



Instituto Nacional de Salud Pública  
Escuela de Salud Pública de México

**Identificación de carbapenemasas en aislamientos  
clínicos multirresistentes de *Acinetobacter  
baumannii***

Tesis para obtener el grado académico de:

Maestra en Ciencias de la Salud, con área de Concentración en  
Enfermedades Infecciosas

Presenta:

Q.F.B. Nadia Nayeli Rodríguez Medina

Comité de tesis:

Directora: Dra. Elsa María Tamayo Legorreta

Asesora: Dra. Celia M. Alpuche Aranda

Cuernavaca, Mor., 20 de Agosto 2014

## CONTENIDO

---

	Resumen	1
1.	Introducción	2
2.	Marco Teórico	4
2.1.	Infecciones Nosocomiales. Definición y etiología	4
2.2.	Género <i>Acinetobacter</i>	5
2.2.1.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6
2.2.1.1.	Factores de virulencia	7
2.3.	Antibióticos Carbapenémicos	9
2.3.1.	Actividad antimicrobiana	10
2.4.	Mecanismos de resistencia bacteriana	10
2.4.1	Mecanismos de resistencia antimicrobiana en <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
2.5.	Base genética de la resistencia a los antibioticos carbapenémicos	16
2.5.1.	Carbapenemasas de la familia OXA	17
2.5.1.1.	Epidemiología	17
2.5.1.2.	Secuencias de Inserción IS <i>Aba</i>	18
2.5.1.3	XerC/XerD	21
2.5.2.	Carbapenemasas de la familia Metallo- $\beta$ -lactamasas	22
2.5.2.1.	Integrones de clase 1	23
2.5.3.	Carbapenemasas de la familia GES y KPC	24
3.	Justificación	26
4.	Pregunta de investigación	27

5.	Objetivo General	27
5.1.	Objetivos particulares	27
6.	Materiales y métodos	28
6.1.	Esquema general de trabajo	28
6.2.	Tipo de investigación	29
6.3.	Obtención de cepas	29
6.4.	Identificación de género y especie	30
6.5.	Detección de cepas productoras de carbapenemasa: CarbAcinteo NP	30
6.6.	Susceptibilidad antimicrobiana	31
6.7.	Caracterización clonal de los aislamientos clínicos de <i>A. baumannii</i>	32
6.8.	Extracción de DNA total	33
6.9.	Amplificación por PCR de los genes que codifican a carbapenemasa	33
7.	Secuenciación de amplicones	35
7.1	Consideraciones éticas y de bioseguridad	35
8.	Resultados	36
9.	Discusión de resultados	48
10.	Conclusiones	53
11.	Bibliografía	54

## RESUMEN

---

*Acinetobacter baumannii* ha pasado en los últimos años de ser considerado un microorganismo de poca relevancia clínica a convertirse en la actualidad en un problema epidemiológico, debido fundamentalmente a la rápida diseminación de aislamientos multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo afectando principalmente unidad de cuidados intensivos (UCI) y unidad de quemados . El objetivo de este estudio fue Identificar los diferentes tipos de carbapenemasas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem. En este estudio se incluyeron 58 aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, provenientes de 4 hospitales de tercer nivel de atención en México colectados en el período de Diciembre 2009-2012. Mediante la prueba CarbAcineto NP se determinó aquellas cepas productoras de carbapenemasa. La identificación de carbapenemasas de clase A (KPC y GES), clase B (VIM, IMP, SIM y NDM-1) y clase D (OXA-51, OXA-23, OXA-24 y OXA-58) se realizó por PCR con oligonucleótidos específicos para cada caso. Estos productos se obtuvieron en un equipo ABIPRISMA y las secuencias de nucleótidos se analizaron mediante programas bioinformáticos. La genotipificación molecular de todos los aislamientos se realizó mediante electroforesis de campos pulsados (PFGE) y se analizó mediante el software GelCompar II. La CMI se determinó por el método de micro-dilución en caldo siguiendo las recomendaciones del CLSI 2012. De los 58 aislamientos de *A. baumannii* se identificó la presencia de la carbapenemasa VIM-2 en un solo aislamiento (1.7%) de igual manera el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> se encontró en un solo aislamiento. Se detectó el gen *bla*<sub>OXA-24</sub> en 43/58 (74.1%) el cual correspondió al alelo OXA-72, el gen *bla*<sub>OXA-58</sub> en 33/58 (56.8%). En ninguno de los aislamientos estudiados se obtuvo amplicones para, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>GES</sub>. El gen *bla*<sub>VIM-2</sub> está contenido en un integrón de clase 1 y corresponde al In559 reportado previamente en *Pseudomonas aeruginosa* en el 2013 por Moyo,S. *et al*. Estos aislamientos fueron susceptibles a tigeciclina, solo el 60.4% de ellos mostró susceptibilidad a colistina; pero resistentes a imipenem, meropenem, ceftazidima, ciprofloxacino y gentamicina. Este estudio muestra que las carbapenemasas de clase A y B no son el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Actualmente, *Acinetobacter baumannii* es un patógeno nosocomial emergente Gram-negativo que afecta principalmente a la unidad de cuidados intensivos (UCI) y a la unidad de quemados. Esta bacteria es resistente a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en especial a las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos. Los antibióticos carbapenémicos, como el imipenem o el meropenem se utilizan para tratar infecciones graves causadas por este patógeno sin embargo, la eficacia terapéutica de estos antibióticos hacia infecciones causadas por *A. baumannii* se ha visto comprometida debido a que este patógeno nosocomial es refractario a los efectos de estos antibióticos.<sup>1</sup>

El éxito que ha tenido *A. baumannii* como causante de infecciones nosocomiales y su capacidad de mantenerse en brotes endémicos se debe en parte a la combinación de los mecanismos de resistencia que posee ya sea enzimáticos o no enzimáticos, como: i) modificación de la permeabilidad mediada por porinas, ii) incremento de bombas de eflujo iii) hidrólisis enzimática. Por otro lado, su éxito también reside en factores que no dependen del patógeno y están relacionados con el ambiente hospitalario como es el uso inadecuado de antibióticos. Esto ha causado la selección de mecanismos enzimáticos en *A. baumannii* y los más representativos son las  $\beta$ -lactamasas con actividad carbapenemasa, es decir con la capacidad de hidrolizar los antibióticos carbapenémicos. En este patógeno se han descrito tres clases de carbapenemasas: clase D oxacilinasas (OXA), clase B metalo- $\beta$ -lactamasas (M $\beta$ L) y clase A dependientes de serina. Las carbapenemasas de la familia OXA (clase D) son enzimas que hidrolizan débilmente a los carbapenémicos a diferencia de las M $\beta$ L.<sup>2</sup>

Las carbapenemasas tipo OXA se encuentran agrupadas de acuerdo a la homología en sus secuencias de aminoácidos, de las cuales los genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> y *bla*<sub>OXA-143-like</sub> se han descrito en *A. baumannii* y su distribución geográfica es bastante heterogénea. A excepción de *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, los grupos restantes se encuentran asociados a secuencias de inserción como *ISAb<sub>a</sub>1*, la cual participa en la sobreexpresión de los genes de resistencia. La localización de los genes que codifican a oxacilinasas en el

cromosoma versus plásmido en *A. baumannii* es variable. El gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> se encuentra en el cromosoma de *A. baumannii* mientras que el resto de los genes *bla*<sub>OXA</sub> pueden estar codificadas en plásmidos (elementos genéticos móviles), los cuales sirven como vehículos para su diseminación a otras bacterias y favoreciendo la resistencia bacteriana.<sup>3,4</sup>

Este trabajo aborda un problema actual de resistencia a antibióticos los cuales son considerados de última elección en el tratamiento de infecciones intrahospitalarias y aportará conocimientos para comprender la transmisión y adquisición de genes de resistencia. También propone recomendaciones que permitan disminuir la transmisión de bacterias resistentes y de esta forma la prevención de la resistencia bacteriana y de las pautas para promover el uso adecuado de los antibióticos.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1-Infecciones nosocomiales. Definición y etiología

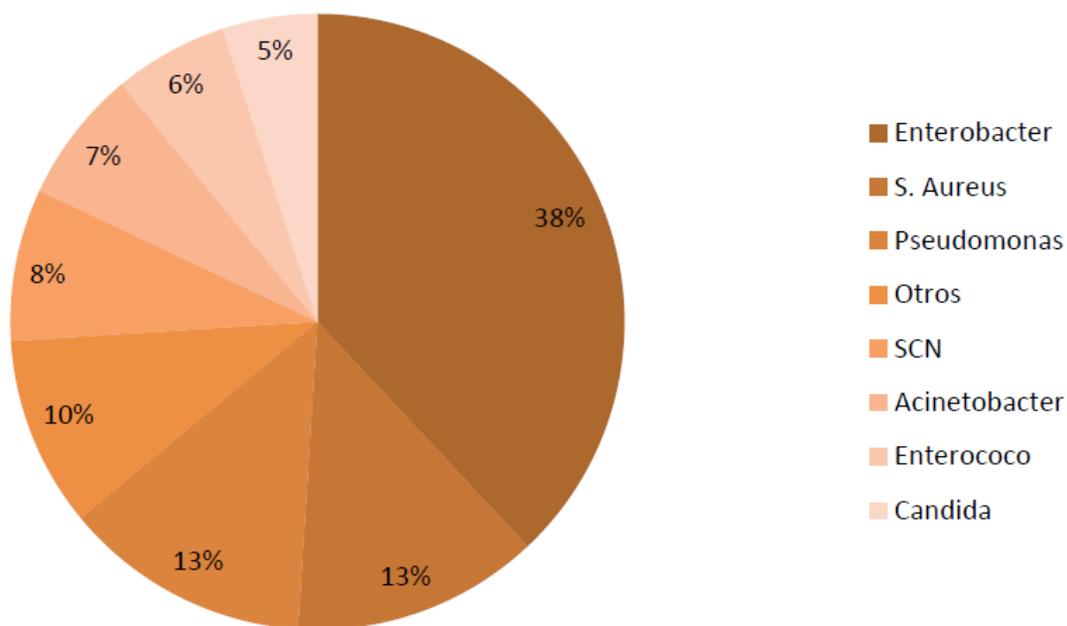
Las infecciones nosocomiales (IN) se definen como aquellas infecciones contraídas en el hospital por un paciente internado por una razón distinta por la cual ingresó, en un periodo de 48 a 72 horas. Sin embargo pueden existir IN adquiridas antes de las 48 horas de ingreso y ser consideradas una infección nosocomial, este fenómeno depende del tiempo de incubación y la forma de adquisición de la infección. Este tipo de infecciones pueden ser ocasionadas principalmente por bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.<sup>5</sup>

Las IN representan un problema de gran importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan mayores tasas de morbilidad y mortalidad, con un incremento consecuente en el costo social de años de vida potencialmente perdidos, así como de años de vida saludables perdidos por muerte prematura o vividos con discapacidades, lo cual se suma al incremento en los días de hospitalización y del gasto económico.<sup>6</sup>

En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8%. En las unidades de cuidados intensivos (UCI) la situación es más preocupante: un estudio realizado en 895 pacientes de 254 UCI en México encontró que 23.2% de éstos tenía una infección nosocomial. La neumonía fue la infección más común (39.7%), seguida de la infección urinaria (20.5%), la de herida quirúrgica (13.3%) y la del torrente sanguíneo (7.3%).<sup>5</sup>

Un aspecto esencial de la epidemiología de las IN es conocer la etiología de dichas infecciones. La Secretaría de Salud en el 2011, a través de la Dirección General de Evaluación de Desempeño (DGED), encomendó al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” realizar un estudio con el objeto de medir la prevalencia de IN en distintos hospitales de la República Mexicana. El estudio consistió en incluir 20 hospitales del IMSS, 14 hospitales del ISSSTE y 19 hospitales de la SSA. Se incluyeron todos los pacientes hospitalizados que adquirieron una infección en al menos 48 horas de haber sido internados al momento de la revisión. Se incluyeron también pacientes que habían

reingresado al hospital por una IN, independientemente del tiempo transcurrido desde su reingreso.<sup>5</sup> La distribución de patógenos nosocomiales en los hospitales generales de México fue la siguiente (Figura 1):



**Figura 1.** Microorganismos identificados en las Infecciones Nosocomiales en los hospitales generales de México

La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en su reporte sobre el panorama de las infecciones intrahospitalarias en México no menciona a *A. baumannii* dentro de los principales microorganismos causantes de algún tipo de IN, lo que sugiere que podría encontrarse dentro del porcentaje que corresponde a la categoría de Otros (14%). Se observa que en el estudio que realizó la Secretaria de Salud, el género *Acinetobacter* tuvo un bajo porcentaje, sin embargo, aún así a causado preocupación como patógeno emergente por lo rápido en que se han diseminado las cepas multirresistentes.<sup>6</sup>

En Estados Unidos a travez del CDDEP (The Center for Disease Dynamics, Economics and Policy) y la red de vigilancia de Estados Unidos (The Surveillance Network) revela que las tendencias de aislamientos de *A. baumannii* multirresistente aumentaron de 32% a 51% para el 2010 y de manera alarmante se reportó un incremento de aislamientos de *A.*

*baumannii* resistentes a carbapenémicos del 5% en 1999 a 41% para el 2010. Por otro lado, el NNIS (The National Nosocomial Infections Surveillance) reportó que la proporción de *A. baumannii* resistente a imipenem en la Unidad de Cuidados Intensivos tuvo un aumento de 1% en 1988 a 25% en el 2001.<sup>7,8</sup>

## **2.2.- Género *Acinetobacter***

El género *Acinetobacter* ha tenido varias modificaciones taxonómicas durante los últimos 30 años, inicialmente este género fue nombrado como *Micrococcus calcoaceticus*, pero en el año de 1954 Brisou y Prévot designaron el género como *Acinetobacter spp*, denominación que se utiliza en la actualidad. El género *Acinetobacter* comprende cocobacilos Gram-negativos con 25 nombres validados de especies y 9 especies genómicas encontradas por hibridación DNA-DNA.<sup>9,91</sup>

Las especies pertenecientes a este género son de amplia distribución, su hábitat natural es el suelo, agua ó como parte de la flora normal de piel, tracto gastrointestinal y respiratorio. Tienen un amplio rango de crecimiento que varía de 37°C a 44°C.<sup>9</sup>

Existen cuatro especies de este género que poseen características bioquímicas y morfológicas similares: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (genoespecie 3) y *A. nosocomialis* (genoespecie 13 TU), por lo que se les ha agrupado en el complejo denominado *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC). De las cuatro especies que conforman el complejo, *A. calcoaceticus* no es una especie clínicamente importante debido a que no se le ha asociado en brotes nosocomiales y que se le aísla con mayor frecuencia de muestras ambientales<sup>10,11</sup>

### **2.2.1- *Acinetobacter baumannii***

*A. baumannii* es la especie con mayor relevancia clínica ya que es la que más frecuentemente se aísla de IN. *A. baumannii* es un cocobacilo Gram-negativo no móvil, catalasa positivo, oxidasa negativo, no fermentador, aerobio estricto y tiene la capacidad de crecer a un amplio rango de temperatura de 32°C a 44°C.<sup>9</sup>

*A. baumannii* ha emergido como un patógeno oportunista que puede ocasionar bacteriemias, septicemias, neumonías, infecciones en tracto urinario, infecciones de heridas y en menor proporción meningitis. Además puede hallarse en múltiples medios animados e inanimados; en material hospitalario, como aparatos de ventilación mecánica, catéteres o líquido de diálisis peritoneal. Las unidades más afectadas por este patógeno son las unidades de cuidados intensivos y de quemados.<sup>12</sup>

Debido al impacto que ha tenido a nivel mundial este patógeno, la Organización Mundial de la Salud incluyó a este patógeno oportunista en la lista de los microorganismos para ser objeto de vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario.<sup>13</sup>

En México se ha estimado que las prevalencias de infección por este patógeno oscila del 8% al 10% en hospitales generales del IMSS, ISSSTE y SSA.<sup>5</sup>

#### **2.2.1.1-Factores de virulencia**

El éxito de la infección por *A. baumannii* se atribuye a que puede sobrevivir en el ambiente hospitalario y adquirir resistencia a los antibióticos, además de que posee mecanismos que le permiten persistir y adaptarse a diferentes condiciones ambientales.

