



Universidad del Valle

“CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DEL COMPLEJO *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* con MULTIRRESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS OBTENIDOS DE PACIENTES DE LAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS DE UN HOSPITAL DE LA CIUDAD DE CALI”.

ROMEL FABIÁN GÓMEZ NARANJO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE SALUD
UNIVERSIDAD DEL VALLE
SANTIAGO DE CALI
2015**

“CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DEL COMPLEJO *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* con MULTIRRESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS OBTENIDOS DE PACIENTES DE LAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS DE UN HOSPITAL DE LA CIUDAD DE CALI”.

ROMEL FABIÁN GÓMEZ NARANJO

Trabajo de presentado como requisito para optar al título de:

Magíster en Ciencias Biomédicas

Directora:

MÓNICA CHÁVEZ VIVAS Ph.D

Codirector:

ANDRÉS O. CASTILLO Giraldo Ph.D

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE SALUD
UNIVERSIDAD DEL VALLE
SANTIAGO DE CALI
2015**

Nota de aceptación:

Firma del jurado

Firma del jurado

Santiago de Cali, _____

*Gracias amado Dios por estar conmigo
en cada instante de mi vida
y orientarme en cada paso que doy.
Tú eres mi Refugio, mi Castillo,
¡mi Dios,
en quien confío!.*

Agradecimientos

A Dios porque me ha permitido caminar entre leones, monstruos y serpientes y siempre me ha puesto a salvo bajo sus alas protectoras.

A mi esposa Beatriz, por todo su amor y los años a mi lado. A mi hija Camila, “la pureza de mi alma”. A mis padres y todos mis hermanos, porque su ejemplo, bendiciones y oraciones me han dado las bases para lograr las metas que me he propuesto.

A los que aún viven y a los que ya partieron, porque de cada uno aprendí lo mejor.

A Mónica Chávez Vivas, mi directora de este trabajo, porque sus palabras de aliento y su apoyo sonaron más fuerte en mi corazón que sus duras correcciones. A mi codirector Andrés Castillo, un señor, un caballero, un gran científico, sus aportes y enseñanzas fueron oportunas y totalmente formadoras.

A Cristina Eugenia Cabrera, por su amistad y su voz de apoyo constante.

Al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas- CIDEIM, por proporcionar la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 3386 como control para este estudio.

A la Universidad Libre Seccional Cali, concretamente al programa de enfermería por apoyar y financiar mis estudios en la Maestría y el reconocimiento que me han dado.

A la Universidad del Valle por permitirme obtener mi título de Magister.

Contenido

	Pág.
Lista de tablas.....	IX
Lista de figuras.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XII
Resumen.....	XIII
Introducción.....	1
Capítulo 1. Planteamiento del problema.....	3
Capítulo 2. Marco Teórico.....	6
Capítulo 3. Objetivos.....	19
Capítulo 4. Metodología.....	20
Capítulo 5. Resultados.....	31
Capítulo 6. Discusión	43
Conclusiones.....	52
Recomendaciones.....	55
Anexos.....	57
Bibliografía.....	69

Lista de tablas

	Pág.
Tabla1: Secuencias de los Primers del estudio.....	26
Tabla 2: Distribución de los Antibiotipos del complejo <i>A. baumannii-calcoaceticus</i> por sitio de muestreo y por perfiles de susceptibilidad a los antibióticos.....	34
Tabla 3: Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico en los 52 aislamientos del Complejo <i>A. baumannii calcoaceticus</i>	36
Tabla 4: Distancia fenotípica entre los aislamientos del complejo <i>ACB</i> según el antibiograma cuantitativo.....	37
Tabla 5. Distribución y caracterización molecular de los aislamientos de <i>A. baumannii</i>	41
Tabla 6 Distribución de los integrones en aislamientos del complejo <i>ACB</i>	42

Lista de Figuras

	Pág
Figura 1. Representación esquemática del integron clase 1.....	15
Figura 2. Representación esquemática del integron clase 2	16
Figura 3. Porcentajes de resistencia a antibióticos de los aislamientos clínicos del complejo <i>ACB</i>	35
Figura 4. Porcentajes de aislamientos clínicos del complejo <i>ACB</i> por antibiotipo en cada sitio de muestra.....	35
Figura 5. Cladograma de los 52 aislamientos del complejo <i>ACB</i>	37
Figura 6. Árbol filogenético calculado con el algoritmo de Máxima verosimilitud.....	39

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACB	Complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención en salud
MIC	Concentración mínima inhibitoria
PBP	Proteínas de unión a penicilinas
bla	Betalactamasa
BLEA	Betalactamasa de Amplio Espectro
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
MDR	Multirresistencia a los antibióticos
PDR	Pan-Resistentes

Resumen

Introducción: La resistencia de los microorganismos a los antibióticos es un importante problema de salud pública que afecta a la mayoría de los países del mundo debido a la presión selectiva que ha ejercido el uso indiscriminado de estos medicamentos.

Objetivo: Caracterizar fenotípica y molecularmente aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) obtenidos de pacientes de las unidades de cuidados intensivos de la Clínica Universitaria Rafael Uribe Uribe.

Metodología: En este estudio se analizaron 52 aislamientos del ACB obtenidos de diferentes tipos de muestras de pacientes de las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) de la clínica universitaria Rafael Uribe Uribe. La caracterización fenotípica se realizó mediante pruebas bioquímicas y de sensibilidad en el laboratorio de la clínica. La identificación molecular de las genopecies se realizó mediante el análisis de las secuencias del gen del ARNr 16s. Para determinar si la resistencia de los aislamientos del complejo está relacionada con la presencia de elementos genéticos como integrones, se amplificaron los genes para identificar integrones de la clase I, II y de otra clase reportados en la literatura. Se amplificaron determinantes de resistencia *bla* (*VIM*, *IMP*, *TEM*, *OXA-51* y *OXA-58*)

Resultados: A partir de los perfiles de susceptibilidad se logró identificar 5 antibiotipos. Además, por comparaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias de los aislamientos, se logró identificar dos clados.

Con base en la amplificación por PCR y la secuenciación directa del gen del ARNr 16S se elaboró un análisis filogenético, en el cual se pudo diferenciar aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (71,4%), *Acinetobacter calcoaceticus* (7,1%) y *Acinetobacter nosocomialis* (10,7%), todas ellas pertenecientes al complejo *A. baumannii-calcoaceticus*.

El integrón clase I se detectó en el 23% de los aislamientos, el clase II el 17,3% y otro el 9,6%.

Finalmente, los determinantes de resistencia más frecuentes fueron; *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58}, cada uno en el 38,5%, el 21,2% *bla*_{VIM-2} y en menor porcentaje *bla*_{IMP-1}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTXM-9}.

Conclusión: Los aislamientos obtenidos de los pacientes son multirresistentes, en su mayoría de la especie *A. baumannii*, portadores de genes de β-lactamasas (carbapenemasas) que probablemente se diseminan mediante integrones.

Palabras Clave: *Acinetobacter baumannii*, Resistencia bacteriana, Antibióticos, Antibiograma, Concentración Mínima Inhibitoria.

Introducción

Las especies del *ACB* son una de las causas importante de morbilidad infecciosa y mortalidad que afecta mayormente a pacientes en la UCI (1,2). En las últimas décadas, entre las genoespecies de este complejo, la *A. baumannii* ha sido la más frecuentemente aislada, y por ende, la de mayor importancia clínica. El complejo *ACB* es responsable de bacteriemias, infecciones del tracto urinario (1,3) y se ha identificado como el principal agente causal de neumonía asociada a ventilación mecánica (4), infección de difícil tratamiento debido a la resistencia que ha venido adquiriendo este complejo bacteriano a la mayoría de antibióticos (1,2,5).

La mortalidad por *A. baumannii* puede llegar a un 30% (6). Lo anterior, acompañado con estancias hospitalarias prolongadas por parte de los pacientes infectados, como también, por los costos económicos implicados en el tratamiento a este tipo de infecciones bacterianas que presentan multirresistencia a los antibióticos (MDR) (7). Un estudio en Colombia reportó que la mortalidad por *A. baumannii* con MDR fue del 25,5% a los 30 días de hospitalización (8). Una característica preocupante de las infecciones por *A. baumannii* para su tratamiento es que la mayoría de sus aislamientos presentan MDR (9-13) a diversos antibióticos, como: los monobactámicos; los inhibidores de β -lactamasas; cefalosporinas de tercera y cuarta generación; carbapenemes y aminoglicósidos. Estas cepas con MDR tienden a generar brotes epidémicos con un predominio de uno o dos cepas (12). Aunque en Colombia existen varios reportes de brotes ocasionados por bacterias del *ACB* (10,12-14), son pocos los estudios de su tipificación molecular (15,16).

Es muy importante, desde el punto de vista epidemiológico y de salud pública, determinar los mecanismos de transmisión de la bacteria y definir los patrones de

transmisión en los brotes hospitalarios para elaborar estrategias de control, tomar conductas terapéuticas y de intervención para limitar el impacto clínico de estas infecciones. El abordaje precoz y efectivo de un brote, permite limitar el número de casos y prevenir su aparición en el futuro.

Para tal fin, estudios previos sugieren realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos para determinar los patrones de resistencia (antibiotipos) de las cepas de *ACB* que contienen genes de resistencia. Además, el empleo de un antibiograma cuantitativo para determinar las diferencias de sensibilidad entre los aislamientos bacterianos, y así, poder agruparlos por las distancias de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que presenten entre los aislamientos (17-19). Pero son los métodos moleculares los que permiten conocer los genes que están generando la resistencia en los aislamientos y los posibles mecanismos de transmisión y diseminación (20).

Capítulo 1. Planteamiento del problema

Alrededor del mundo, se ha reportado la alta capacidad de *A. baumannii* para diseminarse en el ambiente hospitalario (21,22), señalando un incremento en el porcentaje de resistencia hospitalaria en Europa, Norte América, Argentina, Brasil, China, Taiwan, Hong Kong, Japón, Corea y Tahití en el Pacífico Sur (22). El informe anual de la Red de Monitoreo de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para el 2009, mostró que debido a los altos porcentajes de resistencia a los antibióticos de aislamientos de esta bacteria en Latinoamérica, sigue siendo una de las principales especies bacterianas de interés médico (6).

Los estudios epidemiológicos han demostrado que *A. baumannii* es el principal patógeno causante de infecciones en hospitales de países europeos como España (23), Italia (24), Inglaterra (25). En los Estados Unidos, los reportes de brotes epidémicos se registran en hospitales de Nueva York (26), Pensilvania (27) y California (28), en países asiáticos como Corea (29), Taiwán (30), Japón (31) y China (32), en países del Pacífico Sur (33), en países de Latinoamérica como Chile (34), Argentina (35), Brasil (35) y Colombia (8-16).

Para estas cepas se ha determinado que los principales factores que desencadenan la multirresistencia a los antibióticos es la adquisición de plásmidos y cassetes génicos (36) por integrones y transposones (37). Los estudios moleculares de las cepas circulantes en hospitales de Estados Unidos, revelan que la multirresistencia se debe principalmente a la presencia de la secuencia promotora ISAbal, que le confiere a *A. baumannii* resistencia a carbapenemes.

Igualmente, la resistencia a quinolonas es mediada por plásmidos que transportan los genes *qnr*, o por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (27).

En Europa, se ha reportado que la resistencia a los aminoglicósidos se encuentra asociada principalmente a integrones de clase 1 (38). Por su parte, en Japón, la resistencia a los aminoglicósidos, está mediada principalmente por plásmidos que transportan el gen *aac* que codifica una enzima aminoglicosil acetiltransferasa (39). En España, en algunas regiones se ha reportado que la resistencia a los carbapenemes está conferida principalmente a plásmidos que contienen β -lactamasas como OXA-23 y PER-1 (40). En Colombia, la resistencia a carbapenemes está mediada por la enzima OXA-23 (16), cuya expresión está regulada por la inserción de la secuencia promotoral SAb1 en su región control (24).

Los análisis moleculares en cepas MDR de *Acinetobacter spp* han determinado una alta diversidad genética con distintos patrones genéticos. Los reportes evidencian que clones específicos de *A. baumannii* pueden migrar entre los hospitales en un área geográfica en particular, probablemente transportados por los pacientes infectados (41,42). Por ejemplo: reportes indican un incremento notable en la prevalencia de un cierto número de clones predominantes con resistencia a antibióticos carbapenémicos en hospitales de Nueva York (43), Brasil (44) y Argentina (45). Una posible hipótesis que puede explicar esta variación encontrada entre los perfiles genotípicos sugiere que los clones se originan en diferentes sitios por una selección independiente a partir de un ancestro común (46).

La potencialidad que manifiestan estos clones para diseminarse rápidamente los han llevado a denominarlos “clones epidémicos”. Sin embargo, clones epidémicos específicos han sido detectados en distintos hospitales y áreas geográficas distantes entre sí (25). La ocurrencia de brotes monoclonales en múltiples hospitales sugiere la diseminación interinstitucional, presumiblemente por el

movimiento de pacientes, del personal médico, la exposición a fuentes comunes de contaminación de alimentos y equipos médicos (47). Sin embargo, en los últimos años, se reporta la existencia de una gran diversidad de clones de *A. baumannii* en una misma área. En algunos hospitales de España, los clones analizados son altamente diversos (23). Esta característica se ha observado también en Australia (48), China (49), Turquía (50), Gran Bretaña (24), Grecia (51) y Colombia (42).

La adquisición de resistencia por parte de *A. baumannii* a fármacos como las fluoroquinolonas en brotes epidémicos en hospitales de California, han mostrado una amplia diversidad de clones resistentes, cuyos mecanismos de resistencia se deben a la presencia de bombas de eflujo y a mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (25), como lo demuestran estudios en Europa con cepas que presentan resistencia a los aminoglicósidos (39).

En la última década, se logró en Europa caracterizar molecularmente tres tipos de clones pan-resistentes que han servido como referencia para identificar diversos clones pertenecientes a la especie *A. baumannii* (52,53). En el 2008, se identificaron 8 tipos de clones en una instalación militar del ejército estadounidense, de los cuales el 60% correspondían a los tres tipos de clones Europeos (27). El 40% restante procedían de múltiples orígenes, resultado que fue corroborado por otro estudio también realizado en una instalación militar (54).

1.1. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las características fenotípicas y moleculares de los aislamientos del complejo ACB obtenidos de pacientes que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos de la clínica universitaria Rafael Uribe Uribe?

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1. Generalidades de *Acinetobacter*

Las especies del género *Acinetobacter* se encuentran colonizando diversos hábitats, que incluyen agua, suelo, material vegetal y organismos vivos, son quimio-heterótrofos versátiles y crecen en un amplio rango de temperatura y pH (55). Fenotípicamente se distinguen como cocobacilos Gram negativos, con metabolismo estrictamente aerobio y no presentan flagelos. Poseen además, un gran repertorio genético que les permite adaptarse a las condiciones del medio ambiente, degradar sustancias contaminantes y producir sustancias de utilidad para el ser humano a nivel biotecnológico y ambiental (56).

2.2. Genoespecies del género *Acinetobacter*

Las bacterias del género *Acinetobacter* constituyen un grupo heterogéneo, formado por 39 grupos o genoespecies, clasificadas mediante el patrón de homología de su genoma por hibridación del ADN (45, 57). Algunas de estas genoespecies o grupos más representativos han sido clasificadas taxonómicamente de la siguiente forma: a la genoespecie 1 corresponde *A. calcoaceticus*; a la genoespecie 2 corresponde *A. baumannii*; a la genoespecie 3 *A. pittii*; a la genoespecie 4 corresponde *A. haemolyticus*; a la genoespecie 5 corresponde *A. junii*; a la genoespecie 7 corresponde *A. Johnsonii*; a la genoespecie 8 corresponde *A. Iwoffii*; y a la genoespecie 12 corresponde *A. radioresistens* y a la genoespecie 13TU corresponde *A. nosocomialis*.

En la actualidad se han identificado con un nombre científico a un total de 17 especies en el género *Acinetobacter* (57). Las genopecies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. seifertii* se encuentran estrechamente relacionadas entre si y es difícil distinguirlas fenotípicamente; por lo que se han agrupado en el *ACB* (2, 58). Las genopecies de este complejo presentan una gran relevancia como patógenos tanto a nivel hospitalario como de la comunidad, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública por su multirresistencia, sin embargo identificar entre ellas a *A. baumannii* es importante, puesto que es la geno especie que ha mostrado mayor capacidad de adquirir genes de resistencia a antibióticos y es capaz de sobrevivir por largos períodos en superficies y causar infecciones en pacientes en las unidades de cuidados intensivos (1, 9, 44,45).

La identificación de las geno especies de este género por métodos fenotípicos es compleja y poco confiable, en donde técnicas comerciales de identificación como API20E y API20NE han sido científicamente cuestionados, además, los sistemas de clasificación comerciales basados en test de asimilación son ahora de poco uso para la identificación de las especies de este género (60), especialmente, si se trata de discriminar entre las geno especies del complejo *ACB* (61). De allí, la importancia de usar los métodos moleculares como: el análisis para polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por su sigla en inglés); el análisis plasmídico; la electroforesis en campo pulsado (PFGE, por su sigla en inglés); la hibridación ADN-ADN; el análisis de los patrones de restricción amplificados de genes ribosomales (ARDRA, por su sigla en inglés) y la secuenciación del gen del ARNr 16s (57-61). El análisis del gen del ARNr 16s amplificado y digerido con las enzimas de restricción *AluI*, *CfoI*, *MboI*, *RsaI*, y *MspI*, permite identificar la mayoría de las geno especies, incluidas las del complejo *ACB* (57).

2.3. Tipificación bacteriana por Antibiotipo

Algunos autores consideran que el antibiotipo sigue siendo válido como una

primera aproximación al origen clonal al comparar dos aislamientos bacterianos y para ello es posible usar el antibiograma habitual, pero es necesario considerar la epidemiología del microorganismo, la genética bacteriana, los perfiles de susceptibilidad y mecanismos de resistencia habituales en la especie estudiada (19).

Un estudio con aislamientos de *Acinetobacter baumannii* productora de carbapenemasa OXA-24 en un hospital de España, identificó 3 Antibiotipos, el Antibiotipo 1 (MDR), fue el más frecuente con 76,9%, seguido del Antibiotipo 3 solamente susceptible a carbapenemes con 14,1% (62). Otro estudio hecho en Francia identificó 4 perfiles, siendo el más frecuente el antibiotipo a (MDR) con 78,8% de aislamientos (63). Un estudio más reciente hecho en Tunes, identificó 4 antibiotipos, siendo el más frecuente el que presentó resistencia a todos los β -lactámicos, excepto a imipenem en 92% de los aislamientos, seguido del antibiotipo cuyos aislamientos presentaron además resistencia a imipenem con 47% y 38% fueron multirresistentes a todos los antibióticos excepto a colistina (64).

En Latinoamérica, un estudio realizado en un hospital de Argentina mostró la presencia de 8 antibiotipos, de los cuales el más abundante fue el Antibiotipo 1 (43%) con aislamientos resistentes a todos los antibióticos, seguido del Antibiotipo 5 (21%), resistente a todos los antibióticos excepto a ceftazidima, el total de Aislamientos MDR fue del 37% (65).

2.4. Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS)

A. baumannii se reporta con mucha frecuencia como agente causal de numerosas infecciones en las UCI (1,2). Las infecciones suelen ser severas, entre las que se destacan: neumonías, meningitis y septicemias, las cuales tienden a ocurrir en pacientes debilitados e inmunocomprometidos que desencadenan en altas tasas de mortalidad, especialmente cuando el paciente se encuentra en las UCI (3,4).

