

CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Acinetobacter baumannii* PROVENIENTES DE PACIENTES CON INFECCIONES NOSOCOMIALES Y DISPOSITIVOS TIPO CATÉTER EN VENEZUELA

Ruth Rojas*

<https://orcid.org/0000-0002-2619-4021>

Aura Falco**

<https://orcid.org/0000-0002-8653-4868>

Carlos Aranaga***

<https://orcid.org/0000-0003-1806-657X>

Guillermina Alonso****

<https://orcid.org/0000-0002-1664-7728>

* Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Miranda, Venezuela
✉ ruth-ars@hotmail.com

** Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ aura.falco00@usc.edu.co

*** Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ carlos.aranaga00@usc.edu.co

**** Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
✉ guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

Para citar este capítulo:

Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C. y Alonso, G. Identificación y genotipificación de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales y dispositivos tipo catéter en Venezuela. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2020). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas*. (pp. 35-62). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

Resumen. *Acinetobacter baumannii* es uno de los principales patógenos oportunistas, resistente a múltiples antibióticos, causante de infecciones nosocomiales a nivel mundial. Puede provocar septicemias y neumonías asociadas al uso de dispositivos invasivos como catéteres y ventiladores. La diseminación de esta bacteria, que además es intrínsecamente resistente a varios grupos de antimicrobianos, plantea importantes desafíos en el tratamiento de infecciones asociadas a la atención en salud. *A. baumannii* posee el gen *bla*_{OXA-51-like}, que codifica para una oxacilinas, capaz de hidrolizar penicilinas y carbapenémicos, que le confiere un bajo nivel de resistencia intrínseca a estos antibióticos. En Venezuela son pocos los reportes relacionados con infecciones nosocomiales causadas por estas bacterias, siendo este el motivo por el cual se planteó identificar y genotipificar aislados de *A. baumannii* provenientes de dispositivos invasivos tipo catéter y su comparación con otros aislados nosocomiales de la misma especie, provenientes de diversos centros de salud de Caracas. Para ello se realizaron pruebas bioquímicas y moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias específicas (rep-PCR) que permitieron establecer relaciones genéticas entre aislados; y su identificación hasta el nivel de especie empleando iniciadores específicos para amplificar el gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr y el gen *bla*_{OXA-51-like}. Los resultados indican que se identificaron los aislados evaluados y se estableció la filogenia entre ellos, lo cual pone en evidencia la importancia que tienen los estudios epidemiológicos para apoyar sistemas de vigilancia, permitiendo el establecimiento de medidas adecuadas de prevención en la diseminación de estos patógenos de importancia clínica.

Palabras claves: *Acinetobacter baumannii*, *bla*_{OXA-51-like}, genotipificación, resistencia, antibióticos.

Abstract. *Acinetobacter baumannii* is now recognised as causing a broad range of severe nosocomial infections, including ventilator-associated pneumonia as well as bloodstream infections in critically ill patients. Its resistant to several antimicrobial groups, poses significant challenges in the treatment of health care associated infections. The *bla*_{OXA-51-like} gene encodes for an oxacillinase, which confers low levels of intrinsic resistance to penicillin and carbapenems. In Venezuela there are few reports related to nosocomial infections caused by these bacteria, for that we proposed to identify and genotype *A. baumannii* isolates from the invasive catheter-type devices and their compare these with other nosocomial isolates of the same species, from some health centers in Caracas. For this, biochemical and molecular tests such as the polymerase chain reaction to amplify specific sequences (rep-PCR) were performed to establish genetic relationships between isolates; and its identification at specie level using specific primers to amplify the gene responsible for encoding the 16S subunit of the rRNA and the *bla*_{OXA-51-like}. The results indicate that the isolates were identified as *A. baumannii* and the phylogeny between them was established. This demonstrates the importance of epidemiological studies to generate surveillance systems in health centers related to nosocomial infections associated with the use of catheters. These surveillance systems would provide basic information to develop control measures to prevent the spread of these pathogens on these environments.

1. Introducción

Las bacterias son microorganismos capaces de causar infecciones nosocomiales en el 9% de los pacientes hospitalizados que se encuentran ubicados en áreas de alta densidad poblacional como: Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), salas neonatales, salas de medicina, cirugía y pediatría (Padgett et al., 2013; Chíncha et al., 2013). Este tipo de infecciones

son consideradas como un problema clínico y de salud pública a nivel mundial debido a los altos costos de hospitalización y a la mortalidad, especialmente cuando está asociada a bacterias que son capaces de colonizar dispositivos médicos como catéteres y ventiladores, formando una matriz biológica que puede interferir con la administración de los tratamientos (Ojeda y Megías, 2000; Buffet et al., 2012).

Una de las especies que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas humanas es *Acinetobacter baumannii*, que forma parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* con: *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* y la especie ambiental *Acinetobacter calcoaceticus* (Falah et al., 2019; Rolain et al., 2016; Peleg et al., 2008; Bergogne-Berezin y Towner, 1996; Bouvet y Grimont, 1987). Estas bacterias son cocobacilos Gram negativos, aerobios, no fermentadores, catalasa positiva y oxidasa negativa e inmóviles (Hernández et al., 2010) que habitan ambientes naturales muy variados como el suelo, el agua y los alimentos; adicionalmente, se encuentran en entornos hospitalarios y en dispositivos médicos como ventiladores mecánicos, catéteres, entre otros (González et al., 2002; Berdinelli y Friedman, 2008; Falah et al., 2019). Más específicamente, *A. baumannii* es capaz de causar bacteriemias, neumonías, meningitis, infección del tracto urinario, entre otras patologías (Peleg et al., 2010; Abdi et al., 2014). En países como Estados Unidos y Canadá, se ha reportado que *A. baumannii* fue el noveno patógeno más común en infecciones hospitalarias del torrente sanguíneo, mientras que en América Latina fue responsable del 5,3% de todos los aislados de bacteriemias nosocomiales, lo cual pone en evidencia la importancia epidemiológica de este patógeno en los recintos hospitalarios (Richards et al., 2000; Gales y col., 2001; Brenner et al., 2004; Lemos et al., 2011).