Se ha demostrado que el sistema de captación de Hierro, el sistema para la formación de biopelículas (biofilms) en superficies abióticas, la presencia de proteínas de membrana externa (AbOmpA) y el sistema de secreción tipo IV son los responsables directos de la patogénesis y virulencia de *A. baumannii*.<sup>14</sup>

- **Producción de sideróforos :**

El Hierro es un factor importante para el crecimiento de la mayoría de las bacterias por lo que su disponibilidad es fundamental en el éxito o fracaso de microorganismos patógenos o simbióticos para invadir un organismo o para colonizar un ambiente determinado. El mejor mecanismo por medio del cual las bacterias captan hierro son los sideróforos, los cuales son compuestos quelantes de bajo peso molecular clasificados por su estructura química como catecoles, carboxilatos e hidroximatos. El sistema de transporte de hierro varía entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los sideróforos son producidos por

la bacteria y excretados al medio en el cual se unen al hierro formando un complejo. Las bacterias Gram-negativas tienen receptores de membrana externa (TonB) que reconocen el complejo sideroforo-Fe<sup>3+</sup>. Una vez que el sideroforo se encuentra unido al receptor de la membrana externa, el complejo cruza la membrana a través de un sistema dependiente de ATP permitiéndole llegar al citoplasma. Algunas bacterias no solo producen sus propios sideróforos sino también producen receptores capaces de unir sideróforos producidos por otras bacterias.<sup>15</sup>

El sideroforo descrito en *A. baumannii* se denomina **Acinetobactina** el cual le proporciona la habilidad para colonizar e invadir al hospedero humano obteniendo del medio ambiente el hierro requerido por la bacteria.<sup>16</sup>

- **Formación de biofilms:**

Las infecciones ocasionadas por bacterias productoras de biofilm son difíciles de erradicar debido a que su presencia se considera un mecanismo de resistencia mecánico que impide la acción terapéutica de los antibióticos y actúan los mecanismos de defensa del huésped contra la bacteria. Los factores más comunes que pueden influir en la formación de biofilms son: la disponibilidad de nutrientes, la presencia de pili y flagelo, componentes de la superficie bacteriana como proteínas de membrana externa o adhesinas, regulación por quórum (autoinducción por producción de acilhomoserina lactona) y la secreción de macromoléculas. La presencia de los pili es esencial para la formación de biofilms, su formación está regulada por el operón *csuA/BABCDE* el cual juega un papel importante en los pasos iniciales de la formación de biofilm permitiendo a las bacterias adherirse a superficies abióticas.<sup>17</sup>

La proteína Bap (biofilm-associated protein) se localiza en la superficie de la membrana externa y se piensa que está involucrada tanto en las interacciones célula-célula como en la maduración del biofilm.<sup>18</sup>

*A. baumannii* además de adherirse a superficies no abióticas también lo puede hacer en superficies abióticas como las células epiteliales bronquiales o alveolares. Así mismo la

habilidad de *A. baumannii* para adherirse y formar biofilms en objetos y superficies inanimadas podría explicar su éxito en el ambiente hospitalario.<sup>2, 14, 18</sup>

- **Pili:**

La presencia de los pili como factor de patogenicidad y virulencia se ha relacionado con la capacidad de la bacteria para adherirse a las superficies asegurando la formación de biopelículas o biofilms en diversos tipos de instrumentos médicos así como también la adherencia a las células epiteliales.<sup>14</sup>

A pesar de que *A. baumannii* es considerada una bacteria no móvil por la ausencia de flagelo, puede llegar a tener movilidad mediante la extensión y retracción los pili tipo IV.<sup>14, 91</sup>

- **AbOmpA**

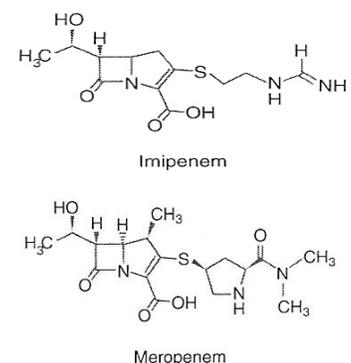
La proteína de membrana externa de *A. baumannii* (AbOmpA) es la más abundante en la superficie celular, involucrada en la adherencia e invasión de células epiteliales, además de inducir apoptosis en las fases tempranas de la infección por esta bacteria. Por otro lado, también esta implicada en la formación del biofilm.<sup>14, 91</sup>

- **Sistema de secreción tipo IV**

El sistema de secreción tipo IV es una maquinaria de secreción versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas, además este sistema le proporciona la habilidad de competir entre especies bacterianas a través de la secreción de proteínas efectoras que pudieran tener efectos bacteriostáticos o bactericidas hacia otras bacterias que se encuentran en el mismo ambiente.<sup>18</sup>

### 2.3.- Antibióticos carbapenémicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son el grupo de antibióticos más numeroso y más utilizado en la clínica. Esta clase de antibióticos componente principal de la pared celular, en la que intervienen las



**Figura 2.** Estructura química del Imipenem y Meropenem

PBP ó proteínas fijadoras de penicilina. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos bloquean las PBP's porque el anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 2) tiene una estructura similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas del peptidoglicano, sustrato natural de las PBP. Esta familia de antibióticos están formados por las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos, estos últimos son utilizados como el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones graves por *A. baumannii*.<sup>19</sup>

### **2.3.1.- Actividad antimicrobiana**

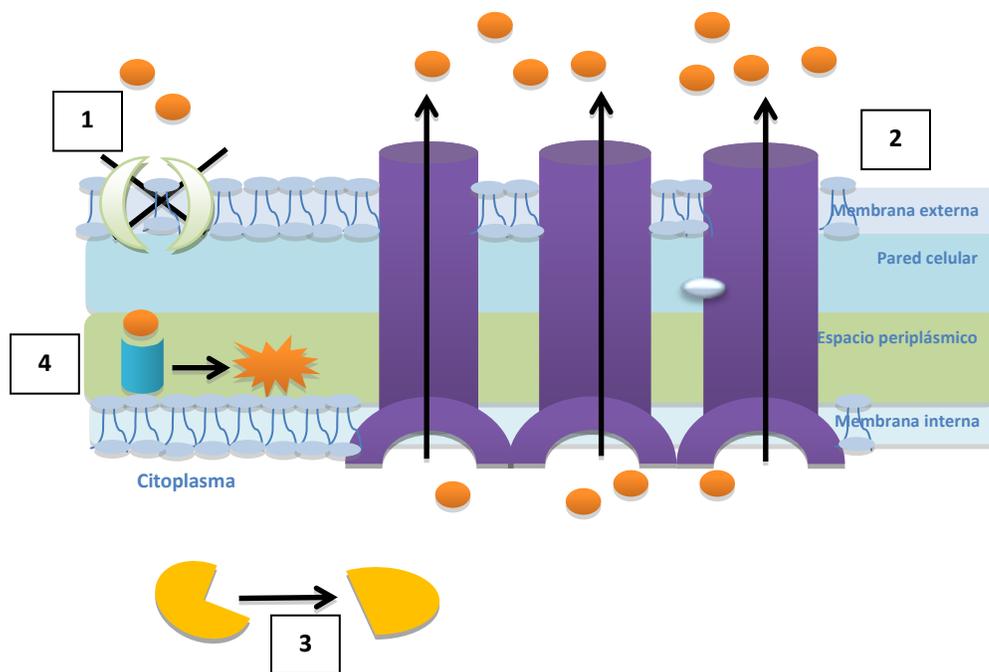
Los carbapenémicos presentan el espectro de actividad más amplio dentro de la familia de  $\beta$ -lactámicos y tienen actividad frente a numerosos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos por lo que son imprescindibles en el tratamiento de infecciones nosocomiales e incluso debieran considerarse dentro del tratamiento empírico cuando se sospecha de algún patógeno multirresistente.<sup>20</sup>

Todos los carbapenémicos disponibles son similares en cuanto a espectro, aunque con diferencias significativas en la actividad antimicrobiana. Los carbapenémicos más utilizados en la práctica clínica son el imipenem y el meropenem, sin embargo existen otros carbapenémicos utilizados como el biapenem, el ertapenem y el doripenem, los cuales son ligeramente más efectivos contra bacterias Gram-negativas. Existen consideraciones para cada carbapenémico, en el caso del ertapenem tiene un espectro más limitado debido a que no es tan activo como el imipenem o el meropenem contra *P. aeruginosa*. El meropenem no es tan potente como el imipenem o el doripenem contra *A. baumannii*; el doripenem tiene concentraciones mínimas inhibitorias más bajas que imipenem o meropenem contra *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Por otro lado el doripenem es el carbapenémico menos susceptible a la hidrólisis (de 2 a 150 veces más bajo con respecto al imipenem) mediada por carbapenemasas.<sup>21, 22</sup>

En la actualidad, los carbapenémicos son considerados el tratamiento de elección contra patógenos multirresistentes debido a que estos antibióticos no pueden ser hidrolizados por la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Adicionalmente su pequeño tamaño molecular favorece su penetración a través de la membrana externa.<sup>20</sup>

## 2.4.- Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es una condición que se caracteriza por una refractariedad de las bacterias al efecto de los antibióticos. Esta resistencia puede ser natural o adquirida. La primera consiste en mecanismos propios de una especie y la adquirida puede ser a través de la adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones ó integrones.<sup>23</sup> Los mecanismos de resistencia en bacterias Gram-negativas se describen a continuación (Figura 3):



**Figura 3.** Mecanismos de resistencia en bacterias Gram-negativas. 1) Disminución de la entrada del antibiótico a través de la membrana externa, 2) Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por bombas de eflujo, 3) Modificación del sitio blanco, 4) Inactivación del antibiótico por enzimas. Modificado de Schmieder y Edwards, 2012

- **1.- Disminución de la entrada del antibiótico través de la membrana externa**

Las porinas son canales proteicos localizados en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que participan en el transporte de moléculas desde el medio externo al espacio periplásmico. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Este tipo de

cambios pueden dar origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los antibióticos carbapenémicos.<sup>23, 24</sup>

- **2.- Expulsión del antibiótico mediada por bombas de eflujo**

Las bombas de eflujo son estructuras proteicas que corresponden a una clase de transportadores involucrados en la captación de nutrientes esenciales e iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas desde el citoplasma o periplasma hacia el exterior, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente. Se encuentran clasificadas en cinco grandes familias, ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), RND (*resistance-nodulation-cell division*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) y SMR (*small multidrug resistance*). La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse).<sup>25</sup>

- **3.- Modificación del sitio blanco**

Las mutaciones en los genes que codifican al blanco de acción del antibiótico, como la RNA polimerasa, el RNA ribosomal 16S, las PBP y la DNA girasa generan resistencia a ese antibiótico. El sitio blanco de los carbapenémicos, y de todos los  $\beta$ -lactámicos, son las proteínas unidoras de penicilinas (PBPs). Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los  $\beta$ -lactámicos.<sup>24</sup>

- **4.- Inactivación del antibiótico por enzimas**

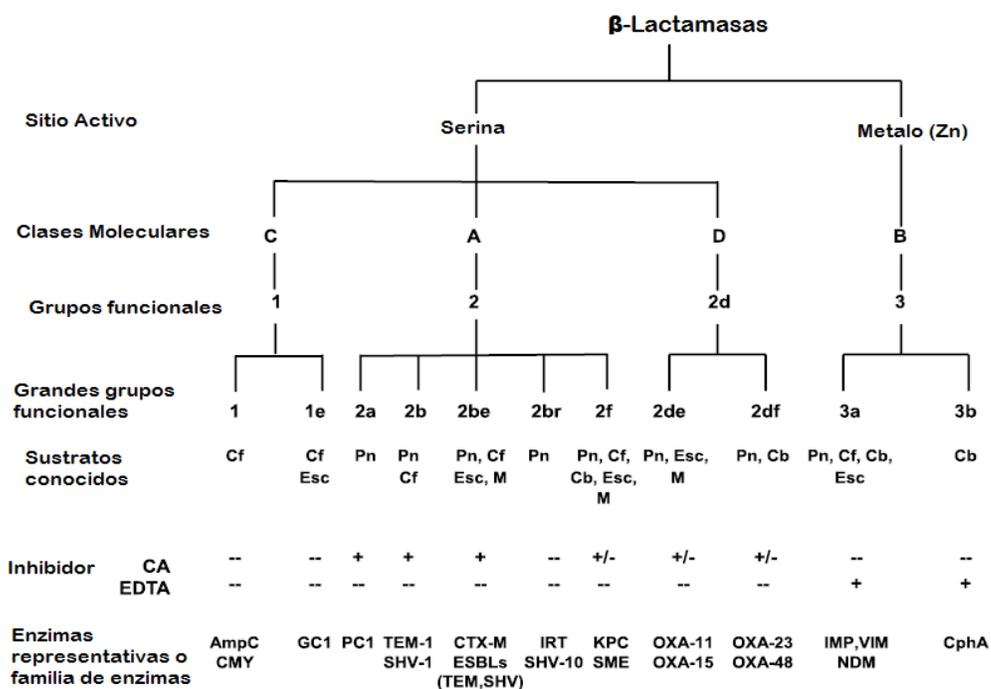
La bacteria produce enzimas que inactivan el antibiótico; las más características son las  $\beta$ -lactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas.<sup>24</sup>

La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas ha sufrido varios cambios a lo largo de los años, inicialmente la clasificación se basó en el grado de homología de sus secuencias de aminoácidos. Esta clasificación propuesta por Ambler en 1980 se le conoce como clasificación molecular y agrupa a las  $\beta$ -lactamasas en dos grandes grupos.<sup>26</sup>

1.- **Serina  $\beta$ -lactamasas:** enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo (Clase A y D).

2.- **Metallo- $\beta$ -lactamasas (M $\beta$ L):** enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes principalmente Zinc, como cofactor para su actividad enzimática (Clase B).

Posteriormente Bush propuso una clasificación funcional basada no solamente en la actividad hidrolítica hacia diferentes clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos sino también toma en cuenta las propiedades de inactivación y sensibilidad a la acción inhibitoria por el ácido clavulánico o EDTA.<sup>27</sup>



Abreviaturas: Cb, carbapenémicos; Cf, cefalosporinas; CA, ácido clavulánico; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; Esc, cefalosporinas de espectro extendido; M, monobactams; Pn, penicilinas

**Figura 4.** Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas.

La clasificación actual agrupa ambas clasificaciones (Figura 4), los subgrupos y las enzimas más prevalentes están basados en estudios epidemiológicos recientes.<sup>27, 28</sup>

Una bacteria puede combinar estos mecanismos de resistencia para hacer más eficiente la inactivación del antibiótico. El problema de la resistencia a los antibióticos es global y

complejo, ya que incluye un gran número de especies bacterianas patógenas de importancia médica. Por lo que la elección de un tratamiento adecuado en la práctica diaria se ha convertido en un reto. Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes se asocian a una mayor morbi-mortalidad.

