

Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá

Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolations from a burns unit in a third level attention hospital in Bogotá

Fecha de recepción: 07/02/2006
Fecha de aceptación: 25/04/2006

JANNETH OROUÍDEA PINZÓN¹, JOSÉ RAMÓN MANTILLA²,
EMILIA MARÍA VALENZUELA², FEDERICO FERNÁNDEZ³,
CARLOS ARTURO ÁLVAREZ⁴, ELKIN DE JESÚS OSORIO¹

RESUMEN

Objetivo. En este estudio se realiza una descripción fenotípica y genética de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la Unidad de Quemados del hospital Simón Bolívar de Bogotá durante diez meses de seguimiento.

Materiales y métodos. Se tipificaron 25 aislamientos provenientes de pacientes y 3 ambientales mediante REP-PCR. Para la detección microbiológica de carbapenemasas se realizó la prueba de Hodge y el sinergismo de doble disco. Se determinaron los puntos isoelectrónicos con isoelectroenfoque de las betalactamasas producidas. La detección de los genes *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} se realizó mediante PCR.

Resultados. Según su genotipo, los aislamientos se reunieron en nueve grupos. La genotipificación clasificó los aislamientos en nueve grupos relacionados con un índice de similitud superior a 0,85. En el grupo E, constituido por el 39,2% de los aislamientos, se detectó un clon conformado por

los tres aislamientos ambientales y dos recuperados de pacientes. Se presentó resistencia a los carbapenémicos en 64,2% de los 28 aislamientos; de éstos, el 66,6% fueron resistentes, además, a todos los betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas probados. En 17 de los 18 aislamientos resistentes a imipenem se evidenció la presencia de carbapenemasas del tipo oxacilinas. En todos los aislamientos resistentes a imipenem se detectó el gen *bla*_{OXA23} y la presencia de dos betalactamasas con puntos isoelectrónicos de 6,3 y 6,9.

Conclusiones. Se detectó un grupo endémico de *A. baumannii* que permaneció durante los 10 meses del estudio. La presencia de una carbapenemasa del grupo OXA23 fue un factor determinante de la resistencia a los carbapenémicos. Sin embargo, los resultados microbiológicos permiten suponer la presencia de otros posibles mecanismos de resistencia.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, carbapenemasas, infección hospitalaria.

Infectio 2006; 10(2): 71-78

¹ Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, Secretaría Distrital de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

² Laboratorio de Epidemiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

³ Unidad de Quemados, Hospital Simón Bolívar, Bogotá, D.C., Colombia.

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Financiación: este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Salud Pública, Secretaría de Salud de Bogotá y el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

ABSTRACT

Objective. This study is a fenotypical and genetical description of *Acinetobacter baumannii* carried out in a ten month follow-up at the Unidad de Quemados from the Hospital Simon Bolívar in Bogotá. **Materials and methods.** 25 patient and 3 environmental isolates were typified by REP-PCR. Hodge's test and double disc synergy were done for microbiologic carbapenemase detection. Isoelectric points were determined by betalactamasas isoelectric focusing. Gene *bla*_{OXA23'}, *bla*_{OXA24'}, *bla*_{VIM'}, *bla*_{IMP} detection was carried out through PCR. **Results.** Isolate genotypification allowed their classification in nine groups based on similarities greater than 0.85. The E group consisted of 39.2% of the isolates, a clone formed by three environmental isolates and two reco-

vered from patients. 64.2% out 28 isolates displayed carbapenem resistance, and 66.6% of them were also resistant to betalactams, aminoglycosides and fluoroquinolones. Oxacillinase carbapenemase presence was evident in 17 of 18 isolates resistant to imipenem. Gene *bla*_{OXA23} and two betalactamasas were detected in isolates resistant to imipenem, with 6.3 and 6.9 isoelectric points.

Conclusions. An endemic group of *A. baumannii* was detected in the 10 month study duration. OXA23 carbapenemase presence was an important factor for carbapenem resistance; however, microbiologic results allow us to assume the possible presence of other resistance mechanisms.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, carbapenemases, nosocomial infection.

