

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DETERMINACIÓN DE PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *ACINETOBACTER*
SPP. DE ORIGEN ANIMAL Y NOSOCOMIAL**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

MVZ. ESA. ESLYN ISABEL SOLIS ZENTENO

DIRECTORA:
DRA. SAWAKO OSHIMA

CO-DIRECTOR:
M.C. RAFAEL MARTÍNEZ MIRANDA

Mexicali, Baja California, México

Diciembre del 2016

COMITÉ ASESOR

Esta Tesis se realizó bajo la dirección del Comité de Tesis indicado, ha sido revisado y aceptada por el mismo, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Veterinarias.

Dra. Sawako Oshima

DIRECTORA

M.C. Rafael Martínez Miranda

CO-DIRECTOR

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

ASESOR

Dr. Tomas Benjamin Rentería Evangelista

ASESOR

Dra. Angelica M. Martinez Contreras

ASESORA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme en esta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgar la beca para la realización de mi proyecto de Investigación y mis estudios.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por permitirme usar las instalaciones.

A la Dra. Sawako por su apoyo con conocimientos y motivación en el proyecto y durante el proceso de mi formación.

Al Dr. Gerardo Medina, Dra. Angelica M. Martinez Contreras, M.C. Rafael Martínez Miranda por su enseñanza y apoyo en el proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres Ruperto Solis y Ma. Guadalupe Zenteno Garduño por darme la confianza y amor incondicional en todo momento

A mi esposo Manuel por su apoyo y amor brindados.

A mi hijo Bersain por bendecir nuestra vida.

A la Dra. Sawako en especial por ayudarme a continuar en este proceso, creer en mi y sus consejos.

Al M.C. Rafael Martínez Miranda por brindarme su apoyo incondicional y conocimientos.

A mis amigos del laboratorio de Biología Molecular, Brucelosis y Tuberculosis, Salud Pública Veterinaria por esas pláticas y revisiones exhaustivas.

A mis amigos del área de Nutrición e Inocuidad y Calidad en alimentos por brindarme su amistad.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LITERATURA	2
Características de <i>Acinetobacter</i> spp.	2
Distribución.....	4
Reporte de Infeccion nosocomial en Latinoamerica	6
Resistencia a antibióticos	7
Multiresistencia.....	11
Clasificación de genes de resistencia	14
Diagnóstico bacteriológico.....	19
Diagnóstico molecular	19
Variación genómica	21
MATERIALES Y METODOS	23
Lugar de estudio.....	23
Aislamiento bacteriano	23
PCR del gen rpoB y 16S rRNA.....	24
Análisis filogenético	25
Antibiogramas	27
Detección molecular de genes codificantes de carbapenamasa.....	28
Análisis de tipificación de secuencias de multiples locus (MLST).	29
RESULTADOS	32
Resistencia a antimicrobianos.....	38
Tipificación de secuencias de multiples locus (MLST)	42
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN	51
LITERATURA CITADA.....	52
ANEXOS.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Resumen de mecanismos de resistencia.....	10
Figura 2. Definición resistencia a medicamentos junto con opciones terapéuticas.....	13
Figura 3. Clasificación de las carbapenemasas.....	18
Figura 4. Amplificación de un fragmento del gen rpoB.....	35
Figura 5. Analisis filogenético de <i>Acinetobacter</i> spp. según la secuencia parcial de rpoB.....	36
Figura 6. Alineación múltiple de un fragmento del gen rpoB (región polimórfica).....	37
Figura 7. Visualización de genes de resistencia oxa 23, oxa 24 y oxa58.....	41
Figura 8. Electroforesis de la amplificación del esquema de Universidad de Oxford.....	44

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Revisión de taxonomía del genero <i>Acinetobacter</i>	3
Cuadro 2. Cebadores usados para la identificación de <i>Acinetobacter spp.</i> y genes de resistencia.....	26
Cuadro 3. Cebadores del esquema de MLST Pasteur.....	30
Cuadro 4. Cebadores del esquema MLST de Oxford.....	31
Cuadro 5. Aislados de <i>A. baumannii</i> incluidos en el trabajo.....	34
Cuadro 6. Antibiograma de muestras de origen animal y nosocomial.....	39
Cuadro 7. Genes de resistencia Bla_{oxa} amplificados	40
Cuadro 8. Perfiles de MLST esquema de Pasteur y Universidad de Oxford.....	43
Cuadro 9. Comparación de las secuencias tipo de MLST del esquema de Universidad de Oxford.....	45
Cuadro 10. Análisis de agrupación (eBurst) de MLST del esquema de Universidad de Oxford en muestras de origen nosocomial.....	46
Cuadro 11. Analisis de agrupación de (eBurst) de MLST del esquema de Universidad de Oxford en muestras de origen animal.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

Cpn60: 60-KDa chaperonina

FusA: Factor de enlongación EF-G

GdhB: Glucosa deshidrogenasa B

GltA: Citrato sintasa

Gpi: Isomerasa de glucosa -6 –fosfato

GyrB: ADN girasa subunidad B

MDR: Multidrogo resistente

MLST: Tipificación multilocus de secuencias

PCR: Reaccion en cadena de la polimerasa

PDR: Pandroga resistente

PyrG: Sintasa CTP

RecA: Factor homologo de recombinación

RplB: Proteina ribosomal 50S L2

RpoB: RNA polimerasa subnidad B

RpoD: Factor sigma polimerasa RNA

ST: Secuencia Tipo

UCI: Unidades de Cuidado Intensivo

XDR: Extrema drogorresistencia

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo gram negativo, aeróbico, de distribución mundial y de medioambiente. Por su naturaleza cuenta con mecanismos de resistencia a antibióticos, y es resistente a múltiples antibióticos, con propagación epidémica entre pacientes tanto en humanos como animales. Tiene la habilidad de persistir en el ambiente por largos periodos que lo hacen eficaz como patógeno endémico. Se considera, que en Mexicali, BC, los aislados de *Acinetobacter* spp. de origen animal/nosocomial obtenidos poseen resistencias a diferentes antibióticos y cuentan con segmentos genéticos que les confiere ese fenotipo, además de la misma ST de rpoB y MLST. En este trabajo se determinaron los perfiles de resistencias a antibióticos y características genotípica y genómica de cepas de *Acinetobacter* spp. Aislados de origen animal y nosocomial en Baja California. 19 aislados de *Acinetobacter* spp., de los cuales 3 asociados a mastitis bovina y 16 a pacientes humanos fueron identificados, genotipados por PCR y secuenciados en el gen rpoB. Se determinó la resistencia fenotípica se realizó con la técnica de difusión en agar a 9 familias de antibióticos y la resistencia genotípica por PCR de tres genes de carbapenemasas (Bla_{OXA-23}, Bla_{OXA-24} Bla_{OXA-58}). Por último se determinaron las características genómicas de 6 aislados con la técnica de MLST con el esquema de Instituto Pasteur (MLST-IP) y/o Universidad de Oxford (MLST-UO). Todos los 19 aislados se confirmaron como *A. baumannii* por PCR de rpoB. Todos los aislados de origen bovino fueron MDR con GT del rpoB como G4 y los de origen nosocomial fueron XDR y con GT de rpoB aun no reportado en la literatura. 12 de 19 aislados fueron positivos al gen Bla_{OXA-23}. Por MLST-IP se identificaron 2 ST (156 y 239), con MLST-UO 3 ST (1054, 205, 207) y una ST nueva. El genotipado de rpoB y la tipificación por MLST demuestran ser herramientas útiles de epidemiología molecular y se podrá utilizar en el programa de vigilancia de hospital junto con el análisis fenotípico y genotípico de resistencia para monitorear *A. baumannii* MDR y XDR altamente patogénico.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a gram-negative, aerobic, global distribution and environmental cocobacillus. By its nature it has mechanisms of resistance to antibiotics, and is resistant to multiple antibiotics, with epidemic spread between patients in both humans and animals. It has the ability to persist in the environment for long periods that make it effective as an endemic pathogen. It is considered that, in Mexicali, BC, *Acinetobacter* spp. isolates obtained from animal / nosocomial origin have resistance to different antibiotics and have genetic segments that confer this phenotype, in addition to the same ST of rpoB and MLST. In this work, the profiles of antibiotic resistance and genotypic and genomic characteristics of *Acinetobacter* spp. strains isolated from animal and nosocomial origin were determined in Baja California. 19 isolates of *Acinetobacter* spp., in which 3 associated with bovine mastitis and 16 to human patients were identified, genotyped by PCR and sequenced in the rpoB gene. We determined profiles of phenotypic resistance to 9 families of antibiotics and profiles of genetic resistance by PCR of three carbapenemase genes (BlaOXA-23, BlaOXA-24 BlaOXA-58). Finally, the genomic characteristics of 6 isolates with the MLST technique were determined with the scheme of Instituto Pasteur (MLST-IP) and / or Oxford University (MLST-OU). All 19 isolates were confirmed as *A. baumannii* by rpoB PCR. All isolates of bovine origin were MDR with genotype of rpoB as G4 and those of nosocomial origin were XDR and with genotype of rpoB not yet reported in the literature. 12 of 19 isolates were positive for the BlaOXA-23 gene. By MLST-IP 2 STs (ST156 and ST239), with MLST-OU 3 STs (ST1054, ST205, ST207) and a new ST were identified. rpoB genotyping and MLST genomic typing prove to be useful tools of molecular epidemiology and can be used in the hospital surveillance program together with monitoring analysis of phenotypic and genotype resistance of *A. baumannii* MDR and highly pathogenic XDR.

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter spp. es un organismo de vida libre presente en el ambiente como suelo, agua, comida y aguas residuales (Bergogne-Berezin et al., 2008), han sido implicado como parte de la flora de piel humana y animal (Peleg et al., 2008) más de un 40% colonizan diferentes partes del cuerpo (Berlau et al., 1999a; Seifert et al., 1997) y flora fecal (Dijkshoorn et al., 2005).

Acinetobacter baumannii esta implicado en varios tipos de infecciones, especialmente en individuos inmunocomprometidos y unidades de cuidados intensivos (UCI) que con frecuencia son resistentes a múltiples antibióticos, con propagación epidémica entre pacientes tanto en humanos como animales (Boerlin et al., 2001). Tiene la habilidad de persistir en el ambiente por periodos extendidos con un amplio rango de condiciones que lo hacen particularmente eficaz como patógeno endémico (Ettinger y Feldman 2009).

En Guadalajara, Jalisco, México existen reportes del 2011 con una prevalencia del 20.8% en UCI; *A. baumannii* es el segundo de 5 patógenos bacterianos más aislados en el 2007 después de *E. coli* considerándose patógeno endémico nosocomial (Morfin-Otero et al., 2013). Existen 2 factores que han contribuido a la importancia de la bacteria: incidencia actual y resistencia a los múltiples fármacos por su uso prologando y tratamientos complejos, lo cual contribuye a la propagación de bacterias multidroga resistentes (Bergogne-Berezin et al., 2008; Kwon et al., 2007; Poirel et al., 2012). Considerándose que en Mexicali, BC los aislados de *Acinetobacter* spp. de origen animal/nosocomial obtenidos poseen resistencias a diferentes antibióticos y cuentan con segmentos genéticos que les confiere ese fenotipo, además de la misma ST de rpoB y MLST.

Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar los perfiles de resistencias a antibióticos y genotipificación de cepas multidroga resistentes de *Acinetobacter baumannii* de Baja California.

REVISION DE LITERATURA

Características de *Acinetobacter* spp.

El género *Acinetobacter* comparte muchas características que permite su identificación presuntiva a este nivel. Son gram negativos, aerobios estrictos, catalasa-positivos, oxidasa negativos, no motiles, cocobacilos no fermentadores, su ADN genómico muestra el contenido de G+C de 39% a 47%, conocidos como patógenos oportunistas (Bergogne-Berezin et al., 2008). Las especies microbianas del genero han sido consideradas como un grupo de alto grado de similitud en términos de sus propiedades fenotípicas. Sin embargo, con la hibridación de ácidos nucleicos y secuenciación proporcionan los mejores métodos disponibles para la designación de las especies y determinación de las relaciones entre los diferentes organismos (Bergogne-Bérézín y Towner 1996).

Varias cepas de *Acinetobacter* crecen entre 20° C y 37° C teniendo un óptimo de 33-35° C. Las especies de *Acinetobacter* de origen humano crecen bien en medio solido como agar sangre de borrego y soya tripticasa a una temperatura de incubación de 37°C (Bergogne-Berezin et al., 2008). Estos organismos forman colonias lisas, a veces mucoides blanco grisáceo; colonias de *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* se asemejan a los de *Enterobacteriaceae*, con un diámetro de la colonia de 1,5 a 3 mm después de cultivo durante la noche, mientras la mayoría de las otras especies de *Acinetobacter* producen colonias más pequeño y translúcida. A diferencia de la *Enterobacteriaceae*, algunas especies de *Acinetobacter* fuera de *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* pueden no crecer en agar McConkey (Peleg et al., 2008). Se pueden distinguir las especies nombras del genero *Acinetobacter* (cuadro 1). El género incluye especies patógenas y no patógenas (de Berardinis et al., 2009).

Cuadro 1.- Revisión taxonómica del género *Acinetobacter*.

Especie	Referencia
<i>Acinetobacter apis</i>	(Kim et al., 2014)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	(Bouvet y Grimont 1986a)
<i>Acinetobacter baylyi</i>	(Carr et al., 2003)
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	(Nemec et al., 2009)
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	(Nemec et al., 2010)
<i>Acinetobacter bohemicus</i>	(Krizova et al., 2014)
<i>Acinetobacter boissieri</i>	(Alvarez-Perez et al., 2013)
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	(Carr et al., 2003)
<i>Acinetobacter brisouii</i>	(Anandham et al., 2010)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(Baumann et al., 1968)
<i>Acinetobacter gandensis</i>	(Smet et al., 2014)
<i>Acinetobacter gernerii</i>	(Carr et al., 2003)
<i>Acinetobacter grimontii</i>	(Carr et al., 2003)
<i>Acinetobacter guangdongensis</i>	(Feng et al., 2014)
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	(Nemec et al., 2010)
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	(Nemec et al., 2009)
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	(Bouvet y Grimont 1986b)
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	(Li et al., 2014a)
<i>Acinetobacter indicus</i>	(Malhotra et al., 2012)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	(Bouvet y Grimont 1986b)
<i>Acinetobacter junii</i>	(Bouvet y Grimont 1986b)
<i>Acinetobacter kookii</i>	(Choi et al., 2013)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	(Bouvet y Grimont 1986b)
<i>Acinetobacter nectaris</i>	(Alvarez-Perez et al., 2013)
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	(Nemec et al., 2011)
<i>Acinetobacter pakistanensis</i>	(Saira et al., 2014)

Acinetobacter parvus	(Nemec et al., 2003)
Acinetobacter pittii	(Nemec et al., 2011)
Acinetobacter puyangensis	(Li et al., 2013)
Acinetobacter qingfengensis	(Li et al., 2014b)
Acinetobacter radioresistens	(Nishimura et al., 1988)
Acinetobacter rudis	(Vaz-Moreira et al., 2011)
Acinetobacter schindleri	(Nemec et al., 2001b)
Acinetobacter seifertii	(Nemec et al., 2015)
Acinetobacter soli	(Kim et al., 2008)
Acinetobacter tandoii	(Carr et al., 2003)
Acinetobacter tjernbergiae	(Carr et al., 2003)
Acinetobacter townneri	(Carr et al., 2003)
Acinetobacter ursingii	(Nemec et al., 2001a)
Acinetobacter venetianus	(Vanechoutte et al., 2009)

Distribución

Acinetobacter spp. es ubicuo en la naturaleza y puede ser encontrada en agua, comida, suelo, lodo, organismos vivos, vegetales así como en heces, orina y piel de humanos y animales (Bergogne-Berezin et al., 2008; Gennari y Lombardi 1993; Kempf et al., 2012; Peleg et al., 2008; Turton et al., 2010; Zordan et al., 2011). *Acinetobacter* spp. puede ser aislada de piel en uno o más sitios del cuerpo, y las frecuencias de la colonización fueron los siguientes: antebrazo (51 %), frente (47 %) dedos del pie (34 %) heces de animales, artrópodos, vegetales (Berlau et al., 1999a; Dijkshoorn et al., 2005; Seifert et al., 1997) con 44% en piel de voluntarios sanos, las especies aisladas más frecuentemente son *A. lwoffii* (61%), especies genómicas de *Acinetobacter* 15BJ (12%), *A. radioresistens* (8%) y especies genómicas 3 *Acinetobacter* (5%). (Berlau et al., 1999a).

Los miembros de *Acinetobacter*, en particular *A. baumannii* son comúnmente encontradas en ambientes de hospital, como colonizadores de la piel de pacientes y membranas mucosas, como agente etiológico incluido en el rango de infecciones nosocomiales y como contaminante del equipo médico (Bergogne-Berezin et al., 2008). Se ha sugerido que la piel humana podría ser la fuente de severas infecciones, como bacteremias (Berlau et al., 1999a; Fournier y Richet 2006). Las infecciones nosocomiales pueden estar derivadas de la flora endógena de pacientes o de microorganismos exógenos adquiridos por pacientes durante su estancia en el hospital (Boerlin et al., 2001). De acuerdo con Berlau et al. (1999b), la comida del hospital puede ser una fuente potencial de adquisición de *A. baumannii*, aunque existen estudios que han demostrado que la colonización del tracto digestivo puede ser común en el ambiente hospitalario, con tasas de colonización de hasta el 41 % en los pacientes en la unidad de cuidados intensivos (Corbella et al., 1996).

En la práctica clínica, las infecciones con el género *Acinetobacter* están asociadas a dispositivos artificiales como en los brotes en UCI por la contaminación en el equipo de ventilación y neumonías con un 17% (Munoz-Price y Weinstein 2008). En las UCI la presencia y duración de los procedimientos invasivos, así como la exposición a antibióticos de amplio espectro han sido identificados como factores de riesgo en muchos estudios para la adquisición de *Acinetobacter* spp. (Koeleman et al., 2001). Sobrecrecimiento bacteriano en el estómago es otra vía que puede estar involucrado en el desarrollo de la neumonía nosocomial y bacteriemia. Esto puede ocurrir en condiciones de disminución de la secreción de ácido a menudo observado en pacientes de UCI (Bergogne-Berezin et al., 2008) así como la colonización del tracto gastrointestinal es considerado por algunos autores como el reservorio principal de cepas resistentes (Corbella et al., 1996).

