



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Alberto Hurtado
con acreditación internacional

Título: Detección molecular de los genes que confieren resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* aislados de hemocultivos procedentes de hospitales de Lima durante el período 2008-2013.

Title: Molecular detection of encoding genes for resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures from Lima hospitals during 2008-2013.

AUTORES:

Castillo Alfaro Yanet Zuviette¹, Nieto Flores Cynthia Fernanda¹

Trabajo de investigación para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica con mención en Laboratorio Clínico

ASESORES:

Dra. Coralith Marlinda García Apac^{1,2,3}, Lic. Aurora Lizeth Astocondor Gamarra^{1,2}

Afiliaciones:

¹ Facultad de Medicina Alberto Hurtado, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt

³ Hospital Nacional Cayetano Heredia

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) is an opportunistic microorganism that causes a high rate of antimicrobial resistance. **Objective:** To determine the frequency and types of carbapenemase-producing genes in *Acinetobacter baumannii* isolates resistant to carbapenems causing bacteremia. **Materials and methods:** A descriptive study of a series of cases was carried out. The identification and susceptibility of the isolates was by means of the *Microscan* NC50 system and the detection of class A genes (*bla_{GES}*, *bla_{IMI}*, *bla_{SME}*, *bla_{KPC}*), class B (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SPM}*) and class D (*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*) that confer resistance to carbapenems were determined by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Likewise, the colistin CMI was determined by E-test strips. **Results:** Of the 112 isolates, 79 were identified as *A. baumannii* by detection of the *bla_{OXA-51-like}* gene. All *A. baumannii* were resistant to most of the antibiotics analyzed, only tetracycline had a higher percentage of sensitivity. Of all isolates resistant to carbapenems, 95.7% (44/46) were positive for *bla_{OXA-23-like}*; 2.2% (1/46) were *bla_{OXA-24-like}* and none of the isolates were positive for *bla_{OXA-58-like}*. The 46 isolates of *A. baumannii* were susceptible to colistin. **Conclusions:** More than 50% of *A. baumannii* were resistant to carbapenems, the most frequent carbapenemase producing gene was *bla_{OXA-23-like}*. All *A. baumannii* resistant to carbapenems were susceptible to colistin.

Key words: *Acinetobacter*, resistance, carbapenemics, colistin, *bla_{OXA-type}* genes.
(Source: DECS BIREME)

RESUMEN

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) es un microorganismo oportunista causante de una elevada tasa de resistencia antimicrobiana. **Objetivo:** Determinar la frecuencia y los tipos de genes productores de carbapenemasas en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos causantes de bacteriemia. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de serie de casos. La identificación y susceptibilidad de los aislamientos fue mediante el sistema *Microscan NC50* y la detección de los genes de clase A (*bla_{GES}*, *bla_{IMI}*, *bla_{SME}*, *bla_{KPC}*), clase B (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SPM}*) y clase D (*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*) que confieren resistencia a los carbapenémicos fueron determinados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Asimismo el CMI de colistina fue determinado por tiras de E-test. **Resultados:** De los 112 aislamientos, 79 aislamientos fueron identificados como *A. baumannii* mediante la detección del gen *bla_{OXA-51-like}*. Todos los *A. baumannii* fueron resistentes a la mayoría de los antibióticos analizados, solo tetraciclina tuvo mayor porcentaje de sensibilidad. De todos los aislamientos resistentes a carbapenémicos el 95.7% (44/46) fueron positivos para *bla_{OXA-23-like}*; 2.2% (1/46) fueron *bla_{OXA-24-like}* y ninguno de las aislamientos fueron positivos para *bla_{OXA-58-like}*. Los 46 aislamientos de *A. baumannii* fueron sensibles a colistina. **Conclusiones:** Más del 50% de los *A. baumannii* fueron resistentes a los carbapenémicos, el gen productor de la carbapenemasa más frecuente fue *bla_{OXA-23-like}*. Todos los *A. baumannii* resistentes a los carbapenémicos fueron susceptibles a colistina.

Palabras clave: *Acinetobacter*, resistencia, carbapenémicos, colistina, *bla_{OXA-type}* genes.
(Fuente: DECS BIREME)

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii es uno de los principales patógenos nosocomiales, su presencia ha sido asociada a diversas infecciones como bacteriemia en cuyos casos se han descrito altas tasas de mortalidad del 26 al 68%. (1,2,10)

A. baumannii es resistente natural a varios antimicrobianos como penicilinas, cloranfenicol, y cefalosporinas de espectro reducido, esto hace que el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* sean cada vez más complejas y limitadas. Por tal motivo las opciones terapéuticas están basadas en el empleo de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, sin embargo en la actualidad diversos estudios han reportado una creciente resistencia frente a estas cefalosporinas de amplio espectro quedando como últimas opciones de tratamiento el uso de carbapenémicos y colistina. (3,4,5)

Los carbapenémicos son antimicrobianos que forman parte de la familia de los betalactámicos (6,7), por ende actúan cuando el antimicrobiano se une a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) interfiriendo con la síntesis de la pared celular produciendo la lisis de la bacteria. (2,8)

Hasta hace unas décadas los tratamientos basados en carbapenémicos en infecciones por *A. baumannii* multirresistente, eran altamente efectivos, sin embargo la aparición de cepas resistentes no se hicieron esperar, hasta que en la actualidad las tasas de resistencia vienen siendo crecientes en diferentes países del mundo. En Latinoamérica el programa de vigilancia (SENTRY) reportó un incremento en las tasas de resistencia del 25 al 40% durante los años 2001 y 2005 respectivamente. En el Perú se realizó un estudio en el Hospital Almenara desde el año 2004 hasta el 2006, durante el primer año no se encontró resistencia a carbapenémicos, sin embargo durante los últimos años del estudio, la tasa alcanzó a un 40% de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. (1,9,10)

La resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* está mayormente asociada a la presencia de enzimas carbapenemasas, estas enzimas destruyen el anillo betalactámico e inactivan los carbapenémicos. (2) Existen diferentes tipos de carbapenemasas, según la clasificación molecular de Ambler, pueden ser de clase A, clase B y clase D. (11)

Las carbapenemasas de clase A se caracterizan por presentar en su centro activo un grupo serino, las enzimas más representativas en este grupo son GES, IMI, SME, KPC y NMC y son codificadas por los genes *bla_{GES}*, *bla_{IMI}*, *bla_{SME}*, *bla_{KPC}* y *bla_{NMC}* respectivamente. En *A. baumannii* se han descrito genes de tipo KPC y GES, provenientes de países como Puerto Rico, Francia y Turquía. (11, 12)

Las carbapenemasas de clase B o también llamadas metalo-betalactamasas (MBL) tienen en su centro activo un ion de zinc, las enzimas más representativas en este grupo son: IMP, VIM, GIM, SPM, SIM y NDM y son codificadas por los genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{NDM}* respectivamente. En *A. baumannii* se han descrito los tipos IMP-like, VIM-like, SIM-like, estas enzimas han sido distribuidas en países como Italia y Grecia. Recientemente se vienen identificando a las enzimas NDMs en estas especies en países del mediterráneo como Algeria, Libia, Francia, Eslovenia y Turquía. (12,13)