Los análisis de estas cepas demuestran una elevada multirresistencia a los antibióticos, lo que explicaría la severidad en las infecciones (5-7). Las bacterias de este género se encuentran asociadas a brotes epidémicos nosocomiales, la mayoría de ellas corresponde a aislamientos clínicos de *A. baumannii* (12).

La infección por la bacteria se establece frecuentemente en pacientes con enfermedades crónicas, quienes presentan múltiples condiciones de morbilidad, hospitalizados por largos períodos, que han sufrido múltiples procedimientos invasivos, con edad avanzada, falla respiratoria o cardiovascular, cirugías recientes, cateterización vascular central y urinaria, traqueotomía, alimentación parenteral y tratamiento antimicrobiano con antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y carbapenemes (2).

Las principales manifestaciones clínicas asociadas a *Acinetobacter spp.*, corresponden a neumonías asociadas a ventilación mecánica y a infecciones del torrente sanguíneo, en ambos casos alcanzan una mortalidad cercana al 75% (4). Tienen también la potencialidad de provocar infecciones purulentas en casi cualquier órgano del cuerpo (3). Se ha descrito también, un raro síndrome de neumonía fulminante ocasionado por cepas adquiridas en la comunidad; el síndrome constituye una entidad clínica particular que se acompaña de una incidencia alta de bacteremia, síndrome de dificultad respiratoria, coagulación intravascular diseminada con un desenlace fatal (3, 4).

2.5. Principales Mecanismos de Resistencia

La resistencia a los antibióticos en cepas nosocomiales del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* incluye principalmente, la presencia de enzimas degradadoras del antibiótico, concretamente β -lactamasas (66,67), alteraciones en las proteínas que unen penicilina (PBP) (68), alteraciones de los canales (porinas) de la membrana externa (69,70) y bombas de eflujo (71).

2.5.1. Producción de β -lactamasas

La producción de β -lactamasas se debe a sustancias bacterianas naturales (bacteriocinas o colicinas) que producen las bacterias vecinas para competir por un nicho con otro microorganismo (66).

En relación a las β -lactamasas, enzimas que confieren resistencia a los β -lactámicos en los organismos Gram negativos, ésta es mediada por plásmidos, en el caso de las β -lactamasas tipo TEM y SHV y por integrones en las β -lactamasas tipo VIM, IMP, GES, VEB, CTX-M-2-9 y CMY (21-23). La primera β -lactamasa de origen plasmídico aislada de bacterias Gram negativas en la década de los 60's fue TEM-1, esta enzima hidroliza penicilina y sus derivados: ampicilina, carbenicilina, piperacilina y cefalosporinas de primera generación (66). Después hicieron su aparición las β -lactamasas SHV-1, cuyos genes pueden estar codificados cromosomalmente, pero la gran mayoría son codificadas en plásmidos. Las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 son consideradas β -lactamasas de amplio espectro (BLAE) (67). También pueden estar codificadas en elementos móviles o secuencias de inserción, como integrones en el caso de las oxacilinasas de la clase D (23,24) o transposones para las metalo-carbapemasas (21). Las β -lactamasas pueden estar codificadas cromosomalmente, como las β -lactamasas *AmpC*, que corresponden a cefalosporinasas cromosomales intrínsecas de todas las cepas de *A. baumannii* (72). Generalmente estas enzimas tienen un nivel bajo de expresión, pero si se inserta una secuencia promotora (ISAba1) cerca del gen *ampC*, aumenta la síntesis de la enzima, generando resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (9).

Una mutación en la β -lactamasa tipo SHV-1 provocó la aparición en 1983 de la SHV-2, primera β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), ésta fue aislada en Alemania, de una cepa de *K. pneumoniae* (66,67) A partir de aquí, este fenómeno se fue extendiendo y hoy se han descrito más de 100 derivadas de TEM-1 y TEM-2 y más de 50 derivadas de la SHV-1 (67).

Por consideración práctica se asume que las BLEE son capaces de hidrolizar adecuadamente cefalosporinas de distintas generaciones pero, particularmente, moléculas de tercera generación (oximino β -lactámicos: cefotaxime, ceftazidime y ceftriaxona) y al oximino-monobactam: aztreonam, pero no tienen efecto sobre las cefamicinas (cefotitina, cefotetán) y los carbapenemes; su actividad es inhibida por el ácido clavulánico (66).

Otras enzimas de importancia epidemiológica son las tipo SHV-4, SHV-5, TEM-10, TEM-26, TEM-67, CTX-M-2, CTX-M-8, CTXM-12, PER-2, GES y BES (73-77), que son comúnmente encontradas en Colombia y el resto de Latinoamérica (77-80).

En la actualidad, han aparecido aislamientos resistentes a los carbapenemes, especialmente en las bacterias entéricas no fermentadores de lactosa como *A. baumannii*. La resistencia en estas bacterias se debe a la presencia de enzimas carbapenemasas mediadas por plásmidos con actividad contra penicilinas, oximino-cefalosporinas, cefamicinas y carbapenemes, pero no aztreonam (51). Las carbapenemasas que principalmente se aíslan son de tipo IMP (29) y VIM (82). Las β -lactamasas de clase D u oxacilinasas son las que se describen con mayor frecuencia en cepas de *A. baumannii*, siendo las principales OXA-23 (9,16,33), OXA-24 (62), OXA-51 (83) y OXA-58 (84), las tres primeras asociadas con la secuencia promotora *ISAb1* que aumenta su expresión (9). Estas enzimas pueden estar codificadas en plásmidos, excepto OXA-51, codificada en el cromosoma bacteriano y con frecuencia usada como marcador de especie (83). Sin embargo, recientemente esta oxacilinasas, junto con la OXA-58, fueron reportadas en enterobacterias, lo que evidencia la capacidad de diseminación a bacterias de otro género (84).

Algunos autores afirman que la resistencia a los carbapenemes se debe principalmente a la presencia de las carbapenemasas mediadas por plásmidos con actividad contra las oximino-cefalosporinas, cefamicinas y carbapenemes (85),

mientras otros afirman que usualmente, la resistencia a los carbapenemes en bacterias Gram negativas ocurre por la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único (86).

2.5.2. Alteración de la permeabilidad de las membranas

Los mecanismos moleculares no enzimáticos actúan en sinergia con las β -lactamasas que hidrolizan carbapenemes, lo que les proporciona a estas bacterias un mayor nivel de resistencia, aunque han sido pobremente descritos (1, 69). Ellos incluyen la disminución de la expresión de las porinas y la sobreexpresión de la bomba de eflujo (88,89).

En el caso de *A. baumannii*, la porina más caracterizada es la *CarO* (70). El análisis de cepas MDR que presentan un MIC alto a imipenem (>16g/L) mostró alteraciones en el gen *CarO* debido a varios elementos de inserción que ocasionaron la disminución de su expresión (88), algunos estudios han sugerido que esta proteína está relacionada con la recaptación de la ornitina y otros aminoácidos básicos y por homología del imipenem, también se vería disminuido su ingreso a la bacteria (70). Otra porina que se ha identificado en *A. baumannii* es la *OmpW* (91), la cual es homóloga a las *OmpW* encontradas en *E. coli* y *P. aeruginosa*, que disminuye la entrada de colistina y de los β -lactámicos al interior de la bacteria (88, 91). También se ha descrito una OMP de 43 kDa perteneciente a la familia de las *OprD* (*OprD-like*), relacionada con cierre de porinas para imipenem y meropenem (91).

La mayoría de las bombas de expulsión multidrogas de bacilos Gramnegativos pertenece a la familia RND (resistance-nodulation-cell division) (92). Los tres componentes de estas bombas son: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína accesoria periplasmática o proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa o porina (93). Los genes que codifican los componentes de estas bombas de expulsión se encuentran en el

cromosoma bacteriano, generalmente en forma de operones (89). Por su amplio rango de sustratos, contribuyen a la resistencia de antimicrobianos no relacionados estructuralmente, por lo que se clasifican como sistemas multidrogas inespecíficos (94).

Dentro de las bombas de expulsión, la más estudiada es el sistema *AdeABC* (88), que puede expulsar β -lactámicos (incluyendo carbapenémicos), aminoglicósidos, macrólidos, cloranfenicol, tigeciclina, tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim (1, 93). Sin embargo, otras bombas de expulsión también han sido asociadas a *A. baumannii* MDR, las *AdeFGH* (95), y *AdelJK* (96). *AdeABC*, en primer lugar y *AdeFGH* en segundo juegan un papel fundamental en la resistencia adquirida, mientras *AdelJK* es responsable de la resistencia intrínseca (96).

2.5.3. Alteración de las proteínas de unión a la penicilina (PBP)

La proteína PBP está formada por tres dominios: un dominio N-terminal estrechamente asociado a un dominio central de unión a penicilina y un dominio C-terminal conectado por medio de un lazo ("loop") de 28 residuos. El dominio central de unión a penicilina, que es homólogo al de otras PBPs y β -lactamasas, contiene tres motivos de aminoácidos conservados que están relacionados con el sitio activo de la enzima. La transpeptidación entre dos muropéptidos permite las reacciones cruzadas en el peptidoglicano. Las PBPs interactúan con los β -lactámicos por formación de un complejo relativamente estable con el sitio activo de la serina y como consecuencia, se altera la pared bacteriana de modo que la mayor parte de las bacterias sensibles que se encuentren en un medio hipotónico sucumbirán ante la acción del antibiótico (68).

Los altos niveles de resistencia de las bacterias a los antibióticos se debe a la expresión de una forma alternativa de la PBP (PBP2a o PBP2b), que la codifica el gen *mecA*, la cual tiene una baja afinidad por la mayoría de antibióticos betalactámicos. Este gen está localizado en el cromosoma bacteriano y su

expresión es constitutiva o inducible por algunos antibióticos betalactámicos, pero no por metilina u oxacilina (97).

Finalmente, con relación a las proteínas de unión a penicilina en *A. baumannii*, se ha descrito que la ausencia de la PBP2a podría conferir resistencia a imipenem y meropenem. La carencia simultánea de esta proteína y de la *PBP2b* se asocia con niveles de resistencia más elevada a estos antibióticos (98).

2.6. Resistencia mediada por integrones

La resistencia adquirida en forma extracromosomal está mediada por plásmidos, pero también también por integrones con una influencia epidemiológica muy significativa (24,37). Los integrones transportan genes que codifican determinantes de resistencia a antibióticos y determinantes con otras funciones (99).

Los integrones son unos segmentos de ADN que poseen una secuencia común en la región del segmento conservado 5' (5'CS) que contiene un promotor y un gen que codifica una integrasa similar a las descritas en bacteriófagos (101). En su forma más sencilla, están formados por 3 elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (cassettes): uno que codifica una integrasa (*intl*), el otro es el lugar de recombinación sitio-específico (*attI*) y, por último, un promotor (*Pant*) para la expresión de los genes cassettes integrados. A veces contienen un segundo promotor más fuerte, P2, localizado adyacentemente al extremo 3' del primero (102). Un gen cassette consta de una región codificante y un sitio de recombinación, conocido como elemento de 59 pares de bases (100). En total, un integrón simple con estos únicos elementos y sin genes cassette incorporados posee un tamaño aproximado de 1,1 kb (101).

La clasificación de los integrones se basa en la secuencia de la integrasa. Los miembros de las clases 1, 2 y 3, contienen genes cassette de resistencia a los antibióticos. Los de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen genes cassette que no

codifican la resistencia a antibióticos, y el de la clase 9 contiene un gen cassette de resistencia a antibióticos. Existen otros genes cassette de función desconocida y por otro lado el integrón de la clase 8 no presenta ningún gen cassette (99,101).

2.6.1. Integrón Clase 1

La clase de integrón aislada con mayor frecuencia en *A. baumannii* es la 1, la mayoría de los integrones pertenecientes a esta clase se han localizado en elementos transponibles como el *Tn21* (el integrón In2, el *Tn1696* (el integrón In4), (50,102) ambos clasificados como miembros de la familia del Tn3) o en transposones defectivos como es el caso de In0, In2 e In58 (99) o el integrón localizado en el *Tn508640* (104). El integrón clase 1 (figura 1) se caracteriza por tener la secuencia 5' conservada (5'CS) que contiene el gen que codifica para la integrasa y la mayoría de ellos contienen también una secuencia 3' conservada (3'CS) que contiene un gen que confiere resistencia a componentes de amonio cuaternario (*qacE1*), un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) y una secuencia de lectura abierta (*orf*); estos 2 genes de resistencia no son cassettes, sino que se encuentran fijos en el integrón (105). La longitud de esta región 3'CS es variable, por su extremo 3', tal y como se ha descrito en *In1*, *In2*, *In3*, *In4*, *In5* e *In0* son pertenecientes a la clase 1(102, 106).

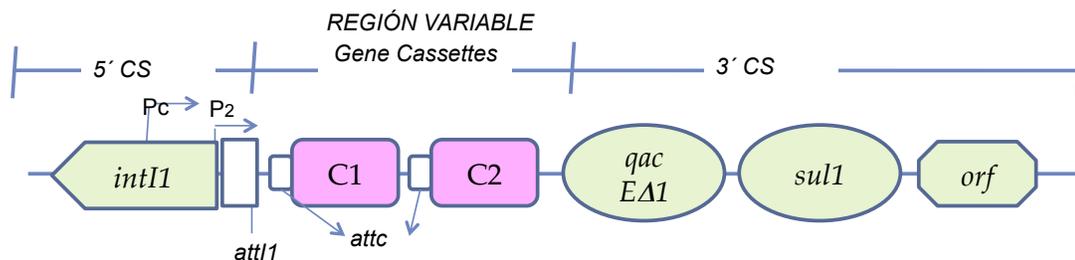


Figura 1. Representación esquemática del integrón clase 1. In0 es el integrón más básico que no contiene ningún gen cassette. La región variable del integrón puede contener varios genes cassette.

Abreviaturas: *intI1*, gen de la integrasa clase 1; *P_C* y *P₂*, genes casete promotores; *attI1*, sitio de recombinación asociada del integrón; *qacEΔ1*, versión truncada del gen de resistencia amonio cuaternario; *sul1*, gen de resistencia a la sulfonamida; *orf*, secuencia de lectura abierta; *attC*, sitio de recombinación del gen cassette; C, gen casete; 5'-CS, segmento conservado del integrón 5'; 3'-CS, segmento conservado del integrón 3'.

Tomado de: Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements* 2012; 2:5, 211–223.

2.6.2. Integrón Clase 2

El integrón Clase 2, también ha sido aislado de cepas de *A. baumannii* en algunos países del mundo (104). Esta clase de integrones se encuentran en el Tn7 y en derivados de éste (Tn1825, Tn1826, Tn4132) (107,108). Con relación a la estructura del segmento conservado 5'CS, ésta es similar a los integrones de la clase 1. La integrasa de esta clase (*IntI2*) muestra un 40% de homología con la integrasa de la clase 1 (109), continúa otra región que contiene un número limitado de casetes que codifican resistencia a trimetoprim (*dfrA/a* o *dfrA/b*), estreptotricina (*sat*) y estreptomina-espectinomicina (*aadA1*) y finalmente un segmento con 5 genes implicados en la transposición (*tns*) (figura 2) (104,110,111).

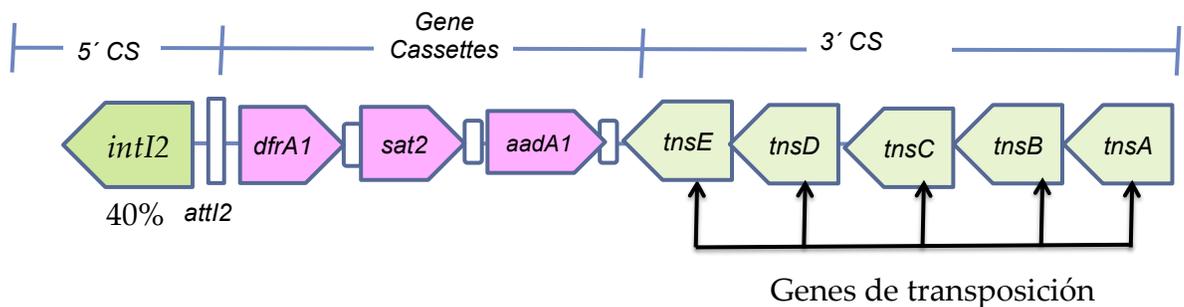


Figura 2. Representación esquemática del integrón clase 2. Integrón de clase 2, en verde se marca la región 5'CS (donde se ubica el gen de la integrasa clase 2 *intI2*, con un 40% de homología con el *intI1*), en el extremo opuesto, en un verde más claro, la región 3'CS y en la región variable color rosado, los genes de resistencia a antibióticos.

Tomado de: Di Conza JA, Gutkind GO. *Integrones: los coleccionistas de genes. Revista Argentina de Microbiología.* 2010; 42: 63-78.

2.7. Epidemiología de las BLEE

En los reportes de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es importante la diseminación mediada por plásmidos, actualmente se conocen nueve tipos de estas β -lactamasas (112). También en Latinoamérica hay reportes de tipo GES-1 en cepas de *K. Pneumoniae* y *P. aeruginosa* en Brasil (76,113).

Las BLEE tipo CTX-M fueron caracterizadas primero en Europa (74). Este tipo aún se sigue aislando en varios países de Europa (74), Africa (114) y Asia (115). En el continente Americano las CTX-M se han reportado en cepas de *E. coli* y *K.*

pneumoniae en Estados Unidos (116) y en Latinoamérica 79), en países como Bolivia (78), Argentina (79), Brasil (79) y en Colombia (117,118).

Otras BLEE de importancia epidemiológica son las enzimas tipo PER-1; las cuales se identificaron por primera vez en una cepa de *P. aeruginosa* en Francia (75,119) y luego en Turquía (120) e Italia (121). En los países asiáticos, los primeros reportes de PER-1 se hicieron en Korea (122) y aún se siguen aislando (119,122). En Canadá el primer reporte de esta β -lactamasa se hizo en *Salmonella* para el año 2003 (123); también se reportó en los EEUU (124). En América Latina, se ha reportado PER-2 en cepas de *E. coli* en Bolivia (125), Uruguay (75) y otros países de Latinoamérica (124,126). En el año 2000, se reportó una nueva BLEE de la clase A en el Brasil, a la que se llamó BES-1 (77) y hasta la fecha de esta revisión, no hay reportes de nuevas enzimas de este tipo en otro país en Latinoamérica o en el mundo.

La VIM es otra BLEE de importancia en el mundo; de ella se ha reportado once variantes, la mayoría han sido identificadas en países de Europa (82) y Asia (29). En Colombia han sido aisladas variantes como VIM-2, VIM-8, VIM-24 (127-129). Sin embargo, la variante VIM-2 es la de mayor distribución en el mundo (82,119,127).

Las BLEE tipo OXA u oxacilinasas han sido caracterizadas de *A. baumannii* e incluyen OXA-23 a 27 (9,16,33), OXA-40, OXA-51 (23,84) y OXA-58 (84), estas enzimas aunque hidrolizan pobremente a los carbapenemes tienen la habilidad de conferir resistencia y son solo parcialmente inhibidas por ácido clavulánico y reportadas como responsables de la resistencia a carbapenemes en latinoamerica (9, 16,130). En Colombia se ha demostrado que la resistencia a carbapenemes es mediada por la enzima OXA-23; la cual aunque se encuentra codificada en el cromosoma bacteriano, su expresión está influenciada por la inserción corriente arriba de la secuencia IS*Aba1* (9).