A. baumannii ha sido reportado rara vez en animales ya que se ha considerado mayormente como patógeno nosocomial humano y hasta ahora

no se ha realizado estudios de la flora normal de los animales para determinar la presencia de *Acinetobacter* spp. sin embargo existen diferentes estudios donde son aislados de animales de sacrificio para consumo humano (16/1381) (Hamouda et al., 2011), en pequeñas especies se ha reportado aislamiento a partir de aparato genitourinario, tracto respiratorio, heridas, hemocultivos, con una tasa de mortalidad del 100% en pacientes sistémicamente afectados (Francey et al., 2000), en casos de mastitis bovina *A. Iwoffii/junii* con 6.0% (Nam et al., 2009) *Acinetobacter Iwoffii* 3.1% (Malinowski et al., 2006), de catéteres de yugular en caballos siendo este el único organismo responsable de la infección local y colonización (Endimiani et al., 2011; Vaneechoutte et al., 2000),

Existen tres factores posibles que contribuyen a la persistencia de *A. baumannii* en el ambiente de hospital; resistencia a antimicrobianos, resistencia a la desecación y resistencia a desinfectantes (Bergogne-Berezin et al., 2008). Las cepas de *A. baumannii* sobreviven a la desecación mucho mejor que otras especies como *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. Iwoffii* (Jawad et al., 1996), la mayoría de las cepas de *A. baumannii* sobreviven largo tiempo considerablemente a comparación de *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*, estas observaciones sugieren la propagación aérea de *A. baumannii* en salas de hospital (Wisplinghoff et al., 2000) y explica la ocurrencia repetitiva de brotes después de la desinfección incompleta de las superficies secas contaminadas. Cuando los tiempo de supervivencia de cepas de *A. baumannii* esporádicos y epidémicos son comparados, no hubieron diferencias; todas las cepas investigadas tuvieron la habilidad de sobrevivir por tiempos largos en superficies secas y hubo un incremento potencial de la propagación epidémica (Bergogne-Berezin et al., 2008).

Reporte de Infeccion nosocomial en Latinoamerica .

Las infecciones con *A. baumannii* generalmente ocurren en pacientes con enfermedades severas en UCI, la tasa de mortalidad es alta entre el 26%

al 68% (Sunenshine et al., 2007). En Latinoamérica, las bacterias patógenas frecuentemente aisladas de infecciones nosocomiales de torrente sanguíneo incluyen a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* (Sader et al., 2002); siendo agrupadas bajo el acrónimo de ESKAPE por la característica de MDR (Multidrogo Resistente) y que actualmente se están realizando vigilancia global y regional para su control (Llaca-Díaz et al., 2012).

Existen reportes que en el hospital de Guadalajara, Jalisco, México se obtuvo de pacientes adultos de UCI. En 1999, se obtuvieron 18 aislados de *A. baumannii*, después entre el 2000 y 2001, este número incrementó arriba de 100 aislados. Para el 2010 se obtuvieron más de 500 aislados. En el 2011, la prevalencia de *A. baumannii* fue de 20.8% para las UCI, 9.4% en el área médica, 1.6% para el área de cirugía, 5.8% en área de neurocirugía y 1% en el área pediátrica (Morfin-Otero et al., 2013). En el 2012 en el hospital humano de enseñanza en Monterrey, Nuevo León, México se identificó como *A. baumannii* 268 de 1692 aislados, esto correspondiendo al 15.8% (Llaca-Díaz et al., 2012)

A. baumannii fue más frecuentemente aislado durante los meses de calor seco entre Abril y Junio y durante los meses de calor húmedo entre Julio y Septiembre (Morfin-Otero et al., 2013).

Resistencia a antibióticos

La presión evolutiva es grande en la aparición de resistencia a los antibióticos, esto como resultado del uso prolongado de antibióticos en medicina humana así como en tratamientos en animales. La resistencia a antibióticos es un fenómeno natural, la cual se define como la habilidad de las especies bacterianas a resistir la acción de los antibióticos como

resultado de su estructura inherente o características funcionales (Blair et al., 2015)

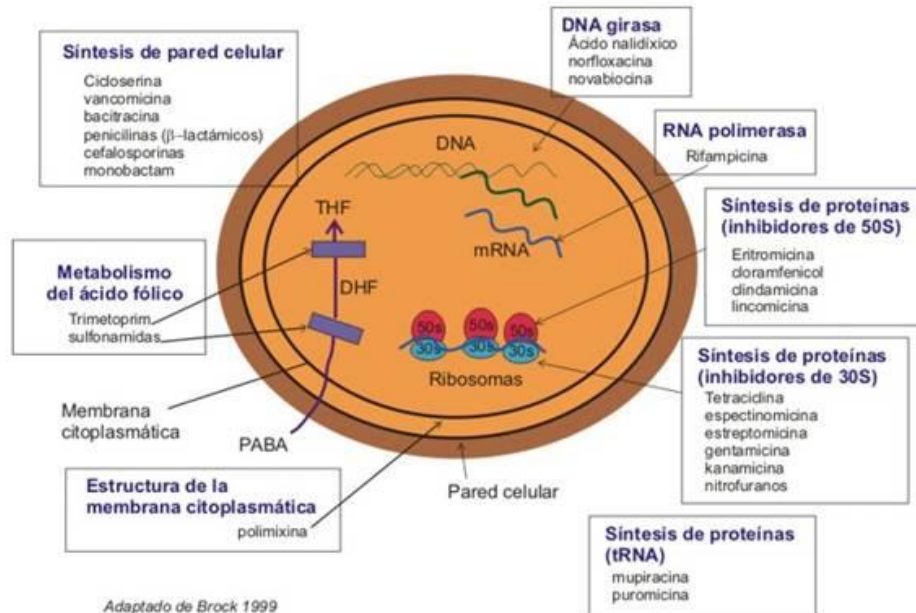
Una de las características sorprendentes de las especies de *Acinetobacter* es la extraordinaria habilidad para desarrollar múltiples mecanismos de resistencia contra las principales clases de antibióticos disponibles en el mercado así como la adquisición de nuevos determinantes de resistencia (Bergogne-Bérézin y Towner 1996;Medeiros y Lincopan 2013), de hecho *A. baumannii* puede expresar fácilmente resistencia a beta lactámicos de amplio espectro (3era generación de cefalosporinas, carboxipenicilinas y carbapenems) y aminoglucosidos por la producción de enzimas hidrolíticas, llamadas beta lactamasas y transferasas que inactivan a los agentes antibacterianos; además muchas cepas pueden expresar altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (Fournier y Richet 2006;Perez et al., 2007).

Se puede asumir que la resistencia a microorganismos permite el incremento de la morbilidad y mortalidad; existe un incremento del riesgo en los pacientes que no reciben un apropiado tratamiento ya que pasan un largo curso de enfermedad o tienen resultado fatal (Acar 1997)

Diversos autores han descrito los mecanismos responsables a la resistencia a beta lactámicos y otras clases de antibióticos en *A. baumannii*:

- 1) Síntesis de carbapenemasas (enzimas) (Poirel y Nordmann 2006).
- 2) Disminución de la permeabilidad de la membrana externa causada por la pérdida o la expresión reducida de las porinas (Clark 1996).
- 3) Alteración en las proteínas de unión a penicilina (Fernandez-Cuenca et al., 2003).
- 4) La actividad de las bombas de eflujo que disminuyen la concentración del antibiótico dentro de la célula bacteriana (Perez et al., 2007).

Canales de porinas y las proteínas de membrana externa son importantes para el transporte de agentes antimicrobianos a la célula, para ganar acceso a las bacterias. La resistencia a carbapenem en especies de *Acinetobacter* ha sido ligada a la pérdida de proteínas que se creen que pasan a través de los canales de porinas hacia la membrana externa (Manchanda et al., 2010). Los plásmidos y transposones son también importantes mecanismos para el establecimiento de cepas multiresistentes (Towner et al., 1991).



(Madigan y Martinko 2004)

Figura 1.- Resumen de mecanismos de resistencia

Se ha estado especulando que la resistencia a desinfectantes puede contribuir a la epidemicidad del organismo en el entorno clínico; recientemente se compararon in vitro las actividades de varios desinfectantes, como propanol.

Las especies de *Acinetobacter* tienen habilidad para desarrollar múltiples mecanismos de resistencia contra las principales clases de antibióticos disponibles en el mercado así como la adquisición de nuevos determinantes de resistencia (Bergogne-Bérézin y Towner 1996; Medeiros y Lincopan 2013), esto debido a el uso prolongado de antibióticos durante la terapéutica lo cual causa una presión selectiva a los antimicrobianos, además poseen genes que codifican la inactivación de enzimas y bombas de flujo específicas presentes en algunas cepas y están asociados a elementos genéticos móviles como transposones, integrones o plásmidos, lo cual sugiere su adquisición por transferencia horizontal (Dijkshoorn et al., 2007)

Se ha observado que las tasas de resistencia en una epidemia de *A. baumannii* son significativamente más altas que las cepas esporádicas (Dijkshoorn et al., 1996). Recientemente se ha incrementado la resistencia a carbapenem en cepas de *A. baumannii* que son exclusivamente encontradas con brotes en hospital (Manikal et al., 2000; Marais et al., 2004).

Multiresistencia

La definición de multidroga resistente según Falagas et al., (2006) observaron que existen diferentes definiciones para la resistencia antimicrobiana que ha sido usada en las publicaciones. En particular los términos “multi-droga resistente” (MDR) y “pandroga resistente” (PDR) han sido usadas para caracterizar aislados de *A. baumannii* o *P. aeruginosa* con variedades en fenotipo y genotipo (Magiorakos et al., 2012). En los aislados

de *A. baumannii* se tiene como MDR a la resistencia a antibióticos representativos, al menos 3 clases de agentes antimicrobianos (Falagas et al., 2006) siendo la definición más comúnmente usada en bacterias gram positivos como gram negativos (Magiorakos et al., 2012).

Se destacan factores que pueden favorecer a la adquisición de multiresistencia:

- 1) La habilidad de sobrevivir en el ambiente y reservorios humanos
- 2) La adquisición de elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones
- 3) La resistencia intrínseca de los microorganismos, lo que puede ser explicado por la baja permeabilidad de ciertos antibióticos a través de la membrana externa, la expresión constitutiva de algún flujo de salida de las bombas o de la interacción entre ambos procesos.

(Bergogne-Berezin et al., 2008)

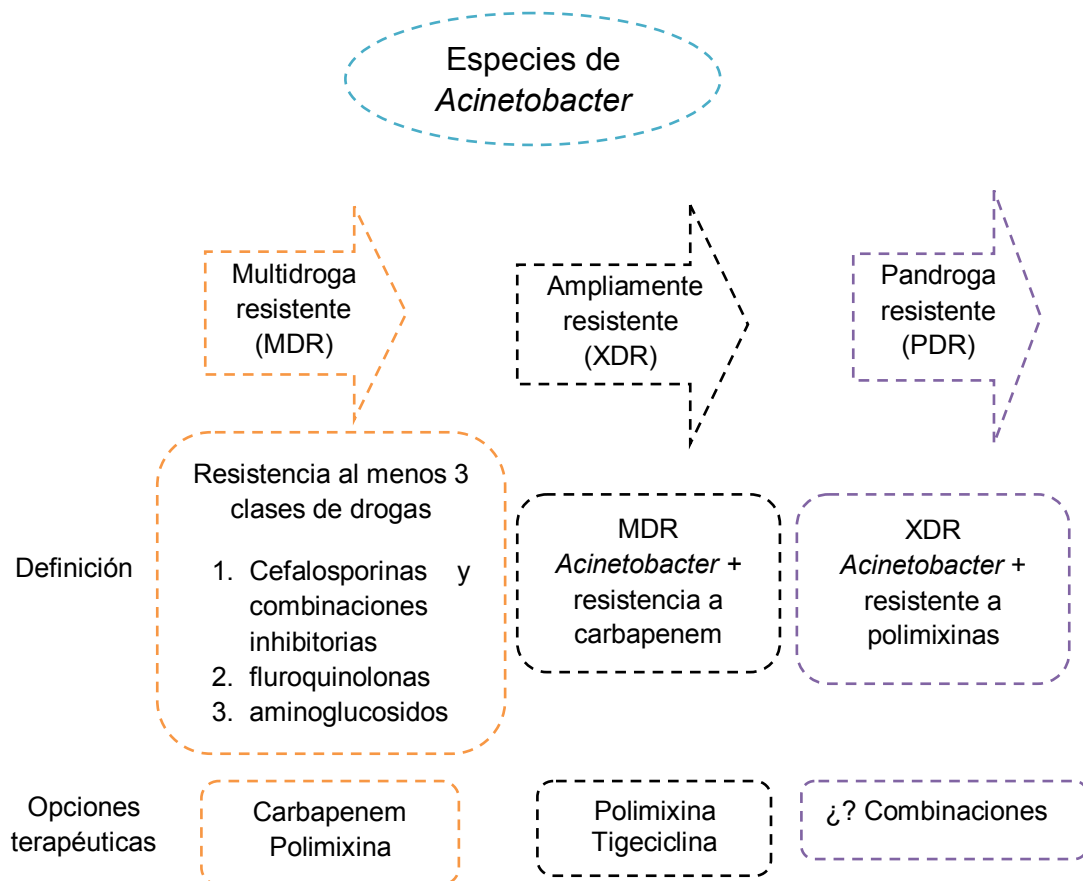


Figura 2. Definición resistencia a medicamentos junto con opciones terapéuticas (Manchanda et al., 2010).

Clasificación de genes de resistencia

La β -lactamasa AmpC codifica cefalosporinas intrínsecas en todas las *A. baumannii*. Usualmente muchas β -lactamasas tienen bajo nivel de expresión que no causa una resistencia clínica apreciable, sin embargo con la adición de un promotor de secuencia de inserción, ISAb₁, cerca del gen ampC incrementa la producción de B-lactamasa causando limitantes al tratamiento con resistencia a cefalosporinas (Poirel y Nordmann 2006). La sobreexpresión de bombas de eflujo bacterianos puede reducir la concentración de antibióticos β -lactámicos en el espacio periplásmico. Para causar resistencia clínica, la bomba de flujo usualmente actúa en asociación con la sobreexpresión de AmpC β -lactamasa o carbapenemasa. Para remover los antibióticos β -lactámicos, la bomba de eflujo puede expulsar activamente quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, desinfectantes y tigeciclina (Peleg et al., 2007).

Se sugiere que *Acinetobacter* spp. ha sido reservorio de genes bla_{NDM}. Se reconoce a *A. baumannii* como un aceptor final de genes y varios determinantes de resistencia, luego transferirlos a *Enterobacterias* y *Pseudomonas* spp.

A. baumannii puede ser resistente a quinolonas a través de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* y puede ser resistente a aminoglucosidos por la expresión de enzimas modificadas de aminoglucosidos (Bonomo y Szabo 2006).

Existe la clasificación de Beta lactamasas de acuerdo a su estructura primaria en 4 clases moleculares (A, B, C, D) (Ambler 1980). Clase A son las beta-lactamasas que poseen serina en su sitio activo y son inhibidos por ac. clavulánico, clase B beta lactamasas dependientes de zinc nombradas

metallo-beta-lactamasas (MBL) , clase C representado por AmpC, posee serina en su sitio activo , grupo D serina-carbapenemasas, llamada OXA-tipo carbapenemasas (Opazo C et al., 2009), las carbapenemasas son un grupo diverso de enzimas que incluye a los de clase A, B y D que son activas contra cefalosporinas y carbapenemicos (Jacoby y Munoz-Price 2005) este ultimo grupo posee baja eficiencia catalítica para hidrolizar carbapenemicos en comparación con MBL pero con la presencia de secuencias de inserción *ISAb_a1* mejora su expresión (Segal et al., 2005;Turton et al., 2006a).

En los oxa-tipo carbapenemasas existen 4 grupos moleculares *bla*_{oxa-23-like} (23, 27, 49, 102, 103, 105, 133 y 134) *bla*_{oxa-24-like} (25 26, 40 y 72) *bla*_{oxa-51-like} (51, 64 a 71, 75 a 80, 82 a 84, 86 a 95, 98 a 100, 104, 106 a 113, 115 a 117, 120 a 127) y *bla*_{oxa-58-like} (58, 96, 97) (Brown y Amyes 2006;Evans y Amyes 2014;Evans 2009). La propagación en todo el mundo del gen *bla*_{oxa-23} ha sido ligado con clones específicos, principalmente con el complejo clonal CC92, que actualmente es el mayor complejo clonal descrita por la Universidad de Oxford por el esquema de tipificación de multilocus de secuencias (MLST-UO). En Colombia se reporto OXA 23 en *A. baumannii* en el 2007 (Medeiros y Lincopan 2013), en Latinoamérica los perfiles alelicos de MLST en la producción de OXA en *A. baumannii* ha sido ligada a CC92, (Stietz et al., 2013) aunque también existen cepas productoras de OXA-23 que pertenecen al CC113 de MLST-UO (Stietz et al., 2013), menos frecuente en Brasil, donde las cepas positivas a OXA-23 pertenecen al complejo clonal internacional CC109 (Martins et al., 2012). Brotes clonales de *A. baumannii* productoras de OXA-23 también ha sido reportada en Korea(Jeon et al., 2005), Francia(Naas et al., 2005) y China (Wang et al., 2007).

El gen *bla*_{OXA-23} puede ser plasmídico o cromosomal y con frecuencia son llevados por plásmidos (transferencia horizontal) (Evans y Amyes 2014). Los elementos *ISAb_a1* o *ISAb_a4* que están región reguladora del gen *bla*_{oxa-23-like} provee una secuencia promotora que mejora su expresión (Corvec et al., 2007), se han encontrado en muchas especies de *Acinetobacter* así

como especies que pertenecen a las *Enterobacteriaceae* (Evans y Amyes 2014; Wang et al., 2007), el reservorio principal del gen *bla*_{OXA-23} ha sido identificado como *Acinetobacter radioresistens* (Poirel et al., 2008), esta especie es raramente involucrada con las infecciones humanas pero esta presente en el ambiente, en donde *A. baumannii* y *A. radioresistens* pueden tener un intercambio genético entre especies que permita la adquisición y expresión del gen *bla*_{OXA-23} en *A. baumannii* (Girlich et al., 2010) y desde 1985 ha sido reportado brotes de *Acinetobacter* spp. productores de OXA-23 resistentes a imipenem en el mundo (Mugnier et al., 2010). Aunque su actividad es menor comparada con las metalo B-lactamasas, OXA-23 pertenece al grupo de las oxacilinasas carbapenem – hidrólisis, poseen la habilidad de hidrolizar imipenem (no siempre meropenem (Poirel y Nordmann 2006) además confiere resistencia a aminopenicilinas, piperacilina y carbapenem (Chuang et al., 2014).

El segundo grupo reportado fue *Bla*_{oxa-24/40-like} (Evans y Amyes 2014), se ha reportado en Taiwan, Tailandia e Indonesia (Mendes et al., 2009), España (Bou et al., 2000) Asia (Wang et al., 2007), Belgica (Afzal-Shah et al., 2001) Estados Unidos (Lolans et al., 2006). En Portugal en el periodo del 2001 al 2004 se describieron 222 aislados de *A. baumannii* de los cuales el 36.6 % que poseían el gen *Bla*_{oxa-24-like} y de los cuales la mayoría fue asociado a ADN plasmidico. Hidroliza penicilinas y metilicilinas (Bou et al., 2000; Evans y Amyes 2014) con debil actividad contra carbapenem y algunas cefalosporinas unido a la sobreexpresion de bombas de flujo y la perdida de porinas de membrana contribuye a la expresión resistencia (Bou et al., 2000; Evans 2009).