#### **2.4.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii***

La súbita emergencia global de cepas de *A. baumannii* resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos incluyendo los carbapenémicos ilustra el potencial de este microorganismo para responder rápidamente a los cambios promovidos por la presión selectiva del ambiente. En *A. baumannii* la resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos se debe a la acción combinada de mecanismos de resistencia mediados por enzimas y no enzimáticos sin embargo, el mecanismo más representativo en *A. baumannii* es caracterizado por la presencia de  $\beta$ -lactamasas, que le brindan la capacidad de degradar una vasta variedad de antibióticos entre ellos los carbapenémicos.<sup>2,29,31</sup>

La expresión disminuida de tres proteínas de membrana externa se han descrito en aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a imipenem: i) una proteína con un peso molecular 33–36 kDa, ii) proteína CarO y iii) una proteína de 43 kDa que presenta homología con la OprD de *P. aeruginosa* (Tabla 1).<sup>25</sup> Se ha descrito que la ausencia de una PBP de 73,2 kDa (PBP2a) podría relacionarse con resistencia al imipenem y/o al meropenem de bajo nivel, mientras que la ausencia simultánea de PBPa y junto con PBP2b se asocia con niveles de resistencia más elevada frente a ambos compuestos.<sup>30</sup>

Se han identificado dos tipos de  $\beta$ -lactamasas intrínsecas en todos los aislamientos de *A. baumannii*, la primera es una cefalosporinasa tipo AmpC, que si se expresa a un nivel basal no reduce la eficacia de cefalosporinas de amplio espectro,<sup>32</sup> sin embargo al encontrarse sobreexpresada genera resistencia a ceftazidima, pero no a carbapenémicos (Tabla 2).<sup>2,33</sup> La segunda  $\beta$ -lactamasa la representan las variantes OXA-51/69 los genes que codifican para estas enzimas se localizan en el cromosoma de todos los aislamientos de *A. baumannii* estudiados a la fecha.<sup>34</sup>

**Tabla 1.** Mecanismos de resistencia no enzimáticos.

Mecanismo de resistencia	Proteína relacionada
Disminución de la permeabilidad mediada por porinas	CarO <sup>a</sup> ( 29 kDa)
Alteración de PBP's	Expresión reducida de PBP-2
Bombas de eflujo	Complejo AdeABC formado por: -AdeB: componente transmembranal -AdeA: proteína de fusión en membrana interna -AdeC: OMP Regulado por el complejo AdeSR: AdeS: proteína-quinasa sensora <sup>b</sup> AdeR: proteína reguladora <sup>b</sup>
Modificación del sitio blanco (Quinolonas)	GyrA y ParC

a. Alteraciones en la estructura y número de porinas que resulta en una disminución en la permeabilidad<sup>2</sup>

b. Mutaciones puntuales en el sistema regulador ha sido asociado con sobre expresión de bomba de

**Tabla 2.** Mecanismos de resistencia enzimáticos.

Mecanismo de resistencia	Enzima
<b>β-Lactamasas</b>	TEM
	SHV
	IMP
	CTX-M
	OXA <sup>a</sup>
	ADC (AmpC)

a.- Actividad carbapenemasa

## 2.5. Base genética de la resistencia a antibióticos carbapenémicos

Las carbapenemasas representan una de las familias más versátiles de  $\beta$ -lactamasas ya que se caracterizan por tener un amplio espectro, inigualable por otras enzimas hidrolíticas de  $\beta$ -lactámicos.<sup>3</sup> De acuerdo a la clasificación propuesta por Ambler y Bush las carbapenemasas pueden ser de:

**Clase A:** un grupo emergente de serina carbapenemasas que incluye principalmente BLEEs sin embargo algunas de ellas poseen actividad carbapenemasa. En *A. baumannii* se han identificados las familias KPC y GES, las cuales se encuentran localizadas en un integrones clase 1.<sup>35</sup>

**Clase B:** son carbapenemasas M $\beta$ L que son capaces, además de hidrolizar carbapenémicos también hidrolizan todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a excepción de aztreonam.<sup>27, 33,34</sup>

**Clase D:** serina carbapenemasas caracterizado por la familia de las enzimas tipo OXA (Oxacilinasas). En *Acinetobacter baumannii* se encuentran descritas: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like y OXA-143-like.<sup>27, 33,34</sup>

La Clase A y D representan el grupo más grande de  $\beta$ -lactamasas ya que durante los últimos 20 años se han ido sumando nuevas variantes de estas enzimas, aproximadamente existen 700 enzimas únicas conformando ambas clases (Figura 5).<sup>33</sup>

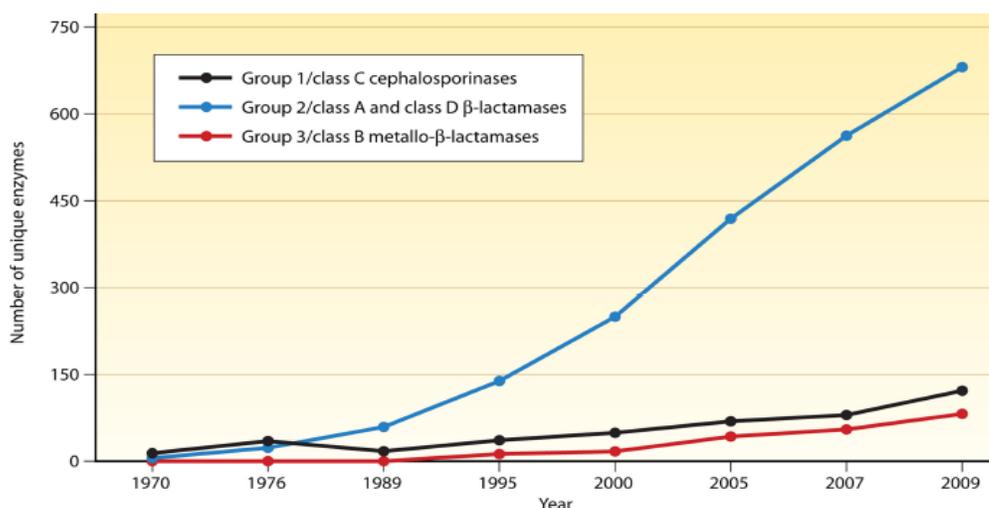
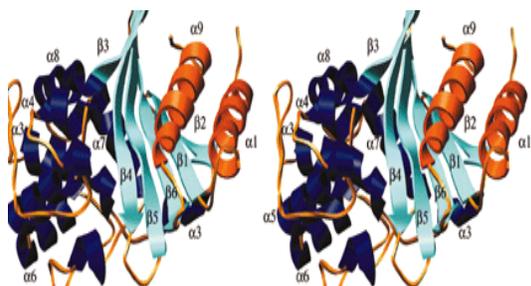


Figura 5. Incremento en el número de carbapenemasas de 1970 a 2009

Un amplio número de  $\beta$ -lactamasas adquiridas pertenecientes tanto a la clase D, clase B o clase A se han identificado como fuente de resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii*.

### 2.5.1. Carbapenemasas de la familia OXA



**Figura 6.** Estructura terciaria de la carbapenemasa OXA-24

Las carbapenemasas de la familia OXA son  $\beta$ -lactamasas que pertenecen a la clase molecular D del grupo funcional 2df y fueron entre las primeras  $\beta$ -lactamasas en ser descritas. Estas enzimas tenían un perfil de sustratos limitado a penicilinas sin embargo ahora son capaces de hidrolizar cefalosporinas

de primera generación, combinaciones  $\beta$ -lactámico/inhibidor de  $\beta$ -lactamasa y carbapenémicos.<sup>33, 36</sup>

Inicialmente el nombre OXA hacía referencia a la capacidad de esta enzima de hidrolizar oxacilina y cloxacilina más rápido que las penicilinas convencionales. En la actualidad esta denominación con respecto a su función ya no es válida ya que estas enzimas tienen una baja tasa hidrolítica frente a estos antibióticos.<sup>22</sup>

Las OXA-  $\beta$ -lactamasas tienen una gran diversidad entre sí ya que engloban enzimas OXA- $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) como OXA-1, OXA-10, OXA-15, OXA-18 y OXA-45 así como OXAs con actividad de carbapenemasa ó CHDL (carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamasas por sus siglas en inglés). Representa una de las clases moleculares con mayor número de variantes ya que se han reportado 418 enzimas OXA- $\beta$ -lactamasas hasta la fecha.<sup>36, 37</sup>

#### 2.5.1.1. Epidemiología

La resistencia a los carbapenémicos ha incrementado globalmente en la última década y esto en parte se debe a la diseminación de OXA- $\beta$ -lactamasas. Datos provenientes de Estados Unidos muestran que el porcentaje de aislamientos de *Acinetobacter baumannii*

resistente a imipenem ha aumentado en un promedio del 10% entre 1999 y 2005 a 48% en el 2008 y la resistencia a imipenem ha aumentado de 19% a 57.4% en el mismo periodo de tiempo.<sup>38</sup>

En *Acinetobacter baumannii* la resistencia a los carbapenémicos se debe a la presencia de CHDLs y constituyen la principal fuente de resistencia adquirida a estos antibióticos. Se encuentran agrupadas en 5 familias: OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like y OXA-143-like (Tabla 4).<sup>37</sup> El grupo más grande de CHDLs es el de OXA-51-like, esta enzima se identificó por primera vez en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de Argentina aislados en 1996. Estas enzimas son intrínsecas de la especie y se encuentran naturalmente en el cromosoma de la bacteria, lo cual ha llevado a la identificación de 95 variantes a la fecha.<sup>39</sup> Poseen una actividad carbapenemasa débil y comparte una débil identidad con las otras  $\beta$ -lactamasas de clase D conocidas. Por otro lado, las CHDLs OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like y OXA-143-like se han identificado principalmente en estructuras genéticas móviles como plásmidos o transposones que contribuyen a su diseminación entre especies del género *Acinetobacter*.<sup>31</sup>

Las carbapenemasas de la familia OXA confieren solo niveles moderados a carbapenémicos, por lo que su acción se complementa con otros mecanismos de resistencia como la pérdida o la modificación de porinas y la sobreexpresión de bombas de eflujo.<sup>40</sup>

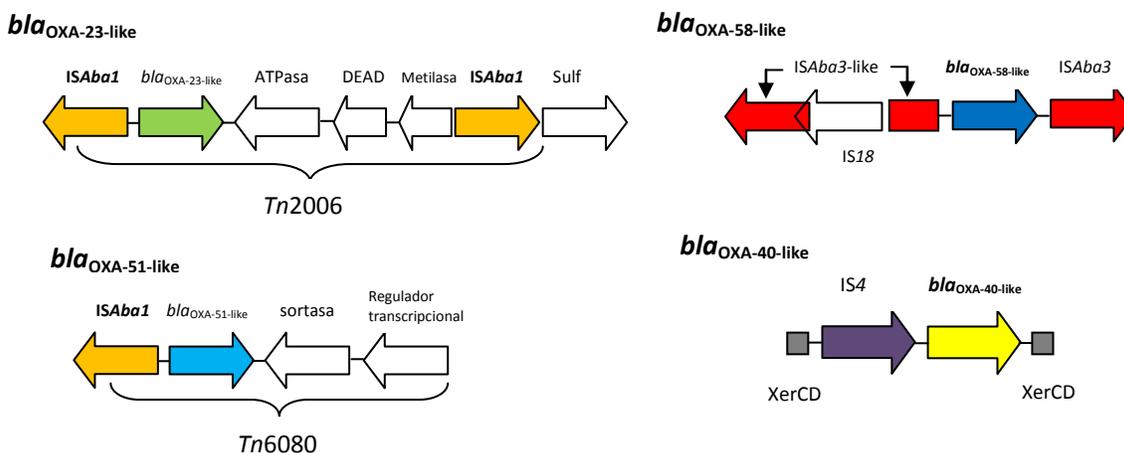
#### **2.5.1.2. Secuencias de inserción ISAb<sub>a</sub>**

Los elementos o secuencias de inserción (IS) son segmentos de DNA que pueden moverse de una posición cromosómica a otra del mismo cromosoma. Las secuencias de inserción (IS) juegan un papel importante en la movilización y expresión de las carbapenemas de la familia OXA. Las IS tienen un gen codificante para una transposasa (TnpA) esencial para llevar a cabo la transposición o movilización de los genes y están flanqueadas por secuencias repetidas invertidas (Figura 7).<sup>41</sup>

**Tabla 4.** Familias de carbapenemasas tipo OXA descritas en *A. baumannii*

Familia	Variantes	Nº de enzimas en el grupo	Localización	Especies
OXA-23-like	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225, OXA-239	19	plásmido, cromosoma	<i>A. baumannii</i> , <i>A. junii</i> , <i>A. radioresistens</i> , <i>A. pittii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Acinetobacter</i> phenon 5, <i>Acinetobacter</i> phenon 6/ct 13TU, <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter</i> genomic species 10/11, <i>A. Iwoffii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>A. baylyi</i>
OXA-24/40-like	OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207	7	plásmido, cromosoma	<i>A. baumannii</i> , <i>A. haemolyticus</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. baylyi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>K. pneumoniae</i>
OXA-51-like	OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250, OXA-254	95	plásmido, cromosoma	<i>A. baumannii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
OXA-58-like	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164	4	plásmido, cromosoma	<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter</i> phenon 6/ct 13TU, <i>A. junii</i> , <i>Acinetobacter</i> genomic species 9, <i>A. bereziniae</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>A. radioresistens</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Delftia acidovorans</i>
OXA-143-like	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255	5	Plásmido	<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i>

La asociación entre elementos móviles y genes *bla*<sub>OXA</sub> es particularmente evidente en las especies de *Acinetobacter*, donde las secuencias de inserción se encuentran frecuentemente en asociación con algún gen *bla*<sub>OXA</sub>. La más prevalente de estas secuencias de inserción es *ISAb*<sub>1</sub>. El elemento IS está localizado río arriba de los genes *bla*<sub>ADC</sub> y se ha demostrado que en esta localización la IS conduce a la expresión del gen *bla*<sub>ADC</sub>, el cual confiere resistencia a cefalosporinas.<sup>42</sup> *ISAb*<sub>1</sub> desde entonces se le ha identificado en asociación con los genes como *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>.<sup>43, 44,45</sup> Cuando *ISAb*<sub>1</sub> es localizada río arriba de los genes *bla*<sub>OXA</sub> tiende a aumentar su expresión a un nivel que confiere resistencia a carbapenémicos. La localización de *ISAb*<sub>1</sub> 25 pb río arriba del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> proporciona un promotor que conduce a la transcripción del gen.<sup>46, 47</sup> De la misma manera cuando *ISAb*<sub>1</sub> se localiza 7 pb río arriba del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> provee el promotor que puede incrementar su expresión Figura 7.<sup>36, 48</sup>



**Figura 7.** Elementos genéticos móviles asociados a los genes *bla*<sub>OXA</sub>

Este aumento en los niveles de expresión conlleva a que las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC por sus siglas en inglés) de los carbapenémicos se eleven. Los MICs de los carbapenémicos para los aislamientos de *A. baumannii* en los que se sobreexpresa el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gracias a la presencia de *ISAb*<sub>1</sub> son los mismos a aquellas concentraciones mínimas inhibitorias de los aislamientos que expresan alguna CHDL adquirida, indicando que todos los aislamientos de *A. baumannii* pudieran convertirse resistentes a carbapenémicos a través de la inserción de elementos IS.<sup>49</sup> Además del papel en la

expresión de los genes *bla*<sub>OXA</sub>, *ISAb1* también parece ser responsable de su movilización. De hecho, se han identificado desde una hasta múltiples copias de *ISAb1* en diferentes transposones. Un ejemplo de estos transposones es el *Tn2006* donde dos copias de *ISAb1* flanquean el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub>.<sup>50</sup> Existen muchos otros elementos IS que se han identificado con menos frecuencia, por ejemplo: la secuencia de inserción *ISAb125* se encontró asociada con el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> y es responsable de la duplicación de este gen en aislamientos de *A. pittii*.<sup>51</sup>

La identificación de *ISAb1* dentro de una gama de diferentes transposones que acarrean genes *bla*<sub>OXA</sub> junto con otros determinantes de resistencia así como su amplia diseminación en la naturaleza en diversas especies de *Acinetobacter*, indican el importante papel que estos elementos juegan en la plasticidad genómica dentro de las especies de *Acinetobacter*.<sup>36, 50</sup>

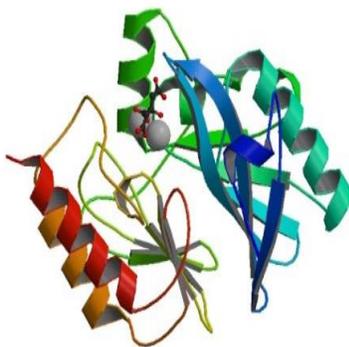


**Figura 8.** Estructura de una secuencia de inserción.  
IR: secuencias repetidas invertidas  
TnpA: transposasa

### 2.5.1.3. Xerc/XerD

El gen *bla*<sub>OXA-40/24-like</sub> de *Acinetobacter* se encuentra raramente en asociación con secuencias de inserción, únicamente existe un reporte de la asociación de un elemento IS4 río arriba.<sup>52</sup> A diferencia de las otras OXA carbapenemasas (OXA-23, OXA-51 y OXA-58) en la mayoría de los casos, los genes que flanquean al gen *bla*<sub>OXA-40-like</sub> son recombinasas XerC y XerD (Figura 7). Estas recombinasas están involucradas en la conversión de dímeros de cromosomas y plásmidos en monómeros.<sup>53</sup> Es probable que los genes *bla*<sub>OXA-40-like</sub>, dado que se encuentran en plásmidos, se movilicen a través de un proceso de recombinación sitio específico mediado por XerC y XerD.<sup>54,55</sup>

### 2.5.2. Carbapenemasas de la familia Metallo- $\beta$ -lactamasas



**Figura 8.** Estructura terciaria de la metalo- $\beta$ -lactamasa **VIM-4**

Las MBLs y las serina- $\beta$ -lactamasas median la resistencia a  $\beta$ -lactámicos rompiendo el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, sin embargo la manera en como estos dos grupos de enzimas logran realizar esta reacción difiere considerablemente.<sup>56</sup> A diferencia de las serina  $\beta$ -lactamasas las M $\beta$ Ls poseen un amplio espectro de actividad ya que reconocen la mayoría de los sustratos  $\beta$ -lactámicos. Las enzimas que pertenecen a esta clasificación requieren de cationes divalentes como cofactores para una actividad enzimática óptima y se inhiben por la acción de quelantes como el EDTA. El principal metal que se requiere en el sitio activo es el zinc, mientras que la mayoría de las M $\beta$ Ls alojan dos iones de zinc en su sitio activo las enzimas que pertenecen a la clase 3b solo tienen un ion.<sup>57</sup> Las M $\beta$ Ls poseen un conjunto de diferentes aminoácidos que definen la arquitectura del sitio activo el cual coordina los iones de zinc. Los iones de zinc usualmente coordinan dos moléculas de agua necesarias para la reacción de hidrolisis. El principal motivo de unión a zinc es histidina-X-histidina-X-acido aspártico (HXHXD), el cual es común en la mayoría de las M $\beta$ Ls excepto de las enzimas que pertenecen a la clase 3b.<sup>58</sup> Se considera que las M $\beta$ L son enzimas más eficientes ya que tienen una mayor actividad hidrolítica frente a los carbapenémicos, a diferencia de las carbapenemasas tipo OXA que hidrolizan débilmente a este tipo de antibióticos.<sup>33, 59</sup>

Las M $\beta$ Ls se encuentran agrupadas en seis familias denominadas: VIM con 41 variantes (IMP-1 a IMP-41), IMP con 48 variantes (VIM-1 a VIM-48), GIM, SPM, SIM y la familia recientemente descrita NDM con 12 variantes descritas a la fecha (NDM-1 a NDM-12).<sup>37, 60</sup> La mayoría de los genes que codifican para las enzimas IMP y VIM así como GIM-1 se encuentran en genes casete de integrones de clase 1 y pueden estar asociados a elementos genéticos móviles como transposones o plásmidos responsables directos de la diseminación de los genes de resistencia.<sup>61, 62, 63, 64, 65, 66</sup> La presencia de este tipo de

estructuras genéticas se ha descrito en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp y en menor proporción en especies de enterobacterias.