* * * * *

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista causante de infecciones intrahospitalarias (1, 3), particularmente asociado con neumonías y bacteriemias en unidades con pacientes críticos y salas de quemados (2, 4). En el pasado, esta especie bacteriana no representaba un problema en el ámbito hospitalario ya que era susceptible a diferentes antibióticos. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la aparición de resistencia múltiple (5, 17, 19).

En Latinoamérica, *Acinetobacter* spp. causa infección intrahospitalaria con frecuencias 2 a 10 veces mayores que en Canadá o Estados Unidos y la prevalencia de la resistencia a imipenem es de 11,45%, (23). De acuerdo con el Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana de Bogotá (GREBO), los perfiles de resistencia de aislamientos de *A. Baumannii* provenientes de las unidades de cuidado intensivo de 15 instituciones de Bogotá (2001 a 2003) fueron: ceftazidima (62,8%), cefepima (76,6%), aztreonam (91,6)%, amikacina (69,3%), ciprofloxacina (76,1%), piperaciclina/tazobactam (78,0%) e imipenem (38,7%).

Los carbapenémicos se emplean cuando se presentan aislamientos de *A. Baumannii* resistentes. Sin embargo, cada vez se describen con mayor frecuencia aislamientos de esta especie causantes de infección hospitalaria resistentes a este grupo de antibióticos (8, 17, 30). En Bogotá, se ha observado un aumento en la prevalencia de resistencia al imipenem, que pasó de 10,5% en el 2001 a 54,3% en el 2005 (www.grebo.org). La producción de betalactamasas del grupo B y D se ha relacionado con la aparición de dicha resistencia (3, 7, 18) que, además, puede estar asociada con la pérdida o disminución de proteínas de la membrana externa (11).

Por otra parte, las técnicas de tipificación molecular, como la REP-PCR, permiten hacer el seguimiento y demostrar de manera contundente la presencia de aislamientos endémicos causantes de infección hospitalaria, y la aparición de brotes y posibles reservorios; esto facilita una evaluación más objetiva y permite generar intervenciones rápidas, oportunas y certeras.

El objetivo del presente estudio fue describir el fenotipo y la genética de los aislamientos de *A. Baumannii* en la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá, durante diez meses de seguimiento.

MÉTODOS

Identificación de los aislamientos. Durante el período comprendido entre el 21 agosto de 2004 y el 21 de mayo de 2005 se recuperaron 28 aislamientos de *A. baumannii* de la Unidad de Quemados del Hospital Simón Bolívar; tres provenían de cultivos ambientales. La identificación inicial se hizo en el hospital con el sistema Vitek® (Biomérieux-Francia) y la confirmación se realizó en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) de Bogotá con el sistema BBL cristal® (BD- Estados Unidos).

Determinación de la sensibilidad antibiótica. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron con el sistema automatizado Vitek® (Biomérieux-Francia) en el laboratorio clínico del hospital, tarjeta de susceptibilidad Colombia GNS-651: amikacina, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefepime, ceftazidima, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, nitrofurantoína, piperacilina, piperacilina-tazobactam y trimetoprim-sulfametoxazol.

Detección microbiológica de carbapenemasas y metalobetalactamasas. Todos los aislamientos resistentes a imipenem se analizaron mediante la prueba de Hodge para la detección de carbapenemasas (14). A los aislamientos con resultado positivo para dicho ensayo se les practicó la prueba de sinergismo de doble disco para la detección de metalobetalactamasas (14). El control positivo fue *Pseudomonas aeruginosa* productora de VIM-2, donado por Marcela Radice de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, y el control negativo, la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tipificación genética. El ADN extraído mediante lisis celular por ebullición, de cultivos en medio líquido (21), se amplificó mediante los iniciadores recomendados por Quelle (27). La reacción se llevó a cabo en termociclador iCycler® (Bio Rad-Estados Unidos): 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto 30 segundos a 47°C y 2 minutos 30 segundos a 72°C, y extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, a un voltaje de 4,6 V/cm en solución tampón TBE 0,5X durante 2,5 horas. El ADN se visualizó por tinción con bromuro

de etidio 0,5 µg/ml y el registro fotográfico se hizo en el equipo Gel-Doc® (Bio Rad-Estados Unidos). El porcentaje de similitud de los perfiles electroforéticos de los aislamientos se estimó con el coeficiente DICE y el análisis de agrupamiento se efectuó por el algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*) usando el programa NTSYSpc, versión 2.0, con el cual se creó un dendrograma. Los aislamientos que mostraron un porcentaje de similitud superior al 85% se consideraron relacionados genéticamente.