OXA-51-like se considera intrinseca en *A. baumannii*, cromosomal en esta especie (Evans y Amyes 2014) y no transferible (Evans 2009). Existen 37 miembros del grupo de enzimas OXA-51-like, variando en su estructura entre 1 a 16 aminoacidos (Evans et al., 2008). El gen *bla*_{OXA-51-like} esta presente en aislados de *A. baumannii* puede ser usado como una forma

sencilla de identificar *A. baumannii* (Turton et al., 2006b; Wang et al., 2007), OXA-51-like hidroliza debilmente imipenem pero no meropenem. Con el grupo de OXA-51-like existen subgrupos de enzimas (bla_{OXA-66} -like, bla_{OXA-69} , bla_{OXA-71}) asociados con a lineas epidemiologicas denominadas clones europeos I, II, III. (Evans et al., 2008). Bla_{OXA-51} se ha sugerido como ubicuo en *A. baumannii* y la secuencia de inserción de *ISAbal* como secuencia promotora mejora la expresión del gen, contribuyendo a potencializar el incremento de los niveles de resistencia a carbapenems (Turton et al., 2006a)

Oxa-58-like fue encontrado por primera vez en Francia en el 2003 y en Turquía albergando plasmidos que se propagan entre multiples clones de *Acinetobacter* spp. (Vahaboglu et al., 2006); así también se ha reportado que bla_{OXA-58} esta extendido geograficamente sobre tres continentes en un periodo de 10 años (Coelho et al., 2006a), además el gen bla_{OXA-58} también pertenece a CC92-58 y fue encontrado en Italia (Ansaldi et al., 2011); posee habilidad para hidrolizar cefalotina, pero no ceftazidima, cefotaxima o cefepima, no afecta a la mayoría de las cefalosporinas de espectro extendido (Poirel et al., 2005). Los aislados con enzimas OXA-51 tipo mas OXA-58 son frecuentemente asociados a pandroga resistente (Vahaboglu et al., 2006),.

Las cepas productoras de enzimas OXA están asociadas a brotes de infecciones nosocomiales (Dalla-Costa et al., 2003).

En la detección de genes carbapenemasas clase D bla_{OXA} en Jalisco, México se han descrito la detección de bla_{OXA51} (Morfin-Otero et al., 2013), cd. de México detección de $bla_{OXA 51,58,239}$ (Tamayo-Legorreta et al., 2014) y en Guadalajara, Jalisco se detecto $bla_{OXA 72}$ que pertenece al grupo $bla_{OXA24-40}$ like (Alcantar-Curiel et al., 2014),



Figura 3. Clasificación de las carbapenemasas

Diagnóstico bacteriológico

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, sigue siendo el método de diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos (Bou et al., 2011). En las características macroscópicas se toma en cuenta la morfología y hemólisis; en el cultivo se analizan los medios de cultivo y requisitos de crecimiento en relación a atmósfera, temperatura y nutrición (Bou et al., 2011). Dentro de las pruebas bioquímicas, se utilizan como identificación preliminar y con lectura inmediata 1) la catalasa y oxidasa; 2) otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h como el indol, citrato, ureasa; 3) pruebas lentas con lectura de 18 a 48 h a 37° C, la característica principal de crecimiento a 44°C es de *Acinetobacter baumannii* que incluirían la óxido.fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, fermentación de azúcares, hidrólisis de esculina, hidrólisis de gelatina (Bou et al., 2011).

Uno de los limitantes de las pruebas de identificación fenotípica en el género *Acinetobacter* spp. es que no hay una única prueba que permita la identificación a nivel del género y especie, otro problema es que las especies de *Acinetobacter* spp. se encuentran estrechamente relacionadas por lo que se proponen métodos genotípicos confirmatorios (Bergogne-Berezin et al., 2008).

Diagnóstico molecular

Diversas técnicas como ADN fingerprinting y el análisis de métodos bioquímicos han sido utilizados para diferenciar cepas de *Acinetobacter* spp.

porque las características fenotípicas son similares entre cepas. Se ha considerado el análisis filogenético basado en genes housekeeping como 16S ribosomal RNA (rRNA) (Jung y Park 2015).

La subunidad pequeña del gen 16S ribosomal RNA es la más usada para la clasificación de los microorganismos y constituye la base de la clasificación actual de las bacterias (Bergogne-Berezin et al., 2008). La utilidad de la secuencia del gen 16S rRNA ha sido usada en la taxonomía de *Acinetobacter* (Nemec et al., 2003; Vaneechoutte et al., 2006)

El gen 16S rRNA utilizado actualmente para secuenciación ha fallado para distinguir especies genómicas estrechamente relacionadas de *Acinetobacter* debido a su naturaleza poliformica extremadamente baja (Ibrahim et al., 1997). Comparado con el gen 16S rRNA, los genes de housekeeping proveen un alto grado de resolución (Yamamoto y Harayama 1998) y *rpoB* ha sido utilizado para la clasificación de varias bacterias no relacionadas a nivel intragenica (Khamis et al., 2004), además la secuencia de *rpoB* es mas polimórfico que 16S rADN (Khamis et al., 2004)

En un estudio previo (La Scola et al., 2006) como alternativa diseño un método de identificación molecular, secuenciación de una región completa del gen *rpoB*, que codifica un gen RNA polimerasa subunidad- β , y lo identifica como 4 zonas hipervariables (dos de esas zonas están en el gen *rpoB*, de 350 y 450 pb, las otras dos partes son espaciadores flanqueantes ambas al final del gen *rpoB*, *rplL-rpoB*, 301-310 bases y *rpoB-rpoC*, 86-117 bases) (La Scola et al., 2006). Uno de estos fragmentos, llamado zona 1 de 350 pb ha identificado mejor las especies de *Acinetobacter* (Gundi et al., 2009).

La taxonomía del genero *Acinetobacter* es compleja. En el estudio de La Scola et al., (2006) compararon 14 genopecies de *Acinetobacter* teniendo como resultado en los arboles filogenéticos en base al gen 16S rRNA y *rpoB* que con el valor de bootstrap de >75% fue estadísticamente

significativo ($P > 0.05$), porque en el árbol basado en *rpoB* puedo distinguir 11 de 12 secuencias y en 16S rRNA 4 de 12 secuencias, demostrando así la robustez del árbol filogenético basado en el gen *rpoB*.

Gundi et al., (2009), propuso la secuenciación del gen parcial de *rpoB* (zona 1) tomado del estudio de La Scola et al., (2006) como marcador de filogenético para diferenciar a nivel de especie en los aislados de *Acinetobacter* spp. teniendo como resultado de un 88.3-96.9% de rango de similitud interespecies. Con esto, enfatiza el alto poder de discriminación de la secuencia de *rpoB* comparada con la secuencia del gen 16S rRNA, además de ser una herramienta molecular simple para la identificación de *Acinetobacter* spp., además de la identificación de relación entre especies de *Acinetobacter* emergentes clínicos, incluyendo cepas que pertenecen a las especies del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* (Gundi et al., 2009).

Variación genómica

Existen varios métodos de tipificación genómica que son empleadas en el estudio epidemiológico molecular de *A. baumannii*, incluyendo métodos basados en PCR como análisis polimorfismo amplificados al azar, PCR del gen integrasa, PCR del sitio de restricción infrecuente, ribotipado, análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), electroforesis de campos pulsados (PFGE), tipificación de multilocus de secuencias (MLST) (Bartual et al., 2005)

La técnica más comúnmente usada es la electroforesis de campos pulsados (PFGE) que tiene una alta discriminación (Adams-Haduch et al., 2011), es usada para tipificar los aislados de *A. baumannii* e identificar si están los clones dominantes en la región (Chuang et al., 2014), es altamente discriminatorio y detectan pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano a menudo los laboratorios no utilizan los mismos métodos, y aun en el caso de que lo hagan los resultados son

casi siempre difíciles de comparar. Los métodos que hemos mencionado están basados en la generación de patrones de bandas en geles de agarosa y su comparación en formato de imagen (Vázquez y Berrón 2004).

Tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) es usado para comparar las secuencias de nucleótidos de siete genes constitutivos (housekeeping en inglés) en los aislados generando información objetiva y portable (Adams-Haduch et al., 2011). Estos genes son escogidos para el análisis por que el producto juegan una vital función, están presentes en todos los aislados de una especie (Bartual et al., 2005). Mide las variaciones en los diferentes locus que se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos internos de genes seleccionados. Las combinaciones alélicas encontradas definen lo que se conoce secuencia tipo (ST) (Vázquez y Berrón 2004; Wisplinghoff et al., 2008). MLST es un método costoso de tipificación debido a la necesidad de secuenciación, el uso selectivo de esta técnica puede mejorar sustancialmente el entendimiento de epidemiología molecular en diferentes hospitales y áreas geográficas (Adams-Haduch et al., 2011). Además, tiene la ventaja de definir las líneas clonales de los aislados de grandes áreas geográficas en el tiempo y monitoreo de su difusión nacional e internacional (Peleg et al., 2008) y ofrece la posibilidad de transferir información entre laboratorios o comparar resultados vía internet (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk>) (Bartual et al., 2005) (www.pubmlst.org). Es considerado como estándar de oro y aplicada intensivamente en la caracterización de genotipos circulantes (Rafei et al., 2015)

MLST permite la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) genotipos (Vázquez y Berrón 2004). Mejorar la base de datos de MLST con genotipos de *A. baumannii* mejorará el entendimiento de reservorios potenciales, origen de infecciones humanas y adquisición de mecanismos de resistencia (Rafei et al., 2015).

MATERIALES Y METODOS

Lugar de estudio

Las muestras fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Biología Molecular y en laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, situado en la ciudad de Mexicali, Baja California.

Aislamiento bacteriano

Los aislados bacterianos de origen animal fueron obtenidos de leche de bovinos con mastitis del establo lechero del IICV-UABC en el periodo de agosto 2014 - abril 2015; los aislados de origen nosocomial fueron proporcionados directamente de un hospital (A) de pacientes de UCI (4 aislados de 4 pacientes) en el mes de Septiembre del 2015 y de un laboratorio clínico (12 aislados de 12 pacientes) obtenidos de pacientes de UCI de dos hospitales en el periodo de marzo – mayo 2016.

Los aislados fueron previamente identificados por técnicas bioquímicas como *Acinetobacter spp.*

Las muestras de leche fueron previamente cultivadas en cajas de agar sangre y Todd Hewitt (TH) y las de origen nosocomial fueron proporcionadas en cajas de Agar Sangre y MacConkey a la temperatura de 35°-37°C. Todos los aislados fueron mantenidos en cajas de Agar Sangre (AS) a 4°C y en criopreservación con caldo Infusión soya tripticasa (Falagas et al., 2006) y glicerol a temperatura de -20°C y -80°C; una porción de cultivo está liofilizado y almacenado a 4°C.

PCR del gen rpoB y 16S rRNA

El ADN genómico fue extraído de los aislados de *Acinetobacter* spp. usando el kit de extracción Dnease blood & Tissue de la marca QIAGEN según las instrucciones del fabricante (anexo) y fue almacenado a -20°C hasta la realización de PCR. Las muestras de origen animal ya habían sido previamente identificadas como *Acinetobacter baumannii* por PCR con la amplificación del gen 16S rRNA (Ibrahim et al., 1997; Nemec et al., 2003; Vaneechoutte et al., 1995) y enviadas a secuenciar al laboratorio de Quimera (Biolabs) en Ensenada, B.C., para confirmar la identificación se amplificaron con el gen rpoB (Bouvresse et al., 2011; Gundi et al., 2009; Kumsa et al., 2012).

Los aislados fueron sometidos a análisis del gen rpoB para confirmar la identificación como *Acinetobacter* spp. y a su vez la especie y genotipo (Gundi et al., 2009; La Scola et al., 2006). Se realizó el PCR con los oligonucleótidos específicos al gen rpoB (Ac696F, Ac1093R, cuadro 2), los cuales son diseñados para la región conservada en el género *Acinetobacter*, para amplificar una región del rpoB altamente polimórfica entre las especies de *Acinetobacter*. Todas las mezclas de PCR contenían 5 µl de taq buffer 10x, 3 µl MgCl₂ 25Mm, 1 µl de cada cebador a una concentración de 10 pmol/µL, 4 µl de dNTP a 2mM, 1 µl de Taq polimerasa (preparado en el laboratorio de biología molecular IICV-UABC) 5 µl de ADN y 30 µl de H₂O esterilizada, con un volumen final de 50 µl; se utilizó el termociclador BioRad iCycler, Thermal Cycler. La mezcla fue sujeta a 35 ciclos (94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C 1 min). Cada programa de amplificación empezó con la desnaturalización a 95°C por 5 min y enlogación final a 72°C por 7 min.

Los productos amplificados (391 pb) fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio, y visualizaron con el transiluminador de la luz ultravioleta (UV) del sistema de foto-documentación de la marca BioDoc-It™ Imaging System. El gen rpoB es

de 350 pb pero la visualización en el gel de agarosa amplificó a 391 pb, esto es debido a que cuenta con los oligos. Se usó un marcador de peso molecular de GeneRuler 1kb plus ADN Ladder, de la marca Thermo SCIENTIFIC para verificar el tamaño de los productos.

Una vez verificado el tamaño esperado del fragmento amplificado, los productos de PCR fueron purificados para eliminar el exceso de cebadores y nucleótidos por diálisis con filtros de membrana de nitrocelulosa de la Marca Milipore. El ADN purificado se envió para secuenciación mediante el método de terminación didesoxi, en Eurofins MWG Operon (Louisville, KY, E.U.A.). Todas las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas usando el programa BioEdit 7.2. (BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright 1997-2013 Tom Hall).

Análisis filogenético

Las secuencias del gen *rpoB* fueron sometidas a BLAST para análisis y determinación de las similitudes entre los disponibles en GenBank; se construyó un árbol filogenético en base al gen *rpoB* (Gundi et al., 2009) con las ST G1 - ST G51, usando el programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) (Molecular Evolution Genetic Analysis; The Biodesing Institute, Tempe, AZ).

Una vez obtenidas las secuencias se procedió a la alineación múltiple de las secuencias para comparar las diferencias entre los aislados de origen animal y nosocomial con el programa MEGA 4 (véase cuadro).

Cuadro 2.- Cebadores usados para la identificación de *Acinetobacter spp.* y genes de resistencia.

Gen blanco	Nombre del cebador	Secuencia 5'→3'	Tamaño
rpoB ¹ (gen RNA polimerasa subunidad B)	Ac696F	5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3'	350 pb
	Ac1093R	5'-CMACACCYTTGTTMCCRTGA-3'	350 pb
16S rADN ²	8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	527 pb
	535R	5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'	527 pb
bla _{OXA-23} ³	bla _{OXA-23} F:	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'	501
	bla _{OXA-23} R:	5'-ATTTCTGACCGCATTTCAT-3'	
Bla _{OXA-24} ³	Bla _{OXA-24} F:	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	246
	Bla _{OXA-24} R:	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	
Bla _{OXA-58} ³	Bla _{OXA-58} F:	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	599
	Bla _{OXA-58} R:	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	

1.(La Scola et al., 2006); 2. (Negoro et al., 2013); 3. (Woodford et al., 2006)

Antibiogramas

En el Cuadro 6 se representan los sensidiscos usados de la marca BIORAD con la técnica de difusión en agar en los aislados de origen animal y humano siguiendo los estándares de CLSI los cuales fueron realizados en el laboratorio de Biología molecular del IICV-UABC y laboratorio "EL DORADO"; los cuales usaron diferentes antibióticos para los aislados de origen animal y humano, eso debido al criterio de los laboratorios y la observación clínica del paciente.

Para los 3 aislados de origen animal y dos aislados de origen nosocomial (144a, 144b, 154b, 5596, 5605) se realizó la técnica de difusión en agar. Los aislados de origen nosocomial proporcionados por el hospital A (IM 1, 2, 3, 4) ya contaban con el antibiograma por la técnica de MIC y los proporcionados por el hospital B y C (5596, 5605, 117, 5775, 5999, 5967, 6026, 6188, 6196, 6244, 6380, 6431) contaban con la técnica de difusión en agar.

Se realizó la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos por medio de la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer); para esta técnica se usó el agar Mueller Hinton (MH) con sensidiscos de la marca BIORAD que contienen una concentración conocida de diferentes antibióticos.

Para la preparación del inóculo a partir de aislados previamente confirmados por PCR como *Acinetobacter* spp., se cultivo un caldo previamente de 18 a 24 horas, se comparó con la turbidez en la escala de 0.5 de Mc Farland que corresponde aproximada de 1 a 2×10^8 UFC/ml, después se sembró sobre las placas de M.H. con un hisopo estéril. Para ello se introdujo el hisopo estéril en la suspensión bacteriana y se sembró en las placas de M.H. frotándose en tres direcciones para asegurar una completa distribución. Luego inoculada la caja se esperó 3 a 5 min para aplicar los sensidiscos de los antibióticos seleccionados con pinza estéril aplicando ligera presión (CLSI 2012; Muñoz y Duarte 2012), según las indicaciones del fabricante se incorporó los antibióticos que vienen

unidos con una distancia mayor de 2.4 cm entre centros. Con esto se logró evitar la interacción entre antimicrobianos y obtener halos completos dentro de la placa (Brizuela-Lab. 2005;CLSI 2012).

Se procedió a una incubación de 35°C por 16 a 18 horas y posterior a esto se examinó cada placa, se midió con una regla calibrada el diámetro de las zonas de inhibición y comparando con la tabla de interpretación proporcionada por el laboratorio se midió la obtención de halos de inhibición que se correlacionan con la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) y se clasificó según el comportamiento clínico de los aislados bacterianos como: “Susceptibles” y “No susceptibles”. (Brizuela-Lab. 2005;CLSI 2012;Magiorakos et al., 2012) (ver Anexo 18)

Detección molecular de genes codificantes de carbapenamasa.

Todos los ADN positivos a *Acinetobacter spp.* fueron analizados para determinar la presencia de genes codificantes de carbapenamasas por PCR usando cebadores específicos a genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58} (cuadro 2).

Se preparó la mezcla de PCR con 5 µl de taq buffer 10x, 3µl MgCl₂ 25Mm, 1 µl de cada cebador a una concentración de 10pmol/uL, 4µl de dNTP a 2mM, 1 µl de Taq polimerasa (preparado en el laboratorio de biología molecular IICV-UABC) 5µl de ADN y 30 µl de H₂O esterilizada, con un volumen final de 50 µL; la mezcla fue sujeta a desnaturalización inicial de 94°C por 5 min., 30 ciclos (94°C por 30seg, 52°C por 40 seg, 72°C por 50 seg), con un paso final de extensión a 72°C por 6 min (Woodford et al., 2006). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, y se visualizaron con tinción por bromuro de etidio utilizando el transiluminador de luz ultravioleta (UV) del sistema de foto-documentación de la marca BioDoc-It™ Imaging System. Se usó un marcador de peso molecular de (100kb HypperLadder, Invitrogen, Inc.) para confirmar el tamaño de los productos amplificados.

Análisis de tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST).