Las carbapenemasas de clase D, son enzimas betalactamasas también llamadas oxacilinasas, se caracterizan por hidrolizar amino y carboxipenicilinas, algunas de estas enzimas se comportan como betalactamasas de espectro extendido (OXA BLEE) e hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido como ceftazidima y cefepime, asimismo también pueden actuar como carbapenemasas hidrolizando carbapenémicos (OXA carbapenemasas), las enzimas más importantes en este grupo son las OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24-like y OXA-58-like estas son codificadas por los genes *bla_{oxa-51}*, *bla_{oxa-23}*, *bla_{oxa-24}* y *bla_{oxa-58}*. El gen *bla_{oxa-51}* fue encontrado por primera vez en Argentina de un aislamiento de *A. baumannii* en 1996, son sintetizados de forma intrínseca por la especie *A. baumannii*, el cual se usa como marcador para la identificación de la especie, sin embargo este gen también puede causar resistencia a carbapenémicos cuando en su estructura existe un segmento de inserción ISAbal. (11,14,15)

Las opciones terapéuticas que actualmente se disponen para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* multidrogo resistentes son un problema dado el incremento de cepas resistentes a carbapenémicos, para estos casos existe como única alternativa de tratamiento el uso de colistina; un antimicrobiano perteneciente a la familia de las polimixinas; este antibiótico fue descubierto en la década de los 40, y poseen gran actividad frente a bacilos gram negativos multiresistentes, sin embargo fue dejado de usar en la década de los 80 por causar nefrotoxicidad. A pesar de ello su uso todavía puede ser válido en casos de infecciones severas por *A. baumannii*. (17)

Los objetivos de este estudio fueron determinar la frecuencia y los tipos de genes productores de carbapenemasas en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos causantes de bacteriemia. Así como también determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* y determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de colistina en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

Estudio descriptivo de serie de casos.

Muestra:

Se analizaron 112 aislamientos identificados como *Acinetobacter* sp. procedentes de hemocultivos de pacientes de 5 hospitales: Hospital Nacional, Guillermo Almenara, Hospital Nacional Cayetano Heredia, Hospital Edgardo Rebagliati Martins, Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren. El estudio se llevó a cabo durante el periodo 2008-2013.

Criterio de inclusión:

Se estudiaron todos los aislamientos identificados como *Acinetobacter* sp.

Criterio de exclusión:

Se excluyeron del estudio los aislamientos diferentes a *Acinetobacter* sp.

Operacionalización de variables:

Las variables usadas para este estudio están descritas en el Anexo 1.

METODOLOGÍA

MÉTODOS FENOTÍPICOS:

Transporte de las cepas:

Las cepas aisladas de hemocultivos positivos fueron transportadas desde cada hospital participante hasta el Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt (Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición), el medio que se usó para el transporte de cepas fue viales que contienen 2 ml de agar tripticasa soya (TSA).

Reactivación de las cepas:

Se tomó una asada a partir del medio usado como transporte y se sembró en caldo tripticasa soya, se dejó incubar por 18-24 horas a 37°C.

Re-identificación de las cepas:

Una vez reactivados los aislamientos se re-identificaron las cepas mediante el sistema de identificación comercial MicroScan, paneles NC50 (Dade-Behring, West Sacramento, CA, USA), estos paneles contienen un grupo de carbohidratos que permiten la diferenciación de género y especie de bacterias gram negativas. Los paneles fueron controlados mediante una *E. coli* ATCC 25922. (Ver procedimiento en el Anexo 2). La identificación definitiva de las especies de *A. baumannii* fue mediante la detección del gen *bla_{OXA-51-like}*.

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Acinetobacter* sp:

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante un sistema comercial MicroScan; paneles NC50 (Dade-Behring, West Sacramento, CA, USA); estos son paneles que incluyen en su presentación un grupo de antibióticos liofilizados que fueron hidratados con la cepa de estudio, posteriormente fueron incubados a 37°C por 18-24 horas. Se evaluó el perfil de susceptibilidad para los siguientes antibióticos: amikacina, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftiaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacilin-tazobactam, piperacilina, ticarcilina-clavulanico, tobramicina, trimetoprim sulfametoxasol y tetraciclina.

Los resultados de CMI para cada antibiótico se comparó con los puntos de corte de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2016) para su clasificación en sensible, intermedio y resistente. Para el control de calidad de los antibióticos que contienen los paneles se usó una cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Determinación de la susceptibilidad a colistina:

Se usaron tiras de E-test de colistina, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislamientos resistentes a algún carbapenémico (imipenem o meropenem). Se preparó una suspensión equivalente a 0.5 Mc Farland (OD: 0.08-0.1), y cada suspensión bacteriana fue sembrada en placas de agar Muller Hinton. Sobre la superficie del medio se colocó una tira de E-test de colistina, y las muestras fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Los resultados fueron comparados con los puntos de corte del CLSI siendo estos los siguientes: sensible: $\leq 2\mu\text{g/ml}$ y resistente: $\geq 4\mu\text{g/ml}$.

METODOS MOLECULARES:

Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) por el método de lisis:

Los *A. baumannii* resistentes a algún carbapenémico (imipenem o meropenem) fueron sembrados en medios de agar tripticasa soya. Una vez crecidas estas bacterias se seleccionaron algunas colonias para ser resuspendidas en 100 μl de agua libre de nucleasas. Esta suspensión se calentó a 100°C por 10 minutos, seguido de una centrifugación de 5 minutos a 12000 rpm. Finalmente se separó el sobrenadante que contiene el ADN en Microtubos de 0.2ml y se guardó hasta su uso a -20°C. (18)

Detección de los genes que codifican carbapenemasas de clase A por PCR multiplex:

La técnica que se empleó para el desarrollo del PCR multiplex fue descrita por Hong. (18) (ver procedimiento en Anexo N° 3).

Se usó como controles positivos: *bla_{GES}* (*Pseudomona aeruginosa*), *bla_{IMI}* (*E. coli*), *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae*), como control negativo se usó DNA de *E. coli* ATCC 25922 y control de agua. Las condiciones de ciclaje y temperatura fueron las siguientes: 1 ciclo de denaturación inicial a 94°C por 15 minutos, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, una hibridación a 60°C por 90 segundos, seguido de una extensión a 72°C por 90 segundos y finalmente un último ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio y buffer TBE 0.5X, este fue introducido en una cámara de electroforesis que contiene buffer TBE 0.5X, sobre los pocillos de la agarosa, se cargó 10ul de los productos de PCR, el voltaje y tiempo para la electroforesis depende del tamaño del gel. Una vez terminada la electroforesis se reveló el gel en un fotodocumentador con luz ultravioleta. (18)

Detección de los genes que codifican carbapenemasas de clase B por PCR multiplex:

La técnica que se empleó para el desarrollo del PCR multiplex fue descrita por Ellington. (19) (ver procedimiento en Anexo N° 4).