Uno de los principales intereses en detectar cepas productoras de MβLs es la contraindicación del uso de carbapenémicos como opción terapéutica. Aunque los inhibidores de metalo enzimas pueden utilizarse *in vitro* no hay inhibidores disponibles que puedan usarse como tratamiento en pacientes.<sup>67</sup> La única terapia alternativa pudiera ser la administración de polymixinas, la cual se ha reportado ser eficiente para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes ya sea Gram-negativas o Gram-positivas. La ocurrencia de un aislamiento positivo para MβL en el ambiente hospitalario posee no solo un problema terapéutico sino también una seria preocupación para el control y manejo de la infección ya que están asociadas con altas tasas de mortalidad, morbilidad y aumento en los costos hospitalarios.<sup>31, 68</sup>

#### **2.5.2.1. Integrones clase 1**

Los integrones, principalmente los de clase 1 y los transposones son las principales estructuras genéticas que acarrean genes adquiridos de resistencia a antibióticos, incluyendo a las metalo-β-lactamasas, en este patógeno nosocomial

Los integrones son elementos genéticos que contribuyen a la transferencia horizontal de genes en bacterias inter o intra especie. Son capaces de adquirir genes casete a través de eventos de recombinación sitio específico entre dos sitios, uno en el integrón y otro en el gen casete. Constan de tres regiones: la región 5' conservada (5CS), la región variable y la región 3' conservada (3CS). En la región 5' conservada se encuentra el gen de la integrasa (*intl*), la cual es necesaria para la recombinación sitio específica, el sitio adyacente de recombinación (*attI*) y un promotor (Pc) localizado río arriba del sitio de integración necesario para una transcripción eficiente y expresión de los genes casetes presentes en el integrón (Figura 9). En la región 3' conservada con frecuencia se encuentra el gen *qacEΔ1* junto con el gen *sul* ambos confieren resistencia a antisépticos y a sulfonamidas respectivamente. Mientras que los genes casete pueden moverse con libertad de un integron a otro, por si mismos los integrones no pueden movilizarse de un organismo a

otro por lo que requieren de otros elementos genéticos como plásmidos y/o transposones.<sup>59, 69</sup>

Los integrones clase 1 fueron los primeros integrones que se identificaron y acarrean resistencia a diversas clases de antibióticos. Se encuentran con mayor prevalencia en aislamientos clínicos y son uno de los más grandes contribuidores a las Infecciones Nosocomiales multidrogo resistentes.<sup>70</sup>

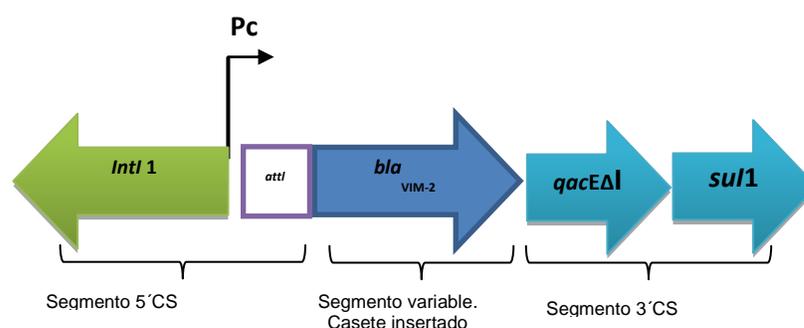


Figura 9. Estructura de un Integron clase 1

### 2.5.3. Carbapenemasas de la familia GES y KPC

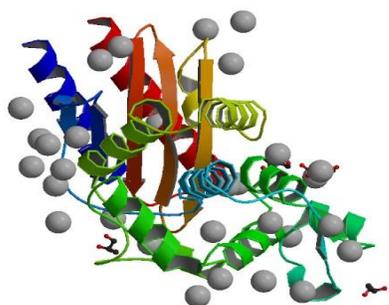


Figura 8. Estructura terciaria de la  $\beta$ -lactamasa GES-14

Aunque la resistencia a los carbapenémicos está relacionada principalmente con la producción y la adquisición de CHDLs y metalo- $\beta$ -lactamasas; la adquisición de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, principalmente del tipo GES, se ha asociado con la resistencia a los carbapenémicos ya que algunas de estas enzimas poseen actividad carbapenemasa.<sup>71</sup> Las BLEEs del tipo GES se están reportando en bacterias

Gram-negativas incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*<sup>72</sup> y recientemente en *Acinetobacter baumannii*.<sup>73,74</sup> GES-11 y GES-14 se han identificado en este microorganismo como las responsables de la resistencia no solo a carbapenémicos si no también a cefamicinas además de hidrolizar monobactámicos como aztreonam, dando lugar a una enzima que es activa contra todos los  $\beta$ -lactámicos.<sup>75</sup> GES-

14 difiere de GES-1 por dos sustituciones, Gly170Ser y Gly243Ala, y GES-11 difiere de GES-1 por una sola sustitución Gly243Ala.<sup>71, 74</sup>



**Figura 9.** Estructura terciaria de la  $\beta$ -lactamasa KPC-2

Por otro lado la familia KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” por sus siglas en inglés) son un grupo potente de carbapenemasas ubicadas en la clase molecular A identificadas inicialmente en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de Estados Unidos. Hay algunos otros reportes de estas enzimas en *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo en *A. baumannii* se han descrito muy raramente.

<sup>76,77, 78, 79,80, 81</sup> El primer miembro de la familia KPC fue KPC-1 seguido de KPC-2 variante que solo posee un cambio en su secuencia de aminoácidos.<sup>82, 83,84</sup>

Las carbapenemasas KPC hidrolizan la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pero son más eficientes para la nitrocefina, la cefalotina, la cefaloridina, la benzilpenicilina, la ampicilina y la piperacilina. También las carbapenemasas KPC hidrolizan el imipenem y el meropenem. La cefotaxima y el aztreonam son hidrolizados 10 veces menos eficiente que las penicilinas.<sup>76, 81</sup>

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

*Acinetobacter baumannii* se ha convertido en un patógeno nosocomial emergente muy importante debido a las infecciones que produce y a su capacidad de presentar multirresistencia o panresistencia.

En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a los antibióticos, especialmente a los antibióticos carbapenémicos, estos son utilizados para tratar infecciones causadas por diversos patógenos incluyendo *A. baumannii*, sin embargo su eficacia está comprometida debido a la presencia de carbapenemasas. La presencia y características de esta enzima juegan un papel relevante en la elección de un tratamiento adecuado.

En México la vigilancia de los mecanismos de resistencia que presentan las cepas de *A. baumannii* continúa en aumento por lo que la identificación de estos mecanismos aportará información sobre la epidemiología molecular de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos. Esta información servirá para apoyar en la vigilancia y control de las infecciones intrahospitalarias causadas por esta bacteria así como prevenir la selección de cepas multirresistentes y hacer un uso adecuado de los antibióticos. Además nuestra investigación aportará información sobre la diseminación y tipo de carbapenemasas presentes en *A. baumannii* en diferentes hospitales mexicanos de tercer nivel.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué tipo de carbapenemasas están presentes en aislamientos clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* en hospitales mexicanos de tercer nivel?

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

- Identificar los tipos de carbapenemasas presentes en aislamientos clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* aislados de hospitales de tercer nivel de atención en México

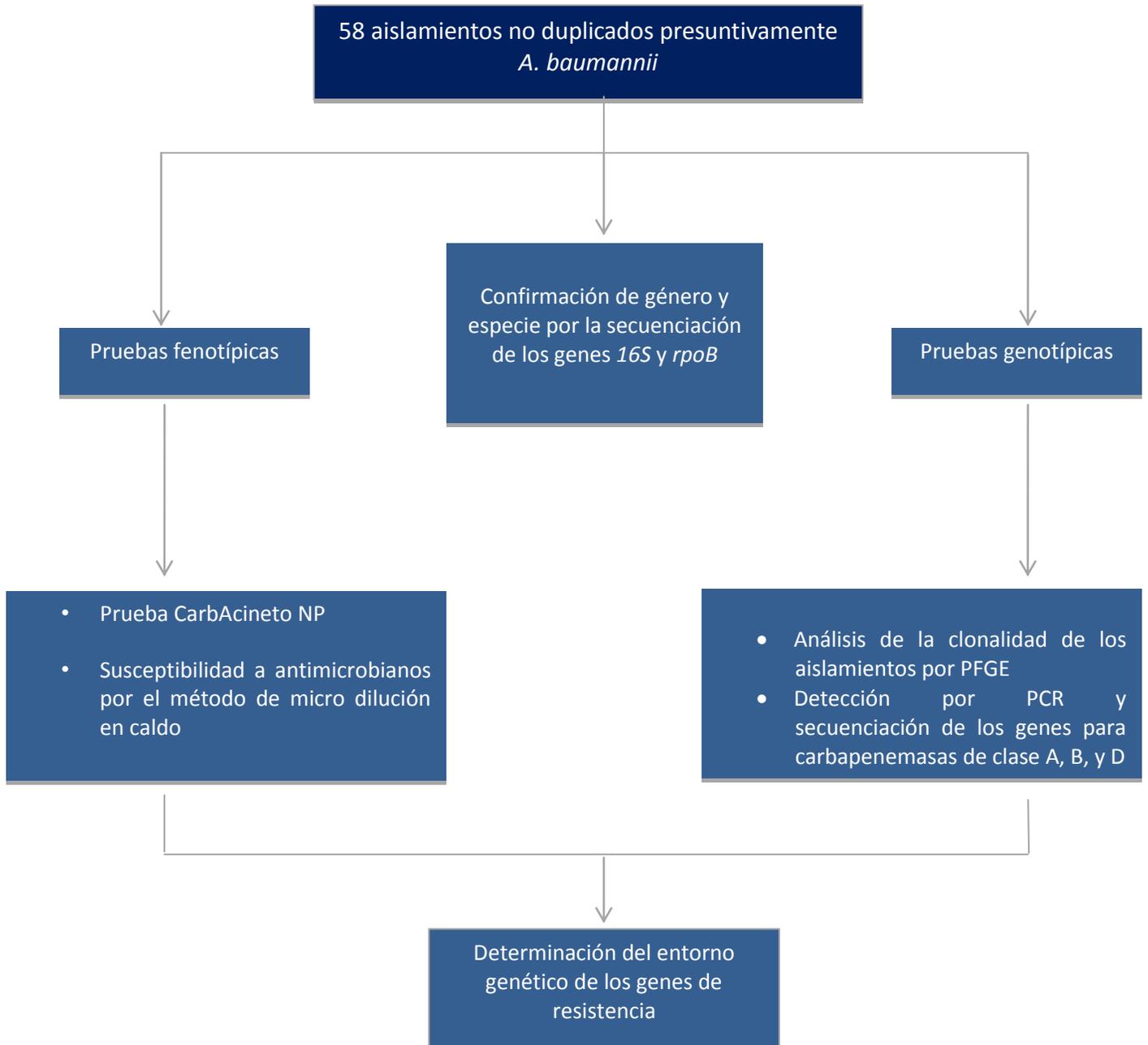
#### **5.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la expresión fenotípica de carbapenemasas en aislamientos clínicos MDR de *A. baumannii*.
- Identificar los genes que codifican para las carbapenemasas en aislamientos clínicos MDR de *A. baumannii*.
- Determinar el entorno genético de los genes de resistencia a carbapenémicos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 6.1. Esquema general de trabajo



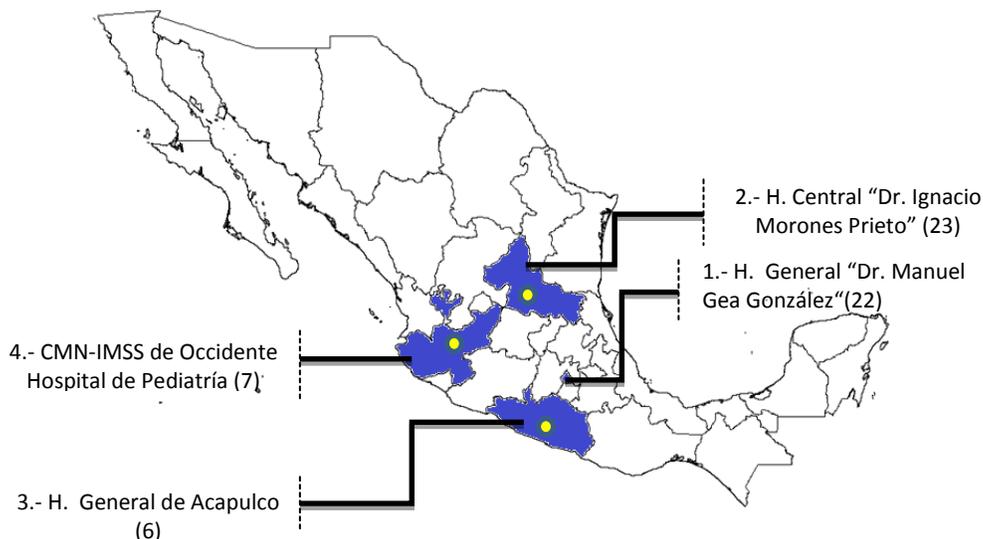
## 6.2.- Tipo de investigación

La investigación que se realizó consistió en un estudio de tipo descriptivo.

## 6.3. Obtención de cepas:

Se analizaron 58 aislamientos multirresistentes de *A. baumannii* provenientes de 4 hospitales de tercer nivel de México: Hospital General “Manuel Gea González”, DF; Hospital Central “Ignacio Morones Prieto” San Luis Potosí Méx, Hospital General de Acapulco, Acapulco Gro, y Hospital Infantil de Guadalajara CMN-IMSS de Occidente, Guadalajara, Jal., Méx (Figura 10). La fuente de obtención fue: secreción bronquial, hemocultivo, herida, punta de catéter, aspirado traqueal, orina, expectoración y tejido. Todas las cepas se aislaron de infecciones intrahospitalarias durante el período de Diciembre 2009-2012 bajo los siguientes criterios de inclusión:

- Provenientes de los servicios de medicina interna, cirugía y unidad de cuidados intensivos
- Resistentes a carbapenémicos: imipenem
- Aislamientos no duplicados



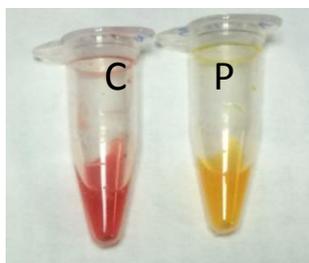
**Figura 10.** Hospitales incluidos en el estudio.

#### 6.4. Identificación de género y especie

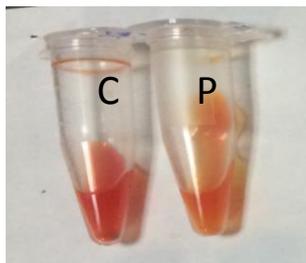
La identificación inicial se realizó en cada uno de los hospitales participantes de forma automatizada con el equipo Phoenix (Becton Dickinson Company, EUA). En el laboratorio del Departamento de Diagnóstico Epidemiológico del CISEI/INSP se reidentificaron con el sistema Api 20NE (bioMeriux®SA). Debido a las similitudes morfológicas y bioquímicas que comparten las especies del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* (ABC), la identificación a nivel de especie se realizó mediante la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y el análisis de la secuencia de los genes *16S* o *rpoB*. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *16s* fueron Ab16sF (5'GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y Ab16sR (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3) y para el gen *rpoB* se emplearon Ac696F (5'TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG 3') y Ac1093R (5'CMACACCYTTGTTMCCRTGA 3') respectivamente.