Con el esquema del Instituto Pasteur (IP) se amplificaron 3 aislados (144A, 144B, 154B) de origen animal y 3 de origen nosocomial (IM1, 2, 4) y con el esquema de la Universidad de Oxford (UO) 1 aislado (144A) de origen animal y 4 aislados (IM1, 2, 5605, 5999) de origen nosocomial para la identificación del perfil de MLST usando las mezclas, ciclos, genes, secuencias de según cada esquema, obteniendo la combinación de los diferentes loci para comparar con la base de datos de <http://pubmlst.org/abaumannii/> los perfiles alélicos e identificar las secuencias tipo (ST), además poder identificar posibles líneas clonales.

Para el esquema de Pasteur y Oxford se usó un volumen final de 50 µl: 5 µl de buffer 10x, 3 µl MgCl₂ a 25mM, 4 µl dNTP's 2mM, 1 µl de cada cebador de 10pmol/ µl, 1 µl de taq polimerasa (preparado en el laboratorio de biología molecular IICV-UABC), 5 ul de ADN y 30 ul de H₂O esterilizada y se utilizó el termociclador BioRad iCycler, Thermal Cycler.

Para el esquema de Pasteur se utilizaron 35 ciclos (94°C por 30 seg, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min), cada ciclo empezó con una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 5 min y polimerización final de 72°C por 6 min (Diancourt et al., 2010) (cuadro 3)

Con el esquema de Oxford se usaron 30 ciclos (94°C por 1 min, 55°C 1 min, 72°C por 2 min) con excepción de *gyrB* y *gpi* por la modificación en la temperatura de alineación de 50°C. Cada ciclo tuvo una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 2 min y una elongación final de 72°C por 2 min (Bartual et al., 2005;Runnegar et al., 2010) (cuadro 4)

Cuadro 3. Cebadores del esquema de MLST Pasteur

Locus	Cebador	Secuencias 5→3	Tamaño
<i>cpn60</i> (60-KDa chaperonina)	cpn60F	ACTGTA CTT GCTCAAGC	405 pb
	cpn60R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	
<i>fusA</i> (Factor de elongación EF-G)	fusA7	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT	633 pb
	fusA8	CCAACATA CKYT GWACACCTTTGTT	
<i>gltA</i> (Citrato sintasa)	gltAF	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	483 pb
	gltAR	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	
<i>pyrG</i> (sintasa CTP)	pyrG7	GGTGT TGTTT CATCACTAGGWAAAGG	297 pb
	pyrG8	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	
<i>recA</i> (Factor homólogo de recombinación)	RA1	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	372 pb
	RA2	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
<i>rplB</i> (Proteína ribosomal 50S L2)	rplB7	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	330 pb
	rplB8	CACCACCACCR TGY GGGTGATC	
<i>rpoB</i> (RNA polimerasa subunidad B)	Vic4	GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA	456 pb
	Vic6	GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC	

(Diancourt et al., 2010).

Cuadro 4. Cebadores del esquema MLST de Oxford

Locus	Cebador	Secuencias 5→3	Tamaño
<i>gltA</i> (Citrato sintasa) ^a	Citrato F1	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C	722 pb
	Citrato R12	GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	
<i>gyrB</i> (ADN girasa subunidad B) ^a	<i>gyrB</i> _F	TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT	594 pb
	<i>gyrB</i> _R	GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA	
<i>gdhB</i> (glucosa deshidrogenasa B) ^a	GDHB 1F	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C	774 pb
	GDH SEC F	ACC ACA TGC TTT GTT ATG	
	GDHB 775 R	GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C	
	GDH SEC R	GTT GGC GTA TGT TGT GC	
<i>recA</i> (factor homólogo de recombinación) ^a	RA1	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC	425 pb
	RA2	GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	
<i>cpn60</i> (60-KDa chaperonina) ^a	<i>cpn60</i> F	GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA	640 pb
	<i>cpn60</i> R	CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	
<i>gpi</i> (Isomerasa de glucosa -6 - fosfato) ^b	<i>gpi</i> _F ^a	GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA	456 pb
	<i>gpi</i> _R	TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	
<i>rpoD</i> (factor sigma polimerasa RNA) ^b	<i>rpoD</i> _F	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG	672 pb
	<i>rpoD</i> _R	TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	

a. (Bartual et al., 2005); b. (Higgins et al., 2012)

RESULTADOS

En el cuadro 5 se resumen los 19 aislados de *Acinetobacter* spp.; 3 aislados de origen animal obtenido de muestras de leche de bovinos con mastitis de establos lecheros del IICV-UABC y 16 aislados de origen nosocomial de pacientes humanos, provenientes de 3 hospitales, A: 4 aislados; B: 2 aislados; C: 10 aislados.

Todos los aislados fueron identificados previamente como *Acinetobacter* spp. mediante técnicas bacteriológicas. Todos los 19 aislados resultaron con la amplificación específica del gen *rpoB* con el tamaño del producto de 391 pb, confirmándose a su identificación *Acinetobacter* spp.. La figura 4 demuestra el resultado representativo de la electroforesis del producto de PCR.

Las secuencias de ADN de los productos de PCR fueron determinado para la especie y el genotipo de *rpoB*. Comparando las secuencias parciales obtenidas (350pb) que corresponde la región altamente polimórfica, todos los aislados de presente estudio fueron confirmado a *Acinetobacter baumannii* con el genotipo del *rpoB* como G4 para tres aislados de origen animal y el genotipo nuevo para aislados de origen nosocomial. (Figura 5, 6).

Figura 6 demuestra la alineación múltiple de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético de la Figura 5.

Todos los aislados identificados como *Acinetobacter* spp. fueron enviados a secuenciación a Eurofins MWG Operon (Louisville, KY, E.U.A.). Una vez obtenidas las secuencias, con el uso del software Seq Scanner 2 se analizaron y copiaron a la base de datos de BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> teniendo que los 19 aislados fueron *Acinetobacter baumannii* con similitudes del >98%.

Con la amplificación del gen parcial *rpoB* con 350 pb se logró además de identificar el género y especie de los aislados, identificar su genotipo y agrupación con el dendrograma para la clasificación y/o comparación con las secuencias tipo (ST) según el criterio Gundi et al., (2009)

Debido a la calidad de la secuencia obtenida de los 19 aislados de *A. baumannii* 2 aislados de origen nosocomial (117, 6188) fueron descartados y se agruparon en el árbol filogenético 17 aislados, con el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007) analizando la similitud de las secuencias con BOOSTRAP-UPGM dando como resultado que las muestras de origen nosocomial no se agruparon con ninguna ST considerando así como ST nueva, y las de origen animal se agruparon como ST G4 (Gundi et al., 2009). Como se alcanza a ver todos fueron agrupados como *A. baumannii* (Figura 5).

Se realizó la alineación múltiple de los 17 aislados de *A. baumannii* confirmando los aislados de origen animal similares a ST G4 y las de origen humano presentan un cambio en el nucleótido 305 (A->G) que no corresponde a ninguna ST reportada por Gundi et al., (2009) (Vease Figura 6).

Cuadro 5. Aislados de *A. baumannii* incluidos en el trabajo.

# ID	Origen	Lugar	Tipo de muestra	Fecha
144a	animal	IICV-UABC	leche	julio/14
144b	animal	IICV-UABC	leche	sept/14
154b	animal	IICV-UABC	leche	junio/14
IM-1	nosocomial	A	secreción bronquial	junio/15
IM-2	nosocomial	A	secreción bronquial	junio/15
IM-3	nosocomial	A	secreción bronquial	junio/15
IM-4	nosocomial	A	herida	junio/15
117	nosocomial	B	catéter central	marzo/16
6026	nosocomial	B	secreción bronquial	abril/16
5596	nosocomial	C	herida	marzo/16
5605	nosocomial	C	secreción bronquial	marzo/16
5772	nosocomial	C	herida	marzo/16
5999	nosocomial	C	secreción bronquial	abril/16
5967	nosocomial	C	secreción bronquial	abril/16
6188	nosocomial	C	secreción de catéter	mayo/2016
6196	nosocomial	C	liquido de abdomen	mayo/2016
6244	nosocomial	C	secreción bronquial	mayo/2016
6380	nosocomial	C	secreción bronquial	mayo/2016
6431	nosocomial	C	secreción de herida	mayo/2016

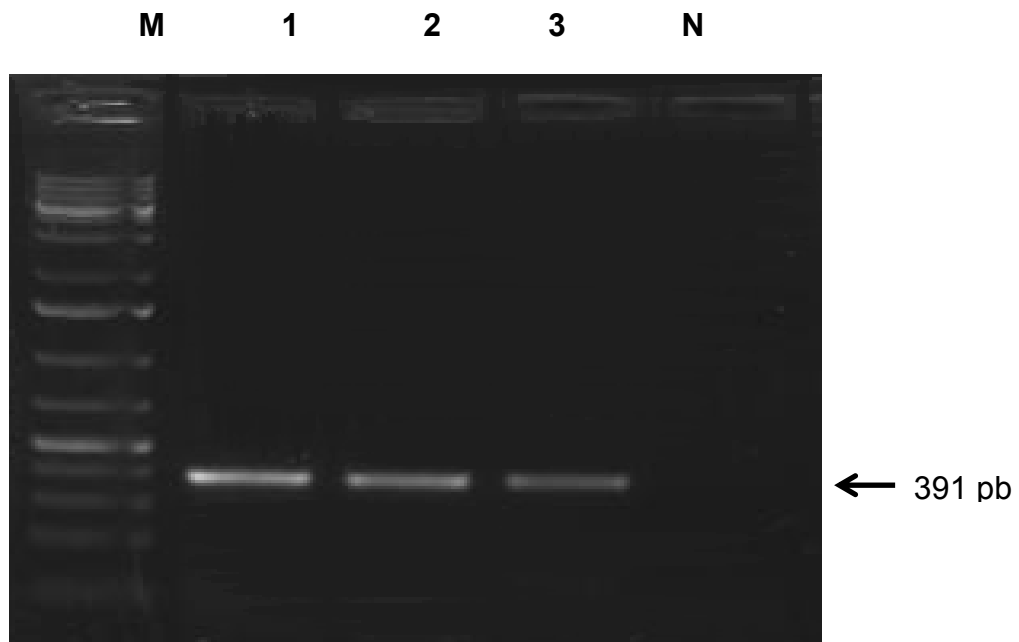


Figura 4. Amplificación de un fragmento del gen *rpoB*_M. Marcador GeneRuler 1kb; 1 (Aislado 5596); 2 (Aislado 5605) ; 3 (Control Positivo-NCIMB 12457; N (Control negativo-agua); gel de agarosa al 1.5%.

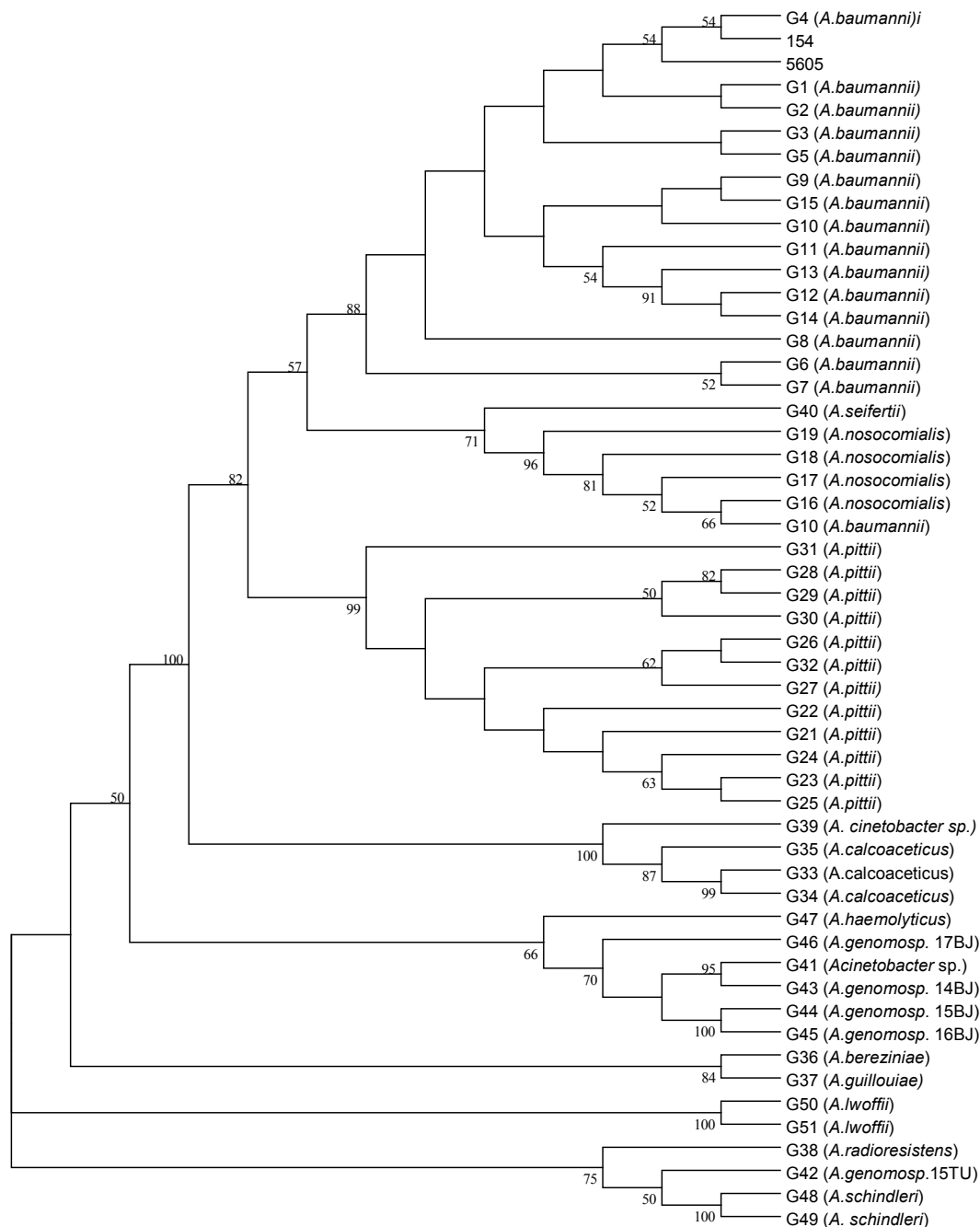


Figura 5. Análisis filogenético de *Acinetobacter* spp. según la secuencia parcial de *rpoB*. La secuencia conservada en 3 aislados de origen animal de este estudio está representada 154, y la secuencia conservada en 16 aislados de origen humano está representada 5605. Los otros 51 genotipos fueron incluidos en el análisis filogenético mediante el método NJ con la prueba de Bootstrap (x1000). Se encuentran agrupados todos los aislados de este estudio en la misma agrupación con el genotipo G4.

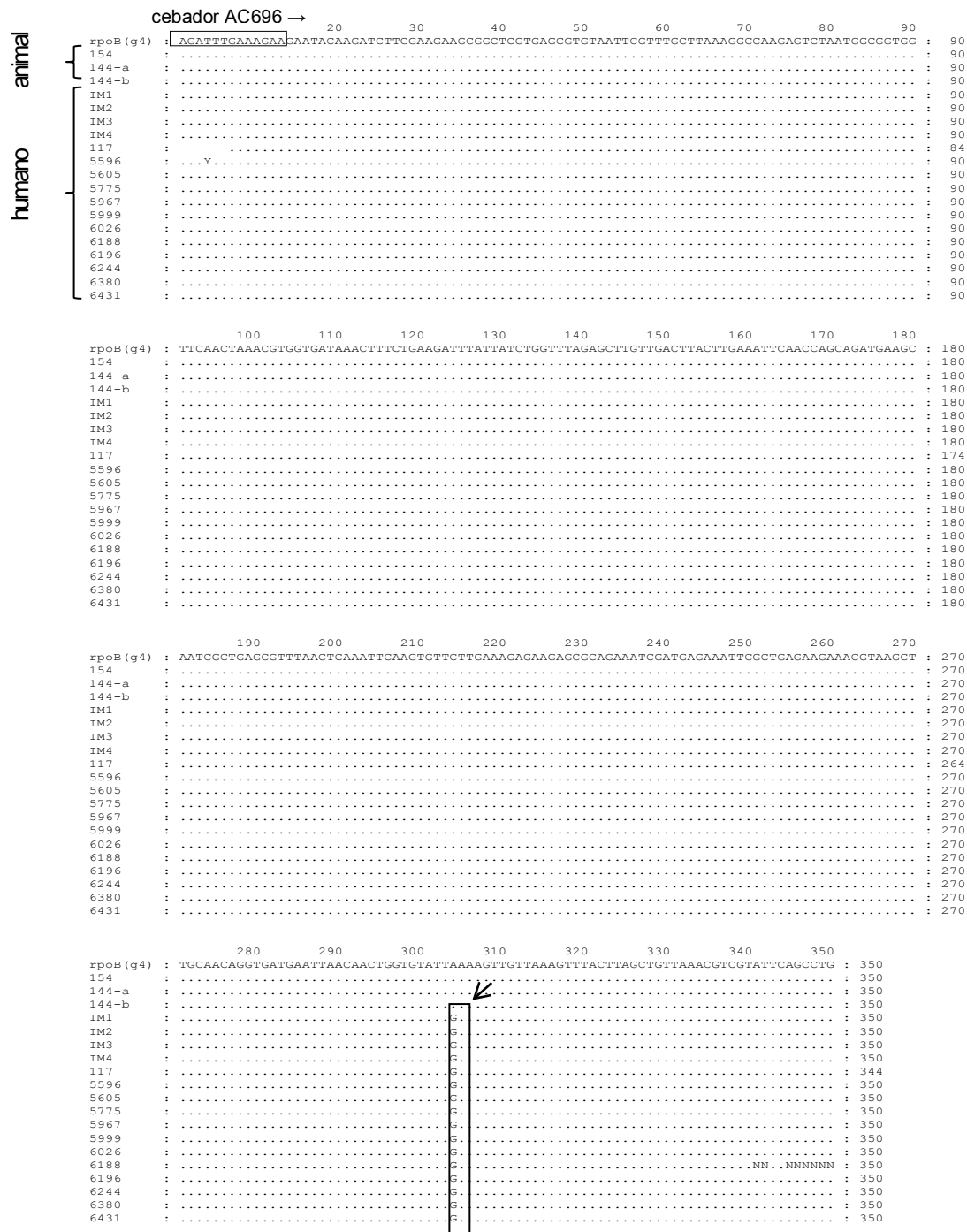


Figura 6. Alineación múltiple de un fragmento del gen rpoB (región polimórfica). Se compararon 19 aislados de este estudio con la secuencia del genotipo G4 (cita artículo). Secuencias de los tres aislados de origen animal (154, 144-a, 144-b) fueron idénticos al genotipo G4. Las secuencias de aislados de origen humano todos fueron idénticas entre ellas y comparado con el genotipo G4 se observó el cambio de un solo nucleótido en la posición de nucleótido 304 (A->G). Ambas secuencias de origen animal y humano se agruparon en el mismo grupo del genotipo G4 según el análisis filogenético (Figura 5).