Se usaron como controles positivos: *bla_{IMP}* (*Pseudomona aeruginosa*) y *bla_{VIM}* (*Pseudomona aeruginosa*), como control negativo se usó DNA de una *E. coli* ATCC 25922 y control de agua. Las condiciones de ciclaje y temperatura fueron las siguientes: 1 ciclo de denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 36 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, una hibridación a 52°C por 40 segundos, seguido de una extensión a 72°C por 50 segundos y finalmente un último ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos. Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio y buffer TBE 0.5X, este fue introducido en una cámara de electroforesis que contiene buffer TBE 0.5X, sobre los pocillos de la agarosa se cargó 10ul de los productos de PCR, el voltaje y tiempo para la electroforesis depende del tamaño del gel.

Una vez terminada la electroforesis se reveló en un fotodocumentador con luz ultravioleta. (19)

Detección de los genes que codifican carbapenemasas de clase D por PCR multiplex:

La técnica que se empleó para el desarrollo del PCR multiplex fue descrita por Kock. (20) (Ver procedimiento en Anexo N° 5).

Se usó como controles positivos DNAs extraídos de dos *A. baumannii*, el primer control de *A. baumannii* contenía los genes *bla_{OXA-51-like}*, *bla_{OXA-24-like}*, y *bla_{OXA-58-like}* y el segundo control de *A. baumannii* contenía *bla_{OXA-51-like}*, *bla_{OXA-23-like}*. Como control negativo se usó DNA de una *E. coli* ATCC 25922, y control de agua. Las condiciones de ciclaje y temperatura fueron las siguientes: 1 ciclo de denaturación inicial a 94°C por 15 minutos, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, una hibridación a 60°C por 90 segundos, seguido de una extensión a 72°C por 90 segundos y finalmente un último ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio y buffer TBE 0.5X, este fue introducido en una cámara de electroforesis que contiene buffer TBE 0.5X, sobre los pocillos de la agarosa, se cargó 10ul de los productos de PCR, el voltaje y tiempo para la electroforesis depende del tamaño del gel. Una vez terminada la electroforesis se reveló en un foto documentador con luz ultravioleta. (20)

RESULTADOS

Identificación de los aislamientos de *Acinetobacter* sp.

Se determinó fenotípicamente que los 112 aislamientos estudiados pertenecían al género *Acinetobacter* sp. de estos 95 aislamientos fueron identificados como el complejo *A. baumannii/A. haemolyticus* y 17 identificados como *Acinetobacter iwoffii*.

La identificación definitiva de la especie *Acinetobacter baumannii* fue mediante la detección del gen *bla_{OXA-51-like}*. Los aislamientos en los que no se detectó este gen fueron denominados para este estudio como *Acinetobacter* NO *baumannii* (A. NO *baumannii*). En 79 aislamientos de los 112 aislamientos se les detectó el gen *bla_{OXA-51-like}*, por tanto fueron identificadas definitivamente como *Acinetobacter baumannii* y 33 como A. NO *baumannii*. (Tabla N°1, ver Anexo 6)

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana:

En la Tabla N°2 se muestra el porcentaje de resistencia de los 79 *A. baumannii*, el 81%, 70.9%, 81% y 72.2% fueron resistentes a cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefepime respectivamente; 50.6% a imipenem, 58.2% a meropenem; 60.8%, 51.9% y 46.8% a amikacina, gentamicina y tobramicina respectivamente; 81% a ciprofloxacina; 64.6% a levofloxacina; 74.7% a piperacilina; 10.1% a tetraciclina; y 58.2% a ticarcilina ácido clavulánico respectivamente. (Ver Anexo 6)

Asimismo en la Tabla N°2 podemos observar que los porcentajes de resistencia en los A. NO *baumannii* fueron menores en comparación con los *A. baumannii*, 36.4% de resistencia para cefotaxima y ceftazidima; 15.2% y 18.2% resistentes a imipenem y meropenem respectivamente y 24.2%, 18.2% y 9.1% a amikacina, gentamicina y tobramicina respectivamente y 3% resistentes a tetraciclina.

En la Tabla N°3 se muestra el porcentaje de resistencia de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes e intermedios a los carbapenémicos (n=46), el 97.8%, 84.8%, 97.8% y 91.3% fueron resistentes a cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefepime respectivamente; 78.3%, 58.7% y 52.2% a amikacina, gentamicina y tobramicina respectivamente; 100% a ciprofloxacina; 69.6% a levofloxacina; 93.5% a piperacilina; 8.7% a tetraciclina; y 95.7% a ticarcilina ácido clavulánico respectivamente. (Ver Anexo 6)

DetECCIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ENZIMAS CARBAPENEMASAS DE CLASE A Y CLASE B:

Los 46 aislamientos resistentes a carbapenémicos (imipenem o meropenem) fueron negativos para tres genes de clase A: *bla_{GES}*, *bla_{IMI}* y *bla_{KPC}* y para dos genes de la clase B: *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*.

DETECCIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ENZIMAS CARBAPENEMASAS DE CLASE D:

En la Tabla N°4 se muestra la distribución de los genes de clase D, la mayoría de las cepas 95.7% (44/46) fueron positivas para el grupo *bla_{OXA-23-like}*; 2.2% (1/46) fue positivo para el grupo *bla_{OXA-24-like}* y ninguna de las cepas fue positiva para el grupo *bla_{OXA-58like}*. (Ver Anexo 6)

En los aislamientos de *A. NO baumannii* resistentes a algún carbapenémico (imipenem o meropenem) (n=6) todas fueron negativas a los grupos de genes *bla_{OXA-23-like}*, *bla_{OXA-24-like}* y *bla_{OXA-58-like}*.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE COLISTINA EN LOS AISLAMIENTOS DE *A. baumannii* RESISTENTES A ALGÚN CARBAPENÉMICO (IMIPENEM O MEROPENEM)

Los 46 (100%) aislamientos analizados fueron sensibles a colistina. 14 (30.4%) tuvieron un CMI de 0.125 ug/ml; 12 (26.1%) de 0.19 ug/ml; 1 de 0.19 ug/ml; 17 (37%) de 0.38 ug/ml; 1 (2.2%) de 0.5 ug/ml y 1 (2.2%) de 1ug/ml. (la Tabla N°5 muestra la distribución de las CMI para cada aislamiento, ver Anexo 6)

El rango del CMI fue 0.125 ug/ml - 1 ug/ml; el CMI 50 fue 0.19 ug/ml y CMI 90 fue 0.38 ug/ml.