En la actualidad se han descrito más de 250 BLEE, cuya información se encuentra disponible en el sitio <http://www.lahey.org/Studies/> diseñado por George Jacoby y Karen Bush (131).

Capítulo 3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterizar fenotípica y molecularmente aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* obtenidos de pacientes hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos de un hospital de tercer nivel en la ciudad de Cali, durante el periodo 2009-2010.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* obtenidos de la población objeto de estudio.
2. Identificar las especies genómicas del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* mediante el análisis del gen del ARN ribosomal 16S.
3. Caracterizar los principales determinantes genéticos asociados a β -lactamasas que confieren resistencia a los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*.
4. Correlacionar la presencia de integrones en los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* con la presencia de determinantes de resistencia.

Capítulo 4. Metodología

4.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal que fue avalado por los Comités de Ética de la Universidad del Valle y de la Clínica Universitaria Rafael Uribe Uribe.

4.3. Procedimientos aplicados en el estudio

4.3.1. Obtención de muestras clínicas

Las bacterias que se incluyeron en este estudio correspondieron a 52 aislamientos del Complejo *A. baumannii-calcoaceticus* obtenidos de muestras clínicas de pacientes de las unidades de cuidados intensivos (UCI) diagnosticados con IAAS de diferentes sitios de aislamiento, por ejemplo: sangre, infección de la herida, muestra nasal, orina y puntas de catéter, durante el periodo comprendido en el periodo marzo de 2009 a julio de 2010. Durante ese periodo de tiempo, la clínica Rafael Uribe Uribe estaba en el proceso de transición de la empresa social del estado (ESE) Antonio Nariño, a la unión temporal Comfenalco-Valle-Universidad Libre, razón por la cual se redujo notoriamente la cantidad de pacientes atendidos.

4.3.2. Aislamiento de las bacterias del complejo *ACB* e Identificación.

Las muestra clínicas fueron inoculadas e incubadas en agar Mc Conkey (Oxoid Ltd., Hampshire, United Kingdom) por 24 horas a 37°C para el aislamiento y posterior identificación de las especies del compeljo *ACB*. La evaluación macroscópica de las colonias se realizó por observación de sus características morfológicas y tintoriales (bacilos cortos Gram negativos, midieron 1.5 a 2.5µ por 1.0 a 1.5µ en fase logarítmica de crecimiento, disponiéndose en parejas, cadenas

o agrupados irregularmente, con tinción variable, además inmóviles y no formaron esporas) y cambios producidos en el agar Mc Conkey, como fue la no fermentación de lactosa. El estudio microscópico se basó en el método de Gram para establecer morfología y tinción bacteriana. La identificación de los aislamientos pertenecientes al complejo *ACB* se realizó en la laboratorio clínico del hospital, empleando el equipo Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO). Los aislamientos se manejaron por códigos, respetando de esta manera la confidencialidad del paciente.

4.3.3. Identificación fenotípica de los aislamientos y pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

La prueba de sensibilidad a los antibióticos se desarrolló empleando el método de difusión en disco en placas de agar Mueller Hinton (Scharlau Chemie S.A) con la calibración del inóculo basado en el estándar Mc-Farland de acuerdo a los parámetros establecidos Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI; antes NCCLS) (132).

Los antibióticos incluidos fueron trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 23,75 mg + 1,25 mg), ticarcilina-ácido clavulánico (TIM, 75µg-10µg), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB, 10 mg), ciprofloxacina (CIP, 5 mg), ceftazidima (CAZ, 30 g), cefepima (FEP, 30 g), aztreonam (ATM), imipenem (IMP, 10 g), meropenem (MEM, 10 g), ampicilina-sulbactam (SAM, 10µg-10 g), amikacina (AMK, 10 mg), cefoperazona-sulbactam (sulperazona, 75 mg mg-30) y tigeciclina (TIG, 15 mg) (Oxoid). Las cepas de *A. baumannii* ATCC 19606TM, *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923TM fueron empleadas como control de calidad.

4.3.4. Determinación de los Antibiotipos

En el estudio se consideró Antibiotipo a todos los aislamientos que presentaron el mismo perfil de sensibilidad a los antibióticos evaluados.

4.3.5. Antibiograma cuantitativo

El análisis se realizó teniendo en cuenta la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada aislamiento obtenida del Vitek GNI card, realizando la sumatoria entre pares de aislamientos del complejo *ACB* utilizando el coeficiente de similitud mediante la siguiente fórmula de distancias euclidianas:

$E_{jk} = \sqrt{\sum (x_{ij} - x_{ik})^2}$, donde x_{ij} - y x_{ik} son los valores de los diámetros de inhibición de un antimicrobiano dado i para dos distintos aislamientos j y k . A un valor más bajo del coeficiente de similitud, mayor es la similitud entre dos cepas bacterianas. Los valores del coeficiente de similitud se establecieron para los 52 aislamientos para construir un cladograma basado en el agrupamiento por UPGMA (133).

4.3.6. Extracción de ADN de las cepas de referencia y de los aislamientos bacterianos

El ADN de las cepas referencia y de los aislamientos bacterianos se extrajo empleando el protocolo modificado de Cheng et al, 2006 (134), que se basa en la lisis bacteriana de un cultivo de toda la noche (1,5 ml) en caldo LB. El ADN se obtuvo mediante tratamiento con solución de Tris 50 mM pH= 8,0 (EDTA 1 mM) y sacarosa al 25% y 10 mg/ml de lisozima, luego se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se trató con 150 μ l de una solución de Tris-HCl 50 mM pH= 8,0 (EDTA 1 mM, 1% SDS y proteinasa K 1 mg/ml) y después se incubó a 56°C durante 60 minutos. Para obtener el ADN mediante tratamiento con alcohol isopropílico y 1/3 de volumen de Acetato amónico 7,5 M (125 μ l), finalmente se resuspendió el ADN extraído en 50 μ l de Tris-HCl 10 mM y disodium EDTA 1 mM, pH 8.0. (TE).

La extracción del ADN de algunas muestras se realizó empleando el Kit comercial de extracción de ácidos nucleicos High Pure PCR Template Preparation Kit [Ref. 11796828001 (ROCHE)]. Una precipitación final se realizó por tratamiento con 40 μ l de acetato de amonio 5M y 250 μ l de isopropanol e incubando a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 12.000 x g. El

ADN se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 100 μ l de TE.

4.3.7. Cuantificación del ADN Extraído

La calidad y concentración del ADN se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1mM) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) (Sigma[®]), y comparó con cantidades conocidas del marcador de peso molecular DNA de λ *Hind*III (Gibco BRL[®]) y posteriormente se evaluó por espectrofotometría usando el equipo Nanodrop 2000c Spectrophotometer V1.0 Thermo Fisher Scientific Inc, del laboratorio de biología molecular de la Universidad Libre seccional Cali.

4.3.8. Amplificación por PCR

Los procesos de Amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Swift[™]MaxPro thermal Cycler Block (ESCO[®], Life Science Division).

4.3.8.1. Gen del ARNr 16s

Para amplificar el gen del ARNr 16S se usaron 10-50 η g de ADN genómico, para obtener una mezcla de reacción de 50 μ l, conteniendo cada primer *ACF* y *ACR* (tabla 1), a una concentración de 0,4 μ M, 0,1 mM dNTPs (BioLine[®]), 1,5 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 0,05 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]). Las condiciones para amplificar el gen ADNr 16s comprendió una extensión inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, una temperatura de alineamiento a 65°C por 40 segundos, una temperatura de extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

4.3.8.2. Genes de β -lactamasas

Para la detección de los determinantes genéticos que confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos se amplificó por PCR los genes de las β -lactamasas tipo IMP, VIM, TEM, CTXM-9, OXA-51 y OXA-58.

La amplificación de los genes de las β -lactamasas *blaVIM* y *blaIMP* presentes en los aislamientos se realizó amplificando 5 a 10 ng de ADN genómico, para obtener una mezcla de reacción de 25 μ l, conteniendo cada primer a una concentración de 0,3 μ M, 0,2 mM dNTPs (BioLine[®]), 2,5 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 1,25 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]). Las condiciones para amplificar los genes *blaVIM* y *blaIMP* comprendieron: una extensión inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, una temperatura de alineamiento a 52°C por un minuto, una temperatura de extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

La amplificación del gen de la β -lactamasa *blaTEM* (tabla 1) presente en los aislamientos se realizó con 5 a 10 ng de ADN genómico, para obtener una mezcla de reacción de 25 μ l, conteniendo cada primer a una concentración de 0,5 μ M, 0,2 mM dNTPs (BioLine[®]), 1,5 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 1,25 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]). Las condiciones para amplificar el gen *blaTEM* comprendió una extensión inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos a 95°C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento a 52°C por 45 segundos, una temperatura de extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para amplificar las β -lactamasas *blaCTXM-9* (tabla 1) se realizó con 5 a 10 ng de ADN genómico, para obtener una mezcla de reacción de 25 μ l, conteniendo cada primer a una concentración de 0,1 μ M, 0,1 mM dNTPs (BioLine[®]), 2,5 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 0,05 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]). Las condiciones para amplificar el gen *blaCTXM-9* comprendieron: una extensión inicial a 94°C por 10 minutos, seguidos por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, una temperatura de

alineamiento a 51°C por 45 segundos, una temperatura de extensión a 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Finalmente, para amplificar los genes de las β -lactamasas tipo *blaOXA-51* y *blaOXA-58* se empleó los primers que se encuentran en la tabla 1. De 5 a 10 ng de ADN genómico se empleó en una mezcla de reacción de 50 μ l que contenía cada primer a una concentración de 1,25 μ M, 0,2 mM dNTPs (BioLine[®]), 1,5 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 1,5 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]). Las condiciones para amplificar los genes *blaOXA-51* y *blaOXA-58*, comprendieron: una extensión inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento a 62°C por 1 minuto, una temperatura de extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 6 minutos.

4.3.8.2. Genes de integrones

En el caso de la amplificación de los integrones de la clase 1 y 2 , se realizó una mezcla de reacción que contenía de 5 a 10 ng de ADN genómico en 50 μ l, conteniendo cada primer a una concentración de 1,5 μ M, 0,2 mM dNTPs (BioLine[®]), 2 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 0,04 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]). Las secuencias de los genes *Int1* e *int12* se muestran en la tabla 1. Las condiciones de amplificación comprendieron: una extensión inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento a 55°C por 30 segundos, una temperatura de extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los primers degenerados *hep35* y *hep36* (tabla 1), fueron usados para detectar la presencia de integrones, estos amplificaron la región conservada de los genes de la integrasa de los integrones de la clase 1, 2 y 3. Para su amplificación, se usaron 10-50ng de ADN genómico, para obtener una mezcla de reacción de 25, conteniendo cada primer a una concentración de 2,0 μ M, 0,2 mM dNTPs (BioLine[®]), 1,5 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 0,5 U/ μ l de Taq polimerasa (Invitrogen[®]).

Las condiciones para amplificar los genes comprendieron: una extensión inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento a 55°C por 45 segundos, una temperatura de extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

La presencia de los genes insertados en la región variable de los integrones clase 1 se determinó utilizando los primers CS5' y CS3' (tabla 1). La mezcla de reacción de 50 µl contenía una cantidad de 5 a 10 ng de ADN genómico y una concentración de cada primer de 1,5 µM, 0,2 mM de dNTPs (BioLine®), 2 mM de MgCl₂, Buffer 1X y 0,04 U/µl de Taq polimerasa (Invitrogen®). Las condiciones para amplificar la región variable comprendieron: una extensión inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento a 55°C por 30 segundos, una temperatura de extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Gen	Secuencia del Primer	Amplicón (pb)	Referencia
<i>rDNA16S</i> AC	F-5'TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC3' R-5'TACCTTGTTACGACTTCACCCCA3'	1500	135
<i>blaTEM</i>	F-5'ATGAGTATTCAACAT TTC CG3' R-5'CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA3'	956	136
<i>bla VIM</i>	F-5'AAAGTTATGCCGCACTCACC3' R-5'TGCAACTTCATGTTATGCCG3'	865	137
<i>bla IMP</i>	F- 5'ATGAGCAAGTTATCCTTATTC3' R- 5'GCTGCAACGACTTGTTAG3'	741	82
<i>blaCTX-M-9</i>	F -5'GTGACAAAGAGAGTGCAACGG3' R-5'ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC-3'	856	138
<i>blaOXA-51</i>	F-5'CGGAGAACGACTCCTCATTA AAAA3' R-5'TTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGA3'	431	139
<i>blaOXA-58</i>	F-5'AAGTATTGGGGCTTGTGCTG3' R-5`CCCCTCTGCGCTCTACATAC3'	599	140
<i>Int1</i>	F-5' CAGTGGACATAAGCCTGTTC 3' R-5' CCCGAGGCATAGACTGTA3'	160	141
<i>Int2</i>	F- TTGCGAGTATCCATAACCTG3' R- TTACCTGCACTGGATTAAGC3'	288	141
CS	R 5'GGCATCCAAGCAGCAAG3' F5' AAGCAGACTTGACCTGA3'	Variable	141
<i>hep35</i> <i>hep36</i>	5'TGCGGGTYAARGATBTKGATTT3' 5'CARCATGCGTRTARAT-3'	491	142

Tabla 1. Secuencias de los Primers que se emplearon en el estudio.

Los controles de calidad utilizados fueron: *Acinetibacter baumannii* ATCC-19606, *E. coli* ATCC-25922, *E. coli* ATCC-35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-700603 y la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 3386 (proporcionada por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas CIDEIM) y como control negativo se empleo la cepa ATCC 25923TM de *Staphylococcus aureus*.

5 µl de cada amplificado se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1mM) y se tiñeron con Bromuro de Etidio (0.5µg/mL); se utilizaron como referencia el marcador de peso molecular de 100 pb ladder (Invitrogen®).

4.3.9. Secuenciación del gen ADN ribosomal 16S

Para llevar a cabo la secuenciación del ADNr16S, 27 aislamientos del complejo *ACB*, los productos de la amplificación fueron purificados utilizando el kit “High Pure PCR Product Purification Kit Version 20” siguiendo las recomendaciones de la casa comercial Roche Applied Science (RAS) y se secuenciaron en un secuenciador automático ABI 3730XL (MACROGEN, Korea).

4.3.10. Alineamiento de las secuencias de los genes del ADNr 16s

Las secuencias del ADNr16S de los 27 aislamientos en formato FASTA fueron alineadas con 27 secuencias referencia de genoespecies del género de *Acinetobacter* que se encuentran en la base de datos del Genbank, utilizando el programa Clustal W, versión MEGA 5,0 y se construyó el árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima verosimilitud con el modelo Kimura, 2 Parámetros con distribución Gamma, asumiendo que una cierta fracción de sitios es evolutivamente invariable (K2+G+I). Se calcularon los valores de bootstrap de consenso (1000 réplicas) para evaluar los valores de confianza de los grupos formados (144,145).

4.4. Análisis estadístico

Las variables que se estudiaron fueron los sitios de muestreo, los antibiogramas, los genes de β -lactamasas, los genes asociados a integrones de la clase 1 y de la clase 2 y el gen del ARNr 16s.

La unidad de análisis fue cada aislamiento del complejo *ACB*, de la cual se registraron las características microbiológicas basadas en los perfiles de susceptibilidad, antibiograma y las características moleculares que correspondieron a la detección por PCR de los genes de resistencia (*blaVIM*, *blaIMP*, *blaTEM*, *blaCTXM-9*, *blaOXA-51*, *blaOXA-58*), presencia de los integrones clase 1 y clase 2, y del ADNr 16s. Los perfiles de susceptibilidad de cada antibiótico evaluado fueron categorizadas en diferentes grados así: resistencia y sensibilidad intermedia (1) y sensibilidad (2), de acuerdo a los estándares para cada antibiótico establecidos por el CLSI para *A. baumannii*, se construyó una base de datos con las variables de interés, empleando el programa Excel™.

Se realizó un análisis de asociación entre las distintas variables como el fenotipo de resistencia a los diferentes antibióticos, el sitio de muestreo, la presencia de los genes que codifican para las β -lactamasas, los integrones y el ADNr16S. Se determinó la prevalencia de la resistencia a los antibióticos, determinantes de resistencia, presencia de integrones y de *A. baumannii* entre los aislamientos del complejo *ACB*.

La significancia de las diferencias en la frecuencia de las variables entre los grupos establecidos fue determinada por análisis estadístico, empleando la prueba de chi-cuadrado de Pearson. La significancia estadística fue asignada para valores de $p < 0,05$, considerando un nivel de confianza del 95% (alfa) y un error (beta) de 5%. Los análisis estadísticos se realizaron empleando los paquetes estadísticos (*SPSS* versión 20.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA y *STATA* 12,0 StataCorp LP, college station, Texas USA).

4.5. Consideraciones éticas

El proyecto se desarrolló bajo los lineamientos enmarcados en la Constitución Nacional y según lo dispuesto por el Ministerio de Salud en la Resolución 8430, que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Las bacterias suministradas por el laboratorio clínico fueron aisladas de pacientes con IAAS, y se clasifican éstas en el Grupo de Riesgo II; es decir, ellas representan un riesgo moderado para el individuo y limitado para la comunidad, según lo normatiza el artículo 67, literal B de la Resolución. Para el manejo de los microorganismos patógenos, se tuvo en cuenta el artículo 63, en los literales A a G de la Resolución (146), que establece las normas para la investigación con microorganismos.

Los microorganismos se manipularon en una Cabina de Seguridad Biológica ESCO Clase II Tipo B1; en la cual, según la OPS/OMS se pueden manipular con seguridad agentes biológicos, que pueden ser causa de enfermedades humanas graves y que representen un serio peligro para los trabajadores; sin embargo, aunque puede existir el riesgo de que se propaguen en la colectividad, las bacterias incluidas en este estudio y portadoras de resistencia, solo causan infecciones bajo ciertas condiciones en pacientes sobre todo hospitalizados y por lo tanto no representan una amenaza directa para otras personas, sin embargo, la Universidad Libre cuenta con protocolos de emergencia y la debida cobertura en riesgos laborales y se dispone de profilaxis y tratamientos efectivos, en la actualidad, según lo establece la OMS (147).

El laboratorio donde se desarrolló la caracterización fenotípica como método rutinario de diagnóstico del paciente es el laboratorio Clínico de la Clínica Rafael Uribe Uribe y la caracterización Molecular se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Libre, cuyo uso está autorizado para que los investigadores del grupo GIMMEIN desarrollen proyectos de investigación y cuenta con un presupuesto anual para su dotación y mantenimiento, cuenta con un manual de procedimientos y normas de bioseguridad de acuerdo con los

parámetros del literal B y H, Artículo 64. Los investigadores no tuvieron contacto con los pacientes y para guardar la confidencialidad de éstos, los datos se manejaron con un código alfa numérico asignado por el laboratorio clínico, siguiendo lo establecido en el artículo 14 (148).

Capítulo 5. Resultados

5.1. Caracterización fenotípica del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* mediante análisis de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

En relación con la identificación fenotípica realizada por el laboratorio clínico de la Clínica Universitaria Rafael Uribe Uribe, mostró que las colonias eran blanco grisáceas, los aislamientos eran cocobacilos Gramnegativos, negativos a la prueba de oxidasa, pero positivos a la de catalasa, eran inmóviles y no fermentadores de glucosa. Todos los aislamientos fueron identificados como el complejo *A. baumannii-calcoaceticus*.