Resistencia a antimicrobianos

Para las muestras de origen animal (cuadro 6) en los 3 aislados se obtuvieron no susceptibilidades de 100% a 2 de 8 familias de antibióticos; carbenicilina¹, Cefotaxima³, ceftriaxona³, cefepima³, ceftazidima³, y se observaron que los aislados se comportaron de forma variable a amikacina³, gentamicina³, netilmicina³ (susceptible y/o no susceptible); se observó una susceptibilidad del 100% a piperacilina-tazobactam², trimetropin-sulfametoxazol⁶, Imipenem⁷, meropenem⁷, tigeciclina⁸, polimixina B⁹, no se probó fluoroquinolonas porque no se obtuvo acceso a los sensibilizadores.

De igual forma se resumen resultados de las cepas de origen nosocomial/humano, con 100% (16/16) de no susceptibilidad a 6 de 8 familias de antibióticos, y los antibióticos que inhibieron el crecimiento de todas las cepas fueron tigeciclina⁸, minociclina⁸, polimixina B⁹, considerándolas como extremadamente drogorresistente (XDR), según el criterio de Manchanda et al., (2010).

Además de la determinación de la resistencia fenotípica con la prueba de difusión en agar, se amplificaron por PCR punto final los genes *Bla_{oxa23}*, *Bla_{oxa24}*, *Bla_{oxa58}*, que codifican resistencia a los B-lactámicos y también algunas cefalosporinas de espectro extendido, resultando positivos los aislados de origen animal y nosocomial 13/19 al gen *Bla_{oxa23}*. Para los genes *Bla_{oxa24}* y *Bla_{oxa58}* resultaron negativos los aislados de origen animal y nosocomial (Cuadro 7; Figura 7).

Cuadro 6. Antibiograma de muestras de origen animal y nosocomial_ Se resumen los resultados del antibiograma de cepas de origen animal y nosocomial/humano de *A. baumannii* de la ciudad de Méxicali B.C., determinado con la técnica de difusión en agar con sensidiscos de la marca BB BDL TM. Familias de antibióticos: Carboxipenicilinas¹, Ureidopenicilinas² Cefalosporinas³, Aminoglucosidos⁴, Fluoroquinolonas⁵, Inhibidores de folato/sulfonamidas-diaminopirimidinas ⁶, Carbapenem⁷, Tetraciclina⁹, Polimixinas¹ S= Sensible; R=resistente o no susceptible; - = No determinado .

# ID	Carbenicilina ¹	Piperacilina ²	Piperacilina-tazobactam ²	Cefepima ³ Cefotaxima ³ Cefepima ³ Ceftriaxona ³	Amikacina ⁴	Gentamicina ⁴	Netilmicina ⁴	Levofloxacin ⁵ Ciprofloxacino ⁵	Sulfametazol-trimetropin ⁶	Meropenem ⁷ Imipenem ⁷	Minociclina ⁸	Tigeciclina ⁸	Colistina ⁹	
144 ^a	R	-	S	R	S	R	R	-	-	S	S	-	S	S
144b	R	-	S	R	S	S	S	-	-	S	S	-	S	S
154b	R	-	S	R	R	S	S	-	-	S	S	-	S	S
IM-1	R	-	R	R	R	R	S	-	-	R	R	-	S*	S
IM-2	R	-	R	R	R	R	R	-	-	R	R	-	S*	S
IM3	R	-	R	R	R	S	S	-	-	R	R	-	S*	S
IM4	R	-	R	R	R	S	R	-	-	R	R	-	S*	S
5596	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
5605	R	R	R	R	R	-	S	R	R	R	R	S	S	S
117	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	S	S	S
5775	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	S	S	S
5999	-	R	R	R	R	-	-	R	R	S	R	S	S	S
5967	-	R	R	R	R	R	-	R	R	S	R	S	S	S
6026	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	S	S	S
6188	-	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	S	S	S
6196	-	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	S	S	S
6244	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	S	S	S
6380	-	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	S	S	S
6431	-	-	R	R	R	R	-	R	R	R	R	S	S	S

Cuadro 7. Genes de resistencia Bla_{oxa} amplificados_ se resume la detección de los genes de resistencia bla_{oxa} de todos los aislados obtenidos

# ID	Genes de resistencia		
	Oxa-23	Oxa-24	Oxa-58
144a	-	-	-
144b	-	-	-
154b	-	-	-
IM-1	-	-	-
IM-2	+	-	-
IM-3	-	-	-
IM-4	+	-	-
5596	+	-	-
5605	+	-	-
117	+	-	-
5775	+	-	-
5999	+	-	-
5967	+	-	-
6026	+	-	-
6188	+	-	-
6196	+	-	-
6244	+	-	-
6380	+	-	-
6431	-	-	-

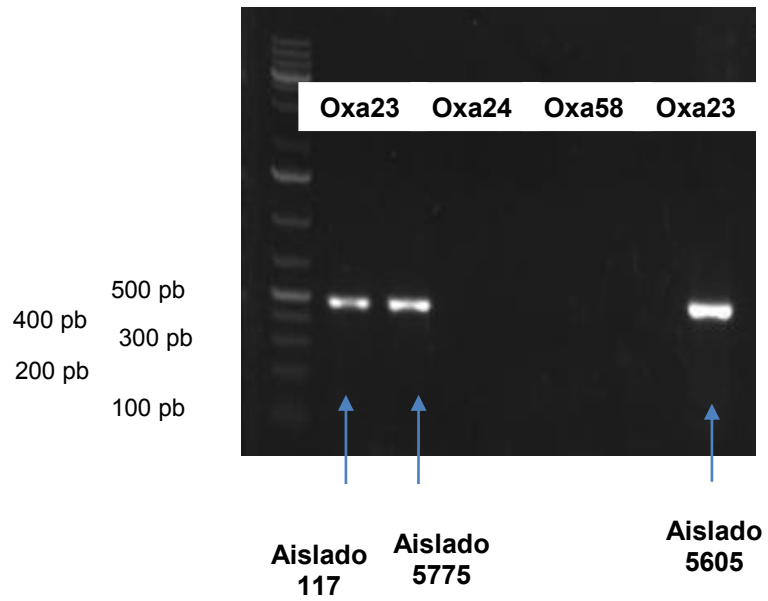


Figura 7. Visualización de genes de resistencia oxa 23, oxa 24 y oxa 58_aislados de origen humano 117 y 5775, como control positivo aislado 5605, se visualiza la amplificación de gen oxa 23 a 501 pb, y los genes oxa 24 y 58 resultaron negativos.

Tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST)

Se realizó el análisis de MLST para los aislados de origen animal y humano y en la figura 8 se muestra el resultado representativo del PCR para la amplificación de 7 genes constitutivos (housekeeping) de los esquemas del Instituto Pasteur (Diancourt et al., 2010), Escuela de Oxford (Bartual et al., 2005).

El esquema de Pasteur en los aislados de origen humano IM-1, 2 y 4, se obtuvo la ST156 y en los aislados de origen animal 144A, 144B y 154B la ST239 (Cuadro 8).

En los aislados de origen humano IM1 y IM2 se identificó como Secuencia Tipo (ST) 1054, el aislado 5605 con ST 205, el aislado 5999 no se identificó el gen constitutivo *recA* pero se confirmó con la comparación exacta de 6 loci como ST207, siendo esta la única opción en la base de datos. El aislado de origen animal 144A no coincidió con ninguna ST registrada (1133 perfiles) en el esquema de la Universidad de Oxford = UO, por lo cual se identificó como ST nueva.

Los aislados de origen animal y humano no pertenecieron a ningún complejo clonal (CC) existente.

Las ST obtenidas en el presente trabajo del esquema de la Universidad de Oxford, fueron comparadas con otras ST (vease Cuadro 10 y 11). El ST 207 no está agrupado con ningún ST registrado por el análisis de eBURST, mientras que los ST 205 y 1054 fueron agrupados en el mismo grupo por compartir 6 alelos idénticos (vease Cuadro 10 y 11).

Cuadro 8. Perfiles de MLST esquema de Pasteur y Universidad de Oxford_se resume el perfil alelico de 6 aislados de origen humano y animal usando el esquema del Instituto Pasteur= IP; 5 aislados de origen humano y animal con el esquema de Oxford.

#ID	origen	Perfiles de MLST (Esquema IP)							Secuencia Tipo (ST)	Perfiles de MLST (Esquema UO)							Secuencia Tipo (ST)		
		cnp60	fusA	gltA	pyrG	recA	rplB	rpoB		#ID	Origen	cnp60	gltA	recA	gpi	rpoD		gyrB	gdhB
IM-1	Humano	26	2	2	2	29	4	4	ST156	IM1	Humano	28	1	10	259	32	17	8	ST1054
IM-2		26	2	2	2	29	4	4		IM2		28	1	10	259	32	17	8	
		5605	28	1	10	99	32	17		8		ST205							
IM-4		26	2	2	2	29	4	4		5999		4	10	ND	100	5	53	74*	ST207
144A	Leche de bovino	1	4	2	2	7	1	4	ST239	144A	Leche de bovino	4	1	28	83	45	12	59	NUEVO
144B		1	4	2	2	7	1	4											
154B		1	4	2	2	7	1	4											

chaperonina 60-KDa (cnp60) de 405pb; Factor de elongación EF-G (fusA) de 633pb; Citrato sintasa (gltA) de 483pb; Sintasa CTP (pyrG) de 297 pb; Factor de recombinación homologo (recA) 372 pb; Proteína L2 ribosomal 50S (rplB) de 330pb; RNA polimerasa subunidad B (rpoB) de 456 pb; ADN girasa subunidad B (gyrB) de 594 pb, Glucosa deshidrogenasa B (gdhB) de 774pb, glucosa-6-fosfato isomerasa (gpi) de 456 pb, RNA polimerasa factor sigma (rpoD) de 672 pb; *Se secuencio una cadena; ND: no determinado.

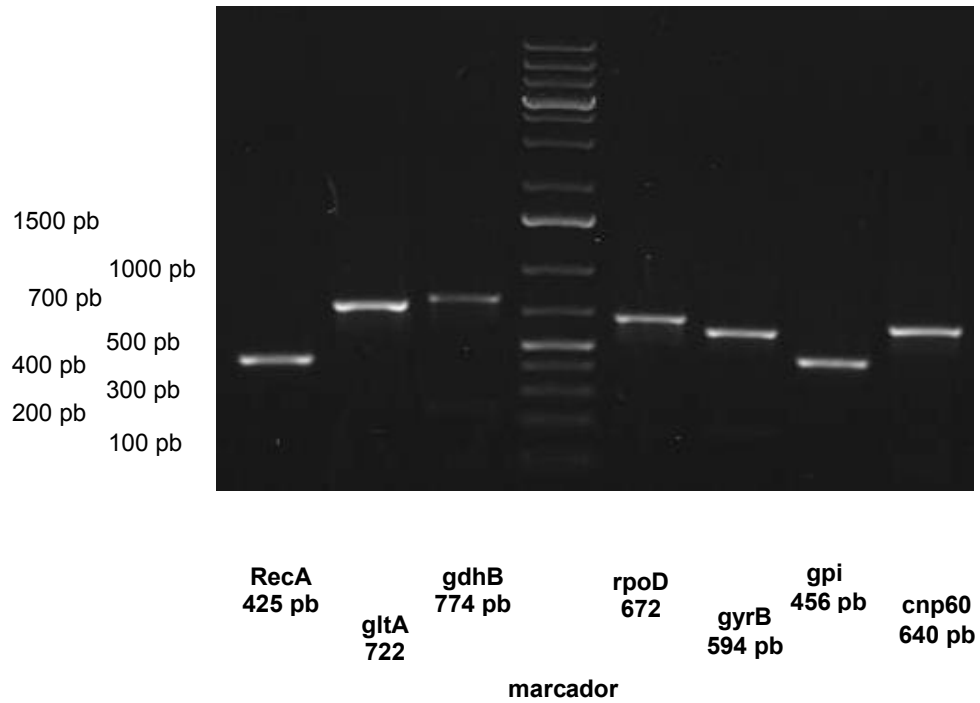


Figura 8. Electroforesis de la amplificación del esquema de Universidad de Oxford_ Se muestra la amplificación del aislado IM-2 con los 7 genes de MLST esquema de UO, gel de agarosa al 1.5%.

Cuadro 9. Comparación de las secuencias tipo de MLST del esquema de Universidad de Oxford

ST	gltA	gyrB	gdhB	recA	cnp60	gpi	rpoD	País
813	1	15	2	28	1	158	32	México (2014)
814	1	15	8	1	1	106	5	México 2014
1091	1	17	8	10	28	97	32	México 2015
1054	1	17	8	10	28	259	32	México 2015, presente estudio
205	1	17	8	10	28	99	32	EU 2012, presente estudio
207	10	53	74	11	4	100	5	EU 2012, presente estudio
Nuevo	1	12	59	28	4	83	45	Presente estudio

Cuadro 10. Análisis de agrupación (eBURST) de MLST del esquema de Universidad de Oxford en muestras de origen nosocomial

ST	gltA	gyrB	gdhB	recA	cnp60	gpi	rpoD	País
1091	1	17	8	10	28	97	32	México 2015
1054	1	17	8	10	28	259	32	México 2015, presente estudio
205	1	17	8	10	28	99	32	EU 2012, presente estudio

Cuadro 11. Análisis de agrupación (eBURST) de MLST del esquema de Universidad de Oxford en muestras de origen animal_

ST	gltA	gyrB	gdhB	recA	cnp60	gpi	rpoD	País
521	1	12	59	28	4	69	45	China 2013
867	1	12	59	28	4	172	45	Taiwan 2014
Nuevo	1	12	59	28	4	83	45	Presente estudio

DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó en la ciudad fronteriza de Mexicali, Baja California, describiendo la identificación molecular, resistencias a antibióticos y genotipificación de *A. baumannii* de origen local. Se buscó posible relación filogenética entre cepas de aislados animales y nosocomial con la genotipificación de *rpoB* para determinar el genotipo teniendo que los aislados de origen animal fueron idénticos a ST G4 la cual pertenece a la colección del Instituto Pasteur de muestras humanas (Gundi et al., 2009), y los de origen nosocomial no fueron agrupados en ningún ST.

Se desconocen los motivos de ingreso al hospital de los 16 pacientes con aislados de *Acinetobacter baumannii* pero existen posibles causas para diseminación pudiendo hipotetizar que los pacientes son admitidos en las ICU para la estabilización después del procedimiento quirúrgico los cuales requieren ventilación mecánica y adquieren *A. baumannii*, después son transferidos a otras áreas, facilitando la diseminación de *A. baumannii* en los hospitales. Una vez introducido al hospital es muy persistente y llega a ser endémico (Morfin-Otero et al., 2013).

La identificación de *Acinetobacter baumannii* se ha hecho usando el gen intrínseco *bla_{oxa51}* (Turton et al., 2006b), secuenciación del gen 16S rRNA (Nemec et al., 2003), y gen *recA* (Nowak y Kur 1995) en la presente investigación se utilizó la amplificación del gen *rpoB* (Gundi et al., 2009) para la identificación del género y secuenciación para identificar la especie y genotipo. Rafei et al., (2015) reporta con la genotipificación del gen parcial *rpoB* de 30 aislados de *Acinetobacter* spp. obtenidos a partir de muestras de suelo, carne y animales que no están identificados dentro de las ST de *rpoB* (Gundi et al., 2009), comprobando que pueden existir más de las 31 genoespecies reportadas, por lo cual *rpoB* todavía es una técnica válida y rápida para la identificación de nuevas genoespecies.

La importancia de la epidemiología molecular con la técnica de MSLT en *A. baumannii* es generar información para identificar rutinas de transmisión, situaciones de brote localizados, complejos clonales, el trazo posible del agente infeccioso entre pacientes u hospitales , así como la resistencia los agentes antimicrobianos (Bergogne-Berezin et al., 2008).

En la tipificación multilocus de secuencias (MLST) se obtuvieron con el esquema de la Universidad de Oxford 3 ST que ya están reportadas en la base de datos PubMLST (<http://pubmlst.org>), IM-1 y IM-2 con ST 1054, el aislado 5605 con ST 205, y aislado 5999 con ST 207 en los cuales se observan diferencias fenotípicas y genotípicas de resistencia (vease cuadro 8) con lo cual se puede hipotetizar que el ST de MLST no está relacionado con el genotipo y fenotipo de resistencias de los aislados.

Por el esquema de Universidad de Oxford las ST 205 y 1054 en tres aislados, fueron agrupados por compartir 6 alelos idénticos con otro ST 1091 identificado en México (vease cuadro 9), mientras que la ST 207 del aislado 5999 se agruparon con las ST reportadas en China 2013 y Taiwan 2014. En ambos cuadros las ST varían según el perfil alelico de *gpi*, lo cual se ha demostrado en otros estudio, que el alelo *gpi* tiene más variaciones con CC, mientras que *gltA*, *RecA*, *gdhB* y *rpoD* son más conservados (Adams-Haduch et al., 2011;Runnegar et al., 2010) aun no se explica porque este alelo tiene muchas variantes (Higgins et al., 2012).

En bovinos de leche es una práctica común proporcionar antibióticos en para el tratamiento de enfermedades específicas y profilaxis contra mastitis en el secado (Sabour et al., 2004), así como en el ambiente de hospital se usa por tiempos prologando antibióticos durante la terapéutica clínica, estas acciones pueden explicar la resistencia de los aislados de origen animal y nosocomial debido al uso específico de antimicrobianos que actúan como agentes selectivos de resistencia sobre las cepas bacterianas (Lee et al., 2004;Sabour et al., 2004) además de la resistencia adquirida por transferencia horizontal por la presencia o/y adquisición de genes que

codifican la inactivación de enzimas, bombas de flujo, elementos genéticos móviles como transposones, integrones o plásmidos (Dijkshoorn et al., 2007).

Todos los aislados de origen animal fueron susceptibles a piperacilina-tazobactam, meropenem, imipenem, tigeciclina y colistina, estos antibióticos no están a la venta en el medio veterinario lo cual limita su uso en la industria lechera, además se observa diferencias en la familia de aminoglucósidos (amikacina, gentamicina) como una respuesta variable (susceptible/resistente) que podría deberse a que estos animales fueron tratados anteriormente con kanamicina, neomicina y gentamicina para el tratamiento de diferentes enfermedades, se ha observado que la actividad de los aminoglucósidos depende de la concentración del antibiótico y su incremento en las concentraciones (Aliakbarzade et al., 2014). El mayor mecanismo de resistencia a aminoglucósidos en aislados clínicos de bacterias gram negativas es la modificación enzimática reduciendo o suspendiendo la unión de la molécula de aminoglucósido al ribosoma (Aliakbarzade et al., 2014), enzimas modificadoras específicas como acetiltransferasa, fosfotransferasa, adeniltransferasa (Seward et al., 1998).