#### 6.5. Detección de cepas productoras de carbapenemasa: CarbAcineto NP

a)



b)



**Figura 11.** Actividad carbapenemasa **a)** del control NDM-1 **b)** del control OXA-48

La actividad carbapenemasa se midió con la prueba CarbAcineto NP<sup>85</sup> la cual se basa en la detección bioquímica de bacterias productoras de carbapenemasas mediante la hidrólisis in vitro del anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem. Para realizar esta prueba se crecieron las cepas en placas con agar Mueller-Hinton utilizando el método de estría cruzada para obtener colonias aisladas y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas. Este ensayo se realizó en tubos eppendorf de 1.5ml donde se resuspendió una asada en 100  $\mu$ l de la solución de lisis (NaCl 5M), adicionando 100  $\mu$ l de rojo fenol pH 8.0 sin antibiótico para el control negativo y 100  $\mu$ l de la solución rojo de fenol con imipenem para la muestra problema. La

preparación del rojo de fenol con imipenem se realizó pesando 0.012 gr del antibiótico y agregando 1 ml de rojo de fenol pH 8.0, la concentración final de trabajo es 3mg/ml.

Los tubos se incubaron a una temperatura de 37°C y posteriormente se tomaron lecturas a los 20 minutos, 1 hora y 2 horas. Los controles empleados fueron *Klebsiella pneumoniae* (NDM-1), *E. coli* (OXA-48), *Klebsiella pneumoniae* (KPC) y *A.baumannii* (OXA-143) además para validar el ensayo se utilizó un control para cada muestra problema (suspensión bacteriana más rojo de fenol). La actividad carbapenemasa se evidenció por el cambio de color del indicador de pH, rojo de fenol de rojo a amarillo/naranja (Figura 11) debido a la formación de ácido carboxílico resultante de la hidrólisis de imipenem.

#### **6.6. Susceptibilidad antimicrobiana:**

La susceptibilidad a los antimicrobianos de los 58 aislamientos clínicos se realizó con el equipo automatizado Phoenix (Becton Dickinson Company, EUA) y confirmado con el equipo MicroScan (Siemens Healthcare, EUA) con combos 20 para bacilos gram-negativos no fermentadores siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los antibióticos que se ensayaron fueron: amikacina, ampicilina, sulbactam, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, meropenem, levofloxacino, piperacilina, piperacilina-tazobactam, ticarcilina, ticarcilina-clavulánico y trimetoprim-sulfametoxazol. También se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés), usando la técnica de microdilución en caldo, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012)<sup>86</sup> para la cual se utilizaron los antibióticos: Imipenem, meropenem, tigeciclina y colistina, utilizando las siguientes concentraciones de trabajo: 0.5-128 µg/ml para Imipenem, 0.125-128 µg/ml para Meropenem, 0.25-32 µg/ml para Colistina y Tigeciclina. Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controles. Para la interpretación de los resultados se utilizaron los puntos de corte de acuerdo a las recomendaciones del CLSI 2012(Tabla 5).

**Tabla 5.** Puntos de corte para los antibióticos utilizados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aislamientos clínicos de *A. baumannii*

Antibiótico	Categoría		
	Sensible ( µg/ml)	Intermedio( µg/ml)	Resistente ( µg/ml)
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Colistina	≤ 2	-	≥ 4
*Tigeciclina	≤ 2	-	≥ 2

\*los puntos de corte para Tigeciclina fueron tomados por la FDA (Food Drug Administration) para Enterobacterias.

### 6.7. Caracterización clonal de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii*:

La relación clonal de todas las cepas se realizó por la técnica de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE por sus siglas en ingles).<sup>87</sup> La purificación del DNA de los aislamientos clínicos se realizó a partir de un cultivo puro en caldo Luria Bertani (LB), se cosecharon las células por centrifugación a 13,000 rpm, por 5 min, a 4°C. Se realizó un lavado con solución salina-Tris (NaCl 1M, Tris 0.01M, pH 8.0), la pastilla se resuspendió en 440 µl de la misma solución y después se mezcló con un volumen igual de agarosa Sea Plaque GTC con punto de fusión de 65°C (Bioproducts Rockland, Maine USA) en 1.5% de solución salina-Tris. Con la mezcla que se obtuvo se fabricaron discos de 20 µl y se mantuvieron en frío a 20°C por 5 minutos, posteriormente se trataron con solución de lisis EC ( Tris 6mM pH 8.0, NaCl 1, EDTA 0.1 M pH 8.0, desoxicolato de sodio 0.1%, sacarosyl 0.5% , 50 µg/ml de RNAsa A, 100 µg/ml de lisozima, 5µg/ml de lisofatina) y se incubaron a 37°C por tres horas, después se decantó y se adicionó la solución ES ( EDTA 0.5 M pH 9, sacarosyl 1%) adicionando 1.0 mg/ml de proteinasa K a una temperatura de 50°C durante 18 horas como mínimo y como máximo 24 horas.

La solución ES se decantó y se lavaron los discos con solución amortiguadora TE 1X (Tris 1M, pH 7.5, EDTA 0.5 M pH 8.0), en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente, por cuatro veces, después se realizó la digestión del DNA con 25 U de enzima *Apa I* durante 17 horas. Después se separaron los fragmentos de DNA por electroforesis

en gel por campos pulsados, en un sistema de electroforesis (Laboratorios BioRad CHEF-DR II) en geles de agarosa al 1.4% en amortiguador TBE 0.5X (Tris base 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1Mm pH 8.0) a un voltaje de 11 V/cm, con pulsos de linearidad de 1 a 100 segundos por 23 horas. El lambda ( $\lambda$ ) marker #340 (New England Biolabs, Ontario Canadá) se usó como marcador estándar de peso molecular. Después se tiñó el gel con bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml y se observó con luz ultravioleta. Para determinar los tipos clonales se analizaron los perfiles de restricción visual, usando los criterios de Tenover.<sup>88</sup>

### 6.8. Extracción de DNA total:

Para identificar los genes que corresponden a las diversas carbapenemasas se procedió a realizar la extracción del DNA por el kit InstaGene Matrix (BioRad, México) para el cual se extrajo DNA de cada aislamiento a partir de un cultivo fresco en placa siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 6.9. Amplificación de los genes para carbapenemasas por PCR:

Para realizar la identificación genotípica de carbapenemasas se realizó la búsqueda de los genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, y *bla*<sub>OXA-58-like</sub> por PCR y solo aquellas que dieron una actividad carbapenemasa franca se procedió a hacer la búsqueda de los genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>GES</sub>. Los oligonucleótidos utilizados en el estudio se encuentran en la Tabla 6 y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Condiciones de amplificación de los genes para las diferentes carbapenemasas

Etapa	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C por 5 minutos	1
Desnaturalización	94°C por 45 segundos	30
Alineamiento	X* por 45 segundos	
Extensión	72°C por 1 minuto	
Extensión final	72 °C por 5 minutos	1

X\* verificar Tabla 6 para la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido

Los productos de PCR amplificados fueron analizados mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris/Borato/EDTA) 0.5X y teñidos con Bromuro de etidio (EtBr), 01 µg/ml. Se empleó el marcador de peso molecular ΦX174/ *Hae* III de Invitrogen®.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados en el estudio

<b>Gen</b>	<b>Pb</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>	<b>Referencia</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	825	5'-TGAACATTAACACTCTT- 3' 5'- CTATAAAATACCTAATTGTT- 3'	52°C	Pournaras S et al. J Antimicrob Chemother. 2006, 57: 557-561.
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	501	5'- GATCGGATTGGAGAACCAGA-3' 5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	53°C	Turton J et al. J Clin Microbiol. 2006, 44(8): 2974-2976.
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	825	5'ATGAAAAAATTTATACTTCC-3' 5'- TTAATGATTCCAAGATTTTC-3'	50°C	Turton J et al. J Clin Microbiol. 2006, 44(8): 2974-2976.
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	328	5'-CGATCAG AATGTTCAAGCGC-3' 5'-ACGATTCTCCCCTCTGCGC-3'	53 °C	Poirel L et al. Antimicrob Agents Chemother. 2005, 49(1): 202-208.
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	361	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3' 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3'	59°C	Ellington M et al. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 321-322.
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	587	5'- CTACCGCAGCAGAGTCTTTG- 3' 5'- AACCAGTTTTGCCTTACCAT- 3'	57°C	Ellington M et al. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 321-322.
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	570	5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3' 5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	59°C	Ellington M et al. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 321-322.
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	661	5'GGT GCA TGC CCG GTG AAA TC3' 5'ATG CTG GCC TTG GGG AAC G3'	60°C	Ellington M et al. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 321-322.

<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	770	5'CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC3' 5'CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC3'	63°C	Ellington M et al. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 321-322.
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	827	5'CTT CAT TCA CGC ACT ATT AC 3' 5' TAA CTT GAC CGA CAG AGG 3'	55°C	Ellington M et al. J Antimicrob Chemother. 2007, 59: 321-322.

## 7. Secuenciación de amplicones:

La secuenciación por el método de Sanger<sup>89</sup> permite determinar el contenido de bases de los fragmentos amplificados por PCR o de genomas y plásmidos completos. Este método se caracteriza por la utilización de dideoxinucleótidos marcados radiactivamente o con cromóforos que definen la amplificación de cada fragmento de acuerdo a la base nucleotídica que se esté produciendo. Los diferentes genes amplificados se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en un secuenciador automatizado (Applied Biosystems, modelo 3130xl) y los datos obtenidos se analizaron con los algoritmos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y CLUSTAL W disponibles en internet.

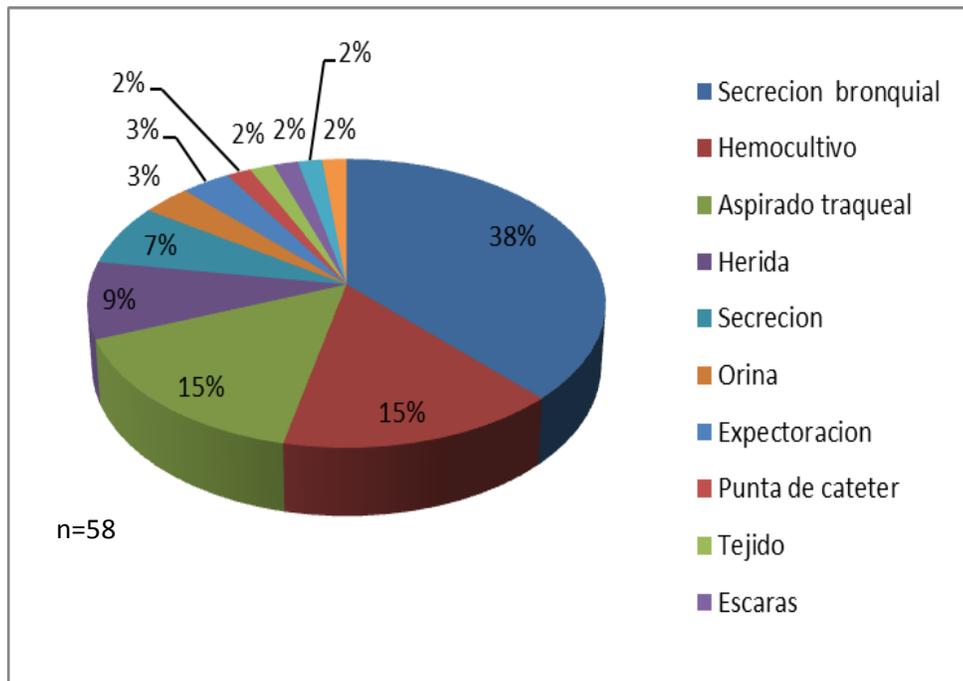
### 7.1 Consideraciones éticas y de bioseguridad

El presente trabajo no comprende la investigación e intervención directa con el paciente, los aislamientos con los que se trabajó fueron obtenidos de manera rutinaria por el hospital. No se trabajó con agentes infecciosos modificados genéticamente. El tratamiento a los desechos generados se realizó por medio de autoclave y cloración.

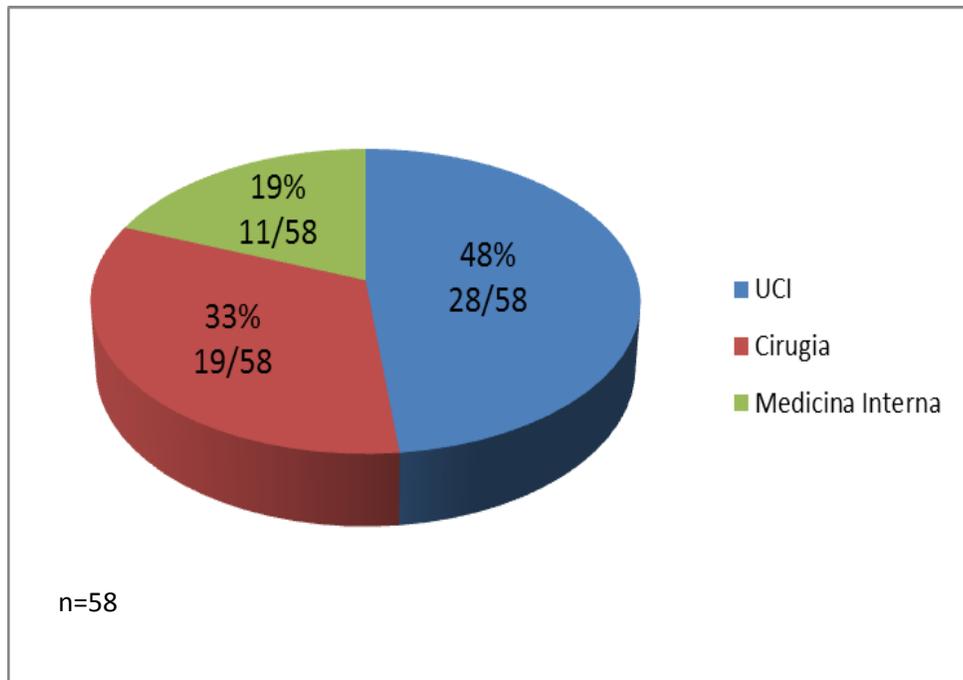
## 8. RESULTADOS

### 8.1. Características de los aislamientos:

Un total de 58 aislamientos no duplicados de *Acinetobacter baumannii* se incluyeron en el estudio. Las fuentes más comunes de obtención de los aislamientos clínicos fueron de secreción bronquial 22/58 (38%), de hemocultivo 9/58 (15%) y de aspirado traqueal 9/58 (15%) Grafica 1. Por otro lado, el servicio donde se obtuvieron con más frecuencia los aislamientos clínicos fue la unidad de cuidados intensivos (UCI) (48%), cirugía (33%) y medicina interna (19%) Grafica 2.