DISCUSIÓN

En este estudio el número de aislamientos identificados como *A. baumannii* mediante la detección del gen *bla_{OXA-51-like}* difiere con los resultados obtenidos por el sistema comercial Microscan® (79 versus 95), generalmente esto ocurre cuando se usan métodos convencionales en los que se usan carbohidratos que no permiten la correcta diferenciación de las especies, por lo cual se sugiere para la identificación definitiva de la especie *A. baumannii* emplear métodos moleculares que permitan detectar el gen *bla_{OXA-51-like}*. (2, 21)

A. baumannii es resistente natural a diversos antimicrobianos debido a algunos mecanismos naturales que presentan; como por ejemplo la sobre expresión de bombas de eflujo, pérdida de porinas, enzimas betalactamasas de tipo AmpC que generan resistencia intrínseca a cefalosporinas de primera y segunda generación; asimismo en los últimos años las tasas de resistencia de cefalosporinas de tercera y cuarta generación vienen siendo incrementadas. En nuestro estudio se encontraron porcentajes de resistencia superiores al 70% para cefalosporinas de tercera y cuarta generación; Xu en su estudio de vigilancia realizado durante un periodo de 4 años (2008-2011) reportó porcentajes similares de resistencias de 70% y 50% para cefalosporinas de tercera y cuarta generación respectivamente. (2,22)

En base a los altos porcentajes de resistencia frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación el tratamiento empírico incluye la combinación de un carbapenémico con otro antibiótico, entre los que destacan el uso de aminoglucósidos; particularmente amikacina; e inhibidores de betalactamasas. Dado que en nuestro estudio existe un porcentaje moderadamente alto de resistencia; superior a un 40%; para los aminoglucósidos sería importante reevaluar su uso como parte de la terapia empírica. Por otro lado el porcentaje de resistencia para los inhibidores de betalactamasas como piperacilin-tazobactam y ticarcilina ácido clavulánico se ha incrementado con el transcurso del tiempo, en el año 2001 el estudio de vigilancia SENTRY realizado en Latinoamérica reportó un porcentaje de resistencia de 27.7% y 23.5% para piperacilina-tazobactam y ticarcilina-ácido clavulánico respectivamente, en nuestro estudio los porcentajes de resistencia para estos antibióticos es el doble de lo reportado. (23)

El antibiótico con menor porcentaje de resistencia fue tetraciclina 10.1%; sin embargo existen otros antibióticos en el grupo de las tetraciclinas (minociclina y doxiciclina) los cuales han demostrado ser eficaces inclusive en combinación con otros antibióticos. El 76.9% de éxito terapéutico en pacientes con infecciones por *Acinetobacter*, por este motivo se sugiere analizar la susceptibilidad de cada antibiótico de este grupo ya que tetraciclina no puede predecir la susceptibilidad para los demás antibióticos. Se han encontrado aislamientos resistentes a tetraciclina pero sensibles a minociclina. Asimismo este último antibiótico ha sido recomendado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para infecciones por *Acinetobacter*. Además este estudio muestra que los aislamientos de *A. baumannii* productores de carbapenemasas cursan con un porcentaje de resistencia a tetraciclina bastante bajo de 8.7%. Por lo tanto se sugiere se sigan realizando estudios a mayor escala y con un mayor número de aislamientos para llegar a conclusiones más robustas. (24,25)

Las carbapenemasas de tipo OXA han sido descritas en diferentes países del mundo, las más frecuentes en *Acinetobacter* incluyen los grupos OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like. (15)

La carbapenemasa *bla*_{OXA-23-like} fue aislada por primera vez de una cepa de *A. baumannii* en Edimburgo el año 1985. Desde ese año se han incrementado los reportes de este grupo de enzimas en diferentes partes del mundo como África, Europa, Asia, China y en Latinoamérica como Brasil, Argentina y Colombia. Este es el primer estudio en Perú que reporta la presencia de este grupo de enzimas en *A. baumannii*. La enzima OXA-58-like fue aislada de un *A. baumannii* en Francia el año 2003, y están mayormente distribuidos en países como Italia, Grecia y Turquía. (16)

Las enzimas *bla*_{OXA-24-like} también llamadas *bla*_{OXA-40-like} han sido relacionadas mayormente con la presencia de plásmidos. En estos grupos de enzimas OXA-23-like, OXA-24-like y OXA-58-like, los niveles de resistencia a carbapenémicos aumentan cuando coexiste otro mecanismo de resistencia no enzimático como por ejemplo la sobre-expresión de las bombas de eflujo. Nosotros encontramos que de 46 cepas de *A. baumannii* resistentes a meropenem 44 (95.7%) fueron portadores del gen *bla*_{OXA-23-like}. (26,27) Otros países como China también han reportado una alta frecuencia de genes *bla*_{OXA-23-like}, sin embargo la frecuencia de estos genes varían según la región. (20)

Por otro lado cabe resaltar que de los 44 *A. baumannii* portadores del gen *bla_{OXA23-like}*, 40 fueron resistentes y 6 tuvieron susceptibilidad intermedia a imipenem. La susceptibilidad de ambos carbapenémicos para estos 6 casos fue discrepante, por lo cual se sugiere que en el laboratorio se evalué a ambos carbapenémicos ya que si se evalúa a solo uno de ellos puede impedir el reconocimiento de cepas portadoras de carbapenemasas de tipo OXA. (9)

Los aislamientos de *A. baumannii* que portan los genes OXA-23 han sido reconocidos como causantes de brotes en diferentes países del mundo como España y Brasil. (28) Otro punto a considerar es que los genes *bla_{OXA-23-like}* pueden ser de origen plasmídico, por lo cual tienen la capacidad de propagarse y diseminarse entre bacterias de la misma o de diferente especie. La resistencia de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en los *A. baumannii* portadores del gen *bla_{OXA-23-like}* fue superior al 80% y el porcentaje de resistencia para amikacina y tobramicina fue 78.3% y 52.2% respectivamente. Estos resultados coinciden con otros estudios que reportan un alto porcentaje de resistencia acompañante en *A. baumannii* productores de carbapenemasas. (15,29)

Los genes *bla_{OXA-24-like}* fueron identificado por primera vez de un *A. baumannii*, en un brote ocurrido en España el año 1997. En nuestro estudio identificamos un solo aislamiento productor de este gen (2.2%), el cual fue resistente a la mayoría de los antibióticos analizados, pero curso con sensibilidad a ceftazidima, ceftriaxona y cefepime. La sensibilidad a cefalosporinas de tercera y cuarta generación se explica por la baja actividad que tiene *bla_{OXA-24-like}* para hidrolizar a cefalosporinas y carbapenémicos, sin embargo en este caso la resistencia que se observa a los carbapenémicos puede ser debido a otros mecanismos de resistencia acompañantes como carbapenemasas (*bla_{OXA-24-like}*) más expresión de bombas de eflujo, tal como sucede con los *A. baumannii* portadores del gen *bla_{OXA-23-like}*. (16)