En la detección de genes carbapenemasas clase D bla_{oxa} en Jalisco, México se han descrito la detección de bla_{oxa51} (Morfin-Otero et al., 2013), cd. de México detección de $bla_{oxa 51,58,239}$ (Tamayo-Legorreta et al., 2014) y en Guadalajara, Jalisco se detectó $bla_{oxa 72}$ que pertenece al grupo $bla_{oxa24-40like}$ (Alcantar-Curiel et al., 2014),

Se ha reportado que la presencia de OXA-23 con expresión de resistencia a diferentes familias de antibióticos (Wang et al., 2007) el gen $bla_{OXA-23-like}$ ha demostrado ser la carbapenemasa más extendida y adquirida en *A. baumannii* (Coelho et al., 2006b; Higgins et al., 2013), la cual puede estar atribuida a la movilización horizontal de secuencias de inserción ISAba1 y/o transposones como Tn2006 (Mosqueda et al., 2013). En el presente trabajo se identificó el gen bla_{oxa-23} en 13/16 aislados de origen nosocomial, con la característica fenotípica XDR, Eliolopus et al., (2008)

menciona que altos niveles de resistencia a carbapenem conferido por OXA-23 puede ser la clave para las cepas epidémicas donde se incrementa el uso de carbapenem en combinación de fluoroquinolonas y bajo la presión selectiva fuerza la propagación epidémica de los organismos que producen beta lactamasas de espectro extendido.

En los aislados de origen animal y nosocomial que no se detecto la presencia del gen OXA-23 y se observo la resistencia a beta lactamicos (carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas, carbapenem) se puede explicar con otros mecanismos de resistencia enzimáticos que no se incluyeron el trabajo, como la hidrólisis por beta lactamasas que confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenems (Eliopoulos et al., 2008), como las carbapenemasas de clase A, B, C según la clasificación Ambler (1980). La clasificación A están SME, NMC, IMI, KPC, GES, clasificación B VIM, SIM, IMP, GIM, SPM, NDM y la clasificación C AmpC (Opazo et al., 2012).

Dentro de los mecanismos no enzimáticos que pueden conferir resistencia Limansky et al., (2002) y Mussi et al., (2005) demostraron que la pérdida de la porina 29-kDa OMP en aislados clínicos de *A. baumannii* en los que no hubo actividad de carbapenemasas puede conferir la resistencia a imipenem. La modificación de las proteínas de unión de penicilinas como fuente de resistencia a imipenem (Poirel y Nordmann 2006), por ultimo las bombas de expulsión, AdeABC, puede expulsar B-lactamicos (incluyendo carbapenemicos) aminoglicosidos, macrolidos cloranfenicol, tetraciclina, fluoroquinolonas y trimetropim (Peleg et al., 2008).

En el presente trabajo no se contó con el control negativo, para OXA-23, OXA 24, OXA-58 debido a esto consideramos la posibilidad de tener falsos negativos, poco ADN molde, mutación en el sitio de unión del primer siendo necesario determinar el límite de detección del fragmento de ADN blanco en el ensayo de PCR.

CONCLUSIONES

Los 19 aislados de origen animal/humano del presente estudio fueron identificados como *A. baumannii* con técnicas microbiológicas y moleculares.

Los 3 aislados de origen animal fueron considerados como multidrogo resistente (MDR) mientras que todos los 16 aislados de origen humano como extrema drogo resistencia (XDR).

Se identificaron diferentes genotipos de un fragmento del gen *rpoB* para aislados de origen animal y humano, donde la secuencia tipo (ST) G4 correspondió a los aislados de origen animal y una ST nueva correspondió a todos los aislados de origen humano de diferentes brotes de infección nosocomial.

La técnica de MLST nos permitió detectar variaciones genómicas presentes entre aislados de origen animal y humano así como variaciones dentro de aislados de origen humano, además de poder comparar con aislados reportados en una base de datos.

Se recomienda implementar un programa de vigilancia en hospitales empleando herramientas de epidemiología molecular para el monitoreo de *A. baumannii* MDR y XDR altamente patogénico.

LITERATURA CITADA

- Acar, J. F. (1997). "Consequences of Bacterial Resistance to Antibiotics in Medical Practice." *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement 1), S17-S18.
- Adams-Haduch, J. M., Onuoha, E. O., Bogdanovich, T., Tian, G.-B., Marschall, J., Urban, C. M., Spellberg, B. J., Rhee, D., Halstead, D. C., Pasculle, A. W., y Doi, Y. (2011). "Molecular Epidemiology of Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States." *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3849-3854.
- Afzal-Shah, M., Woodford, N., y Livermore, D. M. (2001). "Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother*, 45(2), 583-8.
- Alcantar-Curiel, M. D., Garcia-Torres, L. F., Gonzalez-Chavez, M. I., Morfin-Otero, R., Gayosso-Vazquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., Fernandez-Vazquez, J. L., Giono-Cerezo, S., Rodriguez-Noriega, E., y Santos-Preciado, J. I. (2014). "Molecular mechanisms associated with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico." *Arch Med Res*, 45(7), 553-60.
- Aliakbarzade, K., Farajnia, S., Karimi Nik, A., Zarei, F., y Tanomand, A. (2014). "Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates." *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(10), e11924.
- Alvarez-Perez, S., Lievens, B., Jacquemyn, H., y Herrera, C. M. (2013). "*Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants." *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 4), 1532-9.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036), 321-31.
- Anandham, R., Weon, H. Y., Kim, S. J., Kim, Y. S., Kim, B. Y., y Kwon, S. W. (2010). "*Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea." *J Microbiol*, 48(1), 36-9.
- Ansaldi, F., Canepa, P., Bassetti, M., Zancolli, M., Molinari, M. P., Talamini, A., Ginocchio, F., Durando, P., Mussap, M., Orengo, G., Viscoli, C., y Icardi, G. (2011). "Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation." *J Hosp Infect*, 79(2), 134-40.
- Bartual, S. G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M., Wisplinghoff, H., y Rodríguez-Valera, F. (2005). "Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*." *J Clin Microbiol*, 43(9), 4382-90.

- Baumann, P., Doudoroff, M., y Stanier, R. Y. (1968). "A Study of the Moraxella Group II. Oxidative-negative Species (Genus Acinetobacter)." *Journal of Bacteriology*, 95(5), 1520-1541.
- Bergogne-Berezin, E., Friedman, H., y Bendinelli, M. (2008). "Acinetobacter Biology and Pathogenesis." 220.
- Bergogne-Bérézin, E., y Towner, K. J. (1996). "Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features." *Clin Microbiol Rev*, 9(2), 148-65.
- Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H., y Pitt, T. (1999a). "Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18(3), 179-83.
- Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., y Pitt, T. L. (1999b). "Isolation of Acinetobacter spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections." *J Hosp Infect*, 42(3), 201-4.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., y Piddock, L. J. V. (2015). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." *Nat Rev Micro*, 13(1), 42-51.
- Boerlin, P., Eugster, S., Gaschen, F., Straub, R., y Schawalder, P. (2001). "Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital." *Vet Microbiol*, 82(4), 347-59.
- Bonomo, R. A., y Szabo, D. (2006). "Mechanisms of Multidrug Resistance in Acinetobacter Species and Pseudomonas aeruginosa." *Clinical Infectious Diseases*, 43(Supplement 2), S49-S56.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(08), 601-608.
- Bou, G., Oliver, A., y Martínez-Beltrán, J. (2000). "OXA-24, a Novel Class D β -Lactamase with Carbapenemase Activity in an Acinetobacter baumannii Clinical Strain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1556-1561.
- Bouvet, P., y Grimont, P. (1986a). "Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii." *Int J Syst Evol Microbiol*, 36, 228 - 240.
- Bouvet, P. J. M., y Grimont, P. A. D. (1986b). "Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(2), 228-240.
- Bouvresse, S., Socolovschi, C., Berdjane, Z., Durand, R., Izri, A., Raoult, D., Chosidow, O., y Brouqui, P. (2011). "No evidence of Bartonella quintana but detection of Acinetobacter baumannii in head lice from

- elementary schoolchildren in Paris." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(6), 475-477.
- Brizuela-Lab. (2005). "Manual de instrucción: Discos múltiples." 2.
- Brown, S., y Amyes, S. (2006). "OXA (beta)-lactamases in Acinetobacter: the story so far." *J Antimicrob Chemother*, 57(1), 1-3.
- Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B. K. C., Gürtler, V., y Seviour, R. J. (2003). "Seven novel species of Acinetobacter isolated from activated sludge." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 953-963.
- Choi, J. Y., Ko, G., Jheong, W., Huys, G., Seifert, H., Dijkshoorn, L., y Ko, K. S. (2013). "Acinetobacter kookii sp. nov., isolated from soil." *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 12), 4402-6.
- Chuang, Y.-C., Sheng, W.-H., Lauderdale, T.-L., Li, S.-Y., Wang, J.-T., Chen, Y.-C., y Chang, S.-C. (2014). "Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility and carbapenemase resistance determinants among Acinetobacter baumannii clinical isolates in Taiwan." *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(4), 324-332.
- Clark, R. B. (1996). "Imipenem resistance among Acinetobacter baumannii: association with reduced expression of a 33–36 kDa outer membrane protein." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38(2), 245-251.
- CLSI. (2012). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement." *15th informational supplement, M100-s22*, 32, 188.
- Coelho, J., Woodford, N., Afzal-Shah, M., y Livermore, D. (2006a). "Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in Acinetobacter spp. collected over 10 years in three continents." *Antimicrob Agents Chemother*, 50(2), 756-8.
- Coelho, J. M., Turton, J. F., Kaufmann, M. E., Glover, J., Woodford, N., Warner, M., Palepou, M.-F., Pike, R., Pitt, T. L., Patel, B. C., y Livermore, D. M. (2006b). "Occurrence of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Clones at Multiple Hospitals in London and Southeast England." *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3623-3627.
- Corbella, X., Pujol, M., Ayats, J., Sendra, M., Ardanuy, C., Domínguez, M. A., Liñares, J., Ariza, J., y Gudiol, F. (1996). "Relevance of Digestive Tract Colonization in the Epidemiology of Nosocomial Infections Due to Multiresistant Acinetobacter baumannii." *Clinical Infectious Diseases*, 23(2), 329-334.
- Corvec, S., Poirel, L., Naas, T., Drugeon, H., y Nordmann, P. (2007). "Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene blaOXA-23 in Acinetobacter baumannii." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1530-1533.
- Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M., Souza, H. A., Castro, M. E., Stier, C. J., Bragagnolo, K. L., Rea-Neto, A., Pentead-Filho, S. R., Livermore, D. M., y Woodford, N. (2003). "Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil." *J Clin Microbiol*, 41(7), 3403-6.

- de Berardinis, V., Durot, M., Weissenbach, J., y Salanoubat, M. (2009). "Acinetobacter baylyi ADP1 as a model for metabolic system biology." *Curr Opin Microbiol*, 12(5), 568-76.
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., y Brisse, S. (2010). "The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool." *PLoS One*, 5(4), e10034.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M., Garaizar, J., Ursing, J., y Pitt, T. (1996). "Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods." *J Clin Microbiol*, 34, 1519 - 1525.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., y Seifert, H. (2007). "An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*." *Nat Rev Microbiol*, 5(12), 939-51.
- Dijkshoorn, L., Van Aken, E., Shunburne, L., Van Der Reijden, T. J. K., Bernardis, A. T., Nemec, A., y Towner, K. J. (2005). "Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals." *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 329-332.
- Eliopoulos, G. M., Maragakis, L. L., y Perl, T. M. (2008). "*Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options." *Clinical Infectious Diseases*, 46(8), 1254-1263.
- Endimiani, A., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., Gerber, V., Francey, T., Bonomo, R. A., y Perreten, V. (2011). "*Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data." *J Antimicrob Chemother*, 66(10), 2248-54.
- Ettinger, S. J., y Feldman, E. C. (2009). "Textbook of Veterinary Internal Medicine." *Elsevier Health Sciences*, 2208.
- Evans, B. A., y Amyes, S. G. B. (2014). "OXA β -Lactamases." *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241-263.
- Evans, B. A., Hamouda, A., Towner, K. J., y Amyes, S. G. (2008). "OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*." *Clin Microbiol Infect*, 14(3), 268-75.
- Evans, B. A., S. Hamouda, A. (2009). "The Significance of the OXA-51-like β -lactamases of *Acinetobacter baumannii* ", 236.
- Falagas, M. E., Koletsi, P. K., y Bliziotis, I. A. (2006). "The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Medical Microbiology*, 55(12), 1619-1629.
- Feng, G. D., Yang, S. Z., Wang, Y. H., Deng, M. R., y Zhu, H. H. (2014). "*Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore." *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 10), 3417-21.
- Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., y Pascual, A. (2003). "Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding

- protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*." *J Antimicrob Chemother*, 51(3), 565-74.
- Fournier, P. E., y Richet, H. (2006). "The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities." *Clin Infect Dis*, 42(5), 692-9.
- Francey, T., Gaschen, F., Nicolet, J., y Burnens, A. P. (2000). "The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit." *J Vet Intern Med*, 14(2), 177-83.
- Gennari, M., y Lombardi, P. (1993). "Comparative Characterization of *Acinetobacter* Strains Isolated from Different Foods and Clinical Sources." *Zentralblatt für Bakteriologie*, 279(4), 553-564.
- Girlich, D., Poirel, L., y Nordmann, P. (2010). "First Isolation of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene from an Environmental *Acinetobacter baumannii* Isolate." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 578-579.
- Gundi, V. A., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., y La Scola, B. (2009). "Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species." *Microbiology*, 155(Pt 7), 2333-41.
- Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., y Amyes, S. G. B. (2011). "Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin." *International journal of antimicrobial agents*, 38(Article), 314-318.
- Higgins, P. G., Janßen, K., Fresen, M. M., Wisplinghoff, H., y Seifert, H. (2012). "Molecular Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Isolates Obtained in the United States from 1995 to 2004 Using rep-PCR and Multilocus Sequence Typing." *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3493-3500.
- Higgins, P. G., Perez-Llarena, F. J., Zander, E., Fernandez, A., Bou, G., y Seifert, H. (2013). "OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother*, 57(5), 2121-6.
- Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., y Liesack, W. (1997). "Phylogenetic Relationship of the Twenty-One DNA Groups of the Genus *Acinetobacter* as Revealed by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 837-841.
- Jacoby, G. A., y Munoz-Price, L. S. (2005). "The New β -Lactamases." *New England Journal of Medicine*, 352(4), 380-391.
- Jawad, A., Heritage, J., Snelling, A. M., Gascoyne-Binzi, D. M., y Hawkey, P. M. (1996). "Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces." *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 2881-7.
- Jeon, B.-C., Jeong, S. H., Bae, I. K., Kwon, S. B., Lee, K., Young, D., Lee, J. H., Song, J. S., y Lee, S. H. (2005). "Investigation of a Nosocomial Outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 β -Lactamase in Korea." *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2241-2245.

- Jung, J., y Park, W. (2015). "Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2533-2548.
- Kempf, M., Rolain, J.-M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., Gassama Sow, A., Diene, S. M., Fenollar, F., y Raoult, D. (2012). "Carbapenem Resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: The Paradigm of a Common Phenomenon in Natural Reservoirs." *PLoS One*, 7(6), e39495.
- Khamis, A., Raoult, D., y La Scola, B. (2004). "rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species." *J Clin Microbiol*, 42(9), 3925-31.
- Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., Kwak, Y. S., y Seong, C. N. (2008). "*Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil." *J Microbiol*, 46(4), 396-401.
- Kim, P. S., Shin, N. R., Kim, J. Y., Yun, J. H., Hyun, D. W., y Bae, J. W. (2014). "*Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*." *J Microbiol*, 52(8), 639-45.
- Koeleman, J. G. M., Stoof, J., Van Der Bijl, M. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., y Savelkoul, P. H. M. (2001). "Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene PCR." *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 8-13.
- Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., y Nemeč, A. (2014). "*Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic." *Syst Appl Microbiol*, 37(7), 467-73.
- Kumsa, B., Socolovschi, C., Parola, P., Rolain, J. M., y Raoult, D. (2012). "Molecular Detection of *Acinetobacter* Species in Lice and Keds of Domestic Animals in Oromia Regional State, Ethiopia." *PLoS One*, 7(12).
- Kwon, K. T., Oh, W. S., Song, J.-H., Chang, H.-H., Jung, S.-I., Kim, S.-W., Ryu, S. Y., Heo, S. T., Jung, D. S., Rhee, J.-Y., Shin, S. Y., Ko, K. S., Peck, K. R., y Lee, N. Y. (2007). "Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 525-530.
- La Scola, B., Gundi, V. A., Khamis, A., y Raoult, D. (2006). "Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species." *J Clin Microbiol*, 44(3), 827-32.
- Lee, S.-O., Kim, N. J., Choi, S.-H., Kim, T. H., Chung, J.-W., Woo, J.-H., Ryu, J., y Kim, Y. S. (2004). "Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: a Case-Control Study." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 224-228.
- Li, W., Zhang, D., Huang, X., y Qin, W. (2014a). "*Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water." *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 5), 1507-13.
- Li, Y., He, W., Wang, T., Piao, C. G., Guo, L. M., Chang, J. P., Guo, M. W., y Xie, S. J. (2014b). "*Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of *Populus x euramericana*." *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 3), 1043-50.

- Li, Y., Piao, C. G., Ma, Y. C., He, W., Wang, H. M., Chang, J. P., Guo, L. M., Wang, X. Z., Xie, S. J., y Guo, M. W. (2013). "Acinetobacter puyangensis sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of Populus xeuramericana canker bark." *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 8), 2963-9.
- Limansky, A. S., Mussi, M. A., y Viale, A. M. (2002). "Loss of a 29-Kilodalton Outer Membrane Protein in Acinetobacter baumannii Is Associated with Imipenem Resistance." *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4776-4778.
- Llaca-Diaz, J. M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., y Garza-Gonzalez, E. (2012). "One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico." *Chemotherapy*, 58(6), 475-81.
- Lolans, K., Rice, T. W., Muñoz-Price, L. S., y Quinn, J. P. (2006). "Multicity Outbreak of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Isolates Producing the Carbapenemase OXA-40." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2941-2945.
- Madigan, M. T., y Martinko, J. M., Parker, P., Brock, T.D., Rodríguez, C., Sánchez, M. (2004). "BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS", Pearson, (ed.). City, pp. 1011.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., y Monnet, D. L. (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R., y Lal, R. (2012). "Acinetobacter indicus sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site." *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(Pt 12), 2883-90.
- Malinowski, E., Lassa, H., Kllossowska, A., Smulski, S., Markiewicz, H., y Kaczmarowski, M. (2006). "Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland." *Pol J Vet Sci*, 9(3), 191-4.
- Manchanda, V., Sanchaita, S., y Singh, N. P. (2010). "Multidrug Resistant Acinetobacter." *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 291-304.
- Manikal, V. M., Landman, D., Saurina, G., Oydna, E., Lal, H., y Quale, J. (2000). "Endemic Carbapenem-Resistant Acinetobacter Species in Brooklyn, New York: Citywide Prevalence, Interinstitutional Spread, and Relation to Antibiotic Usage." *Clinical Infectious Diseases*, 31(1), 101-106.
- Marais, E., de Jong, G., Ferraz, V., Maloba, B., y Dusé, A. G. (2004). "Interhospital transfer of pan-resistant Acinetobacter strains in Johannesburg, South Africa." *American Journal of Infection Control*, 32(5), 278-281.