Perfil de puntos isoelectrónicos. Se utilizó la técnica del isoelectroenfoco para determinar los puntos isoelectrónicos de las betalactamasas (24) presentes en los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a imipenem. Los extractos proteicos se obtuvieron mediante extracción con lisozima (Sigma®-Estados Unidos) (20). Como control se utilizaron dos cepas de *E. coli* productoras de TEM-26 (pI 5,6) y SHV-5 (pI 8,2)

Detección de genes bla_{VIM} , bla_{IMP} , bla_{OXA23} y bla_{OXA24} . El ADN se obtuvo mediante extracción por lisis celular por ebullición (21). Se realizaron ensayos de PCR en todos los aislamientos de *A. baumannii*, mediante los iniciadores para los genes bla_{VIM} : el iniciador *forward* recomendado por Toleman (26) y *reverse* de Doquier (10), para los genes bla_{IMP} los iniciadores recomendados por Toleman (26). La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler® (Bio Rad-Estados Unidos): 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C (IMP), 1 minuto a 56°C (VIM) y 1 minuto a 68°C, y extensión final de 1 minuto a 68°C.

Para los genes bla_{OXA23} y bla_{OXA24} se utilizaron los iniciadores recomendados por Afzal-Shah (2); para OXA-23: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 25 segundos a 94°C, 40 segundos a 52°C, 50 segundos a 72°C y extensión final de 6 minutos a 72°C; para OXA-24, 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, 2 minutos a 72°C y extensión final de 10 minutos a 72°C.

Tabla 1

Iniciadores para detección de carbapenemasas por PCR

Iniciador	Secuencia	Tamaño de amplificación
IMP-F	5' ATG AGC AAG TTA TCT GTA TTC 3'	740 pb
IMP-R	5' TTA GTT GCT TGG TTT TGA TG 3'	
VIM-F	5' GTC TAT TTG ACC GAG TC 3'	
VIM-R	5' CTA CTC AAC GAC TGA GGG 3'	774 pb
OXA23-F	5' GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG 3'	
OXA23-R	5' TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG 3'	
OXA24-F	5' GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA 3'	1.058 pb
OXA24-R	5' TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT 3'	

Fuente: forward, R: reverse.

RESULTADOS

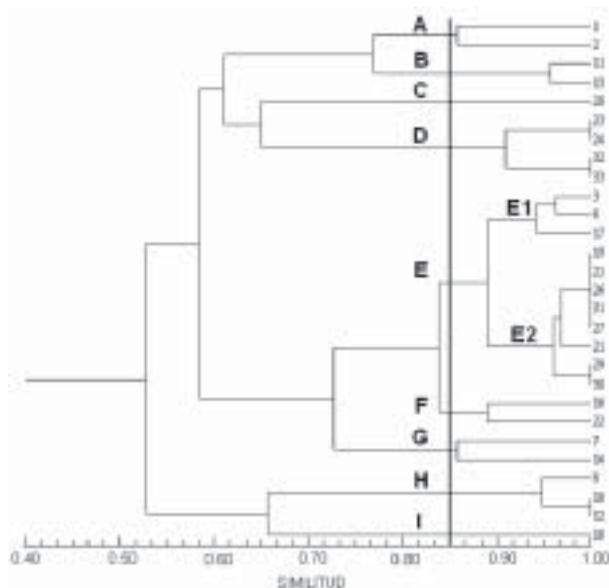
El 64,2% de los aislamientos evidenció resistencia a los carbapenémicos representados por imipenem y meropenem. Para los demás antibióticos, la resistencia fue la siguiente: amikacina, 75%; ampicilina, 100%; ampicilina-sulbactam, 71,4%; cefepime, 78,5%; cefotaxima, 39,2%; ceftazidima, 60,7%; cefalotina, 100%; ciprofloxacina, 78,5%; gentamicina, 78,5%; nitrofurantoina, 100%, y piperacilina, 85,7%. De acuerdo con los perfiles de resistencia, los aislamientos se agruparon en 11 antibiotipos (tabla 2).