De los 46 aislamientos resistentes a meropenem, hubo un solo aislamiento que fue negativo para los genes *bla_{OXA-23-like}* y *bla_{OXA-58-like}* pero positivo para el gen *bla_{OXA-51-like}* (usado en este estudio para la identificación de la especie *A. baumannii*). Estos genes tienen una escasa actividad para hidrolizar carbapenémicos, sin embargo la presencia de un segmento de inserción; ISAbal; puede estar asociada con la resistencia a estos antibióticos. (20)

Los aislamientos que fueron identificados como *A. NO baumannii* tuvieron 18.2% (5/33) y 15.2% (6/33) de resistencia a imipenem y meropenem respectivamente, sin embargo ninguno de los genes analizados fueron positivos, esta resistencia podría explicarse por otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo, aunque todavía no hay suficiente información al respecto. (30)

Colistina es un antibiótico que puede usarse como alternativa terapéutica para infecciones por microorganismos multirresistentes, en nuestro estudio las 46 cepas productoras de carbapenemasas fueron analizadas y todas estas fueron sensibles a colistina, el rango de CMI fue 0.125 ug/ml-1ug/ml, sin embargo en Argentina ya se han identificado *A. baumannii* heterorresistentes a colistina, en aislamientos con puntos de corte sensibles como 2 ug/ml, 1 ug/ml y 0.5 ug/ml. (31)

Los primers de los genes *bla_{SME}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}*, fueron incluidos en los PCRs multiplex, pese a que no se disponían de controles positivos para estos. En el caso que una de las muestras hubiese amplificado con un tamaño esperado para algunos de los genes como 551 pb para *bla_{SME}*, 477 pb para *bla_{GIM}*, 570 pb, *bla_{SIM}* y 271 pb, *bla_{SPM}*, se hubiesen enviado a secuenciar los productos de ADN, con la finalidad de confirmar la presencia de estos genes. Hubiésemos podido confirmar la negatividad de los genes *bla_{SME}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}* si se hubiese incluido los controles positivos para estos genes.

Las limitaciones del estudio incluyeron el tipo de muestreo que se utilizó ya que fue por conveniencia, el cual no nos permite realizar inferencias estadísticas precisas, sin embargo la importancia de este estudio radica en describir de forma exploratoria lo que ocurre actualmente en los aislamientos de *A. baumannii* considerados como causantes de infecciones intrahospitalarias el cual además ha sido asociado a altas tasas de mortalidad.

CONCLUSIONES

- *Acinetobacter baumannii* fue resistente a múltiples antimicrobianos siendo el antibiótico con menor porcentaje de resistencia la tetraciclina 10.1% (8/79). Los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia fueron: 81% (64/79) a cefotaxima, 70.9% (56/79) a ceftazidima, 81% (64/79) a ceftriaxona y 72.2% (57/79) a cefepime. Los porcentajes de resistencia a meropenem e imipenem fueron 58.2% y 50.6 respectivamente.
- La mayoría de los *A. baumannii* resistentes a los carbapenémicos fueron portadores del gen *bla_{OXA-23-like}* 95.7% (44/46). No se detectó la presencia de carbapenemasas en los *Acinetobacter* NO *baumannii* resistentes a carbapenémicos. Todos los *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos fueron sensibles a colistina.

RECOMENDACIONES

- La identificación molecular es mejor que la identificación fenotípica para *A. baumannii*, porque el gen *bla_{OXA-51-like}* permite la identificación definitiva de las especies de *A. baumannii*.
- La producción del gen *bla_{OXA-23-like}* en este estudio es el mecanismo importante de resistencia a los carbapenémicos entre *A. baumannii*, por ello se deben tomar medidas preventivas para evitar la transmisión de estas infecciones resistentes en los hospitales.
- La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una herramienta fundamental para detectar genes que confieren resistencia para microorganismos.
- La tetraciclina presenta bajos niveles de resistencia por lo que su uso debería ser considerado para tratamiento. Sabemos que la tetraciclina no se usa en nuestro medio para infecciones por *A. baumannii*, por ello sugerimos incluir a la tetraciclina y sus derivados como parte del antibiograma.
- Es necesario realizar futuros estudios que evalúen la tendencia de la resistencia antimicrobiana, en otros hospitales del país.

REFERENCIAS

1. Paz R, De León D, Ramírez R. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, EsSalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Méd Per* 2008; 25(3): 140-147.
2. Vanegas J, Roncancio G, Jiménez J. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Rev CES Med* 2014; 28(2): 233-246.
3. Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asghari B, Lari A. ESBL and MBL mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. *Infez Med* 2012; 20(3): 182-187.
4. Prado A, Arias N, Chávez M, Cabrera C, Gómez R. Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali. *Bioméd* 2014; 34(Supl 1):101-7.
5. Chávez M, Salazar M, Cabrera C, Gómez R, Pallares C. Bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones nosocomiales de un hospital en Colombia. *EnfInf Microbiol* 2012; 33(1): 19-25.
6. Núñez A, Morales C, Rivera M, González A. Nuevos betalactámicos. *Rev Med Int Med Crítica* 2006; 3(6): 132-135.
7. Suarez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *EnfermInfecc Microbiol Clin* 2009; 27(2): 116-129.
8. Moreno K. Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *RevMed Costa Rica y Centroamérica* 2013; LXX (608): 599-605.
9. Villegas M, Kattan J, Correa A, Lolans K, Guzman A, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 2001-4.
10. Rodríguez R, Bustillo D, Caicedo D, Cadena D, Castellanos C. *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. *Méd UIS* 2016; 29(2):113-35.

11. Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28 (Supl 1): 19-28.
12. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. *Biomed Res Int* 2014; 2014(2014): 1-11.
13. Safari M, Mozaffari N, Bahador A, Jafari R, Alikhani M. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units. *Saudi J Biol Sci* 2015; 22(4): 424-9.
14. Patel G, Bonomo R. Stormy waters ahead: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* 2013; 4(48): 1-17.
15. Cuaical N, Delgado Y, Anzola Y, Zamora D, Torres L. Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2012; 32 (2): 95-100.
16. Evans B, Amyes S. OXA beta-lactamasas. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(2): 241-263.
17. Pérez M, Sánchez M, Rodríguez S. Utilización de la colistina nebulizada en la colonización e infección respiratoria por *Acinetobacter baumannii* en pacientes críticos. *Med Intensiva*. 2011; 35(4): 226-231.
18. Hong S, Kim K, Hub J, Jung B, Kang M, Hong S. Multiplex PCR for Rapid Detection of Genes Encoding Class A Carbapenemases. *Ann Lab Med* 2012; 32:359-361.
19. Ellington M, Kistler J, Livermore D, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamasas. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(2):321-2.