- Martins, A. F., Kuchenbecker, R. S., Pilger, K. O., Pagano, M., y Barth, A. L. (2012). "High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil." *Am J Infect Control*, 40(2), 108-12.
- Medeiros, M., y Lincopan, N. (2013). "Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options." *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 49, 391-405.
- Mendes, R. E., Bell, J. M., Turnidge, J. D., Castanheira, M., y Jones, R. N. (2009). "Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program." *J Antimicrob Chemother*, 63(1), 55-9.
- Morfin-Otero, R., Alcantar-Curiel, M. D., Rocha, M. J., Alpuche-Aranda, C. M., Santos-Preciado, J. I., Gayosso-Vazquez, C., Araiza-Navarro, J. R., Flores-Vaca, M., Esparza-Ahumada, S., Gonzalez-Diaz, E., Perez-Gomez, H. R., y Rodriguez-Noriega, E. (2013). "*Acinetobacter baumannii* infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years." *Chemotherapy*, 59(1), 57-65.
- Mosqueda, N., Espinal, P., Cosgaya, C., Viota, S., Plasencia, V., Álvarez-Lerma, F., Montero, M., Gómez, J., Horcajada, J. P., Vila, J., y Roca, I. (2013). "Globally Expanding Carbapenemase Finally Appears in Spain: Nosocomial Outbreak of *Acinetobacter baumannii* Producing Plasmid-Encoded OXA-23 in Barcelona, Spain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 5155-5157.
- Mugnier, P. D., Poirel, L., Naas, T., y Nordmann, P. (2010). "Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*." *Emerg Infect Dis*, 16(1), 35-40.
- Munoz-Price, L. S., y Weinstein, R. A. (2008). "*Acinetobacter* Infection." *New England Journal of Medicine*, 358(12), 1271-1281.
- Muñoz, D. A., y Duarte, V. C. (2012). "Manual de procedimientos para la determinación de susceptibilidad antibiótica en patógenos de importancia hospitalaria.", 30.
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., y Viale, A. M. (2005). "Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins." *Antimicrob Agents Chemother*, 49(4), 1432-40.
- Naas, T., Levy, M., Hirschauer, C., Marchandin, H., y Nordmann, P. (2005). "Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the Carbapenemase OXA-23 in a Tertiary Care Hospital of Papeete, French Polynesia." *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4826-4829.
- Nam, H. M., Lim, S. K., Kang, H. M., Kim, J. M., Moon, J. S., Jang, K. C., Joo, Y. S., y Jung, S. C. (2009). "Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea." *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2020-2026.

- Negoro, E., Iwasaki, H., Tai, K., Ikegaya, S., Takagi, K., Kishi, S., Yamauchi, T., Yoshida, A., Urasaki, Y., Shimadzu, M., y Ueda, T. (2013). "Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases." *Int J Infect Dis*, 17(4), e271-6.
- Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T. J., y Dijkshoorn, L. (2001a). "Acinetobacter ursingii sp. nov. and Acinetobacter schindleri sp. nov., isolated from human clinical specimens." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1891-9.
- Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T. J., y Dijkshoorn, L. (2001b). "Acinetobacter ursingii sp. nov. and Acinetobacter schindleri sp. nov., isolated from human clinical specimens." *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 5), 1891-9.
- Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., Van Der Reijden, T. J., Jezek, P., y Vaneechoutte, M. (2003). "Acinetobacter parvus sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens." *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 5), 1563-7.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., y Higgins, P. G. (2015). "Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex isolated from human clinical specimens." *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(Pt 3), 934-42.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., y Dijkshoorn, L. (2011). "Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU)." *Res Microbiol*, 162, 393 - 404.
- Nemec, A., Musilek, M., Maixnerova, M., De Baere, T., van der Reijden, T. J., Vaneechoutte, M., y Dijkshoorn, L. (2009). "Acinetobacter beijerinckii sp. nov. and Acinetobacter gyllenbergii sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans." *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 1), 118-24.
- Nemec, A., Musilek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerova, M., van der Reijden, T., Zdrahal, Z., Vaneechoutte, M., y Dijkshoorn, L. (2010). "Acinetobacter bereziniae sp. nov. and Acinetobacter guillouiae sp. nov., to accommodate Acinetobacter genomic species 10 and 11, respectively." *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 896 - 903.
- Nishimura, Y., Ino, T., y Iizuka, H. (1988). "Acinetobacter radioresistens sp. nov. Isolated from Cotton and Soil." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(2), 209-211.
- Nowak, A., y Kur, J. (1995). "Genomic species typing of acinetobacters by polymerase chain reaction amplification of the recA gene." *FEMS Microbiol Lett*, 130(2-3), 327-32.

- Opazo, A., Dominguez, M., Bello, H., Amyes, S. G., y Gonzalez-Rocha, G. (2012). "OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America." *J Infect Dev Ctries*, 6(4), 311-6.
- Opazo C, A., Mella M, S., Domínguez Y, M., Bello T, H., y González R, G. (2009). "Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos." *Revista chilena de infectología*, 26, 499-503.
- Peleg, A. Y., Adams, J., y Paterson, D. L. (2007). "Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6), 2065-9.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., y Paterson, D. L. (2008). "*Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen." *Clin Microbiol Rev*, 21(3), 538-82.
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., y Bonomo, R. A. (2007). "Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471-3484.
- Poirel, L., Berçot, B., Millemann, Y., Bonnín Ré, A., Pannaux, G., y Nordmann, P. (2012). "Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France." *Emerg Infect Dis*, 18(3), 523-5.
- Poirel, L., Figueiredo, S., Cattoir, V., Carattoli, A., y Nordmann, P. (2008). "*Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp." *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 1252 - 1256.
- Poirel, L., Marque, S., Heritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., y Nordmann, P. (2005). "OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother*, 49(1), 202-8.
- Poirel, L., y Nordmann, P. (2006). "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology." *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826-836.
- Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.-L., Dabboussi, F., y Kempf, M. (2015). "Extrahuman Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon." *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2359-2367.
- Runnegar, N., Sidjabat, H., Goh, H. M. S., Nimmo, G. R., Schembri, M. A., y Paterson, D. L. (2010). "Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Single Institution over a 10-Year Period." *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 4051-4056.
- Sabour, P. M., Gill, J. J., Lepp, D., Pacan, J. C., Ahmed, R., Dingwell, R., y Leslie, K. (2004). "Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds." *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3449-3455.
- Sader, H. S., Jones, R. N., Andrade-Baiocchi, S., y Biedenbach, D. J. (2002). "Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin

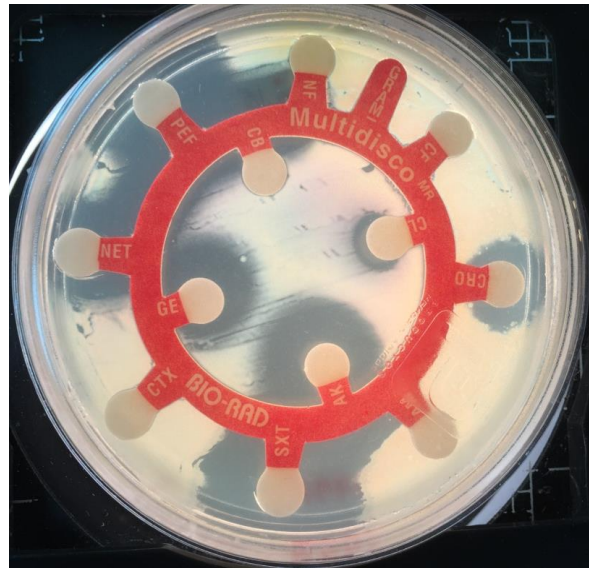
- American medical centers." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(3), 273-280.
- Saira, A., Iftikhar, A., Takuji, K., Toshiya, I., Ali, G. M., Toru, F., y Moriya, O. (2014). "Heavy metal-tolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond." *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51(3), 595-608.
- Segal, H., Garny, S., y Elisha, B. G. (2005). "Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*?" *FEMS Microbiol Lett*, 243(2), 425-9.
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., y Vaneechoutte, M. (1997). "Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods." *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2819-2825.
- Seward, R. J., Lambert, T., y Towner, K. J. (1998). "Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp." *J Med Microbiol*, 47(5), 455-62.
- Smet, A., Cools, P., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Haesebrouck, F., Kempf, M., Nemec, A., y Vaneechoutte, M. (2014). "*Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle." *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 12), 4007-15.
- Stietz, M. S., Ramirez, M. S., Vilacoba, E., Merkier, A. K., Limansky, A. S., Centron, D., y Catalano, M. (2013). "*Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III." *Infect Genet Evol*, 14, 294-301.
- Sunenshine, R. H., Wright, M.-O., Maragakis, L. L., Harris, A. D., Song, X., Hebden, J., Cosgrove, S. E., Anderson, A., Carnell, J., Jernigan, D. B., Kleinbaum, D. G., Perl, T. M., Standiford, H. C., y Srinivasan, A. (2007). "Multidrug-resistant *Acinetobacter* Infection Mortality Rate and Length of Hospitalization." *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 97-103.
- Tamayo-Legorreta, E. M., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Sanchez-Perez, A., Galicia-Paredes, A., Meza-Chavez, A., y Silva-Sanchez, J. (2014). "Identification of OXA-23 carbapenemases: novel variant OXA-239 in *Acinetobacter baumannii* ST758 clinical isolates in Mexico." *New Microbes and New Infections*, 2(6), 173-174.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., y Kumar, S. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol*, 24(8), 1596-9.
- Towner, K. J., Bergogne-Bérézin, E., y Fewson, C. A. (1991). "The Biology of *Acinetobacter*." 57, 149-167.
- Turton, J. F., Shah, J., Ozongwu, C., y Pike, R. (2010). "Incidence of *Acinetobacter* Species Other than *A. baumannii* among Clinical Isolates of *Acinetobacter*: Evidence for Emerging Species." *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1445-1449.
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., y Pitt, T. L. (2006a). "The role of ISAb1 in

- expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*." *FEMS Microbiol Lett*, 258(1), 72-7.
- Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., y Pitt, T. L. (2006b). "Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species." *J Clin Microbiol*, 44(8), 2974-6.
- Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A., Kolayli, F., y Eroglu, C. (2006). "High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres." *J Antimicrob Chemother*, 58(3), 537-42.
- Vaneechoutte, M., Devriese, L. A., Dijkshoorn, L., Lamote, B., Deprez, P., Verschraegen, G., y Haesebrouck, F. (2000). "*Acinetobacter baumannii*-Infected Vascular Catheters Collected from Horses in an Equine Clinic." *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4280-4281.
- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claeys, G., y Verschraegen, G. (1995). "Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis." *J Clin Microbiol*, 33(1), 11-5.
- Vaneechoutte, M., Nemec, A., Musilek, M., van der Reijden, T. J., van den Barselaar, M., Tjernberg, I., Calame, W., Fani, R., De Baere, T., y Dijkshoorn, L. (2009). "Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov." *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 6), 1376-81.
- Vaneechoutte, M., Young, D. M., Ornston, L. N., De Baere, T., Nemec, A., Van Der Reijden, T., Carr, E., Tjernberg, I., y Dijkshoorn, L. (2006). "Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*." *Appl Environ Microbiol*, 72(1), 932-6.
- Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A. R., Gomila, M., Nunes, O. C., Manaia, C. M., y Halpern, M. (2011). "*Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater." *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(Pt 12), 2837-43.
- Vázquez, J. A., y Berrón, S. (2004). "Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(2), 113-120.
- Wang, H., Guo, P., Sun, H., Wang, H., Yang, Q., Chen, M., Xu, Y., y Zhu, Y. (2007). "Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals." *Antimicrob Agents Chemother*, 51(11), 4022-8.
- Wisplinghoff, H., Edmond, M. B., Pfaller, M. A., Jones, R. N., Wenzel, R. P., y Seifert, H. (2000). "Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility." *Clin Infect Dis*, 31(3), 690-7.
- Wisplinghoff, H., Hippler, C., Bartual, S. G., Haefs, C., Stefanik, D., Higgins, P. G., y Seifert, H. (2008). "Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU

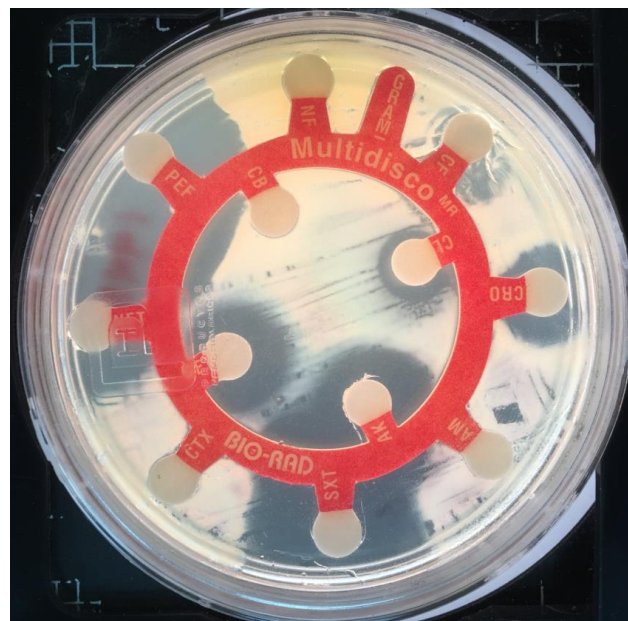
- isolates using a multilocus sequencing typing scheme." *Clin Microbiol Infect*, 14(7), 708-15.
- Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G., y Livermore, D. M. (2006). "Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp." *Int J Antimicrob Agents*, 27(4), 351-3.
- Yamamoto, S., y Harayama, S. (1998). "Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes." *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 3, 813-9.
- Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., y Dijkshoorn, L. (2011). "Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Veterinary Clinics, Germany." *Emerg Infect Dis*, 17(9), 1751-4.

ANEXOS

	Pagina
ANEXO 1. Antibiograma de cepa 144a.....	64
ANEXO 2. Antibiograma cepa 144b.....	64
ANEXO 3. Antibiograma de cepa 154b.....	65
ANEXO 4. Antibiograma de cepa IM-1.....	65
ANEXO 5. Antibiograma de cepa IM1 caja 2.....	66
ANEXO 6. Antibiograma de cepa IM2 caja 1.....	66
ANEXO 7. Antibiograma cepa IM 2 caja.....	67
ANEXO 8. Antibiograma cepa IM 3.....	67
ANEXO 9 . Antibiograma cepa IM4.....	68
ANEXO 10. Antibiograma cepa 5596.....	68
ANEXO 11. Antibiograma cepa 5596 caja 2.....	69
ANEXO 12. Antibiograma cepa 5605.....	69
ANEXO 13. Antibiograma cepa 5605 caja 2.....	70
ANEXO 14. Antibiograma cepa 6196.....	70
ANEXO 15. Protocolo de lisis de ADN (Genomico y plasmidico)....	71
ANEXO 16. Protocolo de purificación total de ADN de sangre animal o células. (spin_column protocol).....	72
ANEXO 17. Concentraciones de antibioticos contenidos en los sensidiscos.....	73
ANEXO 18. Interpretación de los halos de inhibición.....	74
ANEXO 19. Protocolo de purificación con membranas (diálisis).....	75



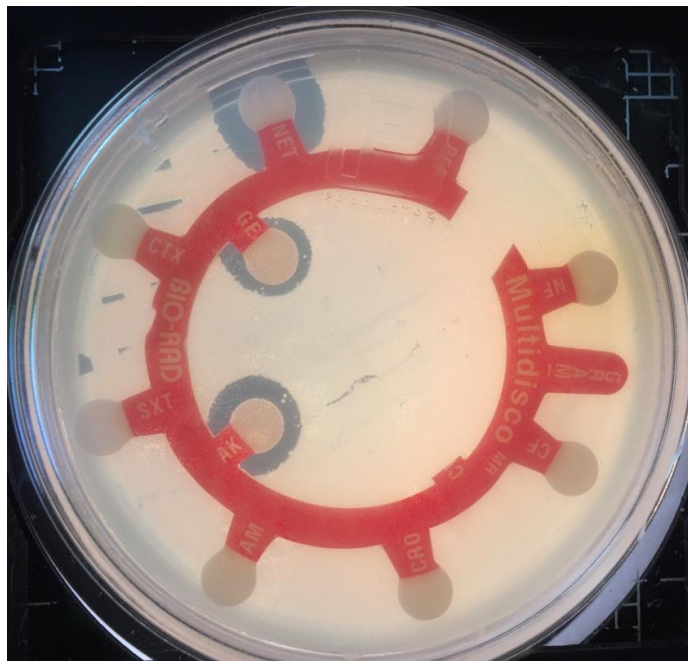
ANEXO 1. Antibiograma de cepa 144a.



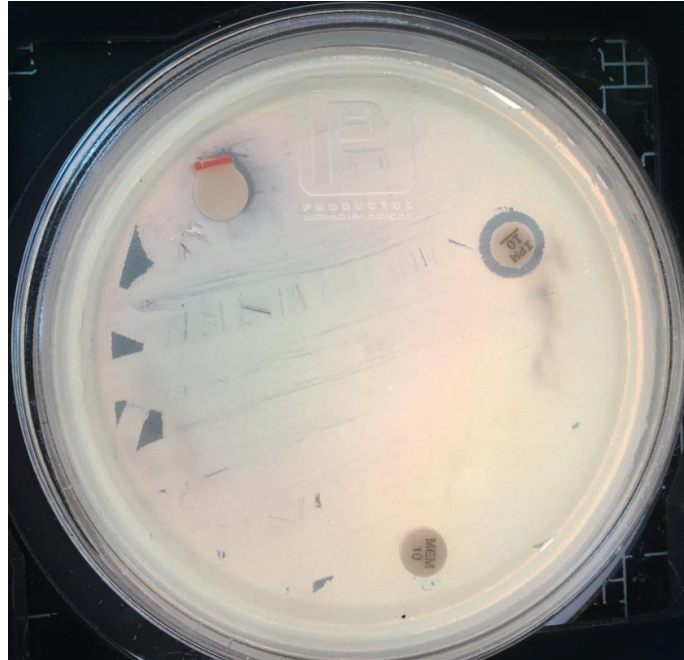
ANEXO 2. Antibiograma cepa 144b.



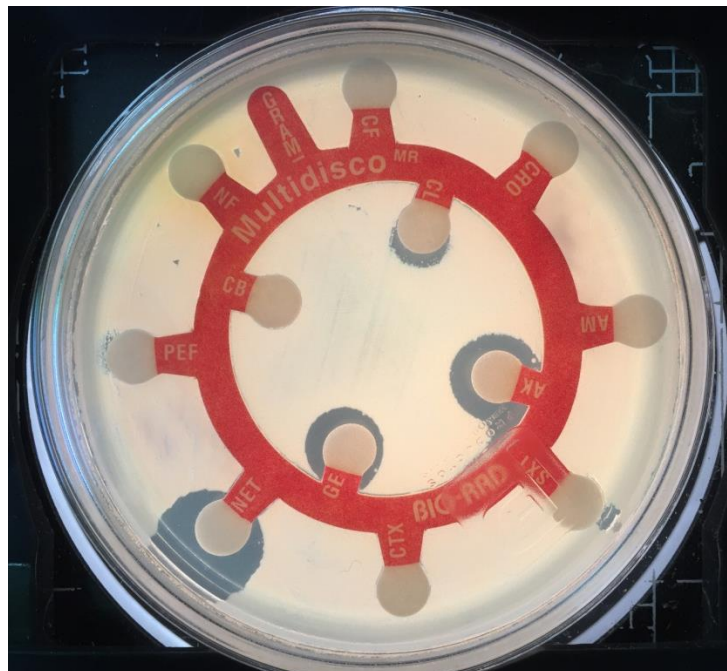
ANEXO 3. Antibiograma de cepa 154b.