Adicionalmente, *A. baumannii* se caracteriza por poseer una notable resistencia a antibióticos tanto de forma natural como adquirida

(Chalbaud y Alonso, 2017) que incluye a las fluoroquinolonas y a las cefalosporinas, que son las principales opciones terapéuticas que se usan para tratar infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas (Karaiskos et al., 2019).

Los principales mecanismos de resistencia a antibióticos beta-lactámicos en esta bacteria involucran la producción de beta-lactamasas intrínsecas y/o adquiridas. *A. baumannii* produce una cefalosporinasa cromosómica llamada AmpC, que es capaz de hidrolizar débilmente las cefalosporinas, así como una enzima intrínseca del tipo oxacilinasas, llamada OXA-51, que confiere bajos niveles de resistencia a penicilinas y carbapenémicos. Otros mecanismos de resistencia presentes en esta bacteria incluyen: aumento en la expresión de bombas de eflujo, alteraciones en las porinas que bloquean la entrada de antibióticos y la capacidad de adquirir múltiples genes que confieren resistencia a antibióticos (Du et al., 2019).

Por lo descrito previamente, el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por *A. baumannii* resistentes a múltiples antibióticos se ha convertido en un grave desafío clínico debido a que las opciones terapéuticas disponibles son limitadas. Este panorama puede volverse más complejo si a esto se le suma el hecho de que a nivel mundial hay un incremento en el número de las infecciones intrahospitalarias ocasionadas por *Acinetobacter baumannii* asociadas al uso de catéteres. Estas infecciones pueden estar asociadas con la atención en salud (IAAS), así como la migración de microorganismos cutáneos hacia el sitio de inserción, a la contaminación de las conexiones del catéter, a la contaminación de los fluidos en infusión o la contaminación secundaria por bacteriemias (Du et al., 2019).

Debido a la importancia clínica de *A. baumannii* se han desarrollado varios métodos para identificarla. Para ello, en el laboratorio de diagnóstico clínico se aplican diversas pruebas fenotípicas que incluyen: crecimiento

en agar MacConkey y en agar sangre, tinción de Gram, así como pruebas bioquímicas como: oxidasa, catalasa, oxidación-fermentación de carbohidratos, motilidad, Simmons citrato, Rojo Metilo–Voges Proskauer y crecimiento a 37°C y 44°C (Falah et al., 2019). Sin embargo, estas pruebas no tienen el poder discriminatorio para diferenciar entre las especies del complejo *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* (Rolain et al., 2016). Debido a esta dificultad se han desarrollado diferentes métodos moleculares entre los cuales se encuentra la detección del gen cromosomal *bla*_{OXA-51-like} a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), la cual es una técnica sencilla y rápida (Seng et al., 2010; Rolain et al., 2016).

Por otro lado, para llevar a cabo estudios epidemiológicos no solo es importante conocer la identidad de agente infeccioso, sino también establecer filogénesis entre los aislados de la misma especie (Sevillano y Gallego, 2011; Allen y Hartman, 2016; Rolain et al., 2016). Existen diferentes pruebas genotípicas que permiten estudiar la relación de los aislados de *A. baumannii*. Los resultados que se obtengan pueden proporcionar información sobre la fuente de transmisión (Kang et al., 2003) y facilitar la evaluación de las medidas de control, mediante la determinación de la prevalencia (Vílchez y Alonso, 2009). Algunas de estas pruebas incluyen métodos basados en PCR, entre las que se incluyen: amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR por sus siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase Chain Reaction*), polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP-PCR por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism PCR*), y la amplificación de dos tipos de secuencias cortas, repetidas y distribuidas a lo largo del genoma bacteriano, llamadas rep-PCR (por sus siglas en inglés: *Repetitive Extragenic Palindromic PCR*) y ERIC-PCR (por sus siglas en inglés: *Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus PCR*) (Kang et al., 2003; Vílchez y Alonso, 2009).

En este estudio se realizó la identificación de aislados de *A. baumannii* provenientes de dispositivos invasivos tipo catéter y causantes de infecciones nosocomiales, recolectados en distintos centros de salud ubicados en Caracas, Venezuela. Los aislados fueron identificados fenotípicamente, aplicando pruebas bioquímicas; y genotípicamente, a través de una PCR que permitió detectar el gen *bla*_{OXA-51-like}. Finalmente se realizó la genotipificación de aislados de *A. baumannii* aplicando las técnicas rep-PCR y ERIC-PCR, con el fin de establecer posibles relaciones genéticas entre aislados de distintos centros de salud ubicados en Caracas, esto con el fin de fortalecer el sistema de vigilancia y monitoreo para la prevención de infecciones asociadas a *A. baumannii* en este tipo de dispositivos médicos.

2. Metodología

Aislados bacterianos

Se evaluaron 14 aislados bacterianos provenientes de muestras de pacientes portadores de catéteres, que presentaron un cuadro infeccioso provocado por *A. baumannii* y de pacientes que presentaron algún tipo de infección nosocomial asociada al mismo patógeno (Tabla 3).