Detección microbiológica de carbapenemasas y metalobetalactamasas. De acuerdo con la prueba de Hodge, 94,4% (17 de 18) de los aislamientos resistentes a carbapenémicos fueron productores de carbapenemasas. Ninguno produjo metalobetalactamasas (resultado negativo para la prueba de sinergismo de doble disco).

Tipificación genética. Los 28 aislamientos se ubicaron en 9 grupos (A, B, C, D, E, F, G, H, I) (figura 1).

Se observa un grupo mayor, el E, constituido por 11 aislamientos agrupados con un índice de similitud superior al 0,89; en él está incluido el mayor número de aislamientos y, a su vez, se constituye en el grupo con mayor periodo de permanencia. Solamente un aislamiento de este grupo presentó susceptibilidad a imipenem (aislamiento 6). Dentro de él se observaron dos subgrupos: el E1 formado por tres aislamientos estrechamente relacionados (índice de similitud de 0,95) y el subgrupo E2 conformado por 8 aislamientos estrechamente relacionados (índice de

Figura 1

Dendrograma REP-PCR de aislamientos de *A. baumannii*

similitud de 0,97). Cinco aislamientos del subgrupo E2 fueron indistinguibles genéticamente; este clon estuvo constituido por tres aislamientos ambientales y dos causantes de infección.

Perfil de puntos isoeléctricos. En los aislamientos resistentes a imipenem, se detectaron cuatro betalactamasas con puntos isoeléctricos de 5,7, 6,3, 6,9 y mayor de 9. En todos se detectaron dos betalactamasas con puntos isoeléctricos de 6,3 y mayor de 9. En dos (aislamientos 26 y 30) se encontró una adicional con punto isoeléctrico de 6,9. En el aislamiento 16 se encontraron dos adicionales con puntos isoeléctricos de 5,7 y 6,9, y en el aislamiento 31, una adicional con punto isoeléctrico de 5,7.

Detección de genes bla por PCR. En la amplificación de todos los aislamientos resistentes a imipenem, con los iniciadores para el gen bla_{OXA-23} se observó un producto amplificado de 1.058 pb. No se evidenció amplificación para genes bla_{OXA-24} ni para los genes de las metalobetalactamasas bla_{IMP} y bla_{VIM} .

Tabla 2

Perfiles de resistencia, grupos genéticos, puntos isoeléctricos y procedencia de los aislamientos estudiados de *A. baumannii*

No.	Muestra	IPM	Antibiotipo	Genotipo	Punto isoeléctrico
1	Hemocultivo	S	5	A	NA
2	Catéter	R	1	A	>9,0/6,3
3	Absceso cerebral	R	2	E1	>9,0/6,3
6	Hemocultivo	S	7	E1	NA
7	Hemocultivo	S	9	G	NA
8	Catéter	S	9	H	NA
10	Hemocultivo	S	8	H	NA
11	Catéter	R	1	B	>9,0/6,3
12	Hemocultivo	S	10	H	NA
13	Secreción pleural	R	1	B	>9,0/6,3
14	Hemocultivo	R	1	G	>9,0/6,3
16	Hemocultivo	R	2	F	>9,0/6,9/6,3/5,7
17	Hemocultivo	R	2	E1	>9,0/6,3
18	Catéter	S	10	I	NA
19	Hemocultivo	R	3	E2	>9,0/6,3
20	Hemocultivo	S	11	C	NA
21	Hemocultivo	R	2	E2	>9,0/6,3
22	Catéter	R	6	F	>9,0/6,3
23	Hemocultivo	S	8	D	NA
24	Catéter	S	8	D	NA
25	Tina	R	1	E2	>9,0/6,3
26	Ventilador UCI	R	1	E2	>9,0/6,9/6,3
27	Mesa cama	R	1	E2	>9,0/6,3
29	Hemocultivo	R	4	E2	>9,0/6,3
30	Hemocultivo	R	1	E2	>9,0/6,9/6,3
31	Hemocultivo	R	1	E2	>9,0/6,3/5,7
32	Hemocultivo	R	1	D	>9,0/6,3
33	Hemocultivo	R	1	D	>9,0/6,3