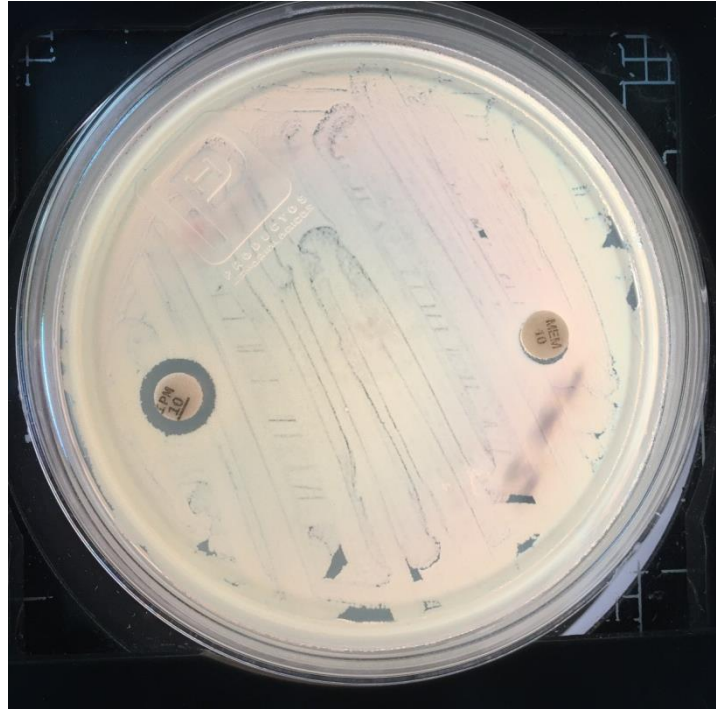
ANEXO 4. Antibiograma de cepa IM-1.



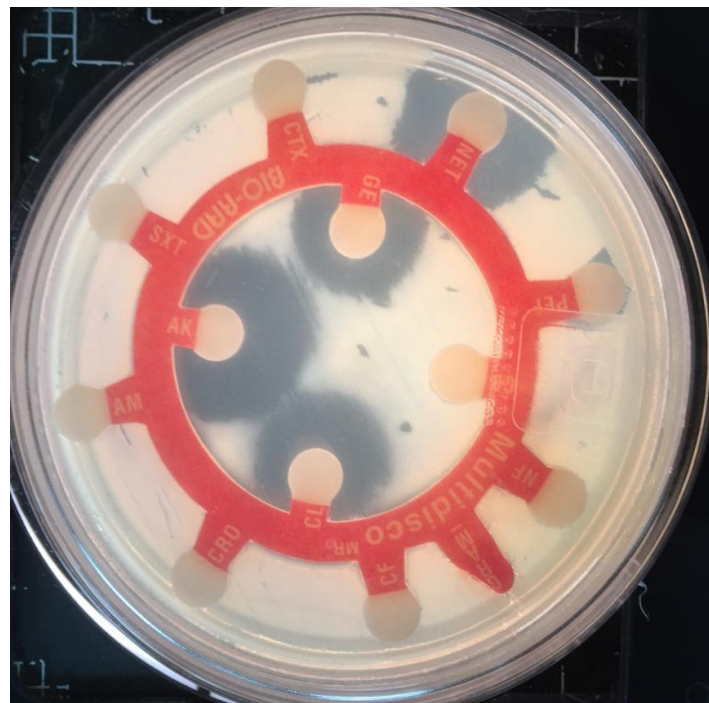
ANEXO 5. Antibiograma de cepa IM1 caja 2.



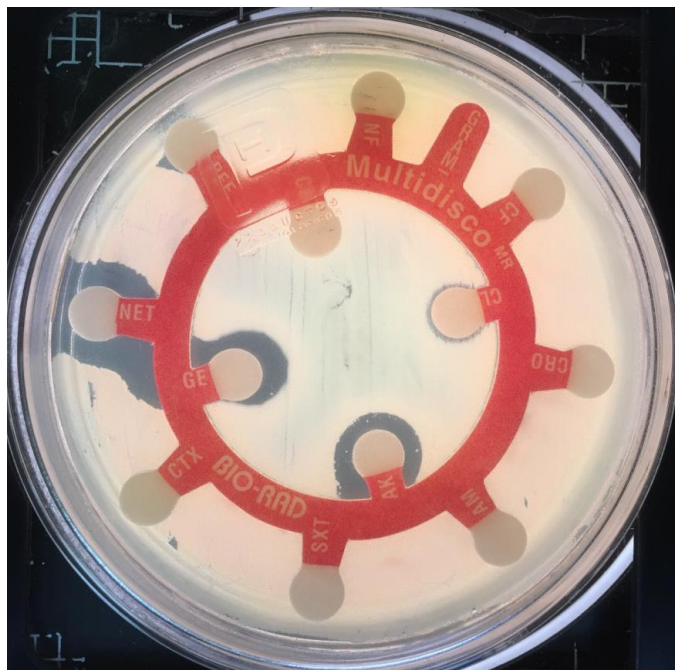
ANEXO 6. Antibiograma de cepa IM2 caja 1



ANEXO 7. Antibiograma cepa IM 2 caja 2



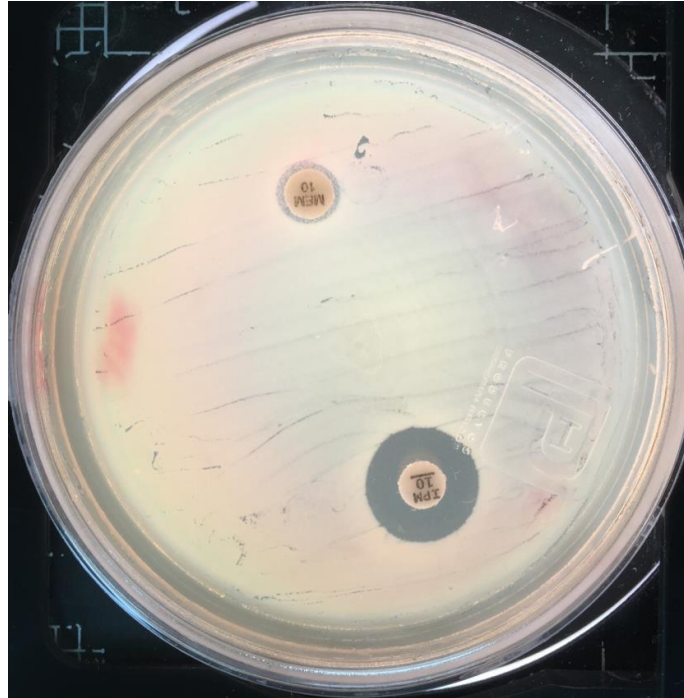
ANEXO 8. Antibiograma cepa IM 3



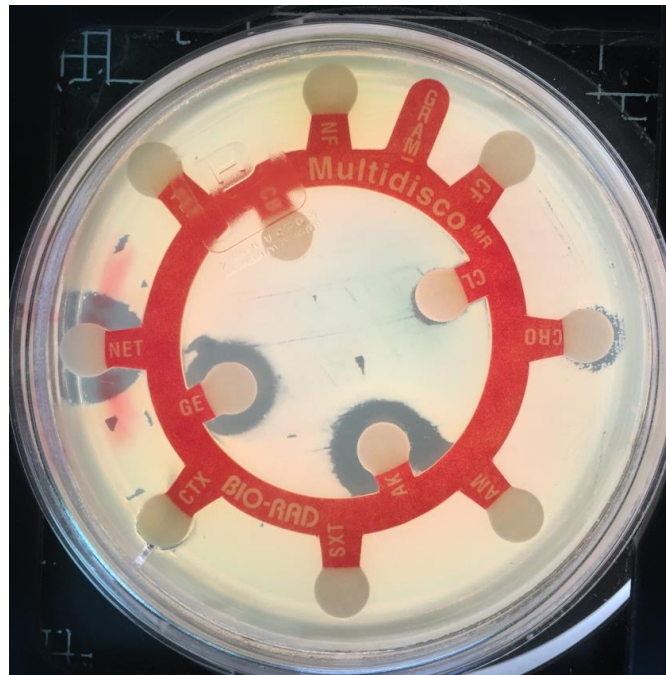
ANEXO 9 . Antibiograma cepa IM4



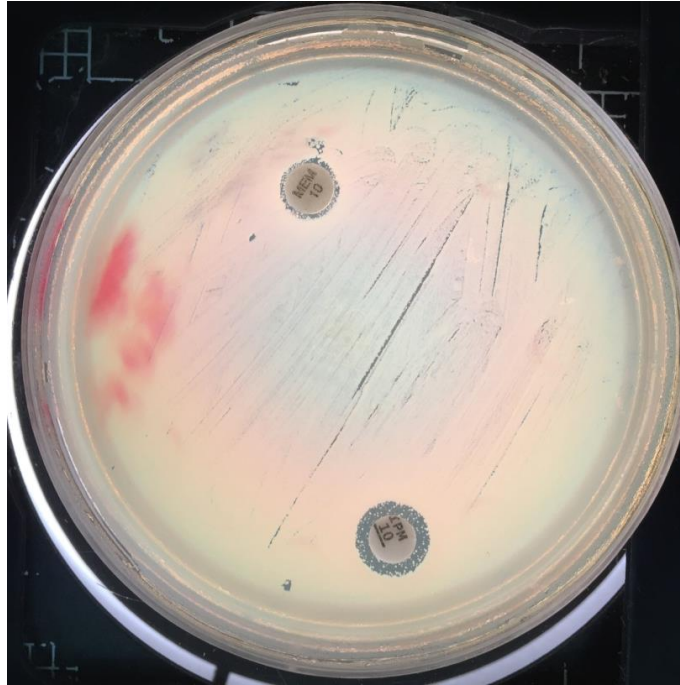
ANEXO 10. Antibiograma cepa 5596



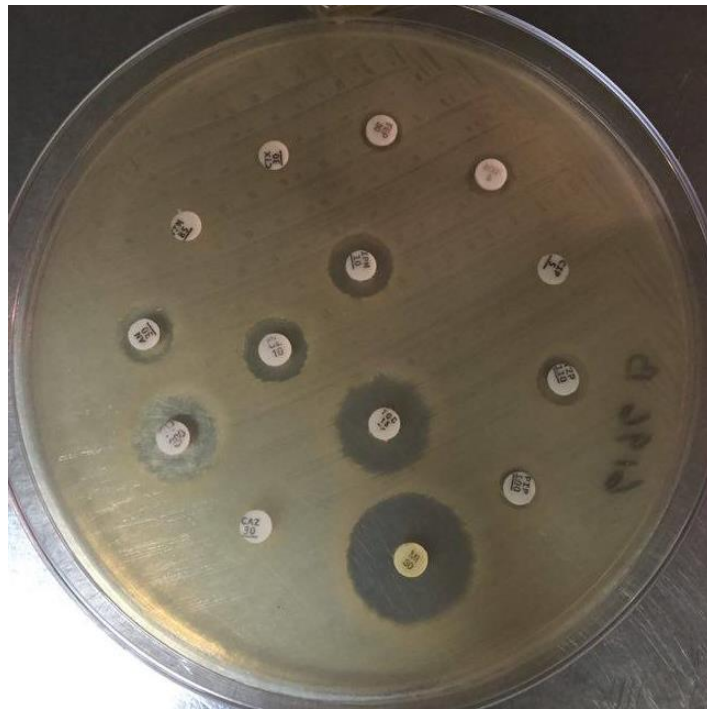
ANEXO 11. Antibiograma cepa 5596 caja 2



ANEXO 12. Antibiograma cepa 5605



ANEXO 13. Antibiograma cepa 5605 caja 2



ANEXO 14. Antibiograma cepa 6196

ANEXO 15

Protocolo de lisis de ADN (Genómico y plasmídico) (protocolo 3)

Procedimiento

1. Agregar de un caldo previamente crecido de 8-18 hrs (toda la noche) de 100-200 ul a un tubo eppendorff de 1.5 ml
2. Centrifugar 10,000 rpm durante 5 min.
3. Quitar el cultivo sobrenadante hasta obtener la pura pastilla.
 - i. El caldo o agar puede tener inhibidores de PCR.
4. Resuspender* en agua esteril con el volumen original del cultivo (100-200 ul).
5. Mezclar con vortex o con pipeta suavemente.
6. Calentar 100°C por 10 min. con termobloque sin agitación
 - i. Tiene que estar previamente calentado (ya con la temperatura tarda de 10 a 15 min. en alcanzarla)
7. Centrifugar 12,000 rpm a 4°C por 10 min.
 - i. Poner en fast cool para que se enfrie antes el rotor y alcance los 4°C pronto.
8. Utilizar solo el sobrenadante de 2 a 5ul para PCR
9. Guardar en el congelador a -20, máximo durará 3-5 meses.

Notas:

*resuspender: se da por entendido que ya llevo proceso de centrifugar y quitar sobrenadante y suspender en otra liquido.

Es importante tener preparadas las temperaturas en cada aparato (termobloque y centrifuga) para que cuente los minutos que requiere el proceso.

Al final queda una pequeña pastilla, se consideran los residuos celulares.

ANEXO 16

Protocolo: purificación total de ADN de sangre animal o células. (spin column protocol)

Este protocolo está diseñado para la purificación total ADN de sangre de animales (eritrocitos nucleados y no nucleados) o de cultivo animal o células humanas.

Procedimiento

Para la extracción de células cultivadas: centrifugar el numero apropiado de celular (máximum 5×10^6) por 5 min a 300 x g. Resuspender el pellet en 200 ul de PBS. Agregar 20 ul proteinasa K. Continuar con el paso 2.

1. Agregar 200 ul de AL (sin etanol). Mezclar por vortex, e incubar a 56°C por 10 min.
2. Agregar 200 ul de etanol (96-100%) a la muestra, mezclar en el vortex.
3. Pipetear la mezcla del paso 3 a una columna DNeasy Mini spin (filtro) colocada en un tubo colector de 2 ml (provisto). Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Desechar el flujo y el tubo colector
4. Colocar la columna DNeasy Mini spin en un tubo colector nuevo (provisto), agregar 500 ul AW1, y centrifugar por 1 min. a 8000 rpm. Desechar el flujo y el tubo colector.
5. Colocar la columna DNeasy Mini spin en un tubo colector nuevo de 2 ml (provisto) , agregar 500 ul de AW2, y centrifugar por 3 min. a 14,000 rpm hasta secar la membrana. Desechar el flujo y el tubo colector.
6. Colocar la columna DNeasy Mini spin en un nuevo tubo de 1.5 a 2.0 (no provisto), y pipetear a 200 ul AE (o agua molecular) directo a la membrana DNeasy. Incubar a temperatura ambiente 1 min, después centrifugar por 1 min. a 8000 rpm para eluir.
La elución con 100 ul (en lugar de 200 ul) incrementa la concentración final en la elución, pero también decrese la cosecha total.
7. Recomendado: para máxima cosecha de ADN, repetir la elución una vez como se describe en el paso 7. Este paso permite el incremento de la cosecha total del ADN.

NOTA: no diluir mas de 200 ul dentro de un tubo de 1.5 porque la columna DNeasy Mini spin puede entrar en contacto con la elución.

ANEXO 17Concentraciones de antibioticos contenidos en los sensidiscos

El estuche de Multidiscos* Gram Negativos II
CAT. 71080580 contiene 50 multidiscos con 12 antimicrobianos y una bolsa con silica gel como desecante.

Cada multidisco contiene aproximadamente:

Amikacina	AK	30µg
Ampicilina	AM	10µg
Levofloxacin	LEV	5µg
Cefalotina	CF	30µg
Cefotaxima	CTX	30µg
Ceftriaxona	CRO	30µg
Cloranfenicol	CL	30µg
Gentamicina	GE	10µg
Netilmicina	NET	30µg
Nitrofurantoina	NF	300µg
Cefepime	FEP	30µg
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	25µg

*Marca registrada

ANEXO 18

Interpretación de los halos de inhibición

Agente Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de halo de inhibición en mm		
		R	I	S
Amikacina	Enterobacteriaceae 30µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Ampicilina	10µg			
	Enterobacteriaceae	≤ 13	14-16	≥ 17
	Staphylococcus spp	≤ 28	-	≥ 29
	Enterococcus spp	≤ 16	-	≥ 17
	Streptococcus spp	-	-	≥ 24
Carbencilina	100µg			
	Enterobacteriaceae	≤ 19	20-22	≥ 23
	Pseudomonas aeruginosa	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefalotina	Enterobacteriaceae 30µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefepime	" 30µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	" 30µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Ceftazidima	" 30µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftriaxona	" 30µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Cefuroxima	" 30µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Cloranfenicol	" 30µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Dicloxacilina	1µg			
	Staphylococcus spp	≤ 10	11-12	≥ 13
Enoxacina	Enterobacteriaceae 10µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Eritromicina	15µg			
	Enterococcus spp	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina	Enterobacteriaceae 10µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Levofloxacina	" 5µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Netilmicina	" 30µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Nitrofurantoína	" 300µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Pefloxacina	5µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Penicilina	10U			
	Staphylococcus spp	≤ 28	-	≥ 29
	Enterococcus spp	≤ 14	-	≥ 15
	N. gonorrhoeae	≤ 26	27-46	≥ 47
	Streptococcus spp	-	-	≥ 24
Tetraciclina	Enterobacteriaceae 30µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim-Sultametoxazol	25µg	≤ 10	11-15	≥ 16

R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensible.

ANEXO 19Protocolo de purificación con membranas (diálisis)

Membranas de nitrocelulosa

Tipo de filtro 0.025 um VSWP

Contiene 100 filtros

Cat. No. VSWP02500

Marca MILLIPORE

Notas:

Usar cajas de petri (pueden ser usadas) enjuagadas con agua ultra pura o destilada.

Cada caja de petri aprox. utiliza 20 ml de agua ultra pura.

El proceso se realiza en campa con blower y sin mechero.

La membrana entera puede tolerar hasta 80-100 ul, la mitad solo 25 ul.

Procedimiento:

1. Llenar las cajas de petri con agua ultra pura según el numero de muestras que se van a purificar
2. Colocar la membrana (una por muestra) en el agua, según venga en el empaque
3. Colocar la muestra despacio en el centro de la membrana (cuantificar con la pipeta lo que se coloca)
4. Esperar 10 minutos para que se efectuó la diálisis.
5. Tomar la muestra y colocarlo en un nuevo tubo marcado previamente como purificado + ID muestra (cuantificar con la pipeta lo que se retira)
6. Guardar a -20°