20. Kock M, Bellomo A, Storm N, Ehlers M. Prevalence of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens obtained from an academic hospital in South Africa. *South Afr J Epidemiol Infect* 2013; 28(1): 28-32.
21. Turton J, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann M, Pitt T. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla_{OXA-51-like}* carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2974-6.
22. Xu T, Xia W, Rong G, Pan S, Huang P, Gu B. A 4-year surveillance of antimicrobial resistance patterns of *Acinetobacter baumannii* in a university-affiliated hospital in China. *J Thorac Dis* 2013; 5(4): 506-12.
23. Diomedi A. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil Infectol* 2005; 22(4): 298-320.
24. Fishbain J, Peleg A. treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51(1): 79-84.
25. Falagas M, Vardakas K, Kapaskelis A, Triarides N, Roussos N. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45(5):455-60.
26. Hammami S , Ghozzi R, Saidani M, Ben Redjeb S. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Tunisia. *Tunis Med* 2011; 89(7): 638-43.
27. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes S, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6(4): 311-6.
28. 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(9): 4826-4829.
29. Rolain J, Loucif L, Al-Maslamani M, Elmagboul E, Al-Ansari N, Taj-Aldeen S, et al. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. *New Microbes New Infect* 2016; 11:47-51.

30. Espinal P, Roca I, Vila J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in *non-baumannii Acinetobacter*. *Future Microbiol* 2011; 6(5): 495-511.
31. Herrera M, Mobilia L, Posse G. Sensibilidad de *Acinetobacter* a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. Detección de aislamientos heterorresistentes. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43 (2): 115-119.

ANEXO 1

Operacionalización de variables

Variables	Definición	Método	Tipo	Escala	Operacionalización	Indicador de medición
Colistina	Polipéptido de alto peso molecular	E-test	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 2 ug/ml) Intermedio (2-4 ug/ml) Resistente (≥ 4 ug/ml)	Frecuencia %
Amikacina	Antibiótico que pertenece a la familia de aminoglucósidos.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 16 ug/ml) Intermedio (32 ug/ml) Resistente (≥ 64 ug/ml)	Frecuencia %
Ceftriaxona	Antibiótico betalactámico que pertenece a las cefalosporinas de tercera generación.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 8 ug/ml) Intermedio (16-32ug/ml) Resistente (≥ 64 ug/ml)	Frecuencia %
Ciprofloxacina	Antibiótico que pertenece a la familia de fluorquinolonas	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 1 ug/ml) Intermedio (2 ug/ml) Resistente (≥ 4 ug/ml)	Frecuencia %
Thrimethoprim sulfametoxazol	Antibiótico que pertenece a la familia de sulfas.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible ($\leq 2/38$ ug/ml) Intermedio (-) Resistente ($\geq 4/76$ ug/ml)	Frecuencia %
Gentamicina	Antibiótico que pertenece a la familia de aminoglucósidos.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 4 ug/ml) Intermedio (8 ug/ml) Resistente (≥ 16 ug/ml)	Frecuencia %
Piperacilina	Antibiótico que pertenece a la familia de betalactámicos.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 16 ug/ml) Intermedio (32-64ug/ml) Resistente (≥ 128 ug/ml)	Frecuencia %
Levofloxacina	Antibiótico que pertenece a la familia de fluorquinolonas.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 2 ug/ml) Intermedio (4 ug/ml)	Frecuencia %

					Resistente (≥ 8 ug/ml)	
Tetraciclina	Antibiótico de amplio espectro, que se obtiene a partir del cultivo de la bacteria Streptomycesviridifaciens o de manera semisintética	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 4 ug/ml) Intermedio (8 ug/ml) Resistente (≥ 16 ug/ml)	Frecuencia %
Tobramicina	Antibiótico que pertenece a la familia de aminoglucósidos.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 4 ug/ml) Intermedio (16 ug/ml) Resistente (≥ 16 ug/ml)	Frecuencia %
Cefepime	Antibiótico que pertenece a las cefalosporinas de cuarta generación.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 8 ug/ml) Intermedio (16 ug/ml) Resistente (≥ 32 ug/ml)	Frecuencia %
Cefotaxima	Antibiótico que pertenece a las cefalosporinas de tercera generación	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 8 ug/ml) Intermedio (16-32ug/ml) Resistente (≥ 64 ug/ml)	Frecuencia %
Ceftazidima	Antibiótico que pertenece a las cefalosporinas de tercera generación	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 8 ug/ml) Intermedio (16 ug/ml) Resistente (≥ 32 ug/ml)	Frecuencia %
Imipenem	Antibiótico que pertenece a los carbapenémicos.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 4 ug/ml) Intermedio (8 ug/ml) Resistente (≥ 16 ug/ml)	Frecuencia %
Meropenem	Antibiótico que pertenece a los carbapenémicos.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible (≤ 4 ug/ml) Intermedio (8 ug/ml) Resistente (≥ 16 ug/ml)	Frecuencia %
Piperacilin-tazobactam	Antibiótico que pertenece a la familia de betalactámicos que está unido a un inhibidor de betalactamasas.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible ($\leq 16/4$ ug/ml) Intermedio (32/4-64/4 ug/ml) Resistente ($\geq 128/4$ ug/ml)	Frecuencia %

Ticarcilina-clavulanico	Antibiótico que pertenece a la familia de betalactámicos que está unido a un inhibidor de betalactamasas.	Microdilución por sistema MicroScan	Cualitativo	Nominal	Sensible ($\leq 16/2$ ug/ml) Intermedio ($32/2-64/2$ ug/ml) Resistente ($\geq 128/2$ ug/ml)	Frecuencia %
<i>bla_{GES}</i>	Genes que codifican la formación de carbapenemasas de clase A que generan resistencia a carbapenémicos.	PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{IMI}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{SME}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{KPC}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{IMP}</i>	Genes que codifican la formación de carbapenemasas de clase B que generan resistencia a carbapenémicos.	PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{VIM}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{GIM}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{SPM}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{SIM}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{OXA-23-like}</i>	Genes que codifican la formación de carbapenemasas de clase D que generan resistencia a carbapenémicos.	PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{OXA-24-like}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{OXA-51-like}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %
<i>bla_{OXA-58-like}</i>		PCR multiplex	Cualitativo	Nominal	Presencia/Ausencia	Frecuencia %

ANEXO 2

PROCEDIMIENTO PARA LA INOCULACIÓN DEL MICROSCAN

- Preparar una suspensión bacteriana equivalente a la escala 0.5 de Mc Farland, a partir de un medio fresco no selectivo, los rangos de absorbancia deben estar entre 0.08 a 0.1 de densidad óptica (DO).
- 100 ul de la escala 0.5 Mc Farland será diluida en 25 ml de agua destilada estéril, homogenizar.
- La rehidratación de los paneles de MicroScan se realizará con una pipeta multicanal, con el cual se resuspenderán 100ul de la dilución (concentración final de inóculo $3-7 \times 10^5$ UFC/ml).
- Se cubrirán algunos pocillos con 3 gotas de aceite mineral GLU, URE, H₂S, LYS, ARG, ORN Y DCB (aparecen subrayados).
- Apilar y tapar los paneles.
- Incubar a 35 °C por 16 horas.

