilada, ajustar el pH a 9 con \approx 20g de NaOH, añadir 0.5g de sarcosyl. Aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

ESP.

Añadir a 1mL de ES 1mg de Proteinasa K.

Gel de agarosa al 2%.

Disolver 4g de agarosa en 200mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregar 20 μ L de bromuro de etidio 2 μ g/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

Jugo azul 6X (Buffer de carga para electroforesis).

Disolver 25mg de azul de bromofenol, 25mg de xilencianol y 3mL de glicerol en TE 1X pH 8 y aforar a 10mL.

NaOH 0.1M.

Disolver 0.4g de NaOH en 100mL de agua destilada.

PIV.

Disolver 29.22g de NaCl en 5mL de Tris-base 1M pH 8 en agua destilada, aforar a 500mL.
Esterilizar en autoclave.

TBE 10X.

Disolver 27g de Tris-base, 13.7g de ácido bórico, 10mL de EDTA 0.5M pH 8 en agua destilada, ajustar pH a 8 y aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 0.5X.

Medir 50mL de TBE 10X y aforar a 1L con agua destilada.

TE 1X (Tris-HCl mM pH 8, EDTA 1 mM).

Mezclar 10mL de Tris-HCl 500mM pH 8 y 1mL de EDTA 500mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl 500 mM.

Disolver 30.3g de Tris base en 300mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 500mL.

"El hombre no es ni una piedra ni una planta, y no puede justificarse a sí mismo por su mera presencia en el mundo. El hombre es hombre solo por su negación a permanecer pasivo, por el impulso que lo proyecta desde el presente hacia el futuro y lo dirige hacía cosas con el propósito de dominarlas y darles forma. Para el hombre, existir significa remodelar la existencia. Vivir es la voluntad de vivir."

Simone de Beauvoir