**Grafica 1.-** Distribución de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* por origen



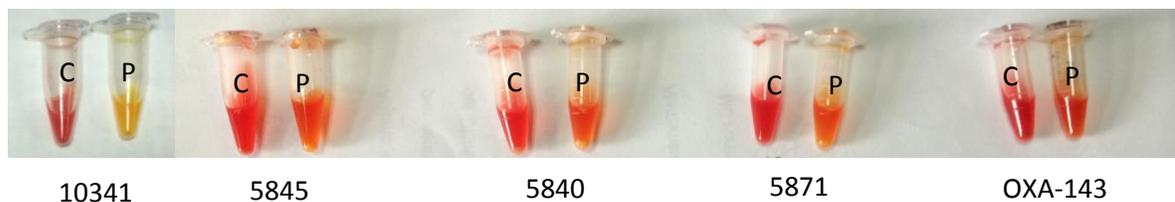
**Gráfica 2.-** Distribución de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* por servicio

## 8.2. Identificación de género y especie

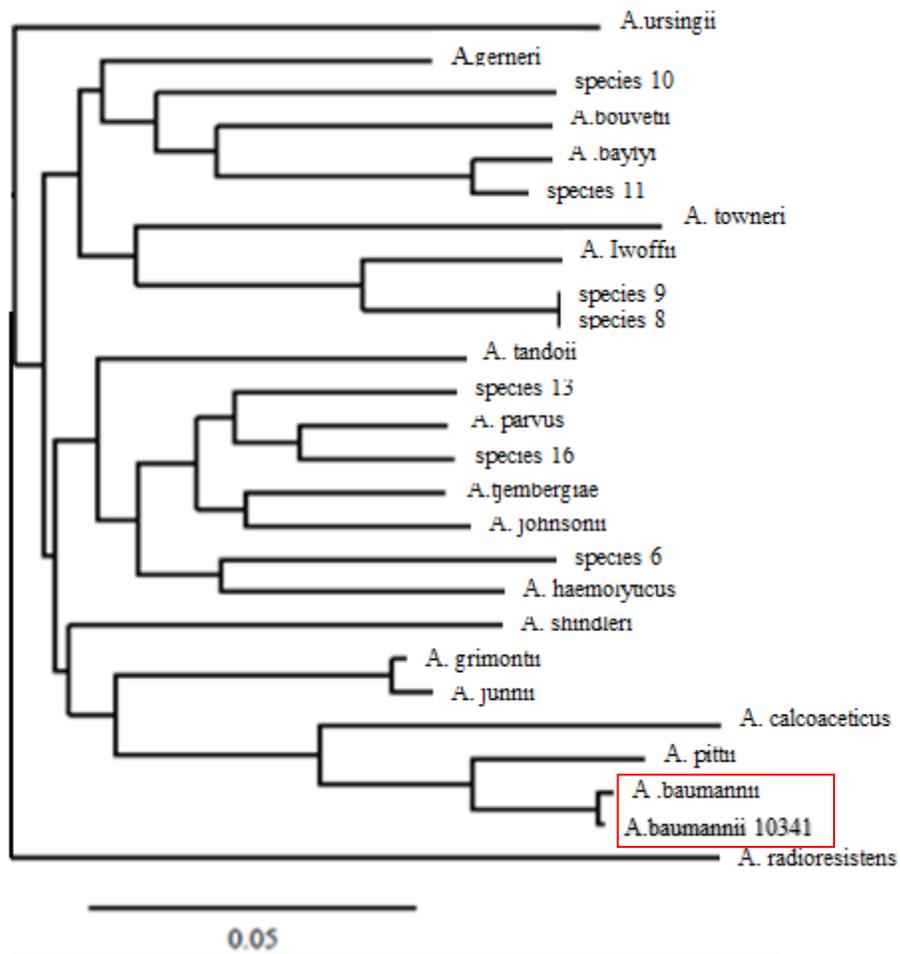
El análisis de las secuencias del gen *rpoB* identificó a todos los aislamientos clínicos como *Acinetobacter baumannii*. En la Figura 12, se muestra el dendrograma filogenético donde un aislamiento clínico de *Acinetobacter* sp se ubica en el clado correspondiente a la especie *baumannii*.

## 8.3.- Detección de cepas productoras de carbapenemasa

Con la prueba CarbAcineto NP se midió la actividad de carbapenemasa. Teniendo como resultado 42 aislamientos clínicos positivos a carbapenemasa y 16 aislamientos negativos a la prueba. En la Figura 13, se muestran los resultados positivos de la prueba.

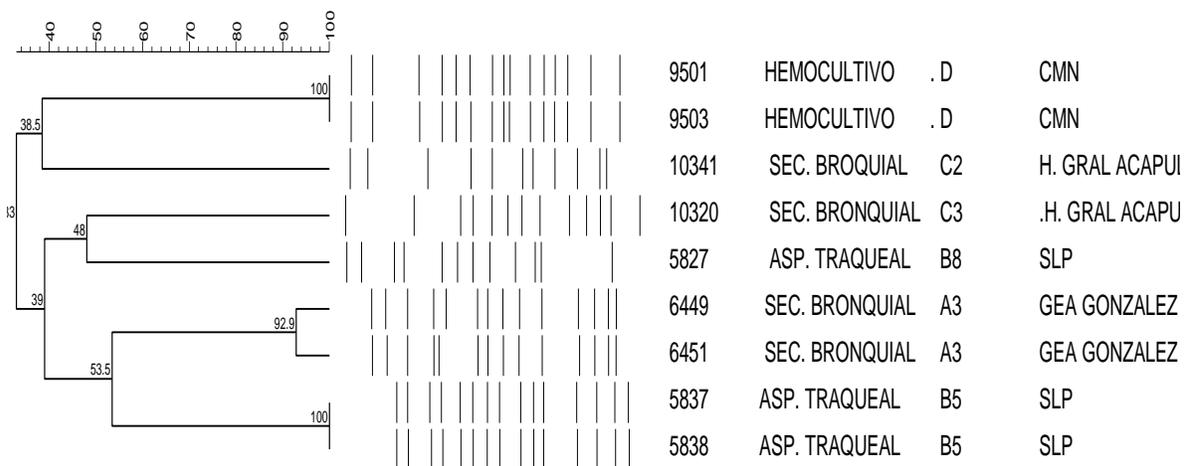


**Figura 13.** Resultados positivos de la prueba CarbAcineto NP. Las muestras 10341 a 5871 son *A. baumannii* y OXA-143 (control positivo). C: control negativo y P: muestra problema.



**Figura 12.** Dendrograma filogenético del gen *rpoB* para la identificación de especie de los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* sp.

**8.4.-Análisis por PFGE de los aislamientos clínicos** El análisis de PFGE para determinar la clonalidad de los aislamientos se muestra en la Figura 14. Los 58 aislamientos se agruparon en 4 grupos clonales. La clona 1 con cuatro subtipos (A-A4), se aisló del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, DF México, la clona 2 con ocho subtipos (B-B8) del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, la clona 3 con tres subtipos (C-C3) del Hospital General Acapulco, Acapulco Gro., y la clona 4 con un subtipo (D-D1) del Hospital de Pediatría, CMN-IMSS de Occidente, Guadalajara Jal.



**Figura 13.** Dendrograma de aislamientos de *A. baumannii*.

### 8.5.- Perfiles de susceptibilidad de los aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*

Los aislamientos fueron resistentes a amikacina (AMK), cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ), gentamicina (GEN), levofloxacino (LEV) y ciprofloxacino (CIP). La susceptibilidad por el MIC muestra que todos los aislamientos fueron resistentes a imipenem y meropenem, siendo la MIC<sub>50</sub> y MIC<sub>90</sub> para imipenem de 64 µg/ml y 128 µg/ml respectivamente. Mientras que para meropenem la MIC<sub>50</sub> y MIC<sub>90</sub> fue de 32 µg/ml. El 100% de los aislamientos fueron susceptibles a tigeciclina y el 60.3% a colistina (Tabla 7).

### 8.6.- Identificación por PCR de β-lactamasas con actividad carbapenemasa

En la Tabla 8 se muestran el número de aislamientos a partir de los cuales se detectaron por PCR los diferentes genes que codifican para carbapenemasas de clase A, B y D.

**Tabla 7.-** Perfiles de susceptibilidad por aislamiento clínico

Aislamiento	Hospital <sup>a</sup>	Clona	MIC (µg/ml)			
			MEM	IMI	CL	TIG
6428	1	A3	32	64	4	0.25
6431	1	A3	32	64	4	0.25
6433	1	A3	32	64	4	0.25
6434	1	A3	32	64	4	0.5
6435	1	A4	32	64	2	0.5
6438	1	A3	32	64	4	0.5
6440	1	A3	32	64	4	0.5
6441	1	A2	32	64	4	0.25
6448	1	A4	32	64	2	0.25
6449	1	A3	32	64	2	0.25
6451	1	A3	32	64	2	1
6454	1	A4	32	64	4	0.5
6461	1	A2	32	64	4	1
6462	1	A2	32	64	2	0.25
6463	1	A	32	64	4	0.5
6468	1	A4	32	64	4	0.25
6470	1	A	32	64	4	0.25
6471	1	A	32	64	4	0.25
6472	1	A	32	64	4	0.5
6473	1	A1	32	64	4	0.25
6474	1	A	32	64	4	0.25
6477	1	B8	32	64	4	0.25
5822	2	B8	32	>128	1	0.25
5827	2	B8	32	32	1	0.25
5828	2	B8	32	>128	1	0.25
5830	2	B8	32	64	1	0.25
5831	2	B8	32	32	1	0.25
5834	2	B5	32	64	1	0.25
5837	2	B5	32	>128	1	0.25
5838	2	B5	32	64	1	0.25
5839	2	B5	32	64	1	0.25
5840	2	B5	32	32	1	0.25
5842	2	B	32	>128	1	0.25
5844	2	B	32	64	1	0.25
5845	2	B7	32	32	1	0.25
5847	2	B	32	32	1	0.25
5851	2	B	32	32	1	0.25
5856	2	B2	32	>128	1	0.25
5859	2	B2	32	>128	1	0.25
5860	2	B3	32	32	1	0.25
5863	2	B4	32	>128	1	0.25
5866	2	B4	32	32	1	0.25
5871	2	B4	32	32	1	0.25
5872	2	B4	32	32	1	0.25
5873	2	B4	32	32	1	0.25
10320	3	C3	32	64	4	0.25
10321	3	C	32	64	8	0.5

10322	3	C	32	64	4	0.25
10323	3	C2	32	64	8	0.25
10324	3	C3	32	64	4	0.25
10341	3	C2	128	>128	4	0.25
9501	4	D	32	64	2	0.25
9502	4	D	32	64	2	0.25
9503	4	D1	32	64	2	0.25
9505	4	D	128	64	2	0.25
9506	4	D	32	64	2	0.25
9507	4	D1	128	64	2	0.25

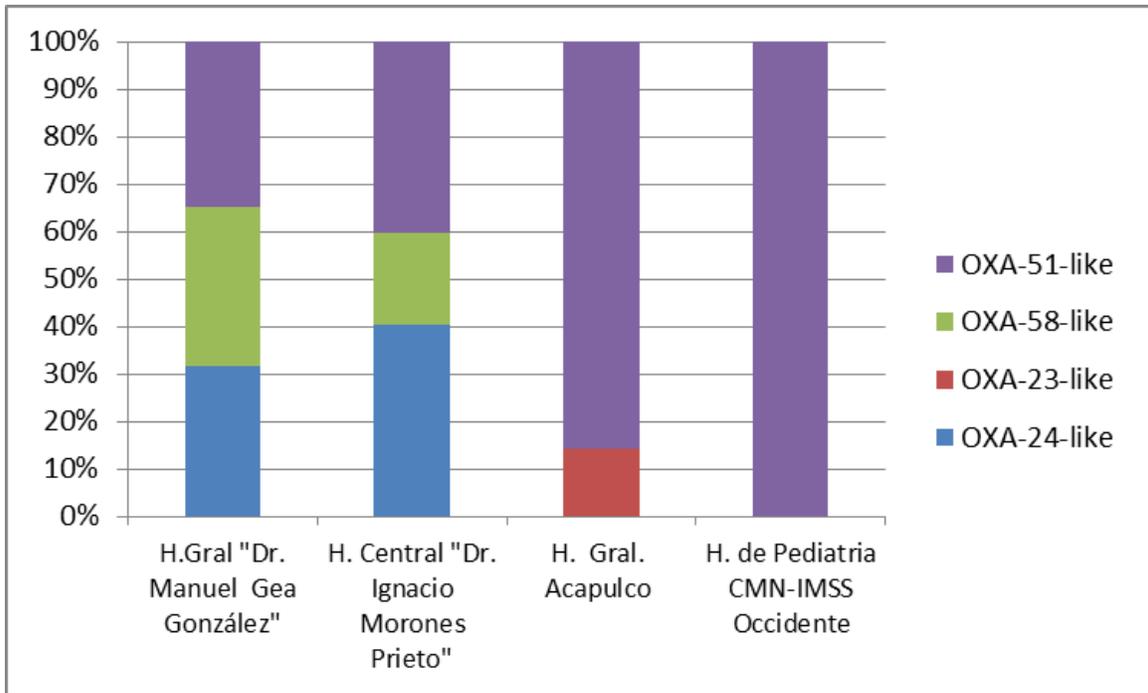
1.- Hospital General "Dr Manuel Gea González" DF México; 2.-Hospital Central "Ignacio Morones Prieto" S.L.P, México; 3.-Hospital General Acapulco, Acapulco Gro; 4.- Hospital de Pediatría, CMN-IMSS, Guadalajara Jal.

En el 100% de los aislamientos resistentes a carbapenémicos se detectó el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>; en el 74.1% de los aislamientos se detectó el gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub>; en el 56.8% el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> y solo un aislamiento (1.7%) el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub>. La presencia de metalo-betalactamasas se detectó en un aislamiento (1.7%) y correspondió al gen *bla*<sub>VIM</sub>. No se obtuvieron amplicones para las carbapenemasas de clase A. La frecuencia y distribución de estas carbapenemasas por hospital se muestra en la Grafica 3.

**Tabla 8.** Productos de amplificación por PCR de los genes que codifican para carbapenemasas de clase A, B y D en aislamientos clínicos de *A. baumannii*

Genes	<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
Tamaño de amplicón esperado	501	825	825	328	361
Número de aislamientos positivos	1	43	58	33	1
Porcentaje	1.7%	74.1%	100%	56.8%	1.7%
Hospital*	3	1-2	1-4	1-2	3

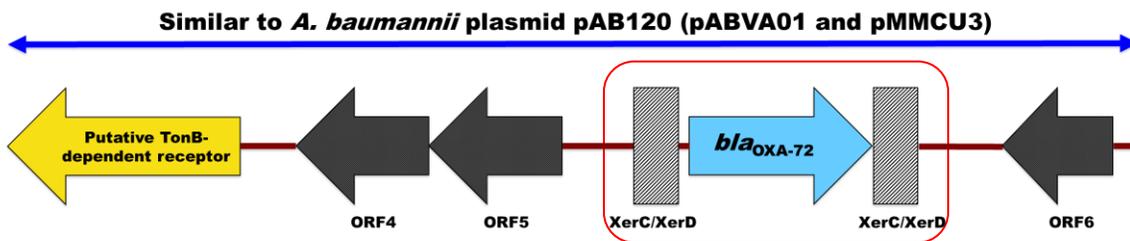
\*1.- Hospital M. Gea González, 2.-Hospital Ignacio Morones Prieto S.L.P, 3.-Hospital General Acapulco, 4.- Hospital General Juárez



**Grafica 3.** Distribución de carbapenemasas tipo OXA por hospital en aislamientos clínicos de *A. baumannii*

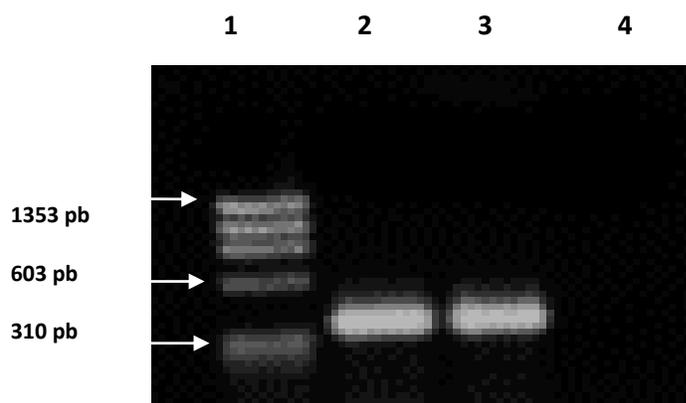
### 8.7. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub>

Se secuenció los amplicones para *bla*<sub>OXA-24-like</sub> al Instituto de Biotecnología/UNAM. El análisis de la secuencia nucleotídica a través de los algoritmos BLAST y CLUSTALW nos indicó que el gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub> presenta una mutación: G224D que corresponde al alelo OXA-72. El contexto genético de este gen se realizó por PCR con los oligonucleótidos XerC y OXA-24, mostrándonos que el gen *bla*<sub>OXA-72</sub> está flanqueado por las secuencias XerC/XerD Figura14. La secuencia del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> no se determinó.



**Figura 14.** Estructura genética del gen *bla*<sub>OXA-72</sub>

## 8.7. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *bla*<sub>VIM</sub>



**Figura 15.** Amplificación del gen *bla*<sub>VIM</sub>.  
1.- Marcador de peso molecular  $\Phi$ X174/Hae III  
2.- Control positivo VIM  
3.- Aislamiento clínico 10341  
4.- Control negativo s/DNA

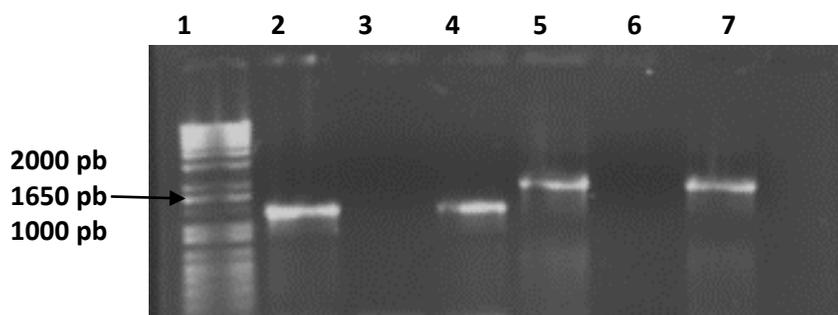
En la Figura 15 se muestra el amplicon de 361 pb aproximadamente que se obtuvo de un aislamiento clínico 10341 de *A. baumannii* que correspondió al gen *bla*<sub>VIM</sub>. El análisis de la secuencia por los algoritmos BLAST y CLUSTALW de este amplicon nos indicó que correspondió al alelo *bla*<sub>VIM-2</sub> (Figura 16).