Los 52 aislamientos del complejo *ACB* se distribuyeron de la siguiente forma: 24 aislamientos (46,2%) fueron obtenidos a partir de rastreo nasal, 12 (23,1%) de herida quirúrgica, seis (11,5%) de punta de catéter, cuatro (5,25%) de sangre, cuatro (5,25%) de orina y dos (3,8%) de secreción uretral (tabla 2).

El 100% de los aislamientos del complejo presentaron resistencia a amikacina, gentamicina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefepime, ceftazidima, imipenem y ticarcilina/clavulanato. En el caso de la resistencia a ciprofloxacina se detectó en el 98,1% (51/52) de los aislamientos, a levofloxacina en el 90,4% (47/52), a ampicilina/sulbactam en el 94,2% (49/52) y a meropenem en el 96,2% (50/52). El menor número de aislamientos resistentes, se detectó a los antibióticos tigeciclina y sulperazona con un 21,2% y 28,8%, respectivamente. (figura 3).

Los aislamientos fueron considerados multiresistentes a los antibióticos (MDR), basado en el criterio de resistencia simultánea a imipenem (o meropenem), amikacina (o tobramicina) y a cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima)

(2). El mayor número de estos aislamientos fueron detectados en los meses de julio y septiembre del año 2009. Diez de estos aislamientos (19,3%) fueron considerados pan-resistentes (PDR), debido a la resistencia simultánea que presentaron a todos los antibióticos empleados en la prueba susceptibilidad (5).

De acuerdo con el patrón de resistencia de los 52 aislamientos del complejo *ACB* obtenido en la prueba de susceptibilidad a los antibióticos, se identificaron cinco patrones o antibiotipos (tabla 2). Los aislamientos considerados MDR fueron 26, que representan el 50%, presentaron sensibilidad sólo a tigeciclina y sulperazona y se clasificaron en el antibiotipo 1. En este antibiotipo se ubicaron 15 aislamientos provenientes de rastreo nasal, seis de herida quirúrgica, cuatro de punta de catéter y uno de sangre (tabla 2). En el antibiotipo 2 se ubicaron nueve aislamientos (17,3%) MDR con sensibilidad a tigeciclina, junto a levofloxacina, ampicilina/sulbactam o meropenem. Seis de estos aislamientos se obtuvieron de rastreo nasal, dos de punta de catéter y uno de orina (tabla 2). En el antibiotipo 3 se clasificaron aislamientos MDR con sensibilidad a tigeciclina o sulperazona. Este antibiotipo se presentó en dos aislamientos provenientes de sangre, dos de orina, uno de herida quirúrgica y uno de rastreo nasal (tabla 2). El antibiotipo 4 comprendió diez aislamientos (19,3%) considerados PDR, la presencia de estos aislamientos fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Finalmente el aislamiento identificado en el antibiotipo 5 representó el 1,9% y se aisló de sangre. Los aislamientos de este grupo fueron MDR con sensibilidad a tigeciclina, sulperazona y a las fluorquinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina).

El sitio de muestra con mayor número de aislamientos correspondió al rastreo nasal (46,2%), con aislamientos del antibiotipo 1 al 4, siendo el antibiotipo 1 el más frecuente con un 63%, seguido del antibiotipo 2 con un 25%. Los aislamientos obtenidos de herida representaron el 23%, siendo el antibiotipo 1, el más frecuente en este sitio (50%), seguido del antibiotipo 4 (33%). Los aislamientos obtenidos de punta de catéter fueron 6 (11,5%) y ellos se clasificaron en los antibiotipos 1 y 2.

Cuatro se obtuvieron de sangre y se ubicaron en los antibiotipos 1, 3 y 5. En el caso de los obtenidos de orina presentaron los antibiotipos 2 y 3. Los dos aislamientos obtenidos de secreción uretral, correspondieron al antibiotipo 4 (figura 4). De acuerdo a los análisis se encontró que el sitio de donde se obtuvo el aislamiento bacteriano y el tipo de antibiotipo presentó una relación estadísticamente significativa ($p=0,001$).

Por otra parte se encontró que el antibiotipo 1 se detectó durante el año 2009 en un aislamiento que circuló en el mes de junio, en julio (en ocho), en agosto en seis, en septiembre en ocho, en octubre en dos y en noviembre en uno. Sólo un aislamiento con este antibiotipo se registró en el año 2010 en mayo. El antibiotipo 2 se obtuvo en aislamientos que circularon en el año 2009, en julio dos, agosto dos, septiembre cuatro y noviembre uno. El antibiotipo 3 se detectó en dos aislamientos que circularon en los meses de septiembre y noviembre del año 2009 y en dos aislamientos que circularon en mayo y uno en julio del año 2010. El antibiotipo 4 se detectó por primera vez en marzo del año 2009 y volvió aparecer en los meses de julio, agosto y noviembre del mismo año y en los meses de abril, mayo y junio del año 2010. Finalmente el antibiotipo 5 se detectó en el mes de octubre del 2009.

Se encontró que el 81% de los aislamientos se obtuvo de colonizaciones, mientras el 19% de infecciones, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$); pero al relacionar Colonización e Infección con los determinantes de resistencia, ni con la presencia de algún tipo de integrón no existió asociación estadística entre esas variables.

Aunque en el mes de septiembre de los años 2009 y 2010 se registró el mayor número de aislamientos (ocho) pertenecientes al antibiotipo 1 y cuatro en el antibiotipo 2, no existe asociación estadísticamente significativa en la fecha que circuló el aislamiento con un antibiotipo determinado ($p>0,05$).

Antibiotipo	Aislados n (%)	Sitio de muestreo						Perfiles de Resistencia	Perfiles de Sensibilidad
		Rn n (%)	Sa n (%)	Pc n (%)	Hq n (%)	Or n (%)	Su n (%)		
1	26 (50)	15 (57,7)	1 (3,8)	4 (15,4)	6 (23,1)	-	-	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, SXT, SAM, TIC/AC, FEP, CAZ, IMP, MEM	TIG, SUL
2	9 (17,3)	6 (66,7)	-	2 (22,2)	-	1 (11,1)	-	AMK, GEN, TOB, CIP, SXT, TIC/AC, FEP, CAZ, IMP	TIG, SUL/ LVX, SAM o MEM
3	6 (11,5)	1 (16,7)	2 (33,3)	-	1 (16,7)	2 (33,3)	-	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, SXT, SAM, TIC/AC, FEP, CAZ, IMP, MEM	TIG ó SUL
4	10(19,3)*	2 (20,0)	-	-	5 (50)**	1 (10)	2 (20)	AMK, GEN, TOB, CIP, LVX, SXT, SAM, TIC/AC, FEP, CAZ, IMP, MEM, TIG, SUL	-
5	1 (1,9)	-	1 (100)	-	-	-	-	AMK, GEN, TOB, SXT, SAM, TIC/AC, FEP, CAZ, IMP, MEM	TIG, SUL, CIP, LVX
Total	52 (100)	24 (46,2)	4 (7,7)	6 (11,5)	12 (23,1)	4 (7,7)	2 (3,8)		

Tabla 2. Distribución de los Antibiotipos del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* por sitio de muestreo y perfiles de susceptibilidad a los antibióticos

* $p < 0,05$; ** (50%; OR=5,000; min 1,136-max 22,000; $p = 0,025$)

Rn= Rastreo nasal; Sa=Sangre; Pc= Punta de catéter; Hq= Herida quirúrgica; Or= Orina; Su=Secreción uretral.

SXT (Trimetoprim/Sulfametoxazol), TIM (Ticarcilina/Clavulanato), GEN (Gentamicina), TOB (Tobramicina), CIP (Ciprofloxacina), CAZ (Ceftazidima), FEP (Cefepima), ATM(Aztreonam), IPM(Imipenem), MEM (Meropenem), SAM (Ampicilina-Sulbactam), AMK (Amikacina), SUL (Cefoperazona-Sulbactam), TIG (Tigeciclina) .

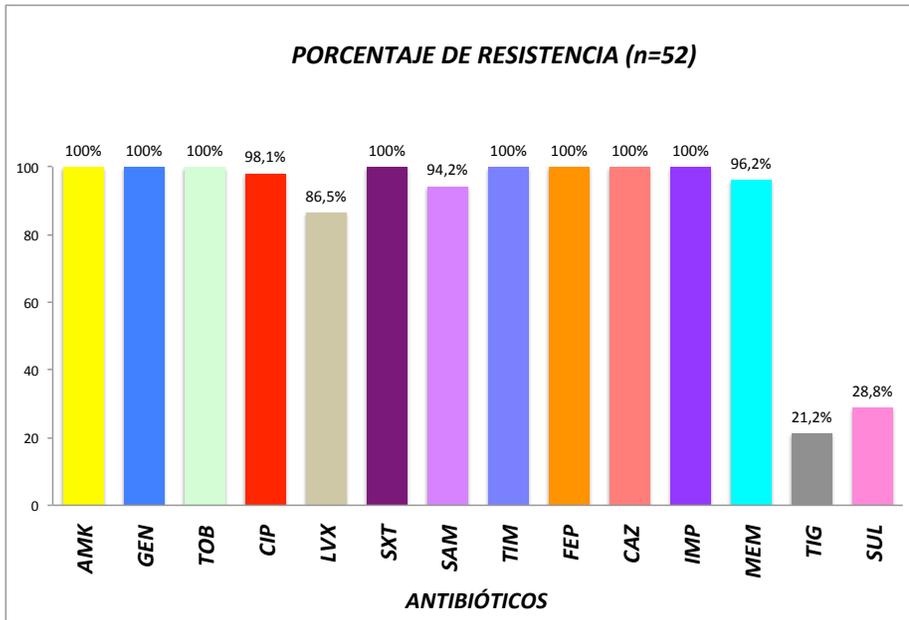
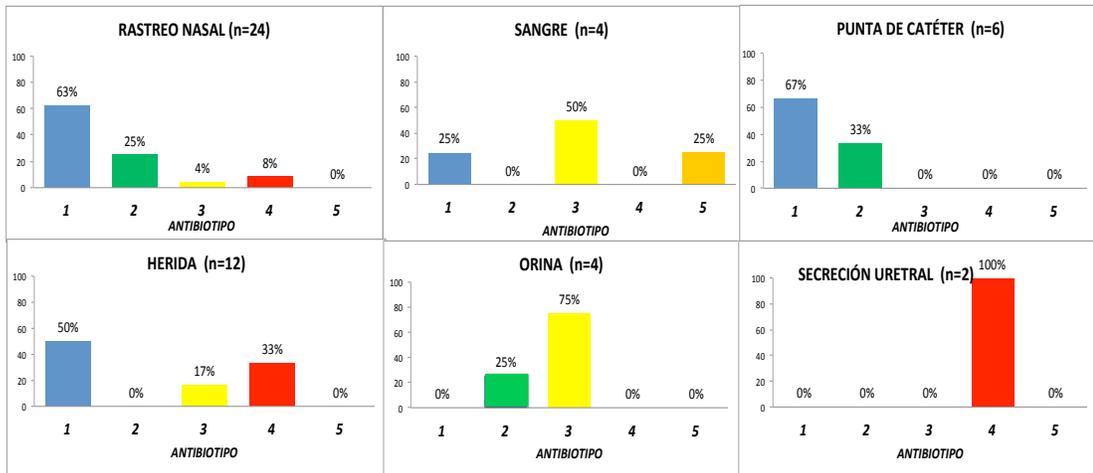


Figura 3. Porcentajes de resistencia a antibióticos de aislamientos clínicos del complejo ACB.



ANTIBIOTIPO	1	2	3	4	5
SENSIBILIDAD	TIG SUL	LVX TIG SUL	TIG		CIP LVX TIG SUL

$p = 0,001$

Figura 4. Porcentajes de aislamientos clínicos del complejo ACB por antibiótipo en cada sitio de muestra.

Como se mencionó en la metodología a partir de las distancias de las CMI de los aislamientos (antibiograma cuantitativo) (tabla 3 y tabla 4), se construyó un

cladograma basado en el agrupamiento por UPGMA. En este cladograma se evidenció la existencia de dos grupos o clados. El clado 1 agrupó 5 aislamientos pertenecientes a los antibiogramas 2, 3 y 4 que circularon en septiembre del 2009 y en mayo del 2010: estos aislamientos se obtuvieron de muestras de orina, sangre, herida quirúrgica, punta de catéter y rastreo nasal. El clado 2 agrupó todos los aislamientos pertenecientes al antibiograma 1 y 5, además de algunos aislamientos de los antibiogramas 2, 3 y 4 (figura 5).

MUESTRA	SAM (CMI)	CAZ (CMI)	CIP (CMI)	IMP (CMI)	LVX (CMI)	MEM (CMI)	TOB (CMI)
5732549	16	2	8	2	8	64	8
2513, 5741683, 5722130, 2514	16	2	8	4	8	64	8
5759531	16	2	8	4	4	8	8
5728549, 5728549, 5723185, 5732013, (3), 4939	16	16	4	8	4	8	8
5717479, 5717971, 5718164, NAC51, 5701177, 5701789, 5702062, (1), 5704225H, 5705015, 5704223H, 5714063, 21311, 31345, 5725011, 5748624, 5757623	16	16	4	8	2	8	8
5790341, 5761126, 5722013, 5762365, 5748623	16	16	2	8	4	8	8
5793538, 5793303, 5793548, 5793546, 5795447, 21262, 5701372, 5701373, 5722093, 5730330, 5723185, 209021 5750598, 5738406, 21499, 5730338, (2), 5728550	16	16	4	8	8	8	8

Tabla 3. Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico en los 52 aislamientos del Complejo *A. baumannii-calcoaceticus*

Los antibióticos evaluados fueron: SAM (Ampicilina-Sulbactam), CAZ (Ceftazidima), CIP (Ciprofloxacina), IMP (Imipenem), LVX (Levofloxacina), MEM (Meropenem), TOB (Tobramicina). Los aislamientos resaltados en negrilla son los representativos de cada grupo.

	5732549	2513	5759531	5728549	5717479	5790341	5793538
5732549	0	2	56	58	58	58	58
2513		0	56	56	58	58	58
5759531			0	15	15	16	16
5728549				0	2	2	4
5717479					0	3	6
5790341						0	16
5793538							0

Tabla 4. Distancia fenotípica entre los aislamientos de *A. baumannii* basados en el antibiograma cuantitativo. La distancia se calculó a partir del coeficiente similitud comparación los diámetros de los halos de inhibición, donde donde x_{ij} - y x_{ik} son los valores de los diámetros de inhibición de un antimicrobiano dado i para dos distintos aislamientos j y k . A partir de estos valores se realizó un agrupamiento por UPGMA con los 52 aislamientos.

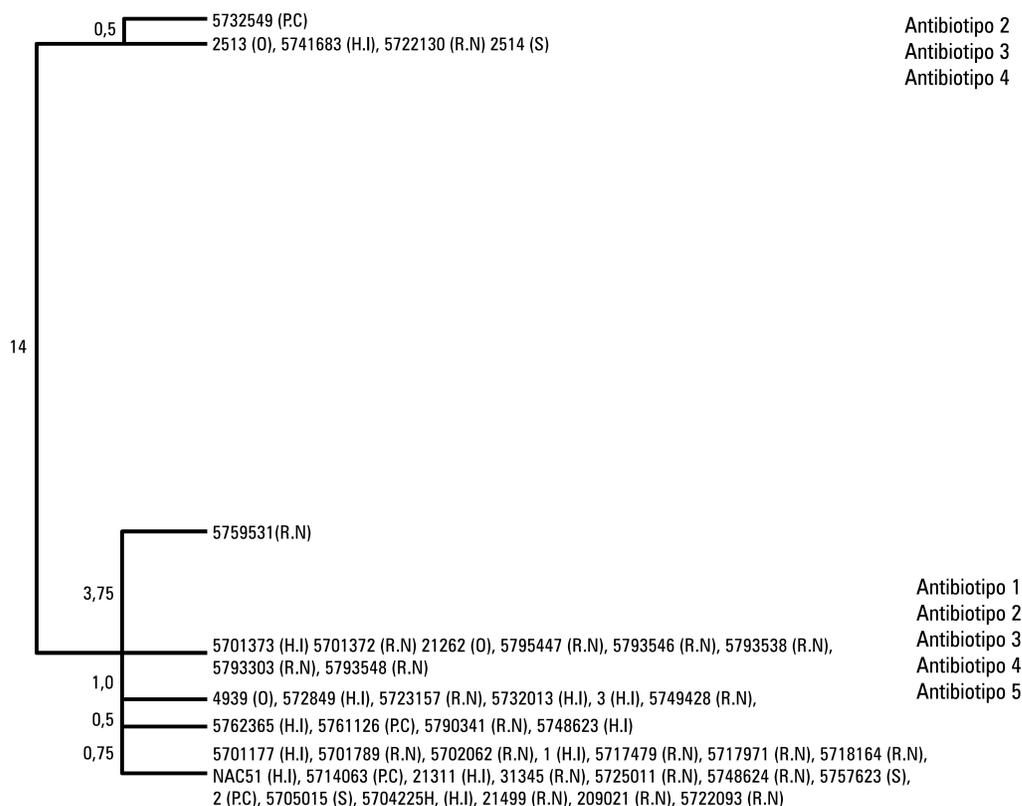


Figura 5. Cladograma de 52 aislamientos del complejo *ACB*. Basado en agrupamiento UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average), con el coeficiente similaridad a través de la fórmula para calcular la distancia euclidiana: $E_{jk} = \sqrt{\sum (x_{ij} - x_{ik})^2}$, donde donde x_{ij} - y x_{ik} son los valores de los diámetros de inhibición de un antimicrobiano dado i para dos distintos aislamientos j y k .

5.2. Identificación de las especies genómicas del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* mediante el análisis del gen del ADNr 16S

Se amplificó el gen del ARNr16s de 27 (51,9%) aislamientos del complejo *ACB*, con base en sus secuencias se realizó el análisis filogenético que agrupó en cuatro clados distribuidos así: 20 (71,4%) aislamientos fueron agrupados con la genoespecie *A. baumannii*, tres (10,7%) con *A. nosocomialis*, dos (7,14%) con *A. calcoaceticus* y *A. pittii*. Sin embargo, dos (7,14%) aislamientos no se agruparon con ninguna de las genoespecies reportadas en el GenBank.

Los aislamientos obtenidos en este estudio fueron compatibles con las genoespecies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* y *A. nosocomialis* y se agruparon en el cluster 2 del cladograma basado en el antibiograma cuantitativo. Sin embargo, sólo un aislamiento (con el código 2513) perteneciente a la genoespecie *A. baumannii*, se ubicó en el clado 1.