Diez de las muestras de *A. baumannii* evaluadas provienen del Hospital Universitario de Caracas (HUC) y fueron aisladas de pacientes con infecciones asociadas al uso de catéteres. También se analizaron cuatro muestras de la misma especie, provenientes de pacientes de distintos centros de salud ubicados en Caracas, que presentaron infecciones nosocomiales durante su permanencia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

Tabla 3. Información clínica de los aislados de *A. baumannii* evaluados.

Identificación aislado	Fecha de la muestra	Hospital	Servicio	Sexo del paciente	Perfil de resistencia
1166	Mayo, 2012	HUC	UTI	Masculino	CAZ, GN, AMC, FEP
1169	Mayo, 2012	HUC	UTI	Masculino	CAZ, AMK, SAM, IPM, FEP
1520	Mayo, 2012	HUC	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM
1172	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	TZP, CAZ, IPM, NOR, GN
1115	Mayo, 2012	HUC	Cardiología	Femenino	CAZ, FEP, AMK, IPM, CIP
1127	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	TGC, CIP, AMK, IPM, FEP, CAZ
1159	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	IPM, CIP, FEP, CAZ
2868	Mayo, 2012	HUC	M1	Femenino	LEV, AMK, TZP, IPM, CAZ
3547	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	CIP, NOR, IPM, CAZ
1521	Mayo, 2012	HUC	NI	NI	NI
207	Marzo, 2007	Instituto Médico La Floresta	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM, SAM
507	Mayo, 2007	Policlínica Metropolitana	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM, SAM
607	Junio, 2007	Policlínica Metropolitana	UTI	Femenino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM
1007	Febrero, 2007	Instituto Médico La Floresta	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM

Fuente: Elaboración propia.

Abreviaturas: UTI: Unidad de Terapia Intensiva, HUC: Hospital Universitario de Caracas, M1: Sala de Medicina 1, TZP: tazobactam-piperacilina, IPM: imipenem, CAZ: ceftazidime, GN: gentamicina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, FEP: cefepime; SAM: sulbactam-ampicilina, AMK: amikacina, NOR: norfloxacin, CIP: ciprofloxacina, TGC: tigeciclina, MEM: Meropenem; LEV: Levofloxacina. NI: información no disponible.

Se mantuvo en el anonimato el nombre de los pacientes para garantizar su privacidad. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en seres humanos, la declaración de Helsinki, ratificada por la 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia en el año 2000 (Rothman, 2000) y el Código de Bioseguridad y Bioética de la República Bolivariana de Venezuela (MPPCTII, 2009).

Identificación y perfil de sensibilidad de los aislados

Las pruebas de identificación y de sensibilidad bacteriana de los aislados las realizaron cada uno de los centros hospitalarios empleando el sistema automatizado Vitek® (*Biomerieux*), siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) del año 2012 (CLSI, 2012). Una vez recibidos en el Laboratorio de Biología de Plásmidos, se aplicaron pruebas que permitieron verificar la identificación, tales como: tinción de Gram, catalasa, oxidasa, Kliger, crecimiento a 42°C, crecimiento en agar MacConkey, producción de indol, sulfuro de hidrógeno y motilidad (MacFaddin, 2003), como ha sido descrito previamente (Chalbaud y Alonso, 2017; Angiolillo et al, 2017, Toba et al, 2018).

Extracción de ADN genómico

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando un lisado celular de *A. baumannii* según Levesqué et al, (1995). Para ello se colocó una colonia aislada en 2 ml de medio Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C con agitación durante 18 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 200 µl de dicho cultivo en 800 µl de agua ultra pura y se hirvió en baño de maría durante 10 minutos. La suspensión bacteriana se centrifugó a 12.000 rpm durante dos minutos y el sobrenadante fue usado para realizar la PCR.

Identificación molecular

Para verificar la identificación de los aislados de *A. baumannii* se realizaron dos reacciones de PCR, una utilizando una secuencia de la subunidad ribosomal 16S específica de la especie y otra para amplificar el gen *bla*_{OXA-51}. En el primer caso se utilizaron los iniciadores 16SF: 5'-GACGTACTCGCAGAATAAGC-3'; y 16SR: 5'-TTAGTCTTGCGACCGTACTC-3' propuestos por Lin et al. (2009), los cuales amplifican una región de la subunidad 16S de 426 pb. El volumen final de reacción fue de 25µl: 1 µl de la muestra de ADN y 24 µl de la mezcla de reacción (Buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 200 µM de dNTPs, Mg⁺² (3 mM), 1U *Taq* polimerasa) y 1 µM de cada uno de los cebadores. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research) con las siguientes condiciones de reacción: 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto, extensión 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Para la amplificación del gen *bla*_{OXA-51-like}, se preparó igualmente una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µl que contuvo: 1 µl de ADN

total, Buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), dNTPs (200 μ M), Mg^{+2} (1.5 mM), *Taq* polimerasa (1U) y cebadores (0.5 μ M c/u). Los iniciadores utilizados fueron los reportados por Woodford y colaboradores (2006), OXA-51-likeF (5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3') y OXA-51-likeR (5'-TGGA-TTGCCTTCATCTTGG3'). La reacción fue llevada en a una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 45 seg a 57 °C, y 1 min a 72 °C, seguido por una extensión final a 72 °C durante 5 min.

En todas las reacciones de PCR se utilizó como control negativo una mezcla de todos los componentes sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen (control de reactivos) y como control positivo de la reacción se usó una cepa previamente caracterizada en el Laboratorio de Biología de Plásmidos como *A. baumannii*, denominada AB3. Los productos de la PCR fueron analizados en electroforesis horizontales en geles de agarosa al 1%, tratados con bromuro de etidio y visualizados en un equipo de fotodocumentación GelDoc (Bio-Rad, USA).