ANEXO 3

Primer para la amplificación de los genes los genes de clase A

Gen	Secuencia	Tamaño
GES	F: GCTTCATTCACGCACTATT	323 pb
	R: CGATGCTAGAAACCGCTC	
IMI	F: TGC GGTCGATTGGAGATAAA	399 bp
	R: CGATTCTTGAAGCTTCTGCG	
SME	F: ACTTTGATGGGAGGATTGGC	551 pb
	R: ACGAATTCGAGCATCACCAG	
KPC	F: GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	638 pb
	R: GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC	

PCR multiplex para la detección de los genes de clase A

(Basado en la técnica descrita por Hong)

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer KAPA	5 X	1X	5 ul
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	25mM	1.5mM	1.5 ul
Deoxinucleótido (dNTPs)	10 mM	0.2mM	0.5 ul
Primer GES –F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer GES – R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer IMI – F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer IMI – R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer SME – F*	25uM	0.5uM	0.5 ul
Primer SME – R*	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer KPC – F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer KPC – R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Enzima DNA polimerasa GoTaq	5U	1.5U	0.1ul
Agua libre de nucleasas (@buffer Gotaqflexi)	-	-	8.9 ul
ADN	-	5 ul	5 ul
Volumen final	-	25 ul	25 ul

*Se incluyeron al master mix, los primers del gen SME, pese a que no se tenía control positivo para este gen.

ANEXO 4

Primer para la amplificación de los genes los genes de clase B

Gen	Secuencia	Tamaño
IMP	F: GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC R: CCAAACYACTASGTTATCT	188 pb
VIM	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390 pb
GIM	F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTTCCAACCTTGGCCATGC	477 pb
SPM	F:AAAATCTGG GTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	271 pb
SIM	F: TACAAGGGATTTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570 pb

PCR multiplex para la detección de los genes de clase B

(Basado en la técnica descrita por Ellington)

Componentes	Concentración	Concentración	Volumen por
	inicial	final	reacción
Buffer KAPA	10X	1X	5 ul
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	50mM	1.5mM	1.5 ul
Deoxinucleótido (dNTPs)	10mM	0.2mM	1.0 ul
Primer IMP – F	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer IMP – R	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer VIM – F	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer VIM – R	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer GIM – F*	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer GIM – R*	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer SPM – F*	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer SPM – R*	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer SIM – F*	10uM	0.5uM	1.0 ul
Primer SIM – R*	10uM	0.5uM	1.0 ul
Enzima DNA polimerasa GoTaq	5U	1.5U	0.3 ul
Agua libre de nucleasas (@buffer Gotaqflexi)	-	-	22.2 ul
ADN	-	10ul	10ul
Volumen final	-	50ul	50ul

*Se incluyeron al master mix, los primers de los genes GIM, SPM y SIM, pese a que no se tenían controles positivos para estos genes.

ANEXO 5

Primer para la amplificación de los genes los genes de clase D

Gen	Secuencia	Tamaño
OXA-23	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	501 pb
OXA-24	F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246 pb
OXA-51	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	353 pb
OXA-58	F: AAGTATTGGGGCTTGTGCTG R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599 pb

PCR multiplex para la detección de los genes de clase D

(Basado en la técnica descrita por Kock)

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer KAPA	5 X	1X	5 ul
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	25 mM	1.5mM	1.5 ul
Deoxinucleótido (dNTPs)	10mM	0.2mM	0.5 ul
Primer OXA-23 - F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-23 - R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-24 - F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-24 - R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-51 - F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-51 - R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-58 - F	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Primer OXA-58 - R	25 uM	0.5uM	0.5 ul
Enzima DNA polimerasa GoTaq	5U	1.5U	0.3 ul
Agua libre de nucleasas (@buffer Gotaqflexi)	-	-	8.7 ul
ADN	-	5 ul	5 ul
Volumen final	-	25 ul	25ul

ANEXO 6

TABLA N°1. Identificación de *A. baumannii* con el sistema comercial *MicroScan NC50* versus detección del gen *bla_{OXA-51-like}*.

Sistema de identificación	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>/haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter</i> NO <i>baumannii</i>	Total
Sistema comercial	95	17*	112
<i>PCR-bla_{OXA-51-like}</i>	79	33	112

*17 aislamientos identificados como *Acinetobacter iwoffii*

TABLA N°2. Frecuencia de la resistencia antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* NO *baumannii*.

Antibióticos	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=79)		<i>Acinetobacter</i> NO <i>baumannii</i> (n=33)		Total (n=112)	
	n	%	n	%	n	%
	Ceftriaxona	64	81.0	13	39.4	77
Ciprofloxacina	64	81.0	12	36.4	76	67.9
Cefotaxima	64	81.0	12	36.4	76	67.9
Piperacilina	59	74.7	7	21.2	66	58.9
Cefepime	57	72.2	8	24.2	65	58.0
Ceftazidima	56	70.9	12	36.4	68	60.7
Levofloxacina	51	64.6	9	27.3	60	53.6
Amikacina	48	60.8	8	24.2	56	50.0
Trimetoprim-sulfametoxazol	48	60.8	6	18.2	54	48.2
Piperacilin-tazobactam	47	59.5	5	15.2	52	46.4
Ticarcilina-ácido clavulánico	46	58.2	8	24.2	54	48.2
Meropenem	46	58.2	6	18.2	52	46.4
Gentamicina	41	51.9	6	18.2	47	42.0
Imipenem	40	50.6	5	15.2	45	40.2
Tobramicina	37	46.8	3	9.1	40	35.7
Tetraciclina	8	10.1	1	3.0	9	8.0

TABLA N° 3. Frecuencia de resistencia antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* productoras de carbapenemasas tipo OXA

Antibiótico	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=46)	
	n	%
Ciprofloxacina	46	100.0
Meropenem	46	100.0
Ceftriaxona	45	97.8
Cefotaxima	45	97.8
Ticarcilina-ácido clavulánico	44	95.7
Piperacilin-tazobactam	43	93.5
Piperacilina	43	93.5
Cefepime	42	91.3
Imipenem	40	87.0
Ceftazidima	39	84.8
Amikacina	36	78.3
Levofloxacina	32	69.6
Trimetoprim-sulfametoxazol	32	69.6
Gentamicina	27	58.7
Tobramicina	24	52.2
Tetraciclina	4	8.7

TABLAN°4. Distribución de los genes productores de carbapenemasas tipo OXA en *Acinetobacter baumannii*

Genes de clase D	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=46)	
	n	%
<i>bla_{OXA-23} like</i>	44	95.7
<i>bla_{OXA-24} like</i>	1	2.2
<i>bla_{OXA-58} like</i>	0	0

TABLA N°5. Distribución de los tipos de enzimas OXA, perfil de sensibilidad y CMI de colistina en *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter* NO *baumannii*.