No.: número del aislamiento, R: resistente, S: sensible

1: AN, AMP, SAM, FEP, CTX, CAZ, CEP, CIP, GEN, IPM, MEM, NIT, PIP, TZP, STX (resistente a todos los antibióticos probados)

2: AN, AMP, SAM, FEP, CTX, CEP, CIP, GEN, IPM, MEM, NIT, PIP, TZP, STX
3: AN, AMP, SAM, FEP, CAZ, CEP, CIP, GEN, IPM, MEM, NIT, PIP, TZP, STX

4: AN, AMP, FEP, CTX, CAZ, CEP, CIP, GEN, IPM, MEM, NIT, PIP, TZP, STX

5: AN, AMP, SAM, FEP, CTX, CAZ, CEP, CIP, GEN, NIT, PIP, TZP, STX

6: AN, AMP, SAM, FEP, CEP, CIP, GEN, IPM, MEM, NIT, PIP, TZP, STX

7: AN, AMP, CEP, CIP, GEN, NIT, PIP, STX

8: AMP, FEP, CEP, NIT, PIP, TZP, STX

9: AM, SAM, CEP, NIT, PIP, STX

10: AMP, CEP, NIT, STX

11: AMP, CEP, NIT

AN: amikacina; AMP: ampicilina; SAM: ampicilina-sulbactam; FEP: cefepime; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CEP: cefalotima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; MEM: meropenem; NIT: nitrofurantoína; PIP: piperacilina; TZP: piperacilina-tazobactam; STX: trimetoprim-sulfametoxazol.

DISCUSIÓN

Las infecciones bacterianas son una de las complicaciones más comunes en los pacientes quemados (4, 29). *A. baumannii* emerge como agente causal de infección intrahospitalaria en las unidades de quemados (13), frecuentemente con resistencia a los carbapenémicos, lo que representa un problema por su difícil manejo terapéutico y eliminación del ambiente (4, 5).

En el presente trabajo se hace una descripción de una epidemia por *A. baumannii* ocurrida durante diez meses de seguimiento en la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel. El mayor porcentaje de aislamientos obtenidos correspondió a fenotipos con resistencia múltiple, que mostraron resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas; esta característica de resistencia múltiple dificulta su erradicación y el control de la

infección, y facilita su diseminación, pues el paciente infectado puede servir como reservorio (4, 29).

Algunas variables consideradas, como el tipo de quemadura, su profundidad y el origen de la muestra, no mostraron relación con la infección por *A. baumannii* resistente. Algunos estudios han mostrado resultados similares (29, 30). Sin embargo, éste es un estudio descriptivo que no permite decir que éstos no sean factores de riesgo como tal.

Mediante la prueba de Hodge se evidenció la presencia de enzimas con actividad de carbapenemasa en 17 de los 18 aislamientos resistentes a imipenem. El resultado negativo para esta prueba en un aislamiento puede deberse a una actividad hidrolítica muy débil (2) o a baja producción enzimática no detectable mediante dicha técnica; este aislamiento mostró un resultado positivo con los iniciadores del grupo *bla*_{OXA23'}, lo que significa que está en capacidad de producir una de las enzimas que hacen parte de este subgrupo, que está relacionada con resistencia a carbapenémicos aunque no se haya detectado mediante la prueba microbiológica.