Genotipificación bacteriana empleando la técnica rep-PCR

La caracterización genotípica de las muestras se realizó empleando la técnica rep-PCR y el oligonucleótido único REP1 (5'-GCGCCGICATGCGGCA-TT-3') (Horcajada et al, 2002). Para este ensayo, las condiciones de reacción utilizadas fueron 94°C durante 5 minutos, 94°C por 1 min, 50°C durante 1 minuto y 72°C por 8 minutos durante 35 ciclos, con una extensión final de 72°C por 15 min. Se empleó como control positivo la cepa AB3 de *A. baumannii*. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis horizontales en geles de agarosa, como se describió previamente.

Análisis de los resultados de la genotipificación por rep-PCR

El criterio para determinar la relación entre los aislados fue el reportado por Tenover et al. (1995), quienes definieron cuatro categorías de relación genética y epidemiológica: a) Indistinguibles: son aislamientos que muestran patrones de bandas iguales por lo que pueden ser considerados clones; b) Estrechamente relacionados: los patrones de bandas difieren en dos o tres bandas; c) Posiblemente relacionados: sus patrones muestran cuatro a seis bandas de diferencia, y; d) No relacionados: los patrones de bandas difieren en más de seis (Falco et al, 2017; Tenover et al., 1995). El análisis *in silico* se realizó empleando el programa Phoretix 1D Gel Image Analysis Software (Totallab, Newcastle, Reino Unido). Partiendo de cada registro fotográfico se normalizan los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis, de acuerdo con el factor de retardo (Rf, por sus siglas en inglés) y se compararon las imágenes. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para la matriz de distancia y el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) para la creación de los dendrogramas.

3. Resultados

Identificación fenotípica de los aislados bacterianos de *A. baumannii*

Los aislamientos utilizados en este estudio presentaron la siguiente distribución temporal: el primer grupo de cepas provienen del Hospital Universitario de Caracas (HUC) y fue aislado durante los meses de mayo a septiembre del 2012. Las muestras del segundo grupo provienen del Instituto Médico La Floresta y la Policlínica Metropolitana, y también fueron tomadas en un período de 4 meses, de febrero a junio del año 2007 (Tabla 3). El 85% de los aislados (11/13) provenían de las Unidades de Terapia Intensiva de los distintos recintos hospitalarios (Tabla 3). Es

importante mencionar que existe una separación espacial considerable de cada uno de los centros de salud que formaron parte del estudio.

Todos los aislamientos utilizados en este estudio fueron identificados de forma automatizada como *A. baumannii* por los laboratorios de bacteriología de cada uno de los recintos hospitalarios que suministraron los aislados. Una vez que se recibieron las muestras en el Laboratorio de Biología de Plásmidos, se procedió a hacer una confirmación de la identificación bacteriana empleando diferentes pruebas fenotípicas. Los resultados indican que todas son cocobacilos Gram negativos, lo cual coincide para la morfología celular de este organismo. Las colonias fueron sometidas a distintas pruebas bioquímicas que permitieron una aproximación hacia la especie de estudio. Los resultados indican que el 100% de los aislamientos eran no fermentadores, inmóviles, no productores de indol ni H₂S y oxidasa negativos. Finalmente, las cepas presentaron crecimiento a 44°C, temperatura característica de la especie. Todos estos resultados en conjunto permiten sugerir que los aislados bacterianos evaluados pueden ser clasificados como *A. baumannii*.

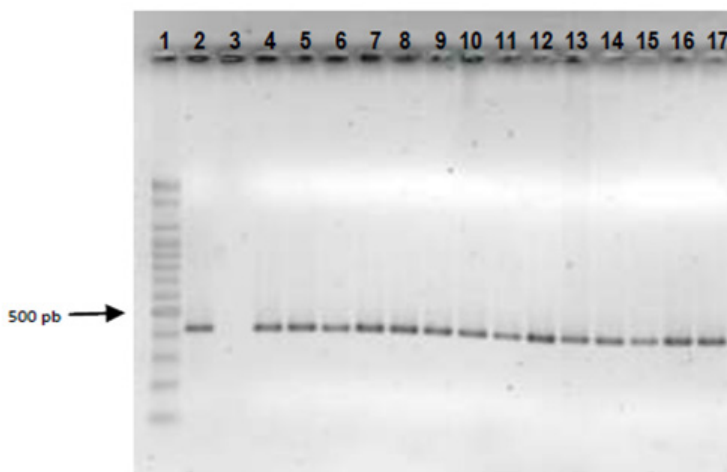
Perfil de sensibilidad de los aislados de *A. baumannii*

Con el fin de determinar el perfil de sensibilidad de los aislados de *A. baumannii* que forman parte de este estudio, se evaluaron de forma automatizada trece (13) antibióticos pertenecientes a cuatro (4) familias diferentes: beta-lactámicos (ceftazidima, cefepima, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y los carbapenémicos: imipenem y meropenem); aminoglucósidos (amikacina y gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina y levofloxacina) y gliciliclinas (tigeciclina).

Los resultados indican que el 100% de los aislados son resistentes a múltiples antibióticos. Por ejemplo, el 100% fue resistente a ceftazidima (cefalosporina de tercera generación), el 84,6% a imipenem (11/13), el 77% a cefepima (cefalosporina de cuarta generación), el 69,2% a ciprofloxacina y a amikacina (9/13), mientras que el 7,7% a tigeciclina (1/13) (Tabla 3).