Código	<i>Acinetobacter</i>	Grupo de enzima (OXA)	Antibióticos sensibles	Colistina CMI (ug/ml)
Rch186	<i>A. baumannii</i>	51, 23	LEV, TIC/CLAV, SXT, TE	1
Rgai286	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, LEV, TOB, SXT, TE	0.19
Rch558	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.38
Rch819	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.38
Rch825	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.38
Rch976	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.38
Rch596	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, LEV, SXT, TE	0.19
Rch608	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.19
Rch760	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.19
Rch759	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.125
Rch1067	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, SXT, TE	0.125
Rch850	<i>A. baumannii</i>	51, 24	FEP, CAZ, CRO	0.5
Rgai839	<i>A. baumannii</i>	51	AK, PIP, SXT	0.38
Rch859	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TOB, SXT, TE	0.38
Rch884	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB, TE	0.125
Rerm601	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, LEV, TE	0.125
Rch329	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TOB, SXT	0.38
Rch903	<i>A. baumannii</i>	51, 23	LEV, TE	0.38
Rgai047	<i>A. baumannii</i>	51, 23	AK, TE	0.19
Rch890	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB	0.19
Rgai011	<i>A. baumannii</i>	51, 23	AK, TE	0.125
Rch868	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB	0.125
Rch1066	<i>A. baumannii</i>	51, 23	CN, TOB	0.125
Rass135	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TOB, TE	0.125
Rerm367	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.38
Rch1006	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.38
Rch174	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.38
Rch200	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.38
Rch210	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.38
Rerm205	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.25
Rgai052	<i>A. baumannii</i>	51, 23	AK,	0.19
Rgai349	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.19
Rgai422	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.19
Rch687	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.125
Rgai247	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.125
Rgai339	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.125
Rgai519	<i>A. baumannii</i>	51, 23	TE	0.125
Rch802	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.38
Rch832	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.38
Rch1031	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.38

Rass016	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.38
Rgai253	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.19
Rch637	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.19
Rerm369	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.19
Rass026	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.125
Rch950	<i>A. baumannii</i>	51, 23	PAN	0.125
Rch372	<i>Acinetobacter NO baumannii</i>		FEP, CIP, CN, LEV, PIP, TIC/CLAV, TOB, SXT, TE	0.094
Rch422	<i>Acinetobacter NO baumannii</i>		AK, CN, LEV, PIP, TIC/CLAV, TOB, SXT, TE	1
Rch1063	<i>Acinetobacter NO baumannii</i>		CN, TOB, SXT, TE	0.125
Rch958	<i>Acinetobacter NO baumannii</i>		TOB, TE	0.19
Rch932	<i>Acinetobacter NO baumannii</i>		PAN	0.38
Rch852	<i>Acinetobacter NO baumannii</i>		PAN	0.125

*Resistente a todos los antibióticos analizados. AK: amikacina, TE: tetraciclina, TOB: tobramicina, CN: gentamicina, LEV: levofloxacina, SXT: trimetoprim sulfametosaxol, PIP: piperacilina, TIC/CLAV: ticarcilina ácido clavulánico, FEP: cefepime, CAZ: ceftazidime, TE: tetraciclina, CTX: cefatoxima, CRO: ceftriaxona y CIP: ciprofloxacina.

Hospitales de Lima

Rgai: Hospital Nacional, Guillermo Almenara

Rch: Hospital Nacional Cayetano Heredia

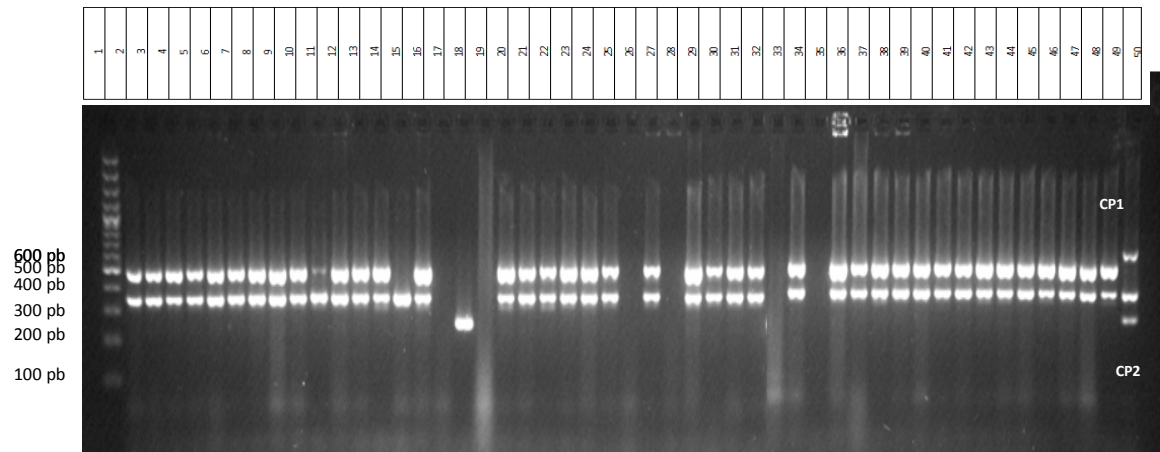
Rerm: Hospital Edgardo Rebagliati Martins

Rass: Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren.

ANEXO 7

Figura N°1

Resultados del PCR Multiplex para la detección de carbapenemasas de Clase D



Corrida electroforética en gel de agarosa 2%. Carriles: 1) Marcador de peso molecular de 100pb; 2)Rgai247; 3) Rass026; 4) Rass016; 5) Rgai243; 6)Rgai011; 7)Rgai47; 8)Rgai253; 9)Rch868; 10)Rch832; 11) Rgai519; 12) Rgai339; 13) Rgai422; 14) Rgai286; 15) Rgai839; 16) Rch596; 17) Rch958*; 18) Rch850; 19) Rch372; 20) Rch819; 21) Rch1031; 22) Rch1067; 23) Rch329; 24) Rch200; 25) Rgai052; 26) Rch932*; 27) Rch884; 28) Rch322*; 29) Rch760; 30) Rch903; 31) Rch1006; 32) Rch637; 33) Rch1063*; 34) Rch950; 35) Rch422*; 36) Rch802; 37) Rch186; 38) Rch825; 39) Rch890; 39) Rch687; 40) Rch174; 41) Rch976; 42) Rch859; 43) Rch558; 44) Rch1066; 45) Rch608; 46) Rch759; 47) Rch210; 48) Rerm369; 49) **CP1**:Control positivo de *Acinetobacter baumannii* portador de los genes: OXA-23 (501pb) y OXA-51 (353 pb), 50) **CP2**:Control positivo de *Acinetobacter baumannii* portador de los genes: OXA-51 (353 pb), OXA-58 (599 pb) yOXA-24 (246 pb).

Pb: pares de bases.

Rch958*, Rch932*, Rch322*, Rch1063*Rch422*: Fueron *Acinetobacter* NO *baumannii* resistentes a carbapenemicos.