La presencia de carbapenemasas del grupo de OXA-23 que hidrolizan débilmente el imipenem (9, 12), identificadas en el presente estudio, posiblemente puede generar resultados de difícil interpretación cuando se realiza la prueba de Hodge. Por lo tanto, la aplicación de este método microbiológico, como método de tamizaje para la identificación de *A. baumannii* productor de enzimas con actividad de carbapenemasa que no sean metalobetalactamasas, debe ser cauteloso.

Los brotes producidos por *A. baumannii* resistente a los carbapenémicos se relacionan con la presencia de metalobetalactamasas de las familias IMP y VIM, identificadas en Asia, Europa, el Reino Unido y Suramérica (28). En este estudio, no se evidenció expresión de estas metalobetalactamasas mediante la prueba de sinergismo de doble disco, ni se detectaron genes mediante PCR.

La genotipificación de los aislamientos agrupados con un porcentaje de similitud superior al 85%, mostró nueve grupos con predominio del grupo E, que incluyó el 39,2% de los aislamientos y permaneció en los diez meses de seguimiento; esto podría suponer un grupo endémico que persiste en el tiempo como agente causante de infección hospitalaria en esta unidad de quemados. La recuperación de cinco aislamientos indistinguibles genéticamente, dentro del grupo E que incluye tres cultivos ambientales

(25, 26 y 28), evidencia la ubicuidad de un grupo de microorganismos en el ambiente que puede favorecer su transmisión y permite recomendar la revisión de los procesos de desinfección en dicha unidad para lograr una erradicación efectiva. Además de estos cinco aislamientos, que son indistinguibles genéticamente según los criterios de Tenover (25), todos los demás en el grupo E se clasificarían como estrechamente relacionados, ya que se observa una diferencia de una a tres bandas entre aislamientos en relación con dicho grupo. Dada la facilidad de cambio de los genomas bacterianos, pueden observarse variaciones entre los patrones electroforéticos, incluso de una misma cepa cuando se cultiva repetidamente o cuando se aísla en diferentes ocasiones del mismo paciente, por lo cual los subgrupos E1 y E2 pueden considerarse presumiblemente relacionados de manera clonal, con un ancestro común reciente (25).

A. baumannii persiste en el ambiente por su versatilidad para utilizar diferentes fuentes de carbono y crecer en diferentes condiciones de temperatura, pH y humedad; esto lo hace capaz de subsistir en fomites, áreas inertes, superficies de equipos, soluciones de limpieza y pacientes críticos (1). Esta capacidad y la facilidad de adquirir resistencia a antimicrobianos han convertido a esta especie saprófita en un eficaz patógeno oportunista intrahospitalario (5, 16). Además, la resistencia a múltiples antibióticos puede, a su vez, favorecer la persistencia, ya que los pacientes infectados pueden actuar como reservorios (29).

En este estudio la mayoría de los aislamientos del grupo E mostraron un fenotipo de múltiple resistencia (tabla 2); cinco de los once aislamientos fueron resistentes frente a los 14 antibióticos evaluados (antibiotipo 1), cinco mostraron resistencia a 13 antibióticos (antibiotipos 2, 3 y 4) y sólo uno, el aislamiento 17, mostró sensibilidad a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación. La resistencia múltiple de estos aislamientos favoreció la persistencia del grupo endémico E y podría generar reservorios de difícil erradicación.

Los aislamientos de los grupos A y F que se recuperaron durante dos meses también agruparon aislamientos con resistencia múltiple. Los demás grupos aparecieron esporádicamente durante los diez meses de estudio; ninguno de ellos tuvo la capacidad de persistir, probablemente asociada con la sensibilidad a los antibióticos observada.

El aislamiento 26, que hace parte del clon detectado dentro del grupo endémico, muestra una betalactamasa con un punto isoeléctrico de 6,9, que no se encontró expresada en los otros cuatro aislamientos; esto podría deberse a que la concentración de la enzima en los extractos proteicos no es detectable o a que la técnica usada para la tipificación molecular no discrimina una posible diferencia entre este aislamiento y los demás que hacen parte del clon.