Identificación molecular de los aislados de *A. baumannii*

Con la finalidad de complementar los resultados obtenidos a través de las pruebas bioquímicas y microbiológicas, se realizó la amplificación por PCR de una región altamente conservada del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S empleando iniciadores especie específicos. Los resultados obtenidos indican que los 14 aislados son *A. baumannii* debido a que se obtuvo un amplificado con el tamaño de banda esperado (426 pb) (Figura 1).

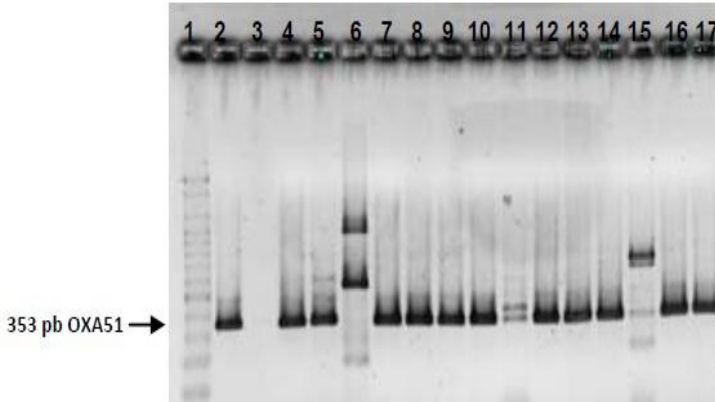


Fuente: Elaboración propia.

Figura 1: Registro fotográfico de la corrida electroforética horizontal de un gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR de una sección del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S en *A. baumannii*. Carril

1: Marcador de Peso Molecular 100 pb (*New England Biolabs*); Carril 2: AB3 (Control positivo); Carril 3: Control negativo; Carril 4: aislado 207; Carril 5: aislado 507; Carril 6: aislado 607; Carril 7: aislado 1007; Carril 8: aislado 1115; Carril 9: aislado 1127; Carril 10: aislado 1159; Carril 11: aislado 1166; Carril 12: aislado 1169; Carril 13: aislado 1172; Carril 14: aislado 1520; Carril 15: aislado 1521; Carril 16: aislado 2868; Carril 17: aislado 3547.

Adicionalmente, se realizó una PCR para verificar la identidad de los aislados evaluados a través de la detección del gen *bla*_{OXA-51-like} (Woodford et al., 2006). El 93% de los aislados evaluados (13/14) generaron una banda del tamaño esperado (353 pb; Figura 2). Sin embargo, en tres de estos aislados, en el 507 (Carril 5), en el 1166 (Carril 11) y en el 1521 (Carril 15), además de observar la banda de 353 pb, también se observaron bandas inespecíficas. Finalmente, para la muestra 607 (Carril 6) no se obtuvo el amplicón de tamaño esperado.



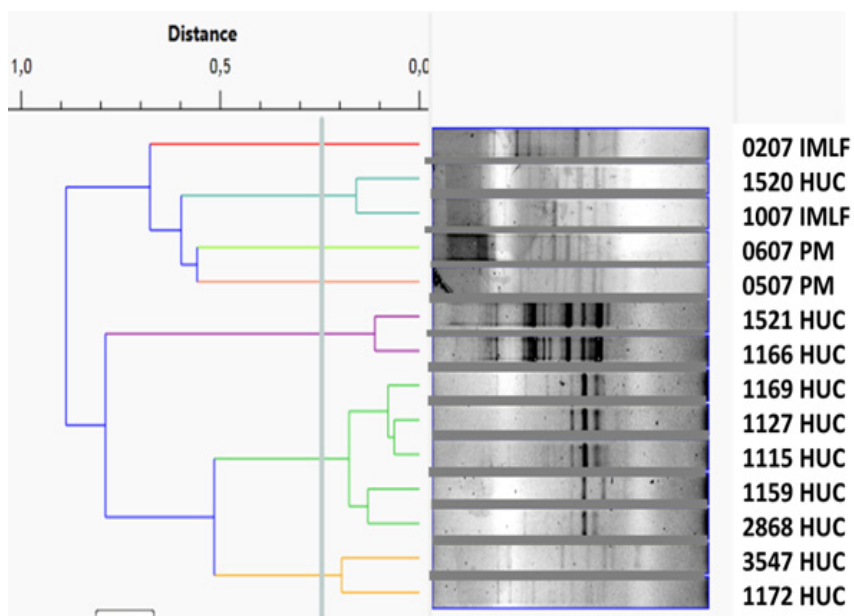
Fuente: Elaboración propia.

Figura 2. Registro fotográfico de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen *bla*_{OXA-51-like}. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (*New England Biolabs*); Carril 2: AB3 (Control positivo); Carril 3: Control negativo; Carril 4: aislado 207; Carril 5: aislado 507; Carril 6: aislado 607; Carril 7: aislado 1007; Carril 8: aislado 1115; Carril 9: aislado 1127; Carril 10: aislado

1159; Carril 11: aislado 1166; Carril 12: aislado 1169; Carril 13: aislado 1172; Carril 14: aislado 1520; Carril 15: aislado 1521; Carril 16: aislado 2868; Carril 17: aislado 3547.