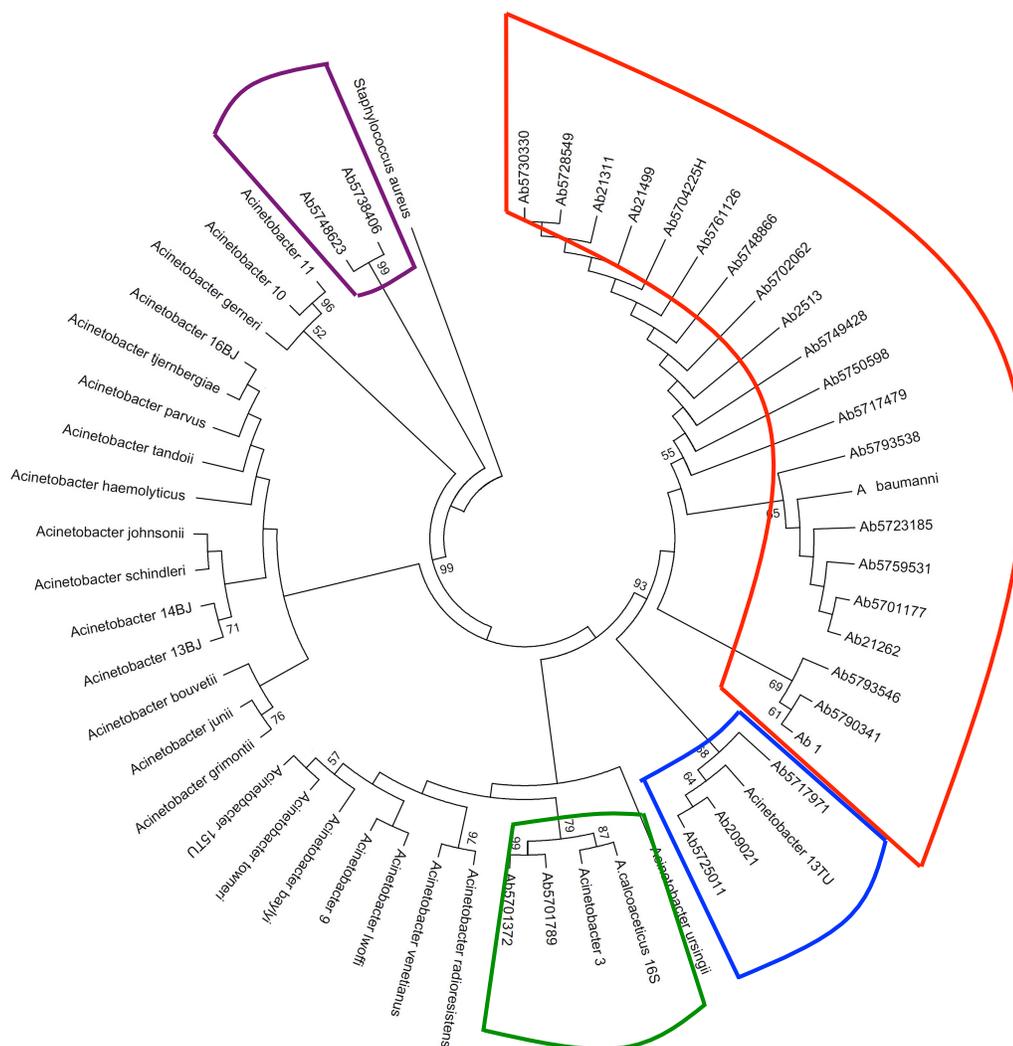


Figura 6. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima verosimilitud con el modelo Kimura 2 Parámetros con distribución Gamma, asumiendo que una cierta fracción de sitios es evolutivamente invariable (K2+G+I). bootstrap (1000 réplicas), que agrupa las secuencias del ADNr 16s de 27 aislamientos y 27 secuencias de genoespecies de *Acinetobacter* obtenidas del GenBank.

5.3. Determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos y presencia de Integrones de aislamientos del Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

En el complejo *ACB* se identificaron 9 aislamientos (17,3%) portadores del gen *bla*_{TEM-1}, 5 (9,6%), del gen *bla*_{CTXM-9} y 20 (38,5%) presentaron el gen *bla*_{OXA-58}. La presencia del gen *bla*_{OXA-58} entre los aislamientos fue significativa ($p < 0,05$).

Los genes que codifican para metalo β -lactamasas, se detectaron en 4 aislamientos (7,7%) con el gen *blaIMP-1* y en 11 (21,2%) con el gen *blaVIM-2*.

En este complejo se detectó también la presencia de integrones de la clase 1 y 2 en 21 aislamientos (40,4%), el integrón clase 1 en 12 (23,1%) y el integrón clase 2 en 9 (17,3%) y seis (6) de estos aislamientos presentaron simultáneamente las dos clases de integrones, con un valor estadísticamente significativo ($p < 0,05\%$). El mayor número de integrones lo presentaron los aislamientos con el antibiotipo 1, sin embargo, no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Los integrones se detectaron preferencialmente en aislamientos obtenidos de de rastreo nasal y herida quirúrgica (siete aislamientos en cada muestra) (datos no mostrados).

La identificación de aislamientos de *A. baumannii* en el complejo ACB se realizó mediante la amplificación del gen *blaOXA-51*, encontrándose que 20 de ellos correspondían a esta especie, representando el 42,3% (tabla 3). 12 (54,5%) de los aislamientos de *A. baumannii* correspondían al antibiotipo 1, dos (9,09%) al antibiotipo 3 y cuatro (18,18%) al antibiotipo 4 y uno (5%) al antibiotipo 5.

Entre estos aislamientos se detectaron los genes *blaTEM-1* en cuatro y *blaCTXM-9* en cinco y los genes *blaIMP-1* y *blaVIM-2* en dos y cinco respectivamente, obtenidos principalmente de rastreo nasal. El gen *blaOXA-58* se detectó en el 50% de los aislamientos de *A. baumannii*, de éstos el 36,36% se obtuvo de rastreo nasal principalmente con el fenotipo Antibiotipo 1 y otro 36,36% de herida, dos de los cuales pertenecían al antibiotipo 1. Aunque se amplificó el gen *blaOXA-23*, este gen no se detectó en ningún aislamiento.

Código de la cepa	Fecha de aislamiento	Sitio de muestra	Antibiótipo	Genes <i>bla</i>					
				OXA-51	TEM	CTXM-9	VIM-2	IMP-1	OXA-58
5790341	06/2009	Rastreo nasal	1	+					
5793538	07/2009	Rastreo nasal	1	+	+				+
21262	07/2009	Orina	2	+					
5701177	07/2009	Herida	1	+	+				
1	07/2009	Herida	4	+					+
5793546	07/2009	Rastreo nasal	1	+			+	+	
5702062	07/2009	Rastreo nasal	2	+					
5704225H	08/2009	Herida	4	+					+
5717479	08/2009	Rastreo nasal	1	+					
21311	08/2009	Herida	1	+					+
5728549	09/2009	Herida	3	+			+		+
21499	09/2009	Rastreo nasal	1	+					+
5730330	09/2009	Punta de catéter	1	+	+				+
5748866	10/2009	Sangre	5	+					
5749428	10/2009	Rastreo nasal	1	+			+		+
5761126	11/2009	Punta de catéter	1	+					+
5750598	11/2009	Sec Uretral	4	+					+
5723185	05/2010	Rastreo nasal	1	+					
2513	05/2010	Orina	3	+			+	+	
5759531	06/2010	Rastreo nasal	4	+	+		+		
				100%	20%	0%	25%	10%	50%

Tabla 5. Distribución y caracterización molecular de los aislamientos de *A. baumannii*

5.4. Detección de la presencia de integrones en los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

En 12 (23%) de los aislamientos del complejo *ACB* se detectaron integrones clase 1, en nueve (17,3%) de ellos se detectaron integrones clase 2, en cinco (10%) otro tipo de integrón.

En dos de los aislamientos del antibiótipo 1 se les detectó integrones clase 1 y 2 simultáneamente, en ellos se detectaron BLEE tipo TEM y carbapenemasa tipo OXA, lo mismo sucedió con dos de los aislamientos del antibiótipo 4, ellos presentaron además carbapenemasa tipo VIM. Un aislamiento del antibiótipo 2 y otro del antibiótipo 3, presentaron las dos clases de integrones, pero ningún determinante de resistencia. Al aislamiento con el antibiótipo 5, no se le detectó integrones.

En siete (25%) aislamientos de *A. baumannii* se detectaron integrones, seis con la clase 1, un aislamiento solo con la clase 2 y dos aislamientos presentaron los integrones de la clase 1 y 2 simultáneamente. (datos no mostrados). Cuatro (13,63%) de la genoespecie *A. baumannii* obtenidos de rastreo nasal presentaron

integrones, dos (9,1%) en herida quirúrgica y uno (4,5%) en orina; sin asociación estadística significativa ($p>0,05$).

Tres de los aislamientos de *A. baumannii* que transportaban integrones presentaron metalo- β -lactamasas tipo VIM-2, de los antibiotipos 1, 3 y 4; sin asociación estadística en ninguno de los casos ($p>0,05$). Situación similar ocurrió con la β -lactamasas tipo TEM que se presentó en tres aislamientos, dos del antibiotipo 1 y uno del antibiotipo 4.

Integrón Clase	Antibiotipos (%)				Sitio muestreo (%)						Determinantes de resistencia (%)						Genoespecie (%)				
	1	2	3	4	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>iii</i>	<i>iv</i>	<i>v</i>	<i>vi</i>	A	B	C	D	E	F	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>
1 (n=12)	25	17	25	33	33	0	8	33	25	0	33	17	33	0	17	50	42	0	0	8	50
2 (n=9)	44	11	11	33	22	0	11	44	11	11	44	0	44	0	0	33	22	0	0	0	78
Otro (n=5)	60	20	20	0	60	20	0	20	0	0	40	0	20	0	40	0	0	20	0	20	60

Tabla 6 Distribución de los integrones en aislamientos del complejo ACB

Sitio de muestreo: *i. Rastreo nasal, ii. Sangre, iii. Punta de catéter,*

iv. Herida, v. Orina, vi. Secreción uretral

Determinantes de resistencia: A. *blaVIM*, B. *blaIMP*, C. *blaTEM*,

D. *blaCTXM-9*, E. *blaOXA58*, F. *blaOXA51*

Genoespecie: *a. A. baumannii, b. A. calcoaceticus, c. Acinetobacter 13TU,*

c. Otro, d. No determinada

Capítulo 6. Discusión

Aunque las infecciones nosocomiales debidas a *A. baumannii* se han reportado en todo el mundo (21,32,35,38,84), existe escasa información acerca del comportamiento epidemiológico de los aislamientos circulantes en la ciudad de Cali. La disponibilidad de 52 aislamientos clínicos proporcionó la oportunidad de examinar la sensibilidad a los antibióticos y las características fenotípicas. Las infecciones por *A. baumannii* se ven favorecidas por el uso de dispositivos como sondas y catéteres, a los que se adhiere esta bacteria, provocando la colonización de la zona (3); en este estudio, se obtuvo con más frecuencia aislamientos del complejo *ACB* de rastreo nasal, seguidos de herida y punta de catéter, todas consideradas como colonizaciones, mientras el 19,2% fueron obtenidas de infecciones.

Los reportes del SENTRY en países de Latinoamérica informan que *Acinetobacter spp* presenta las mayores tasas de resistencia bacteriana y la resistencia a los carbapenemes, es mayor que en Estados Unidos y Europa (35). En este sentido los estudios realizados por Picazo y col (5) en España durante el año 2006, reportan aislamientos con resistencia a la piperacilina/tazobactam en un 90%, a cefalosporinas de tercera generación en un 70,4%, a cefalosporinas de cuarta generación con un 87,3%. Reportes de un estudio similar para el año 2011 en el mismo país, registran un 100% de los aislamientos con resistencia a estos medicamentos (62). En los Estados Unidos se reportó que más del 90% de los aislamientos presentan resistencia a ciprofloxacina, y al menos un 80% a cefalosporinas de espectro extendido, mientras que casi la mitad (49%) de los aislamientos son resistentes a ampicilina/sulbactam. En el presente estudio los aislamientos obtenidos entre los años 2009 y 2010 son 100% resistentes a todos

estos antibióticos lo que comprueba que estas bacterias vienen incrementando su resistencia año tras año y que el comportamiento de los aislamientos del complejo *ACB* para el 2009 y 2010, con un número importante de ellos con característica MDR, pero con tendencia a convertirse en PDR se asemejaban a resultados obtenidos en Europa y Estados Unidos sólo hasta el 2011 (22).

En el caso de la resistencia a los carbapenemes, un estudio multicéntrico realizado por Higgins y col (21) con aislamientos de *A. baumannii* en varios países durante 2010, mostró que el 100% de los aislamientos presentaron resistencia a imipenem, en concordancia con los datos obtenidos en este estudio. Sin embargo, los reportes de España informan que los aislamientos presentan una resistencia a imipenem del 60,8% y a meropenem del 57,6% para el año 2005 (5) y del 47,6% y 93,2% de resistencia para imipenem y meropenem, respectivamente para el año 2011 (62). En los Estados Unidos, la resistencia a los carbapenemes se reporta alrededor del 20% (22). En el presente estudio la resistencia a los carbapenemes superó a los registros de España y Estados Unidos, con aislamientos resistentes a imipenem del 100% y a meropenem del 96,2%, mostrando concordancia con los reportes del SENTRY (35).

En Colombia un estudio realizado en UCI de varios hospitales, comprobó que de todas las bacterias estudiadas, *A. baumannii* presentaba los porcentajes más elevados de resistencia a antibióticos e incluso con un aumento de resistencia a los carbapenemes (16), en consonancia con los resultados del grupo para el control de la resistencia antimicrobiana de Bogotá (GREBO) en él se resalta un relativo incremento en la prevalencia de la resistencia al imipenem (48,1%) y al meropenem (52%) para el año 2006 (149) y Pinzón y col (10) reportan una resistencia a meropenem (94,3%) e imipenem (96,2%) para el año 2012, Martínez y col registran una resistencia a imipenem y meropenem que se mantiene en el 100% y 90% respectivamente (9); los mencionados estudios y el comportamiento de los aislamientos de *Acinetobacter spp* en la Clínica Universitaria Rafael Uribe

Uribe, al comparar los resultados obtenidos entre el 2007 y 2008 (11) y los obtenidos en el presente estudio, evidencian la estabilidad de los aislamientos de *A. baumannii* con resistencia a los carbapenemes en Colombia.

Otro resultado importante fue la característica fenotípica de multirresistencia a fármacos en los aislamientos. Los brotes de cepas PDR se han reportado desde el año 2006 en los Estados Unidos con un 89% de prevalencia (22) y un 100% de cepas multirresistencia a fármacos en Asia (30-32). De acuerdo al concepto pan-resistente (41,152), en este estudio se detectaron cepas PDR en un 19,3% con un valor estadísticamente significativo ($p < 0,05$), este porcentaje es casi el doble del reportado en un estudio adelantado en Brasil en los años 2009 y 2010 donde se reportaron aislamientos PDR en un 11% (150).

Los agentes antibacterianos que para el 2009 eran eficaces contra *A. baumannii* incluyen carbapenémicos, aminoglucósidos (gentamicina o amikacina), colistina y tigeciclina (6). Sin embargo, en este estudio los aislamientos del complejo *ACB* mostraron resistencia a todos estos agentes. Sólo tigeciclina y sulperazona mantienen la actividad antimicrobiana frente a la mayoría de los aislamientos evaluados (>80%). Estos resultados son similares a los informes publicados para los aislamientos clínicos de otras regiones geográficas (43,152). Karageorgopoulos y col (153) consideran que la sensibilidad detectada a tigeciclina en por lo menos el 90% de los aislamientos de *Acinetobacter spp.*, hace de este antibiótico una opción de tratamiento potencialmente eficaz contra las bacterias altamente resistentes. Aunque hay que tener cautela con su uso, puesto que algunos informes indican que a pesar de la actividad de la tigeciclina a nivel “*in vitro*”, su eficacia se pierde significativamente “*in vivo*”, reportándose cada vez más casos de resistencia a este antibiótico (151), lo que sugiere que la reciente introducción de la tigeciclina en la práctica clínica no constituye una solución definitiva al problema de la creciente resistencia a los medicamentos antimicrobianos en *Acinetobacter spp.*, especialmente en *A. baumannii*.

En las tres combinaciones de β -lactámicos/ inhibidores de β -lactamasa evaluados, se observó que la combinación ampicilina-sulbactam y ticarcilina/ácido clavulánico presentan menor actividad frente a los aislamientos del complejo *ACB*, sólo sulperazona presentó actividad antibacteriana significativa, lo que ya había sido reportado (151). Chávez y colaboradores realizaron un estudio en este mismo hospital en los años 2007 y 2008 y encontraron aislamientos de *Acinetobacter spp* con sensibilidad a las cefalosporinas de amplio espectro como cefoperazona, ceftriazona, cefotaxime y cefepime y a los carbapenemes (11). Sin embargo, se observó en este estudio un incremento en la dinámica de la resistencia de estos aislamientos.

Los antibiogramas 2 y 5 circularon únicamente durante el año 2009, estos antibiogramas se caracterizaron por ser MDR con sensibilidad a tigeciclina y sulperazona y a antibióticos como las quinolonas. Los aislamientos del antibiograma 1 se aislaron durante los dos años que duró el estudio. Este antibiograma presentó un fenotipo MDR con posibilidad de tratar las infecciones sólo con tigeciclina y sulperazona. El antibiograma 3 aparece al finales del año 2009 hasta el 2010, los aislamientos de este antibiograma son MDR con tendencia a convertirse en PDR por la resistencia que manifiestan a tigeciclina o sulperazona. Los aislamientos del antibiograma 4 al igual que el antibiograma 1 se presentaron durante el periodo de tiempo que duró el estudio, siendo los más exitosos. Sin embargo a diferencia del antibiograma 1, los aislamientos del antibiograma 4 son PDR, quedando como única opción terapéutica para tratarlos el empleo de colistina (151).

El análisis del antibiograma cuantitativo muestra que los aislamientos distribuidos en los cinco antibiogramas sólo se agruparon en dos clados, lo que demuestra una reducida diversidad fenotípica. Estos resultados son coherentes con los estudios realizados por Villegas y colaboradores (12), quienes demostraron que las cepas MDR de *A. baumannii* tienden a generar brotes epidémicos con el predominio de uno a dos clones. El análisis del ADNr 16S reforzó esta idea, la geno especie más

predominante del complejo *ACB* fue *A. baumannii*, agrupándose preferencialmente en el clado 2 del cladograma basado en el antibiograma cuantitativo, lo que evidencia que entre los aislamientos de *ACB*, esta genoespecie es la que más se aísla en la UCI, con una tendencia monoclonal (12,26,40).

Los resultados de los patrones de susceptibilidad de los aislamientos del complejo *ACB* dieron varios antibiotipos, lo que ha sido reportado por varios autores en Europa (62,63,64) Latinoamérica (65, 154) y Colombia (10), la mayoría de ellos coinciden que el antibiograma cuantitativo no permite diferenciar epidemiológicamente las cepas aisladas, los hallazgos de este estudio difieren con estos autores, puesto que el antibiotipo 1, que fue el más frecuente y mostró sensibilidad solo a tigeciclina y sulperazona, al igual que el antibiotipo 4 que mostró resistencia a los 14 antibióticos evaluados, se aislaron durante todo el periodo de tiempo que duró el estudio y de diversos sitios de muestreo, evidenciando su capacidad para colonizar variados ambientes y a pacientes con distintas patologías (64).

El antibiotipo 1 fue el más frecuente en este estudio (50%) y su patrón de susceptibilidad es similar a los perfiles del antibiotipo más frecuente (78,8% de los clasificados por Biendo y colaboradores en Francia (63), excepto por la sensibilidad de esos aislamientos a imipenem y a colsitina, pero este último no fue utilizado en este estudio. Situación similar sucede al comparar los resultados de este estudio con el realizado por Limanski en Argentina (155), donde el antibiotipo con perfil similar al antibiotipo 1, se identificó solo en el 21% de los aislamientos. En Colombia Pinzón y colaboradores encontraron que de 11 Antibiotipos, el más frecuente (45,5%) correspondió a aislamientos PDR (10), mientras en este estudio el antibiotipo 4 correspondió al 19,3% de los aislamientos, es decir que en la clínica Rafael Uribe Uribe, 3 años después el porcentaje de aislamientos PDR era menor al reportado por otros autores en Colombia.