## 8.8 Amplificación de las diferentes regiones genéticas del integrón que contiene el gen *bla*<sub>VIM-2</sub>:

Dado que las metalo- $\beta$ -lactamasas se encuentran formando parte de integrones de clase 1, se procedió a realizar la amplificación del integrón completo donde la enzima VIM-2 estaba contenida. Inicialmente se realizaron combinaciones de oligonucleótidos para la amplificación de las regiones 5'CS y 3'CS del integrón de clase 1 como se muestra en la Tabla 9. En la Figura 16 se muestra las amplificaciones exitosas que resultaron de la combinación de los oligonucleótidos: 5CS/VIMR para la cual se obtuvo un amplicón de 1300 pb; y TniC/VIMF se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1600 pb. Dado que se encuentra reportado que existen integrones de clase 1 que carecen de la región 3CS y en su lugar poseen el gen *tniCR*,<sup>90</sup> se procedió a realizar la amplificación del gen *tniC* junto

con la región del gen VIM-2. De esta manera se pudo amplificar el integrón completo que contenía el gen *bla*<sub>VIM-2</sub> para su posterior secuenciación.

No se obtuvieron amplicones para la región conservada 3CS ni para gen *su/1* ubicado en el extremo 3'conservado.



**Figura 16.** Amplificación de la región 5CS y del gen *Tnic* del aislamiento clínico positivo para *bla*<sub>VIM-2</sub>. 1.- Marcador de peso molecular 1Kb plus, 2.- Control positivo 6102 (5CS/VIMR), 3.-control negativo, 4.- Aislamiento clínico 10341, 5.-Control positivo 6102(TnicF/VIMF), 6.- Control negativo, 7.- Aislamiento clínico 10341

#### 8.8.- Estructura del integrón que contiene el gen *bla*<sub>VIM-2</sub>:

Se secuenció el integrón completo empleando las combinaciones de oligonucleótidos **5CS/VIMR** y **VIMF/TnicF**; La secuencia tiene un 100% de identidad con un integrón reportado en el 2013 por Moyo, S. *et al.*, denominado como In559.<sup>91,92</sup> Dicho integrón se identificó inicialmente en *Pseudomonas aeruginosa* otra bacteria Gram-negativa de importancia clínica. El In559 carece del extremo 3'conservado característico de los integrones de clase 1, además posee un arreglo en tándem de cuatro genes cassette *aaA7*, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *dfrB5*, *aacC5b* (Figura 17) que confieren resistencia a aminoglucósidos, β-lactámicos y trimetropim respectivamente (Tabla 9).

**Tabla 9.** Oligonucleótidos para la amplificación de las regiones del integrón de clase 1

Combinación	Región amplificada	Resultado
1.- 5CS/VIMR		Amplicon obtenido de 1300 pb
2.- VIMF/3CS		-
3.- VIMF/sulIR		-
4.- VIMF/TnicF		Amplicon obtenido de 1600pb

- No se obtuvo amplicones para esta combinación de oligonucleótidos

**Tabla 10.** Productos y fenotipos de los genes casete presentes en el integrón de clase 1

Gen	Producto	Fenotipo
<i>Int1</i>	Integrasa de clase 1	-
" <i>aacA7</i> "	Aminoglucósido acetil transferasa	confiere resistencia a aminoglucósidos
" <i>blaVIM-2</i> "	Metalo $\beta$ -lactamasa VIM-2	confiere resistencia a $\beta$ -lactámicos
" <i>dfrB5</i> "	Dehidrofolato reductasa	confiere resistencia a trimetoprim
" <i>aacC5b</i> "	Aminoglucósido 3-N-acetiltransferasa	confiere resistencia a aminoglucósidos
" <i>tniR</i> " o " <i>tniC</i> "	Resolvasa	-

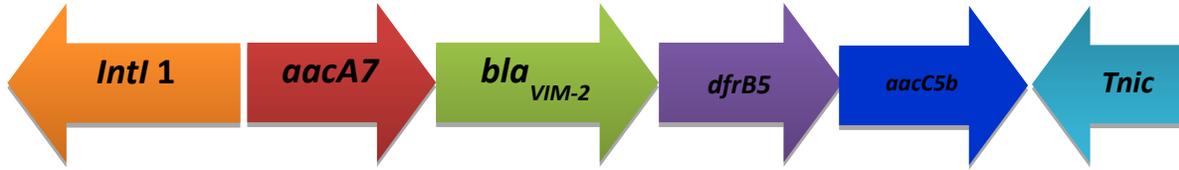
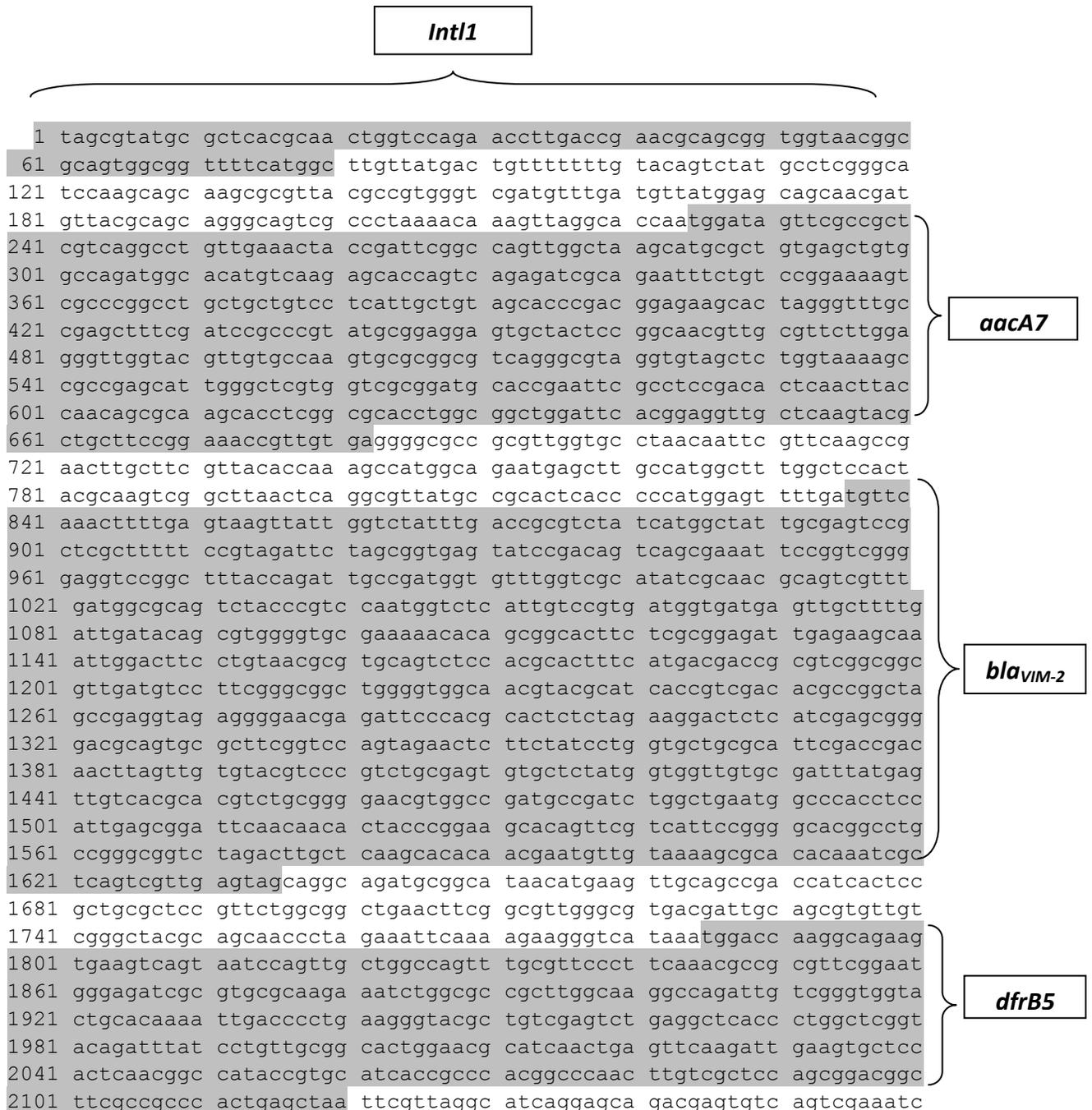


Figura 17. Estructura del integrón de clase 1 del aislamiento positivo para el gen *bla<sub>VIM-2</sub>*



2161 atccatctca ctggaaacga tgttgcggtg ttgcagtcaa taaatgcat gttcggcgag  
 2221 gcattcaacg accaagatag ttatgcccgc aacaagccgc catcaagcta tttcaaaaa  
 2281 ctgcttagca cttctagttt tattgcggtg gctgcggttg acgagcaaaa agtcattggc  
 2341 gctatcgccg cgtatgagtt gcaaaaattc gagcagcaaa gaagcgagat ttatatctac  
 2401 gatctcgctg tagcggcaac ccgccgcaga gaaggcatag ctacagctct aattaaaaaa  
 2461 ctcaaggcta taggcgcagc gcgtggagct tatgtgattt acgtccaagc tgataaaggc  
 2521 gtagaagacc aaccagccat agagctctat aaaaaactag gaaccatcga agacgtattt  
 2581 catttcgaca ttgcggttga gcagagtaaa aatcatgcct aacaaggcac tccagccgac  
 2641 ggctttgctc tcgctgcgct acggcaaadc cgcggctgag tttggcggtt gaacgacagc  
 2701 tttccaaaaa gctctacggc tgctctgggt cgacaccggt aatcggatcg ttgcccact  
 2761 gaacagcgcc ccggtccagg tcgcctccat

2791 ttatgcccgc gaaccgaggg agagcagctt  
 2821 tacgcccgtc ggccgcagtt cgccttggg cgacacgtgc cggtagagcg tctgcccggg  
 2881 aatcccagat tcttcgcaga gatcgcccac cttggtttcc gggtgcccc aagctggccat  
 2941 cgcagggcgt agcttggcgg cggtcattct gaaggggccc cccctttcc tgcgcgagc  
 3001 gcgcgcccag ataagtccag cgactggtcg ctcgaaaatc aactcacgct cgaactcggc  
 3061 cagcgcggca aaaataccga acacaagctt gccggcggca gtcgtcgtgt cgaccgccc  
 3121 accgtgaccg gtcaggacct tcaggcccac gctacgcgca gttaggtcgt gcacggtggt  
 3181 gatcaggtgg cgcagatcac ggccaag

} **tniC**

**Figura 16.-** Secuencia de nucleótidos del integrón de clase 1 portador del gen *bla<sub>VIM-2</sub>*

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

El incremento en la resistencia a carbapenémicos en especies del género *Acinetobacter* principalmente *A. baumannii* ha generado una especial preocupación durante la última década, debido a que la resistencia está asociada mayoritariamente con la producción de carbapenemasas principalmente de clase B metalo-  $\beta$ -lactamasas o clase D oxacilinasas.<sup>93</sup> En el estudio, se analizaron 58 aislamientos clínicos provenientes de cuatro hospitales mexicanos de tercer nivel de atención para la búsqueda de diferentes clases de carbapenemasas. A pesar de que las características clínicas de dichos aislamientos mostraron que la fuente más común de obtención fue de secreción bronquial no podemos asumir que el tipo de infección ocasionada por este patógeno se trató de neumonía nosocomial ya que *A. baumannii* pudo recuperarse como colonizante con el método de aspiración para la obtención de la muestra. El servicio en el que se aisló predominantemente *A. baumannii* fue en UCI. Los pacientes que usualmente ingresan a UCI tienen más procedimientos invasivos, reciben terapias antimicrobianas prolongadas y están en estrecho contacto con otros pacientes por lo que son más susceptibles de ser infectados por bacterias Gram-negativas como *A. baumannii*.<sup>94</sup>

La distinción de las especies incluidas en el género *Acinetobacter* es complicada y, a menudo, se identifican como complejo *A. baumannii-calcoaceticus* en muchos laboratorios de microbiología clínica de los hospitales, sin prestar especial atención a la especie concreta. Este hecho se debe fundamentalmente a que los sistemas de identificación comerciales de los que disponen la mayoría de los laboratorios (API, VITEK, PHOENIX) no son capaces de distinguir unas especies de otras y, con frecuencia ofrecen tan sólo información del género.<sup>95</sup>

Para conseguir una identificación molecular exacta son necesarias pruebas moleculares más complejas. En particular, las técnicas moleculares basadas en la secuenciación del gen 16S ribosómico no permiten distinguir las especies más próximas, debido a una falta de polimorfismo de este gen en el género *Acinetobacter* por lo que es necesario complementar la identificación y filogenia con el estudio de otros genes como el *rpoB* ya

que presenta mayor poder discriminatorio entre las especies identificando adecuadamente hasta en un 98.2% los aislamientos de *A. baumannii* a diferencia del gen *16s* RNA.<sup>96</sup> El uso de la secuencia del gen *rpoB* nos permitió identificar con seguridad a nivel de especies los aislamientos de *Acinetobacter* spp con resultados concordantes.

Los patrones de PFGE mostraron 4 clonas mayoritarias que se correlacionaron con los perfiles de susceptibilidad distribuidas por hospital.

Por medio de la prueba CarbAcineto NP se procedió a detectar fenotípicamente cepas productoras de carbapenemasas. Los resultados observados muestran que aquellos aislamientos positivos a la prueba portaban alguna carbapenemasa ya sea de clase D o clase B, sin embargo aquellas cepas en las que solo se detecto el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> la prueba fenotípica fue negativa, esto se debe a que este ensayo no es capaz de detectar actividad de carbapenemasa entre cepas que sean resistentes a carbapenémicos debido a la sobreexpresión de la enzima cromosomal OXA-51.<sup>85</sup>

Por otro lado, se pudo observar que la degradación del antibiótico varia según el tipo de carbapenemasa presente en cada aislamiento. Así la hidrólisis del imipenem tras dos horas de incubación es mayor en los aislamientos portadores de una MβL que en los que presentan una CHDL.

La presencia de carbapenemasas adquiridas tipo OXA-24-like u OXA-23-like podría explicar los altos niveles de resistencia a carbapenémicos. La OXA-24-like se encontró con más prevalencia de todas la carbapenemasas estudiadas ya que estuvo presente en un 74.1% de los aislamientos clínicos de *A. baumannii*. Esta enzima y sus variantes (OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207) se encuentran ampliamente distribuidas. Un reporte reciente con respecto a la evolución de la resistencia antimicrobiana entre bacilos Gram-negativos en Latino América, documentó la prevalencia de *Acinetobacter* spp productoras de oxacilinasas en Argentina (OXA-23 y OXA-24), Brasil (OXA-23), Chile (OXA-58) y México (OXA-24).<sup>97</sup> La secuenciación del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub> reveló que la variante encontrada en nuestros aislamientos correspondió a OXA-72. Aunque algunos grupos han reportado OXA-24-like en cepas portadoras del gen

*bla*<sub>OXA-51-like</sub> precedido de IS*Aba*, ninguno de nuestros aislamientos presentó esta secuencia de inserción delante del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>.<sup>98</sup> Otros autores han descrito este hecho argumentando que diferentes mecanismos, tanto de transferencia horizontal como de diseminación clonal, deben desempeñar un papel en la propagación del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub> en el ambiente hospitalario. Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos y al origen de la muestra el mecanismo de dispersión clonal parece ser el de mayor relevancia en los hospitales.