Genotipificación de los aislados de *A. baumannii*

En la Figura 3 se puede observar el dendrograma obtenido con la tipificación de los aislados empleando el método rep-PCR. En ella se pueden observar cuatro (4) grupos relacionados genéticamente y señalados con las letras A, B, C y D. El grupo A está constituido por las muestras 1169, 1127, 1115, 1159 y 2868. El B lo conforman las cepas 3547 y 1172; el grupo D las muestras 1521 y 1166, mientras que el C por los aislados 1007 y 1520. Las cepas 207, 507 y 607 son clones únicos y existen dos pares de clones indistinguibles que corresponden a las muestras 1520, 1007 y a las 1115 y 1127, respectivamente. Los resultados permiten afirmar que existe gran variabilidad genética entre los aislados evaluados.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de la genotipificación de los aislados de *A. baumannii* provenientes de distintos centros de salud de la ciudad de Caracas empleando rep-PCR

4. Discusión

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud pública a nivel mundial debido a que ocasionan un aumento en la morbilidad y en la mortalidad de los pacientes (Padgett et al., 2013). Además, generan mayores costos durante su estancia prolongada en el centro hospitalario debido a que hay que aplicar una antibioticoterapia adecuada (Ramírez et al., 2013). Por lo tanto, su estudio permite recabar información de interés para reconocer las fuentes de infección, los factores de riesgo para el paciente, las vías de diseminación y los posibles reservorios de microorganismos causantes de la infección, lo cual conlleva al establecimiento de bases de datos epidemiológicas, medidas de prevención y control adecuadas, que pueden garantizar mejor calidad de vida al paciente hospitalizado y menores costos en salud (Padgett et al., 2013). Un aspecto importante del estudio epidemiológico de estas infecciones es comprender cómo se diseminan las cepas bacterianas dentro de un hospital o entre hospitales de un área determinada (Rivas et al., 2008).

En Venezuela, el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos - PROVENRA (<http://www.provenra.org>), ha permitido mantener monitoreados, de manera activa, los valores de la resistencia bacteriana a los antibióticos, y con esto, el problema asociado de las infecciones nosocomiales. Sin embargo, no existe una organización encargada de monitorear directamente las infecciones intrahospitalarias, para conocer los valores reales de incidencia a nivel nacional. En el caso del Hospital Universitario de Caracas, la Subcomisión de Infecciones (SCI-HUC) es la encargada de recopilar los datos relacionados con los reportes

de las infecciones intrahospitalarias en dicho recinto de salud. Para el año 2007, se reportó una incidencia de 14,11 casos de infecciones nosocomiales por cada 100 pacientes hospitalizados, 2 puntos porcentuales superior al valor reportado en el 2006 (Pitteloud et al., 2007). Es importante mencionar que, de acuerdo con el perfil de susceptibilidad a antibióticos, todos los aislados analizados en este trabajo demostraron ser resistentes a múltiples drogas (Tabla 1), lo cual complica el manejo terapéutico de los pacientes que adquirieron la infección nosocomial.

De acuerdo con un estudio realizado por Seisdedos et al. (2012), una de las principales causas de complicaciones nosocomiales, que ocupa el cuarto nivel entre las infecciones de mayor frecuencia, es la bacteriemia asociada a contaminación de catéteres. En este estudio se verificó la presencia de organismos del género *Acinetobacter* en muestras de pacientes con infecciones asociadas al uso de este dispositivo médico. Dadas las dificultades que existen para poder realizar la clasificación taxonómica adecuada de las especies correspondientes al género *Acinetobacter*, la cual se basa en características fenotípicas, se han desarrollado estudios genotípicos que permitan la identificación definitiva del microorganismo de interés, tal como es el caso del uso de secuencias específicas de genes ubicados en el cromosoma que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal y para la oxacilinasasa OXA-51.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, ambos genes se pueden emplear para identificar a *A. baumannii*. Esto se debe a que el 100% de los aislados dio positivo para el amplificado correspondiente a la secuencia específica de la subunidad ribosomal 16S (Fig. 1), mientras que en el 93% de los casos se obtuvo el amplificado correspondiente al gen *bla*_{OXA-51-like} (Fig. 2). La única cepa que no dio positiva para este gen fue la 607, sin embargo, según Turton et al. (2010), se han reportado patrones positivos modificados y un 100% de especificidad para la técnica ya que

microorganismos distintos de *A. baumannii*, no generan ningún tipo de amplicón con estos iniciadores específicos (Turton et al., 2010).

Con respecto a la epidemiología molecular de los aislados estudiados y de acuerdo con los patrones obtenidos con el rep-PCR, se demostró la presencia de aislados relacionados genéticamente, los cuales se agruparon como: A, B y D (Fig. 3). En el grupo A hay dos muestras, la 1127 y la 1115, que resultaron estar estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético debido a que ambas fueron aisladas de catéter, en mayo del año 2012, en el Hospital Clínico Universitario. Estas cepas comparten el mismo perfil de resistencia a antibióticos, a excepción de que la primera también es resistente a tigeciclina y la segunda a ciprofloxacina. Además, fueron aisladas de distintos servicios del hospital (UTI y cardiología, respectivamente), lo cual podría sugerir que pueden ser parte de una contaminación que está generando infecciones nosocomiales a los pacientes ingresados en el HUC. En el mismo grupo A, se observa que los aislados 2868 y 1169 del mismo hospital (Tabla 1), resultaron estar estrechamente relacionadas genéticamente porque su patrón difiere en 3 bandas (Fig. 3). Estas diferencias se pueden deber a un único evento mutacional que pudo ocurrir en el ancestro común que las originó y que, en ocasiones, puede observarse cuando se hacen varias tomas de muestras del mismo paciente (Tenover et al., 1995).

En el grupo B, las muestras 1172 y 3547 también fueron definidas como estrechamente relacionadas genéticamente, ambas provienen de la UTI, solo que la muestra 1172 fue tomada en mayo de 2012; mientras que la muestra 3547, en septiembre de 2012. Ambas muestras provienen de pacientes diferentes.