Los resultados de la secuenciación del ADNr 16s, mostraron que el 100% de los aislamientos pertenecían al complejo *ACB*, esto coincide con lo encontrado en varios reportes, donde la mayoría de aislamientos son de origen clínico del género *Acinetobacter*. En un estudio realizados por Misbah y colaboradores a partir de la secuenciación del ADNr 16s de aislamientos del complejo *ACB*, el 92% se agruparon con secuencias de genoespecies de *Acinetobacter* disponibles en el Genbank, entre ellos el ATCC 19606. En este estudio, el 71,4% de las secuencias de los aislamientos *ACB*, se agruparon con esta genoespecie. Este hallazgo se confirmó, mediante la identificación por PCR del gen que codifica para la β -lactamasa OXA-51, gen intrínseco de la misma (144).

Entre los aislamientos multirresistentes del complejo *ACB* y los de la genoespecie *A. baumannii*, se detectaron los genes *bla* (*TEM-1*, *CTXM-9*, *OXA-58*, *IMP-1* y *VIM-2*). Aunque la presencia de la Betalactamasa de Amplio Espectro BLEA TEM-1 es una de las principales causas de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos entre los aislamientos de *A. baumannii*, en este estudio sólo el 22,7% de los aislamientos fueron portadores del gen *blaTEM-1*. En los últimos años la tendencia cambió; el incremento en la resistencia a los carbapenemes se debe principalmente a la presencia de metalo β -lactamasas y carbapenemasas clase D tipo OXA (84). En este estudio el 38,5% de los aislamientos del complejo *ACB* y el 50% de *A. baumannii* presentaron β -lactamasas tipo OXA-58. Aunque se ha reportado genes de metalo β -lactamasas y carbapenemasas clase D tipo OXA transportados en integrones (9), en este estudio el 82% de los aislamientos del complejo *ACB* y de *A. baumannii*, en los que se detectaron genes de β -lactamasas tipo OXA-58 no estuvieron relacionadas con integrones. Estos resultados coinciden con lo reportado por Poirel y col (156) que afirman que estos genes regularmente no se encuentran en la forma de genes cassettes y según el mismo autor estos genes se transportan en plásmidos o asociados a un proceso de recombinación homóloga (156).

Leski y colaboradores (84) plantean la posibilidad que se presente una co-selección de aislamientos resistentes a carbapenemes mediados por la adquisición de carbapenemasas clase D tipo OXA. Todos los aislamientos de este estudio presentaron capacidad para hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima y cefepima), los carbapenemes como imipinem y meropenem, por lo que se sugiere la presencia de β -lactamasas de la clase D, tipo OXA-23, aunque esta oxacilinasas no fue detectada en los aislamientos del presente estudio, por lo que la resistencia de algunos de ellos (21,5%) podría deberse a la expresión simultánea de OXA-51, así como la presencia de OXA-58, como lo demuestran algunos reportes en Colombia y latinoamérica (12,21,35). Sin embargo, no se debe descartar que el alto nivel de resistencia en este tipo de oxacilinasas se presenta también asociado a otros mecanismos como la pérdida de o reducción de expresión de proteínas de membrana y por sobre expresión de bombas de eflujo (88,89,93,96).

Se evidenció un número importante de integrones de la clase 1 y 2 entre los aislamientos del complejo *ACB* y *A. baumannii*. Los integrones se han diseminado ampliamente entre las especies de las bacterias no fermentadoras como *A. baumannii* (100). La presencia de integrones de la clase 1 y 2 se han descrito entre los miembros del género *Acinetobacter* en aislamientos clínicos y ambientales (103,110). Se reporta que las cepas epidémicas de *A. baumannii* tienden a contener un mayor número de integrones que las no epidémicas y se afirma que el empleo de antibióticos tiene un fuerte impacto en el desarrollo de la diversidad y mantenimiento de estas cepas en la UCI (141).

El integrón de la clase 1 presenta múltiples cassettes, que confieren resistencia a numerosos antibióticos, este es un sello fenotípico distintivo en los aislamientos de *A. baumannii* (50), lo que explicaría la multiresistencia detectada en aislamientos del complejo *ACB* y la genespecie *A. baumannii*, así como la presencia de diferentes antibiotipos en la UCI. La inserción de estos elementos en el cromosoma bacteriano puede afectar la expresión de genes como *bla*_{OXA-51}, que

codifica una cefalosporinasa y carbapenemasa cromosomal (139), lo que podría explicar la resistencia del 50% de los aislamientos en los portadores de este tipo de integrones y en los que se detectó además el gen *blaOXA-51*.

En este estudio todos los aislamientos de *A. baumannii* presentaron resistencia a cefalosporinas y carbapenemes; sin embargo, sólo al 25% de ellos se les detectaron integrones, dos de rastreo nasal, dos de herida y uno de orina; es decir, el 80% de ellos obtenidos de colonización.

El mayor número de integrones se presentó en aislamientos obtenidos de rastreo nasal y herida quirúrgica, estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Villegas y col, quienes encontraron en aislamientos en la misma ciudad donde se realizó este estudio, que la mayoría de cepas positivas a integrasa y MDR provienen de tejidos más profundos (sangre) y de secreciones (16), esta discrepancia se debe posiblemente a que el mayor número de aislamientos de este estudio fueron obtenidos de colonización y no de infecciones.

Hallar integrones clase 1 en los aislamientos de este estudio puede relacionarse con la resistencia a los antibióticos, debido a que estos elementos le confieren a las bacterias la capacidad de adquirir genes que codifican para la resistencia y le permiten su expresión por acción de la integrasa tipo 1 (23,50). Los integrones clase 1 pueden contener genes de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptomicina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina, quinolonas y antisépticos de amonio cuaternario (100-106).

En los países de Europa (38) y latinoamérica (110) el integrón más frecuentemente encontrado en *A. baumannii* es el de la clase 1. Aislamientos de *A. baumannii* portadores de integrón clase 2 en latinoamérica han sido poco reportados (110), solamente en Chile la mayoría de aislamientos de *A. baumannii* se reportan como portadores de este tipo de integrones, un estudio realizado por Ramírez y colaboradores evidenció una mayor incidencia de integrón clase 2 en el 31% de los aislamientos, en este estudio el 17,3% de los aislamientos presentaron

integrón clase 2, aunque este porcentaje no es significativo por la poca cantidad de aislamientos en los que se detectó algún tipo de integrones, este hallazgo es importante por la escasa información en Colombia sobre aislamientos de *A. baumannii* portadores de integrones Clase 2, que también contienen cassettes de resistencia a antibióticos y podrían explicar la resistencia de estos aislamientos a los mismos.

La detección de integrones con los primers *hep35* y *hep36* en 12 aislamientos (23,3%) permitió identificar cinco de ellos en los que posiblemente haya otra clase de integrón diferente a los de la clase 1 y 2, algunos estudios han detectado la presencia de integrones clase 3 en aislamientos de bacterias Gram negativas resistentes a imipenem, podría ser este el caso, pero se necesitarían análisis moleculares más específicos para poder afirmarlo.

Cinco aislamientos que presentaron el determinante de resistencia *CTXM-9*, no se les detectaron integrones, este hallazgo tiene sentido, debido a que este tipo de β -lactamasas se moviliza a través de plásmidos (74).

32 (61,5%) de aislamientos del complejo *ACB* no presentaron integrones, por lo que la multirresistencia a los antibióticos de ellos debe estar relacionada con otros mecanismos de resistencia mediada por plásmidos (107,112) o por disminución de la permeabilidad celular (88,89,93,96) .

Conclusiones

El análisis fenotípico basado en las pruebas de sensibilidad a los antibióticos sigue siendo una herramienta importante para caracterizar las cepas de *A. baumannii*. La presencia de 5 antibiotipos y la agrupación en dos clados de los aislamientos con resistencia a múltiples fármacos demuestra la capacidad de propagación de estos aislamientos, lo que contribuye a la aparición de brotes epidémicos.

La presencia de aislamientos del complejo *ACB* MDR con sensibilidad solo a tigeciclina y sulperazona en los años 2009 y 2010, con un perfil similar a los aislamientos PDR es preocupante, por la capacidad de estas bacterias para adquirir genes de resistencia y con ello ampliar los mecanismos que les permitan hacerse más adaptables al ambiente hospitalario de lo que eran para esos años, por lo que es probable que algunas cepas MDR ya sean en la actualidad bacterias PDR.

La resistencia del 100% de los aislamientos a imipenem y del 96,2% a meropenem por encima de lo reportado en por otros autores en Colombia es preocupante, porque los carbapenemes son en la actualidad los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias del complejo *ACB*, quedando como única opción de tratamiento el uso de tigeciclina y sulperazona (153), aunque en muchas instituciones se ha implementado el uso de colistina, se prevee que bastarán pocos años para que se observe también un incremento en la resistencia a estos antibióticos (151).

Aunque el antibiograma cuantitativo no permite diferenciar las genoespecies del complejo *ACB*, la clasificación de los aislamientos por sus perfiles de susceptibilidad y su identificación en diferentes sitios de muestreo, durante un

periodo de tiempo, siendo una herramienta de uso cotidiano en el ambiente hospitalario, permite hacer inferencias acerca del comportamiento y diseminación de los antibiotipos. En este estudio, los patrones de sensibilidad permitieron identificar como más frecuente el antibiotipo 1, estando presente en todos los sitios de muestreo y durante todo el periodo de estudio. Sin embargo, los métodos moleculares que además permiten conocer los genes de resistencia presentes en los aislamientos y sus posibles mecanismos de transmisión, pueden proporcionar a las instituciones herramientas importantes para tomar medidas y prevenir la diseminación de dichos genes (19).

La identificación de 2 clados basado en el agrupamiento por UPGMA mostró que la mayoría de aislamientos del clado 2 (con más aislamientos) correspondían al antibiotipo 1 (MDR) y al antibiotipo 5, mientras que en el clado 1 se agruparon los aislamientos de los antibiotipos 2, 3 y 4, los 2 primeros aún muestran sensibilidad a varios antibióticos usados en este estudio.

La presencia de los aislamientos del antibiotipo 4 (PDR), considerada estadísticamente significativa ($p < 0,05$), podría generar la diseminación de genes de resistencia entre las bacterias MDR y aumentar el número de bacterias resistentes en el hospital, debido a la capacidad de la genoespecie *A. baumannii* de hacerlo en el ambiente hospitalario, frente a una fuerte presión selectiva relacionada con el uso indiscriminado de antibióticos.

La identificación del 71,4% de aislamientos de la genoespecie *A. baumannii* mediante la comparación de las secuencias del ADNr 16S, confirma que de las genoespecies del complejo *ACB*, es la más frecuentemente encontrada en IAAS y su aislamiento de todos los sitios de muestreo confirma su capacidad para sobrevivir en diferentes ambientes, colonizar e infectar pacientes inmunocomprometidos como es el caso de los de las UCI.

La detección de los genes *bla* (*TEM-1*, *CTXM-9*, *OXA-58*, *IMP-1* y *VIM-2*) podría explicar en parte la resistencia de estos aislamientos a los β -lactámicos, aunque no se puede descartar la presencia de otros mecanismos de resistencia importantes que han sido reportadas en bacterias del complejo *ACB* como disminución de la permeabilidad de las porinas (*CarO*, *OmpW* u *OprD*) (70, 91) ó sobreexpresión de las bombas de eflujo (*AdeABC*, *AdeFGH* y *AdeIJK*) (95,96), pero para poder afirmarlo, sería necesario hacer estudios moleculares que lo comprueben.

Aunque no hubo asociación estadística entre la presencia de integrones y la detección de las β -lactamasas tipo TEM y VIM-2, tal vez por la poca cantidad de aislamientos en los que se detectaron los integrones ($p>0,05$), la presencia de este tipo de determinantes de resistencia en integrones clase 1 ha sido reportada en varios países del mundo y en Colombia, por lo que no debería descartarse que en los aislamientos donde se detectaron tanto integrones como estas β -lactamasas al mismo tiempo, se deba a que estos genes hacen parte de los cassettes de resistencia de integrones clase 1 o clase 2.

La presencia de los genes *blaOXA-58* fue altamente significativa entre los aislamientos ($p>0,05$) y su detección simultánea con el gen *blaOXA-51* en los aislamientos identificados como de la genoespecie *A. baumannii*, podrían estar relacionados con la resistencia a carbapenemes, aunque para afirmarlo se necesitaría confirmar la presencia de la secuencia promotora *ISAbal* que aumenta su expresión (9).

Recomendaciones

La presión selectiva que los antibióticos imponen a las bacterias, las llevan a generar diversos mecanismos de resistencia frente a un mismo antibiótico. Las aproximaciones moleculares que se emplearon en este trabajo de investigación, permitieron identificar las estrategias específicas de resistencia utilizadas para adaptarse a esa presión selectiva por parte de los aislamientos del complejo *A. baumannii-calcoaceticus*; y se hallaron los posibles mecanismos predominantes de resistencia a los antibióticos y diseminación de genes de resistencia, así como los genoespecies del complejo que con mayor prevalencia se encuentran en los ambientes de la clínica y de la región del Valle del Cauca. Sobre esta base se propone a la clínica implementar entre otras cosas:

- La optimización de las medidas de vigilancia para prevenir y disminuir la diseminación de este tipo de bacterias resistentes en el hospital.
- La elaboración programas de adiestramiento a corto y a largo plazo al personal de salud encargado del cuidado y recuperación de los pacientes para fortalecer las capacidades de control y vigilancia epidemiológica y del laboratorio.
- El desarrollo e implementación de protocolos que permitan el mejoramiento de la calidad en el diagnóstico y determinación de agentes patógenos resistentes prevalentes en el hospital, tratamientos acertivos y manejo de la diseminación intra e interhospitalaria. Además es importante mantener una constante comunicación con instituciones de referencia de la región y el país que permitan tener un panorama de la situación de la resistencia a nivel nacional.
- La capacidad de estas bacterias para adquirir genes de resistencia y la presión selectiva a la que han sido sometidas en la clínica, hace pensar que

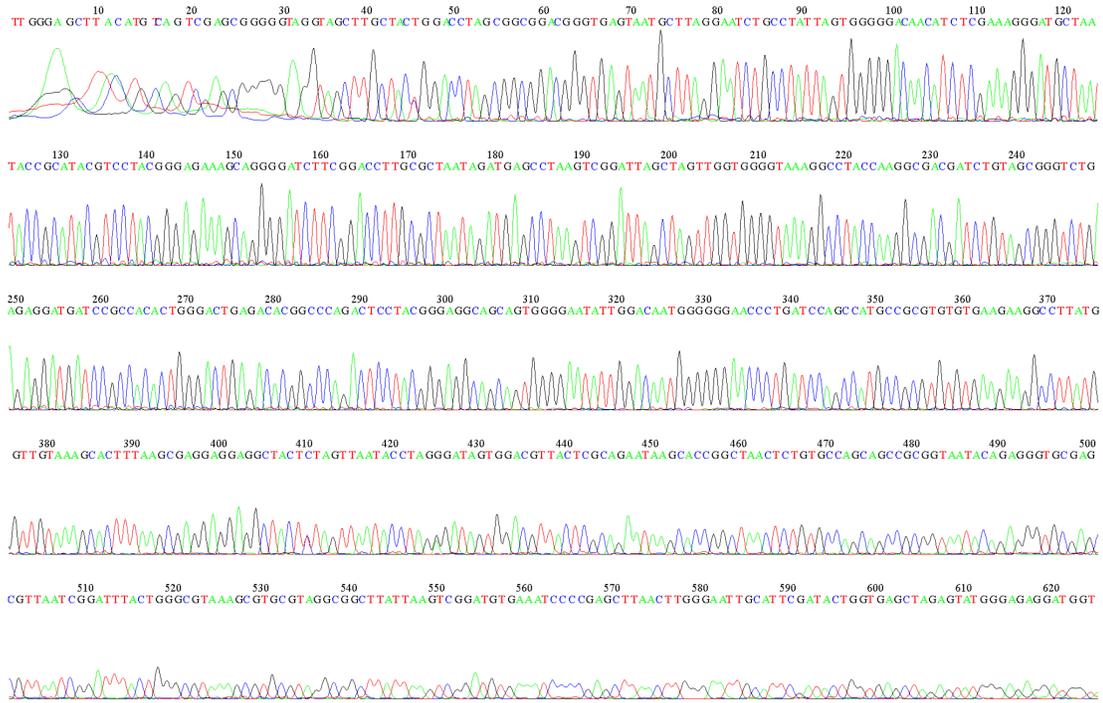
los aislamientos MDR sensibles solo a TIG y SUL, en la actualidad se hayan convertido en PDR, por lo que sería importante hacer nuevos estudios con aislamientos recientes, que permitan conocer los mecanismos actuales con los que se está defendiendo de los antibióticos.

Son necesarios posteriores estudios moleculares que permitan dilucidar la verdadera relación entre los determinantes de resistencia hallados en este estudio y la resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas en el hospital, así como con los integrones en los que se encuentran dichos genes.