Todos los aislamientos en los que se detectó el gen *bla*<sub>OXA-72</sub>, se encontró flanqueado por recombinasas XerC. La presencia de las secuencias tipo XerC/XerD flanqueando el gen *bla*<sub>OXA-72</sub> podría explicar en gran medida la alta diseminación de este gen. Este tipo de proteínas podrían estar involucradas en un sistema de recombinación sitio específico responsable de la movilización de los genes que pertenecen a la familia *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> entre especies de *Acinetobacter*,<sup>99,100</sup> debido a que estas secuencias comparten una gran identidad con los dominios de unión tipo *dif*. Éstos actúan como dianas para la recombinación específica de sitio mediada por las recombinasas XerC y XerD.<sup>101, 102</sup>

Otras de las carbapenemasas de clase D adquiridas diseminada mundialmente es la OXA-23. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en Reino Unido y el sudeste asiático siendo responsable de brotes de *A. baumannii* resistente a los carbapenémicos en ambos países.<sup>103</sup> A pesar de que el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> se encuentra distribuido mundialmente,<sup>91</sup> en México no hay información sobre brotes asociados con la presencia de OXA-23. En este estudio un aislamiento mostró un amplicón 501 pb para el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> cuya secuencia y entorno genético será parte de otro trabajo.

La familia OXA-58-like se encuentra distribuida entre los aislados de *Acinetobacter* no sensibles a carbapenémicos en el sur de Europa causando brotes en Francia, Grecia, Bélgica, Italia y Turquía.<sup>104</sup> En nuestro estudio fue la segunda familia más prevalente en las cepas analizadas presentándose en dos hospitales (Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”). La mayor parte de las cepas en las que se detectó el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> también presentaron el gen *bla*<sub>OXA-72</sub>, por lo que podemos asociar la resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos a ambas enzimas.

Por otro lado la presencia de OXA-51-like en los hospitales CMN-IMSS de Occidente y Hospital General Acapulco como única fuente de carbapenemasas, la resistencia podría atribuírsele a la acción de mecanismos no enzimáticos como: pérdida o modificación de porina o sobreexpresión de bombas de eflujo principalmente.

Otra de las carbapenemasas responsables de la resistencia a la mayoría de los betalactámicos son las metalo- $\beta$ -lactamasas. Estas son las carbapenemasas de mayor importancia clínica ya que se encuentran asociadas con altas tasas de mortalidad, morbilidad y aumento en los costos hospitalarios, en *Acinetobacter baumannii* se han reportado únicamente las familias IMP (“activa frente al imipenem”) VIM ((*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*), SIM (*Seoul imipenemase*) y NDM-1 (*New Delhi metalobetalactamase*), las cuales se encuentran distribuidas mundialmente.<sup>27</sup> Los genes *bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> se transfieren de manera horizontal en plásmidos conjugativos propiciando la diseminación de la resistencia a carbapenémicos.<sup>105, 106</sup> Las enzimas de tipo VIM se han reportado esporádicamente en *A. baumannii*, sin embargo las que se han identificado son representadas por las variantes VIM-1, VIM-2 y VIM-4 en México.<sup>94,107</sup> En nuestro estudio sólo el 1.7% de los aislamientos analizados se determinó la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas, el cual consistió en un aislamiento clínico proveniente del Hospital General Acapulco Guerrero. Después del análisis de la secuencia se identificó la variante alelica VIM-2.

La prevalencia de las distintas M $\beta$ LS en México es escasa, lo que puede explicar el porcentaje bajo de aislamientos portadores de estas carbapenemasas.

El gen *bla*<sub>VIM-2</sub> se encontró como un gen casete contenido en un integrón de clase 1, el cual además de poseer un gen de resistencia para  $\beta$ -lactámicos incluidos los carbapenémicos poseía otros determinantes que le confieren resistencia a aminoglucósidos y a trimetropim. Toleman *et al.*, identificaron integrones en la India que portaban el gen *bla*<sub>VIM-2</sub> en los que el extremo 3' conservado estaba ausente y en su lugar poseían el gen *tnic*. Este tipo de integrones provenían de un progenitor común el transposon *Tn5090* o *Tn402* que por medio de eventos de integración y delección dió origen a la estructura común del integrón de clase 1. Los integrones de clase 1 son una de

las estructuras más exitosas en la adquisición, abundancia y diseminación de genes de resistencia entre bacterias Gram-negativas aisladas de muestras clínicas. <sup>108, 109, 110</sup>

De los aislamientos analizados no se identificaron genes para *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, y *bla*<sub>SIM</sub>. El análisis de los determinantes genéticos muestra que las MβL o carbapenemasas de clase B no son el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en los hospitales estudiados ya que predominan mayoritariamente las carbapenemasas de la familia OXA. Esto se debe a que las carbapenemasas clase D son los determinantes de resistencia a carbapenémicos que comúnmente se presentan en especies del género *Acinetobacter* particularmente en *Acinetobacter baumannii*, además de que comprenden la segunda familia más grande de β-lactamasas encontrándose distribuidas globalmente.

31, 111

## 10. CONCLUSIONES

---

- Las galerías de pruebas bioquímicas tradicionales resultan insuficientes para la correcta identificación de los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp., a nivel de especie y, por tanto, hacen necesario el uso de pruebas moleculares como la secuenciación del gen *rpoB* que nos permitió la correcta identificación de especie.
- El análisis de los determinantes genéticos muestra que las M $\beta$ L no son el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos predominando mayoritariamente las carbapenemasas de la familia OXA.
- La resistencia a carbapenémicos en los aislamientos clínicos estudiados puede atribuirse principalmente a la presencia de carbapenemasas de la familia OXA-24-like y OXA-58-like. Aquellos aislamientos en los que únicamente presentaron el gen *bla*<sub>OXA-51</sub> la resistencia puede ser asociada a la presencia de mecanismo no enzimáticos como presencia de bombas de eflujo sobreexpresadas o disminución de porinas.
- La carbapenemasa VIM-2 se encontró en un aislamiento, la resistencia se le atribuye a la presencia de esta M $\beta$ L.
- La implementación de vigilancia epidemiológica continúa tras el conocimiento de cepas portadoras de carbapenemasa en el ambiente hospitalario es de suma importancia para la implementación de medidas y estrategias que reduzcan la presencia de clonas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente que tengan un impacto negativo no solo al hospital si no al paciente.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1.- Vila, J, y F. Marco, (2010) Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 28(10):726–736
- 2.-Peleg, A.; Seifert, H. y D. Paterson, (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen *Clinical Microbiology Reviews*; p. 538–582
- 3.- Queenan, A. y K. Bush, (2007) Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*; p. 440–458
- 4.- Walther-Rasmussen, J. y N. Høiby, (2006) OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ;(57), 373–383
- 5.- Secretaria de salud., (2011) Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud
- 6.-Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología., (2012) Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica. Manual RHoVE
- 7.-Gaynes, R. et al., (2005) Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Diseases*; 41:848–54
- 8.- <http://www.cddep.org/resistancemap/overview/>
- 9.-Peleg, A.; Seifert, H. y D. Paterson, (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen *Clinical Microbiology Reviews*; p. 538–582
- 10.-Nemec, A. et al., (2011) Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.*;162:393–404.
- 11.-Gerner-smidt, P.,(1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol*; 30:2680-2685.
- 12.- Aguirre-Avalos G., Mijangos-Méndez., J. y G. Amaya-Tapia., (2010) Bacteriemia por *Acinetobacter baumannii*. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 48 (6): 625-634
- 13.- <http://www.who.int/drugresistance/surveillance/es/>

- 14.- Cerqueira, G. y A. Peleg, (2011) Insights into *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *IUBMB Life*, 63(12): 1055–1060,
- 15.- Aguado-Santacruz, G. y B. Moreno-Gómez, (2012) Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 35 (1): 9 - 21
- 16.-Dorsey, C. et al., (2004) The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*; 150, 3657–3667
- 17.- Gaddy, J., (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* 4: 273–278
- 18.-Loehfelm T,; Luke, N. y A. Campagnari, (2008) Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol*; 190:1036–1044.
- 19.- Carruthers, M. et al., (2013) *Acinetobacter baumannii* utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition. *PLoS ONE*; 8(3)
- 20.- Calvo, J. y L. Martínez –Martínez, (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;27(1):44–52
- 21.- Amaury, A. et al., (2006) Nuevos Betalactámicos. *Medicrit*; 3(6):132-135
- 22.- Krisztina, M. et al., (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 4943–4960
- 23.-Nordmann P, Poirel L, Dortet L. (2012) Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*
- 24.- Suárez, C. et al., (2006) Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*; 10(2): 85-93
- 25.- Vila J; Martí, S. y J. Sanchez-Céspedes, (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ;59, 1210–1215
- 26.- Opazo, A. et al., (2009) Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Rev Chil Infect*; 26 (6): 499-503
- 27.- Bush, K. y G. Jacoby, (2010) Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; p. 969–976

- 28.- Bush, K., (2013) Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Therapeutics Reviews* N.Y. Acad. Sci. 1277 84–90
- 29.-Perez, F. et al., (2007) Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; p. 3471–3484
- 30.- Juan, C. et al., (2008) Characterization of the new metallo-b-lactamase VIM-13 and its integronborne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3589–96.
- 31.- Poirel, L. y P. Nordmann, (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:826–836.
- 32.- Corvec, S. et al., (2003) AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother*; 52: 629–635.
- 33.-Bou, G. y J. Martinez-Beltran, (2000) Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC b-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 428–432
- 34.-Heritier, C. et al., (2005) Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 4174–4179.
- 35.- Poirel L.; Bonnin, R. y P. Nordmann, (2011). Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. *IUBMB Life*, 63(12): 1061–1067,
- 36.- Benjamin, A. et al., (2014) OXA  $\beta$ -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27(2):241
- 37.-<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>
- 38.- Rhomberg, P. y R. Jones, (2009). Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65:414–426.
- 39.-Brown S, Young HK, Amyes SGB. 2005. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:15–23.
- 40.- Opazo, A. et al., (2012) OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries*; 6(4):311-316.

- 41.- Lewin BM. () Genes. Editorial Reverté, Vol II, segunda impresión
- 42.- Heritier C, Poirel L, Nordmann P. (2006). Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol. Infect. 12:123–130.
- 43.- Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. (2013). OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 57:2121–2126.
- 44.- Turton, J. et al., (2006) The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett. 258:72–77.
- 45.- Poirel, L. y P. Nordmann (2006) Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 50:1442–1448.
- 46.- Segal, H. et al., (2007) Extended -10 promoter in IS*Aba-1* upstream of *bla*OXA-23 from *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3040–3041.
- 47.- Corvec, S. et al., (2007) Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:1530–1533.
- 48.- Figueiredo, S. et al., (2009) In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba1*-mediated overexpression of the natural *bla*OXA-66 oxacillinase gene. Antimicrob. Agents Chemother. 53:2657–2659.
- 49.- Evans BA, Hamouda A, Amyes SG. (2013) The rise of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Curr. Pharm. Des. 19:223–238.
- 50.- Sahl, J. et al., (2013) Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*. PLoS One 8:e54287.
- 51.- Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB. (2010) Novel genetic context of multiple *bla*OXA-58 genes in *Acinetobacter* genospecies 3. J. Antimicrob. Chemother. 65:1586–1588.
- 52.- Acosta, J. et al., (2011) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. Emerg. Infect. Dis. 17:1064–1067.
- 53.- Summers, D. y D. Sherratt, (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. EMBO J. 7:851–858.

- 54.- Merino, M. et al., (2010) OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2724–2727.
- 55.- Grosso, F. et al., (2012) Role of common *bla*OXA-24/OXA-40-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3969–3972.
- 56.-Frere, J., (1995)  $\beta$ -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* 16:385–395.
- 57.- Rasmussen, B. y K. Bush, (1997) Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:223–232.
- 58.-Wang, Z. et al., (1999) Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:614–622.
- 59.- Timothy, R., et al., (2005) Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.*
- 60.-Amudhan, S., et al., (2012) *bla*IMP and *bla*VIM mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. *J Infect Dev Ctries*; 6(11):757-762
- 61.- Castanheira, M., et al., (2004) Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*48:4654–4661.
- 62.- Lauretti, L., et al., (1999) Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1584–1590
- 63.- Poirel, L., et al., (2001) Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*VIM-2 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:546–552.
- 64.- Poirel, L., et al., (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:891–897.
- 65.- Senda, K., et al., (1996) PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla*IMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum- $\beta$ -lactams. *J. Clin. Microbiol.* 34:2909–2913.

- 66.- Yan, J., et al., (2001) Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2224–2228
- 67.- Nordmann, P. y L. Poirel, (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8:321–331. 109. Oh, E. J., S. Lee,
- 68.- Park, Y., et al., (2003) Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Microbiol. Methods* 54:411–418.
- 69.- Domingues, S., et al., (2012) Integrons Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria *Mobile Genetic Elements* 2:5, 211–223
- 70.- Stokes, H., et al., (2006) Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in sediment microbial community, *J. Bacteriol.* August; 188(16): 5722–5730. doi: 10.1128/JB.01950-05
- 71.- Bonnin, R., et al., (2013) Wide Dissemination of GES-Type Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Kuwait. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 183–188
- 72.- Poirel L.; Bonnin R. y P. Nordmann (2012) Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative rods. *Infect. Genet. Evol.* 12:883– 893.
- 73.- Bogaerts, P., et al., (2010) GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4872– 4878.
- 74.- Bonnin, R., et al., (2011) Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 349–354
- 75.- Dortet, L., et al., (2006) Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 44:4471–4478.
- 76.- Robledo, I., et al., (2010) Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1354-1357
- 77.- Nordmann, P.; Cuzon, G. y T. Naas. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9:228-236

- 78.- Akpaka, P., et al., (2009) Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J. Clin. Microbiol.* 47:2670-2671
- 79.- Villegas, M., y Colombian Nosocomial Resistance Study Group. (2007) First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1553-1555
- 80.- Wolter, D., et al., (2009) Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1660-1664
- 81.- Bratu, S., et al., (2005) Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:776–778.
- 82.-Miriagou, V., et al., (2003) Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1297–1300.
- 83.- Moland, E., et al., (2003) Plasmidmediated, carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:711–714.
- 84.- Yigit, H., et al., (2003) Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3881–3889.
- 85.- Dortet., L.; Poirel, L. y P. Nordmann, (2014) CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase producers in *Acinetobacter* spp. *J. Clin Microbiol*
- 86.- Clinical and Laboratory Standards Institute 2012
- 87.- Manual de procedimientos del Laboratorio 2PA Instituto Nacional de Salud Pública
- 88.- Tenover, F., et al., (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produce by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. . *J. Clin Microbiol* 33(9):2233
- 89.- Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt. Fundamentos de Bioquímica. 2da edición Ed. Médica Panamericana, 2007
- 90.- Toleman, M. et al., (2007) bla<sub>VIM-2</sub> –Harboring integrons isolated in India, Rusia an the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(7):2636

- 91.- Moyo, S. et al., (2013) First report of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania. Reference Centre for Detection of Antimicrobial Resistance, University Hospital of North Norway, Department of Microbiology and Infection Control
- 92.- <http://integrall.bio.ua.pt/>
- 93.- Roca, I., et al., 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drugresistant menace. *Front. Microbiol.* 3:148.
- 94.- Morfín-Otero et al., (2013) *Acinetobacter baumannii* Infections in a Tertiary Care Hospital in Mexico over the Past 13 Years. *Chemotherapy* 59:57–65
- 95.- Álvarez-Buylla Álvarez, A. (2014) Caracterización de *Acinetobacter* spp en el ambiente hospitalario: papel de las distintas especies y estudio molecular de la resistencia a carbapenemas. Tesis de Doctorado. Madrid España, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina
- 96.- Lee, M., et al., (2014) Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*
- 97.- Gales, A. et al., (2012) Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010).
- 98.- Lu, P., et al., (2009) Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a taiwan hospital: Spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*; 63: 641-647.
- 99.- Franolić-Kukina, I. et al., (2011) Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int J Infect Dis* 2011;15:706-9.
- 100.- D'Andrea, M. et al., (2009) Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*;53:3528-33.
- 101.-Merino, M. et al., (2010) OXA-24 carbapenemase gene flanked by Xerc/Xerd-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*; 54: 2724-2727
- 102.-Tian, G. et al., (2011) Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 429-432.

- 103.-Espinal, P. *et al.*, (2013) First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to tn2006 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; 57: 589-591.
- 104.- Marque, S. *et al.*, (2005) Regional occurrence of plasmidmediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol.*; 43: 4885-4888.
- 105.- Poirel, L. *et al.*, (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*;44:891-7
- 106.-Richt, H. *et al.*, (2001) Building communication networks: International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance. *Emerg Infect Dis.*7:319-22
- 107.- Lee, K. *et al.*, (2003) VIM- and IMP-Type Metallo- $\beta$ -lactamase-Producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals
- 108.- Fluit, A. y F. Schmitz, (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10: 272-288.
- 109.- Hall, R. y C. Collis, (1998) Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* 1: 109-119.
- 110.- Mazel, D., (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4: 608-620
- 111.- Zander, E. *et al.*, (2014) Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*.