En el grupo C también hay dos muestras, la 1127 y 1115, que resultaron ser clones. Ambas cepas comparten el mismo perfil de resistencia a

antibióticos, pero la primera de ellas fue aislada en la Unidad de Terapia Intensiva del Instituto Médico La Floresta en el año 2007, mientras que la segunda fue aislada en el 2012, en la misma unidad, pero ahora en el Hospital Clínico Universitario. Los resultados podrían sugerir que este clon pudo ser dispersado por personal asociado a la atención en salud, en el caso de que labore en más de un centro asistencial. Se sugiere aplicar el esquema de secuenciación de múltiples *locus* o MLST (por sus siglas en inglés, *Multi Locus Sequence Type*) para confirmar la clonalidad de ambos aislados (Diancourt et al., 2010).

Por su parte, la muestra 207 del Instituto Médico La Floresta no estaba relacionada genéticamente con ningún otro aislamiento, mientras que las muestras 507 y 607 de la Policlínica Metropolitana, resultaron ser clones (Fig. 3). Es importante mencionar que estas tres (3) cepas mostraron tener una baja relación con los aislados provenientes del HUC. Sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede asegurar que la relación entre los aislados provenientes de diferentes centros de salud se deba a clones circulantes. Para ello se requieren estudios más exhaustivos, que incluyan tanto la toma de muestras de ambientes de ambos centros de salud y del personal que pudiera laborar en ambos centros, así como la evaluación de la historia clínica de los pacientes recluidos en los servicios de ambos hospitales, con el fin de verificar si han sido hospitalizados en uno de los centros de salud incluidos en este estudio y luego trasladados a otro.

En un estudio realizado en el año 2005, por Pancholi y colaboradores, se realizó la caracterización molecular de aislados provenientes de manos y de ambientes de cuidadores. Los autores reportan que cepas de *A. baumannii* tomadas de manos resultaron indistinguibles de algunas provenientes del ambiente (Pancholi et al., 2005). Afirman que si bien, las cepas ambientales resultan susceptibles a los agentes antimicrobianos, en el ambiente hospitalario pueden convertirse en patógenos potenciales.

Este estudio da indicios que las cepas de *A. baumannii* podrían encontrar algún reservorio en la comunidad que sirva como fuente de infección nosocomial. Por lo expuesto se puede sugerir que existe la posibilidad de dispersión de aislados nosocomiales de un hospital a otro, dentro de un área geográfica determinada. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio resultan limitados para explicar la relación entre aislados provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Caracas.

Es fundamental el desarrollo de estudios epidemiológicos que empleen técnicas moleculares para la determinación de las relaciones filogenéticas entre aislados nosocomiales asociados a pacientes portadores de dispositivos tipo catéter. Los resultados obtenidos permiten determinar posibles brotes infecciosos, pero a su vez facilitan el desarrollo de medidas de prevención y control específicas y en consecuencia efectivas que tanto hacen falta en un país en el que el sistema de salud se encuentra actualmente colapsado por la carencia de medicamentos.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto CDCH PG-03.335416 y el Proyecto de Investigación e Innovación PEII No.2012000977, coordinados por Guillermina Alonso del Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos del Instituto de Biología Experimental.

Bibliografía

- Abdi, A.; Hendiani, S.; Mohammadi, P.; Gharavi, S. (2014). Assesment of Biofilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol.*7(1):1-5.
- Allen, DM & Hartman, BJ. (2009). *Acinetobacter* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. New York: Churchill Livingstone Elsevier; p. 2881–5.
- Angiolillo, G.; Fernandez, S.; Falco, A.; Aranaga, C. & Alonso G. (2017). Characterization of plasmids from E. coli SXT resistant isolates from urinary tract infections in Venezuela. *Kasmera Journal*, 45 (11):17-31.
- Berdinelli, M. y Friedman, H. (2008). *Acinetobacter biology and pathogenesis*. Springer. Nueva York. E. U. A. Disponible en: <https://books.google.co.ve>.
- Bergogne-Berezin, E. y Towner, K. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*; 9(2): 148–165
- Bouvet, P. y Grimont, P. (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. In: *Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie*. Masson SAS: Elsevier.
- Brenner, P.; Otaíza, F; Bustamante R. (2004). Nosocomial infections outbreaks in Chile 1985–2002. *Am J Infect Control*. 32(3): E49.

- Buffet, S.; Tattevin, P.; Bonnaure, M. & Jolivet, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds a critical review. *Int J Antimicrob Ag.* 39(5): 381-389.
- Chalbaud, A. y Alonso, G. (2017) Análisis y distribución de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas de origen hospitalario. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 72, <http://vitae.ucv.ve>.
- Chincha, O; Cornelio, E; Valverde, V. & Acevedo, M. (2013). Infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en unidades de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*30(4):616-20.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22 Edition International Supplement M100-S26, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- Diancourt, L.; Passet, V.; Nemeč, A.; Dijkshoorn, L. & Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One.* 5(4): e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034.
- Du, X.; Xu, X.; Yao, J.; Deng, K.; Chen, S.; Shen, Z.; Yang, L. & Feng, G. (2019). Predictors of mortality in patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control.* 16. pii: S0196-6553(19)30151-8. doi: 10.1016/j.ajic.2019.03.003.
- Falah, F.; Shokoohizadeh, L. & Adabi, M. (2019). Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. *Scars Burn Heal.*; 5: 2059513119831369. doi: 10.1177/2059513119831369.