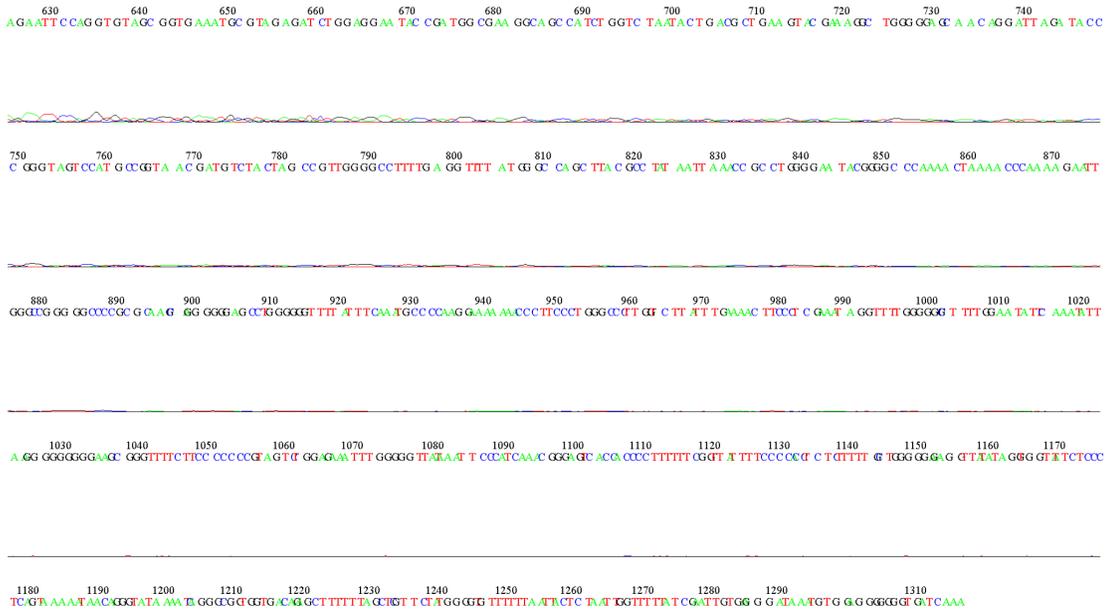
ANEXOS

Anexo 1: Secuencia parcial del gen del ARNr 16S de uno de los aislamientos que agrupó con la secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa *Acinetibacter baumannii* GenBank: JN669235

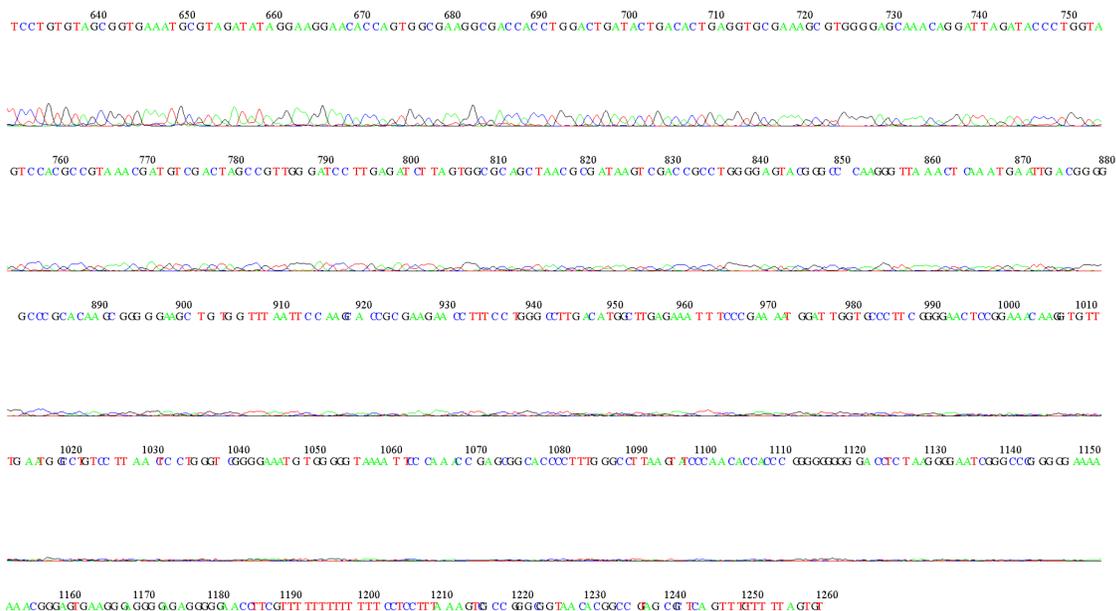
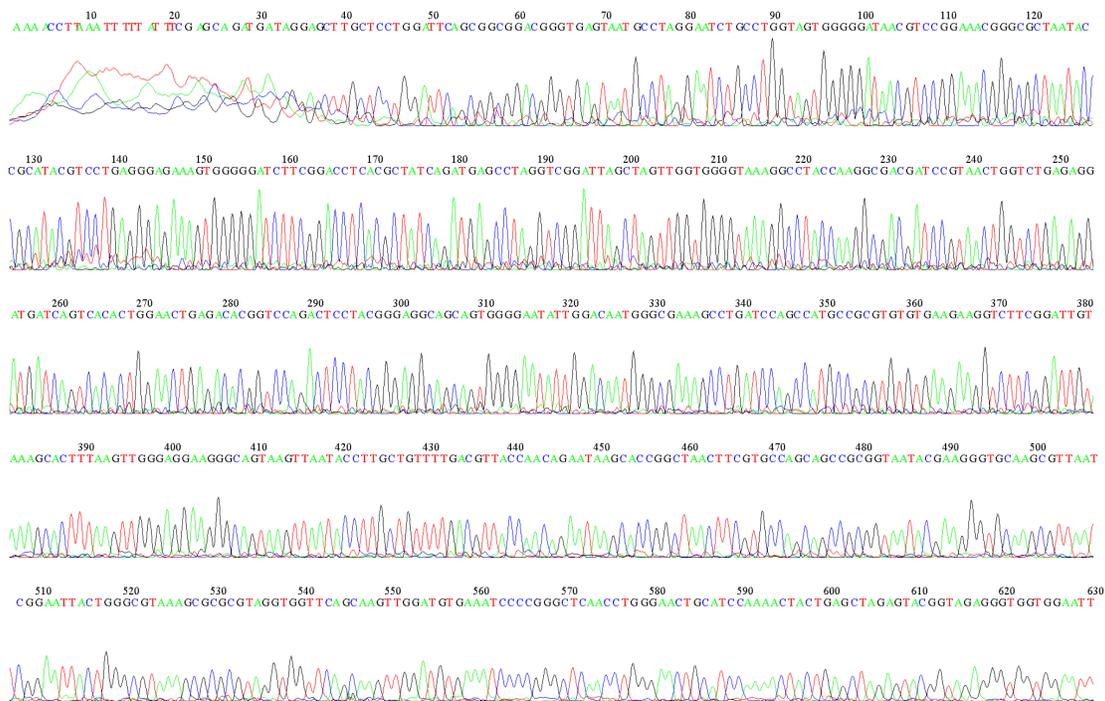
File: 25_ROM_ACF.ab1 Run Ended: 2014/5/27 1:2:22 Signal G:788 A:866 C:779 T:599
Sample: 25_ROM_ACF Lane: 81 Base spacing: 16.226368 1317 bases in 14808 scans Page 1 of 2



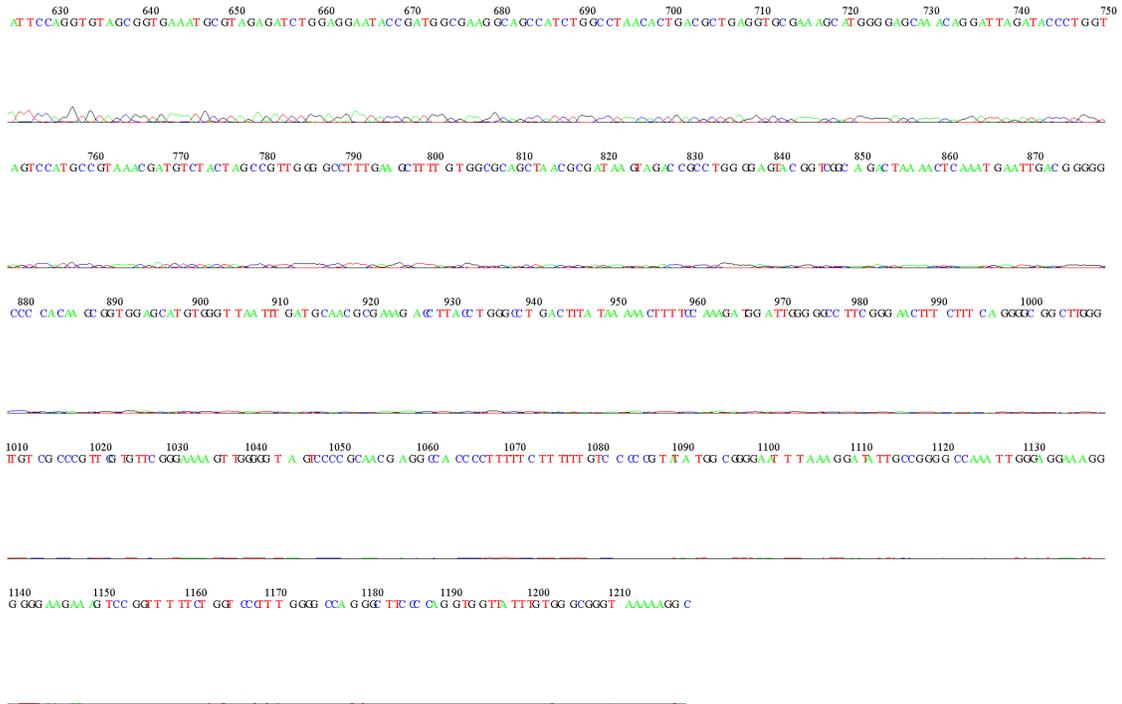
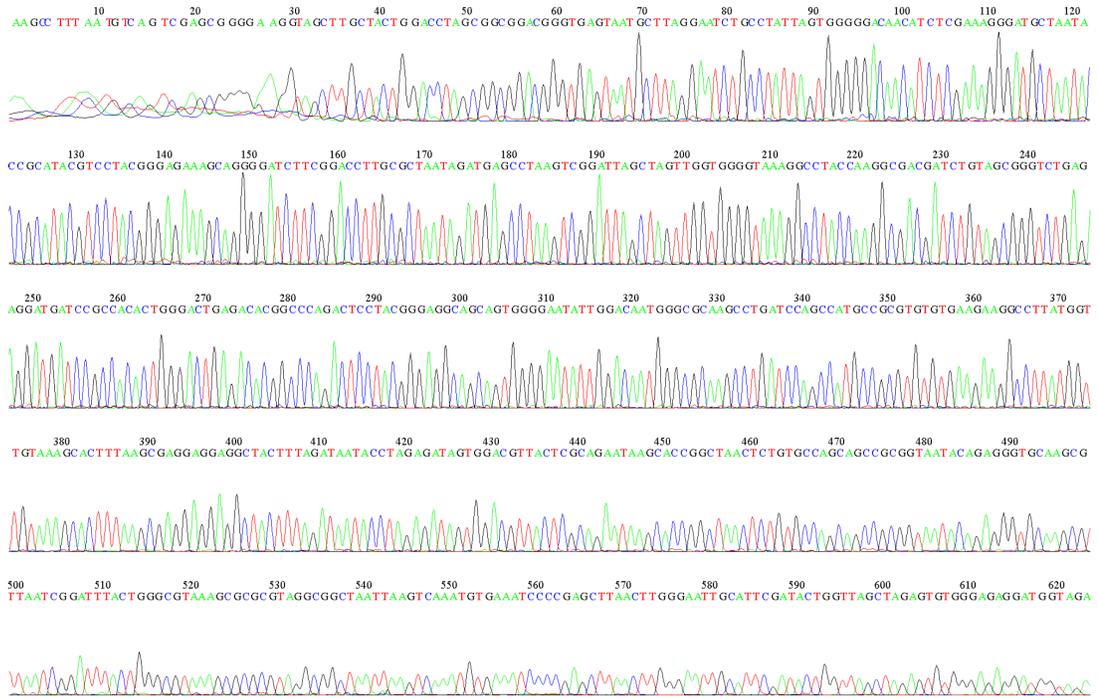
File: 25_ROM_ACF.ab1 Run Ended: 2014/5/27 1:2:22 Signal G:788 A:866 C:779 T:599
Sample: 25_ROM_ACF Lane: 81 Base spacing: 16.226368 1317 bases in 14808 scans Page 2 of 2



Anexo 2: Secuencia parcial del gen del ARNr 16S de uno de los aislamientos que agrupó con la secuencia del gen del ARNr 16S cepa *A. calcoaceticus* GenBank: X81661.1



Anexo 3: Secuencia parcial del gen del ARNr 16S de uno de los aislamientos que agrupó con la secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa genoespecie *Acinetobacter 13TU* GenBank: Z93446.1



Anexo 4: Artículo publicado en la Revista Biomédica en Febrero de 2014. “Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali”. Disponible en: PubMed.gov. Biomédica 2014;34(Supl.1):101-7.

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali

Alfredo Prado¹, Nhora L. Arias¹, Mónica Chávez^{1,2}, Cristina E. Cabrera^{1,3}, Romel F. Gómez¹

¹ Grupo de Investigación en Microbiología Molecular y Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre-Seccional Cali, Cali, Colombia

² Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia

³ Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

El trabajo de laboratorio se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación en Microbiología Molecular y Enfermedades Infecciosas de la Universidad Libre, Cali, Colombia.

Introducción. La caracterización fenotípica de las bacterias del género *Acinetobacter* mediante pruebas bioquímicas y microscópicas es posible. Varios estudios han demostrado que los aislamientos provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud presentan una elevada resistencia a los antibióticos de primera elección.

Objetivo. Describir los patrones de resistencia de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en una institución de salud, así como sus características fenotípicas y los posibles mecanismos de resistencia.

Materiales y métodos. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con 28 informes de muestras tomadas a pacientes hospitalizados con infección por *A. baumannii*. Las pruebas de sensibilidad para ceftazidime, cefepime, meropenem, amikacina y ciprofloxacina se realizaron con el sistema automatizado Vitek® y la clasificación de sensible, intermedia y resistente se hizo con base en el protocolo establecido por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* para el año 2007.

Resultados. El mayor porcentaje de aislamientos correspondió al sexo masculino (53,6 %), a la sala de infectología (28,5 %) y al mes de septiembre (21,4 %); el tipo de muestra más frecuente fue el de secreción endotraqueal (53,6 %). A partir de los patrones de los perfiles de sensibilidad a los antibióticos empleados se obtuvieron 13 filitipos.

Conclusión. *Acinetobacter baumannii* es un agente patógeno resistente a múltiples antimicrobianos, involucrado en brotes de infecciones asociadas a la atención en salud. Los patrones de los perfiles de resistencia permiten inferir que los posibles mecanismos de resistencia presentes en la mayoría de los aislamientos son la producción de betalactamasas de espectro extendido, las enzimas modificadoras del antibiótico y la modificación del sitio diana.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, farmacorresistencia microbiana, infección hospitalaria, pruebas de sensibilidad microbiana.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1666>

Phenotypic characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates in a high-complexity healthcare institution in the city of Cali

Introduction: Phenotypic characterization of the *Acinetobacter* genus bacteria through biochemical and microscopic tests is possible. Studies have shown that the isolates from health-care associated infections show high resistance to first-line antibiotics.

Objective: To describe the resistance patterns of the *A. baumannii* isolates obtained in a health care institution, the phenotypic characteristics of the isolates, and the possible resistance mechanisms.

Materials and methods: A descriptive cross-sectional study was conducted with 28 reports of samples taken from patients hospitalized with infection by *A. baumannii*. Susceptibility testing for ceftazidime, cefepime, meropenem, amikacin, and ciprofloxacin was performed with the Vitek™ automated system and the susceptible, intermediate, and resistant classification was based on the protocol established by the Clinical and Laboratory Standards Institute for 2007.

Results: The highest percentage of isolates corresponded to males (53.6 %), to the infectology ward

Contribución de los autores:

Romel Gómez: diseño del estudio.

Alfredo Prado, Mónica Chávez, Nhora Arias, Cristina E. Cabrera y Romel Gómez: análisis de los datos.

Todos los autores participaron en la elaboración del manuscrito.

Anexo 5: Artículo publicado en la Revista Enfermedades infecciosas y Microbiología en Enero de 2013. “Bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones nosocomiales en un hospital de Colombia” Disponible en: <http://www.imbiomed.com.mx/>. Enf Inf Microbiol 2013; 33(1) : 19-25

Bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones nosocomiales de un hospital en Colombia

Chávez Mónica*
Salazar Martha Cecilia**
Cabrerá Cristina E***
Gómez Romel F****
Pallares Christian J*****

Bacteria resistant to antibiotics in isolates of nosocomial infection in a hospital in Colombia

Fecha de aceptación: agosto 2012

Resumen

OBJETIVO. Identificar las bacterias entéricas Gram negativas con resistencia a los antibióticos, aisladas de infecciones asociadas a la atención de la salud en un hospital de mediana complejidad de la ciudad de Cali.

MATERIAL Y MÉTODO. Los datos del antibiograma se obtuvieron de 1,899 aislamientos de bacterias entéricas Gram negativas, de la familia *Enterobacteriaceae*, y no fermentadoras de lactosa durante el periodo 2007-2008.

RESULTADOS. Los aislados más frecuentes fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, con resistencia variable a β -lactámicos con excepción a los carbapenémicos. De los no fermentadores, *Pseudomonas aeruginosa* presentó resistencia simultánea a β -lactámicos (incluido imipenem), aminoglucósidos, quinolonas y susceptibilidad a meropenem.

La resistencia simultánea a cefoxitina, cefalosporinas de tercera generación, inhibidores de β -lactamasa, y sensibilidad a cefepime en aislados de *P. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *K. pneumoniae* probablemente se deba a β -lactamasa tipo AmpC.

La resistencia simultánea a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aztreonam y a los inhibidores de β -lactamasas en los aislados de *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *C. freundii*, *Morganella morganii* y *K. pneumoniae*, nos sugiere una resistencia mediada por BLEE.

CONCLUSIONES. El alto número de aislados con resistencia a aminoglucósidos, inhibidores del ADN y β -lactámicos está relacionado con el uso indiscriminado de estos antibióticos dentro del hospital. De la interpretación del antibiograma se pueden inferir los mecanismos de resistencia subyacentes, lo cual permite orientar el tratamiento antibiótico adecuado.

Palabras clave: bacterias entéricas, Gram negativas, resistencia, antibióticos, epidemiología.

Abstract

OBJECTIVE. To identify Gram-negative bacteria with resistance to antibiotics isolated from infections associated to health care in a tertiary hospital in the city of Cali, which can be inferred to the predominant resistance mechanism.

MATERIALS AND METHOD. Susceptibility data was obtained from 1,899 isolates of enteric Gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae family and non-fermenting lactose bacteria, during 2007-2008.

RESULTS. The most frequent isolates were *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* with variable resistance to β -lactams except carbapenems. *Ps. aeruginosa* showed simultaneous resistance to β -lactams (including imipenem) and aminoglycosides, but susceptibility to quinolones and meropenem.

Simultaneous resistance to cefoxitin, third generation cephalosporins, β -lactamase inhibitors and susceptibility to cefepime observed in isolates of *P. mirabilis*, *E. aerogenes*, *C. freundii* and *K. pneumoniae* is probably due to production of β -lactamase Amp C. Resistance to cephalosporins of third and fourth generation, aztreonam and β -lactamase inhibitors in isolates of *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morganii* and *K. pneumoniae*, suggests ESBL-mediated resistance.

CONCLUSIONS. The high resistance to aminoglycosides, inhibitors of DNA, and production of β -lactamases may be related to the indiscriminate use of these antibiotics in the hospital.

The interpretation of susceptibility can be inferred to underlying resistance mechanisms, allowing not only to guide the antibiotic treatment, but helping predict which antibiotics could not be appropriate, taking into account the most likely underlying mechanism.

Keywords: Enterobacteria, Gram-negative, resistance, β -lactam antibiotics, epidemiology.

*Profesor Asociado, Laboratorio de Microbiología Molecular. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre seccional Cali. Grupo de Investigación GIMMEIN. Profesor titular, Universidad Santiago de Cali.

**Profesor Asociado, Facultad de Salud, Área de Ciencias Básicas, Universidad Libre Seccional Cali. Grupo de Investigación GIMMEIN. Profesor Asociado Facultad de Salud, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle.

***Profesor auxiliar Facultad de Salud, Área de Ciencias Básicas,

Universidad Libre seccional Cali. Grupo de Investigación GIMMEIN.

****Investigador asociado. Director del Comité de Enfermedades Infecciosas del Hospital Departamental Evaristo García.

*****Investigador asociado. Bacterióloga Clínica Rafael Uribe Uribe.

Correspondencia: Dra. Mónica Chávez

Carrera 47 A número 10-65, Barrio Departamental, Cali, Colombia.

Teléfono: (57) 2 55 36 875

Correo electrónico: monikchavez@gmail.com

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

I Congreso Internacional de Ciencias Biomédicas. Agosto 23 de 2013.

Trabajo presentado: "Patrones de Resistencia a los antibióticos de Aislados de *A. baumannii* de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud de una Unidad de Cuidados Intensivos de un Hospital de la Ciudad de Cali, Colombia".

Modalidad: Ponencia.

II Encuentro Departamental de Semilleros de Investigación RREDSI. Universidad del Valle sede Tuluá. Mayo 17 de 2013.

Trabajo presentado: "Caracterización fenotípica de Iso aislados de *Acinetobacter baumannii* periodo Enero-noviembre de 2011 en una institución de alta complejidad de la ciudad de Cali".

Modalidad Ponencia. Participación en calidad de tutor del estudiante de enfermería Alfredo Prado Diaz, quien obtuvo el primero puesto en el área de la salud y el deporte.

XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Octubre de 2012.

Trabajo presentado: "Caracterización Fenotípica de Aislados de *Acinetobacter baumannii* obtenido de infecciones nosocomiales de un hospital de alta complejidad".