- Falco, A; Barrios, Y; Torres, L; Sandrea, L, Takiff, H. (2017). Epidemiología molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela. *Inv Clin*; 58: 3-21.
- Gales, A.; Jones, R.; Forward, K.; Linares, J.; Sader, H. & Verhoef, J. (2001). Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Clin Infect Dis*. 32(2supl). pp. 104–113.
- González, M.; Izquierdo, A.; Luque, M.; Sánchez, A.; Díaz, M. & Torres, M. (2002). Infecciones urológicas por *Acinetobacter*. Estudio de casos y aplicación del protocolo de actuación de enfermería. *Asoc. Esp. Enf. Uro*. 28 (82): 28- 32.
- Hernández, A.; García, E.; Yagüe, G. & Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter*. 23(1):12-19.
- Horcajada, J.; Vila, J.; Moreno, A.; Ruiz, J.; Martínez, J.; Sanchez, M., Soriano, E. & Mensa, J. (2002). Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinilones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis. *J. Antimicrob Chemother*. 49(1): 55-59.
- Kang, H. y Dunne, W. (2003). Stability of Repetitive-Sequence PCR Patterns with Respect to Culture Age and Subculture Frequency. *Journal of Clinical Microbiology*; 41 (6): 2694– 2696.

- Karaiskos, I.; Lagou, S.; Pontikis, K.; Rapti, V. & Poulakou, G. (2019). The “Old” and the “New” Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front Public Health.*; 7:151. doi: 10.3389/fpubh.2019.00151.
- Lemos, E.; Restrepo, F.; Alvis, N.; Quevedo, E.; Cañon, O. & León, Y. (2011). Mortalidad por *Acinetobacter baumannii* en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Rev Panam Salud Publica.*30(4): 287–294.
- Lin, L.; Ling, B. & Li, X. (2009). Distribution of multidrug efflux pump genes *adeABC*, *adeDE*, and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multipleantimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int. J. Microb. Agents.* 33(1): 27- 32
- Levesque, C.; Piche, L.; Larose, C. & Roy, P. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(1):185-191.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ra. Edición. Ciudad de México, México. Editorial Médica Panamericana, 2003.
- MPPCTII. (2009). Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de Bioética y Bioseguridad. Tercera Edición. República Bolivariana de Venezuela. Caracas.
- Ojeda, E. y Megías, G. (2000). Infecciones asociadas a catéteres. Disponible en: <http://www.uninet.edu/cin2000/conferences/ojeda/ojeda.html>. Consultado en agosto de 2019.

- Pancholi, P.; Healy, M.; Bittner, T.; Webb, R.; Fan, W.; Aiello, A.; Larson, E. & Phyllis, D. (2005). Molecular Characterization of Hand Flora and Environmental Isolates in a Community Settings. *J. Clin. Microbiol.*43(10): 5202- 5207
- Padgett, D.; Luque, M.; Rivera, D.; Zepeda, L. & Hernández, A. (2013). Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia en hospital de especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, 2006-2012. *Rev Med Hondur.* 81(2-4):68- 72.
- Peleg, AY.; Seifert, H. & Paterson, DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*; 21(3): 538–582
- Peleg, A. y Hooper, D. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med.* 362(19): 1804-1813.
- Pitteloud, J.; Villarroel, E.; Figueredo, A. & Silva, M. (2007). *Boletín de infecciones Hospitalarias*. Subcomisión de Infecciones H.U.C. Vol. 19.
- Seng, P.; Rolain, JM; Fournier, PE; La, SB; Drancourt, M. & Raoult, D. (2010). MALDITOF – mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*; 5:1733–54.
- Ramírez, M.; Aranza, J.; Varela, M.; García, A.; Vélez, G.; Salcedo, R.; Fajardo, M.; Cruz, M. & Moreno, F. (2013). Brote de infección nosocomial de infecciones respiratorias bajas por *Acinetobacter baumannii* en un servicio de medicina interna de un hospital general de la Ciudad de México. *Med. Int. Mex.* 29(3): 250- 256

- Richards, M.; Edwards, J.; Culver, D. & Gaynes, R. (2000). Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.*21(8):510-5.
- Rivas, J.; Guzmán, M.; Redondo, C.; Moncada, L.; Rahn, K.; Machiste, M.; Fernandez, S. & Alonso, G. (2008). Genotipificación de cepas bacterianas aisladas de diferentes centros de salud de Venezuela. *Mem Inst Biol Exp.* 5:105-108.
- Rothman, K. (2000) Declaration of Helsinki should be strengthened. *BMJ.* 12; 321(7258):442-445.
- Seisdedos, R.; Conde, M.; Castellanos, J.; García, A.; Valenzuela, J. & Fraga, M. (2012). Infecciones relacionadas con el catéter venoso central en pacientes con nutrición parenteral total. *Nutr. Hosp.* 27(3):775-780.
- Sevillano, E. y Gallego, L. Molecular techniques for detection and control of nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. In: Mendez-Vilas A, editor. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2011. p. 495–503. <http://www.formatex.info/microbiology3/book/495-503.pdf>.
- Tenover, F.; Arbeit, R.; Goering, R.; Mickelsen, P.; Murray, B.; Persing, D. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9): 2233- 2239.
- Toba, F.; Falco, A.; Aranaga, CA & Alonso, G. (2018). Caracterización de bacterias aisladas en un reservorio de agua de Venezuela. Una aproximación a la multiresistencia bacteriana en ambientes

naturales. En: *La contaminación industrial de aguas. Una mirada microbiológica y molecular*. pp- 93-117. Santiago de Cali, Colombia. Editorial USC.

Turton, J.; Woodford, N.; Glover, J.; Yarde, S.; Kaufman, M. & Pitt, T. (2010). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44(8):2974- 2976

Vílchez, G. y Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 29: 6-12.

Woodford, N.; Ellington, M.; Coelho, J.; Turton, J.; Ward, M.; Brown, S.; Amyes, S. & Livermore D. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27(4): 351- 353.