Modalidad: Ponencia.

Memorias: Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. p.77 -90 , v.23.

Tercer Congreso Colombiano de Microbiología. Abril 30 de 2012.

Trabajo presentado: Susceptibilidad de las bacterias entéricas Gram negativas aisladas de infecciones asociadas al cuidado de la salud en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Cali, durante los años 2007-2008.

Modalidad: Ponencia.

Memorias en revista: Hechos Microbiológicos, p.71- 71 , v.2 <, fasc.2

Departamento de microbiología y parasitología Universidad de Antioquia.

Bibliografía

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:538-82.
2. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007; 5:939-51.
3. Fluit A, Schimitz F, Verhoef J and the European SENTRY Participants Group. Frequency of isolation of pathogens from blood-stream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. Eur J Clin Infect Dis. 2001; 20:188-91.
4. Montero, JC, Ortiz, E, Fernández, T, Cayuela, A, Marque, J, García A, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med. 2005; 31:649–55.
5. Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avilal I, Culebras E, Gómez M, López F. Antimicrobial resistance surveillance: VIRA Study 2006. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006; 24(10):617-28.
6. OPS/HDM/CD/A/541/09 Informe Anual de la Red de Monitoreo de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. 2009. Lima Perú. Diciembre 3 y 4 del 2009.
7. Wilson, SJ, Knipe CJ., Zieger MJ., Gabehart KM., Goodman JE., Volk HM., et al. Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. Am. J. Infect. Control 2004; 32:342–44.
8. Lemos EV, De la Hoz Restrepo F, Alvis N, Quevedo E, Cañon O, León Y. Mortalidad por *Acinetobacter baumannii* en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(4): 287–94.

9. Martínez P, Mattar S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the IsaBA1-BlaOXA-23, 51 and IsaB1-BlaaDC-7 genes in Monteria, Colombia. Braz J Microbiol. 2012;1274-80.
10. Pinzón JO, Mantilla JR, Valenzuela EM, Fernández F, Álvarez CA, Osorio E. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolations from a burns unit in a third level attention hospital in Bogotá. Infectio. 2006; 10:71-8.
11. Chávez M, Salazar M, Cabrera C, Gómez R, Pallares C. Bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones nosocomiales de un hospital en Colombia. Enf Inf Microbiol. 2012; 33(4):19-25.
12. Villegas MV, Hartstein AI. Acinetobacter outbreaks, 1977–2000. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24:284–95.
13. Orquídea J, Mantilla JR,, Valenzuela EM,, Fernández F,, Álvarez CA,, Osorio EJ. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. Infectio. 2006; 10(2): 71-8.
14. Saavedra, SY, Nuñez JC Pulido IY, González EB, Valenzuela EM, Reguero MT, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*– *A. baumannii* complex isolates in a third-level hospital in Bogotá, Colombia. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008; 31:389-91.
15. Hernández MA, Valenzuela EM, Pulido IY, Reguero MT, Restrepo S, Gualteros S, et al. The genomic identification of Colombian *Acinetobacter baumannii* clinical isolates by RFLP-PCR analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. Rev. Colomb. Biotecnol. 2011; 13:110–14.
16. Villegas M, Kattan N, Correa A, Lolans K, Guzman A, Woodford N, Livermore D, Quinn J, and the Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 2001-4.

17. Labarca LJ. Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev Chilena Infectol.* 2002; 19 (Supl. 2): S 157-60.
18. Bearson BL, Labarca JA, Brankovic LE, Cohen M, Bruckner DA, Pegues DA. Use of quantitative antibiogram analysis to determine the clonality of coagulase-negative *Staphylococcus* species from blood culture. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(2):148–55.
19. Labarca J. Antibiotipo Utilization As An Epidemiological Marker In Nosocomial Infections: Comparison With Molecular Epidemiology. *Rev Chil Infect.* 2002; 19 (Supl. 2): S 157-60.
20. Vila J, Marcos MA., Jiménez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* 1996;44: 482-9
21. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 233–8.
22. Pérez F, Hujer AM, Hujer K, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of Multidrug Resistant *Acinetobacter*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2007;51:3471-84.
23. Ruiz J, Navia MM, Casals C, Sierra JM, Jiménez de Anta MT, Vila J. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:907–11.
24. Gombac F, Riccio ML, Rossolini GM, Lagatolla C, Tonin E, Monti-Bragadin C, et al. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2002;46:3665–8.
25. Spence RP, Van der Reijden TJK, Dijkshoorn L, Towner KJ. Comparison of *Acinetobacter baumannii* Isolates from United Kingdom Hospitals with Predominant Northern European Genotypes by Amplified-Fragment Length

- Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:832–4.
26. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, et al. Citywide clonal outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. The preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med.* 2002;162:1515–20.
 27. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, et al. Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Ant Agents Chem.* 2008;52:3837–43.
 28. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles county, California. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2499-2507.
 29. Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, et al. Metallobeta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas spp.* and increase of IMP-producing *Acinetobacter spp.* *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50:51–8.
 30. Liu SY, Lin JY, Chu C, Su LH, Lin TY, Chiu CH. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:81–4.
 31. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, et al. Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratorybased surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5256–63.
 32. Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex* in a Chinese hospital. *J Med Microbiol.* 2004;53:653–6.
 33. Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French

- Polynesia. J Clin Microbiol. 2005;43:4826–9.
34. Ramírez MS, Bello H, González Rocha G, Márquez C, Centrón D. Tn7::In2-8 dispersion in multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Chile. Rev. Argent. Microbiol. 2010; 42, 138–40
 35. Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Infect Dis. 2004;8:284–91.
 36. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. Drug Resist Updates. 1998;1:109–19.
 37. Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Beceiro A, et al. Type 1 Integrons in Epidemiologically Unrelated *Acinetobacter baumannii* Isolates Ant Agents Chem. 2004;48:364–5.
 38. Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, Van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii*; clones. J Med Microbiol. 2004;53:1233–40.
 39. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis. 2007;45:88–94.
 40. Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, et al. Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* aislados en hospitales españoles. Estudio multicéntrico nacional: proyecto GEIH-Ab 2000. Enf Infect Microbiol Clin. 2004;22:267-71.
 41. Marais E, de Jong G, Ferraz V, Maloba B, Duse AG. Interhospital transfer of pan-resistant *Acinetobacter* strains in Johannesburg, South Africa. Am J Infect Control. 2004;32:278-81.
 42. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, NY: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. Clin

- Infect Dis. 2000;31:101–6.
43. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis.* 2001;32(2):S104–13.
 44. Sader HS, Mendes CF, Pignatari C, Pfaller MA. Use of macrorestriction analysis to demonstrate interhospital spread of *multiresistant Acinetobacter baumannii* in Sao Paulo, Brazil. *Clin Infect Dis.* 1996;23:631–4.
 45. Quelle LS, Catalano M. Efficacy of two DNA fingerprinting methods for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;39:215-23.
 46. Coelho J, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, et al. Occurrence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clones at Multiple Hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3623–7
 47. Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4086–95.
 48. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, Van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal Gene Transfer in a Polyclonal Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:453–60.
 49. Zhou H, Yang Q, Yu YS, Wei ZQ, Li LJ. Clonal Spread of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* among Different Cities of China. *J Clin Microbiol.* 2007;45:4054–7.
 50. Çiçek AÇ, Düzgün AÖ, Saral A, et al. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013;3(9):743-7.
 51. Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos, Maniatis AN, Sofianou D. Spread

- of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek. J Antimicrob Chemother. 2003;52:1046-7.
52. Van Dessel H, Dijkshoorn L, Van der Reijden T, Bakker N, Van den Broek J, Verhoef, Bricse S. Identification geographically widespread multiresistant *Acinetobacter* from European hospitals. Res Microbiol. 2004;155:105–12.
53. Bricse S, Milatovic D, Fluit AC, Kusters K, Toelstra A, Verhoef J, Schmitz FJ. Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Using automated ribotyping. J Clin Microbiol. 2000;38:3636–45.
54. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin Infect Dis. 2007;44:1577–84.
55. Abdel-El-Haleem D. *Acinetobacter*: Environmental and biotechnological applications. Afr J Biotechnol. 2003;2:71–4.
56. Limansky, AS, Zamboni MI., Guardati MC., Rossignol G, Campos E, Viale A. M. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. Medicina (Buenos Aires). 2004;64:306-12.
57. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, De Vos P, Claeys G, & et al.. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33 : 11-5.
58. Ibrahim A, Gerner-Smidt, P, Liesak W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol. 1997;47:837-41.
59. Gerner-Smidt, P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:277–82.
60. Gerner-Smidt P, Frederiksen W. *Acinetobacter* in Denmark. I. Taxonomy, antibiotic susceptibility, and pathogenicity of 112 clinical strains. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1993;101:815–25.
61. Koeleman J, Stoof J, Biesmans D, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C.

- Comparison of Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Identification of *Acinetobacter* Genomic Species and Typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 1998; 36(9): 2522-9.
62. Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. Emerg Infect Dis. 2011; 17(6):1064-7.
63. Biendo M, Laurans G, Lefebvre JF, Daoudi F, Eb, F. - Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using a combination of antibiotyping and ribotyping. J. Clin. Microbiol., 1999; 37: 2170-5.
64. Ben Othman A, Zribi M, Masmoudi A, Abdellatif S, Ben Lakhal S, Fendri C. Multiresistance and endemic status of *Acinetobacter baumannii* associated with nosocomial infections in a tunisian hospital: a critical situation in the intensive care units. Braz J Microbiol. 2011; 42:415-22.
65. Limansky, A. S., M. I. Zamboni, M. C. Guardati, G. Rossignol, E. Campos, and A. M. Viale. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. Medicina (Buenos Aires). 2004; 64:306-12.
66. Turner P. Extended-spectrum- β -lactamases. Clin Infect Dis 2005;15 (4):273-5
67. Thomson KS, Smith ME. The New β -lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. Microbes infect . 2000; 2: 1225-35.
68. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Indian J. Med. Res. 2011; 133, 332–8.
69. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. 2008; 6: 893–903.
70. Mussi MA, Relling VM, Limansky AS et al. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is

- essential for L-ornithine uptake. *FEBS Lett.* 2007; 581: 5573–8.
71. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3375–80.
72. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:428–432.
73. Naas T, Zerbib D, Girlich M, and Nordmann P. Integration of a transposon Tn1-encoded inhibitor-resistant β -lactamase gene, *bla*TEM-67 from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:19–26.
74. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology.* 2012;3(110):1-19.
75. Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro N, Power P, Ingold E, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Carrying Genes Encoding the PER-2 and TEM-116 Extended-Spectrum Beta-Lactamases Isolated from Children with Diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (6): 2940-3.
76. Da Fonseca LE, Vieira V, Cipriano R, Paulo Vicente A C. Emergence of *bla*-GES-5 in clinical-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 576-7.
77. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 11(44):3061.
78. Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, et al. Detection of CTX-M type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:4556–61.
79. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;

46: 602–4.

80. Bello H, Trabal N, Ibáñez D, Reyes A, Domínguez M, Mella S et al. β -lactamasas de familias diferentes a TEM y SHV en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos. Rev Méd Chile. 2005; 133: 737-9.
81. Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, et al. Metallobeta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;50:51–8.
82. Walsh, TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones, RN. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 52:116–9.
83. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H. Rodriguez-Valera F. (Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005; 43, 4382-90.
84. Leski TA, Bangura U, Jimmy DH, Ansumana R, Lizewski SE, Li RW, et al. Identification of blaOXA-51-like, blaOXA-58, blaDIM-1, and blaVIM Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra Leone. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2435-8.
85. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002; 8(6): 321-31.
86. Suárez C, Kattán J, Guzmán A, Villegas M. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. Infectio. 2006; 10: 85-93
87. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. 2008; 6: 893–903.
88. Vila J, Martí S, Sanchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug

- resistance in *Acinetobacter Baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 2007; 59, 1210–15.
89. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T.. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(9): 3298–3304.
90. Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, Viale AM. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. FEBS Lett. 2007; 581 (29): 5573–8.
91. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67: 593–656.
92. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 3375–80.
93. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochem Cytobiol. 2008; 46 (3): 257-67.
94. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pastel Caron M, Cozzone AJ, et al. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4876–83
95. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon, B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2010b; 54, 4389–93.
96. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. A del JK. a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (2): 557-62.

97. Spratt BG. The 2011 Garrod Lecture: From penicillin-binding proteins to molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(7):1578-88.
98. Vila J, Marco F. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(10):726-36.
99. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Microbiology*. 2001; 98:652-7.
100. Hall RM, Collins CM. Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*. 1995; 15: 593-600.
101. Montserrat Sabaté y Guillem Prats. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 7 (20):341-5.
102. Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiology*. 2000;146: 2855-64.
103. Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KM, et al. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 195:59-65.
104. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2684-8.
105. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*. 2012; 2(5): 211–223.
106. Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol*. 1994;176: 6286-94.
107. Tietze E, Brevet J, Tschape H. Relationships among the streptothricin resistance transposons Tn1825 and Tn1826 and the trimethoprim resistance transposon Tn7. *Plasmid*. 1987;18:246-9.

108. Young HK, Qumsieh MJ, McIntosh ML. Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. *J Antimicrob Chemother.* 1994;34:715-25.
109. Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: A new class of mobile element. *Microbiology.* 1995;141:3015-27.
110. Ramírez MS, Stietz MS, Vilacoba E, Jeric P, Limansky AS, Catalano M, et al. Increasing frequency of class 1 and 2 integrons in multidrug-resistant clones of *Acinetobacter baumannii* reveals the need for continuous molecular surveillance. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37: 175-177.
111. Di Conza JA, Gutkind GO. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología.* 2010; 42: 63-78.
112. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53(6):2227-2238.
113. Renata C, Santos A, Nicoletti AG, Furtado GH and Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 796–807.
114. Gangoue PJ, Miriagou M, Vourli S, Tzelepi E, Ngassam P, Tzouvelekis LS. Emergence of CTX-M-15 producing *Enterobacteria* in Cameroon and characterization of a *bla*CTX-M-15-carrying element. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:441-3.
115. Pattarachai K, Apisarnthanarak A, Laesripa C and Saifon P. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Health Care-Associated Infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2818–24.
116. Moland S, Black JA, Hossain A, Hanson ND, Thomson KS, Pottumarthy S. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:2382–3.

117. Mantilla JR, Reguero MT, González EB, García IA, Leal AL, Espinal PA, et al. Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. *Biomédica*. 2006; 26:408-14.
118. Villegas MV, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, et al. CTX-M-12 beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:629-31
119. Szabó D, Szentandrassy J, Juhász Z, Katona K, Nagy K, Rókusz L. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2008; (5) 30:7:12.
120. Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H: PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005, 249(2):241-5.
121. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42:2523–9.
122. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ, Lee JH, Jung HI, Jang SJ, Sung KH, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in an intensive care unit. *The Journal of hospital infection*. 2005; 3 (59): 242-8.
123. Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Rafiq A. The Multi-provincial *Salmonella Typhimurium* Case Control Study Group. Characterization of the First Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Salmonella* Isolate Identified in Canada. *J Clin Microbiol*. 2003; 1 (41): 460–2.
124. Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 3222-4.

125. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G and Perilli M. Spread of *bla*(CTX-M-type) and *bla*(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. 57:975–8.
126. Vignoli R, Varela G, Mota M.I, Cordeiro N, Power P, Ingold E, Gadea P, Sirok A, Schelotto F, Ayala J, Gutkind G. Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Carrying Genes Encoding the PER-2 and TEM-116 Extended-Spectrum Beta-Lactamases Isolated from Children with Diarrhea in Uruguay *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 6 suppl. 43: 2940-3.
127. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera, Suárez CJ, Correa A, Quenana AM, et al and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First Detection of Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006;50(1):226-9.
128. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42(11):5094-5101.
129. Montealegre MC, Correa A, Briceño DF, Rosas NC, De La Cadena, E, Ruiz SJ, et al. The Colombian Nosocomial Resistance Study Group. Novel VIM Metallo- β -Lactamase Variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011;55(5):2428-30.
130. Leonard DA, Bonomo RA, Powers RA. Class D β -lactamases a re-appraisal after five decades. *Accounts of Chemical Research.* 2013;46(11):2407-15.
131. Bush, K. Palzkill T, Jacoby G. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. 2014. Disponible en: <http://www.lahey.org/Studies/>

132. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement. 2013; M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA.
133. Blanc DS, Petignat C, Moreillon P, Wenger A, Bille J, Francioli P. Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: comparison with molecular typing. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 17 (10): 654-69.
134. Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*. 2006; 28(1):55–9.
135. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni, A., de Vos, P., Claeys, G., Verschraegen, G.. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33(1):11-5.
136. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim SO, Hjelmevoll SO, Littauer P, Dahl KH. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS*. 2004; 112: 815–37.
137. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 440–58.
138. Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacter* Isolates in a Spanish Hospital during a 12-Year Period. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(4):1237-43.
139. Chuang YC, Chang SC, Wang WK. High and Increasing Oxa-51 DNA Load Predict Mortality in *Acinetobacter baumannii* Bacteremia: Implication for Pathogenesis and Evaluation of Therapy. Horsburgh MJ, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e14133.
140. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *bla*_{OXA-51-like} Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(8):2974-76.

141. Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke Grauls CM, Savelkoul PH. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J. Clin. Microbiol. 2001;39:8–13.
142. Gu B, Tong M, Zhao W, et al. Prevalence and Characterization of Class I Integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients in Nanjing, China . Journal of Clinical Microbiology 2007;45(1):241-243.
143. Kimura MA. simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 1980;16:111-20.
144. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. 2011; 28: 2731-39.
145. Misbah S, Hassan H, Yusof MY, Hanifah YA, AbuBakar S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Med J. 2005; 46(9): 461-4.
146. Ministerio de Salud República de Colombia. Resolución 8430 de 1993.
147. Biblioteca Sede OPS - Catalogación en la fuente Organización Panamericana de la Salud Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. Washington, D.C.: OPS, ©2002. ISBN 92 75 32416 6.
148. Declaracion de Helsinki de la Asociacion Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por las Asambleas Médicas Mundiales de 1964, 1975, 1983, 1989, 1996, 2000, 2002, 2004 y 2008.
149. Álvarez C, Cortés J. Resistencia antimicrobiana en unidades de cuidado intensivo de Bogotá, Colombia, 2001-2003. Rev Salud Pública. 2006; 8 (1):86-101.

150. Prata-Rocha ML, Gontijo-Filho PP, Batista de Melo G. Factors influencing survival in patients with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infection. Braz J Infect Dis. 2012; 16(3):237-41.
151. Song JY, Kee SY, Hwang IS. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007; 60: 317–22.
152. Falagas ME, Kolets PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (Multirresistencia A Fármacos) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2006; 55:1619 –29.
153. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. J Antimicrob Chemother. 2008; 62(1):45-55.
154. Silva J, Avello C, Matamoro F, Villagra L, Rojas V, Sandoval L. Antimicrobial resistance of different *Acinetobacter baumannii* biotypes isolated in the northern region of Chile. Rev Med Chil. 1999;127(8):926-34.
155. Limansky AS, Zamboni MI, Guardati MC, Rossignol G, Campos E, Viale AM. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. Medicina (Buenos Aires) 2004; 64:306-12.
156. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50: 1442–48.
157. Ramírez G César, Pino I Carolina, González R Gerardo, Bello T Helia, Domínguez Y Mariana, Mella M Sergio et al . Presencia de integrones y su relación con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. Rev. méd. Chile 2000; 128(8): 863-967.

158. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Oshuka S Et Al.
PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in Gram-negative rods
resistant to broad-spectrum β -lactams. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2909-13.