De igual forma, el aislamiento 31, que es el último que aparece en el tiempo perteneciente al clon, expresa una enzima con punto isoeléctrico de 5,7, posiblemente una betalactamasa del tipo TEM (11), que puede haber sido adquirida del ambiente.

Cuatro aislamientos hacen parte del grupo D, dos indistinguibles genéticamente mostraron sensibilidad al imipenem y dos aislamientos estrechamente relacionados con los anteriores (2 bandas de diferencia) que son indistinguibles genéticamente entre ellos; estos últimos con un perfil de susceptibilidad diferente al de los dos primeros que presentaron resistencia a imipenem.

De igual manera, en los grupos A y G se observa que el primer aislamiento presenta sensibilidad al imipenem, pero el siguiente muestra resistencia a dicho antibiótico; esto podría significar, además de permanencia en el ambiente, adquisición del mecanismo de resistencia.

En los aislamientos resistentes que hacen parte de estos grupos se detectó el gen de bla_{OXA23} y expresión de dos betalactamasas; esto podría sugerir transferencia horizontal de la resistencia. En los aislamientos resistentes a imipenem se encontró una betalactamasa con punto isoeléctrico 6,3, la cual se ha relacionado con resistencia a los carbapenémicos (9) ya que puede corresponder a una de las enzimas del grupo OXA-23.

De igual manera, se detectó la presencia de una secuencia consenso para el grupo de enzimas bla_{OXA-23} en dichos aislamientos, independientemente del grupo al que pertenecieran de acuerdo con la tipificación molecular mediante REP-PCR, lo que sugiere que la presencia de esta enzima está relacionada con resistencia (9).

Se evidenció la expresión de una banda de punto isoeléctrico mayor de 9,0 que corresponde presumiblemente a una cefalosporinasa tipo AmpC que no se puede inducir (7); incluso en el aislamiento sensible a imipenem que se utilizó como control, su ex-

presión *per se* no se ha relacionado con resistencia a carbapenémicos (11).

En los tres aislamientos en los que se detectó una betalactamasa de punto isoeléctrico 6,9, es posible que pueda corresponder a otra de las enzimas tipo OXA reportada en Argentina con punto isoeléctrico 7,0, OXA-51 (7), o a la OXA-58 reportada en Francia (22), asociadas ambas con resistencia a carbapenémicos. La presencia de una enzima con punto isoeléctrico 5,7 en dos aislamientos puede corresponder a TEM; su expresión no se ha asociado a resistencia a carbapenémicos (11).

Los mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *A. baumannii* son múltiples y complejos; generalmente, involucran elementos adicionales a la presencia de betalactamasas (6), como son la pérdida de proteínas de la membrana externa (8, 15), la reducción de la expresión de proteínas de las mismas, las alteraciones en la afinidad de PBP (6) y la expresión exagerada del gen bla_{OXA23} (12); se asocian con la aparición de resistencia a carbapenémicos y podrían estar relacionados con la resistencia a imipenem en los aislamientos estudiados.

En conclusión, se detectó un grupo endémico de *A. baumannii* que permaneció durante los 10 meses del estudio. La presencia de una carbapenemasa del grupo OXA23 fue un factor determinante de la resistencia a los carbapenémicos. Sin embargo, los resultados de los ensayos microbiológicos usados permiten suponer la presencia de otros posibles mecanismos de resistencia.

REFERENCIAS

1. **ABBO A, NAVON-VENEZIA S, HAMMER-MUNTZ O, KRICHALI T, SIEGMAN-IGRA Y, CARMELI Y.** Multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:22-9.
2. **AFZAL-SHAH M, WOODFORD N, LIVERMORE D.** Characterization of OXA-25, OXA-26 and OXA-27 Molecular class D β -Lactamases associated with carbapenems resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:583-8.
3. **AYAN M R, DURMAZ E, AKTAS E, DURMAZ B.** Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching Hospital. *J Hosp Infect.* 2003;54:39-45.
4. **BAYAT A, SHAABAN H, DODGSON A, DUNN KW.** Implications for burns unit design following outbreak

- of multi-resistant *Acinetobacter infection* in ICU and burn unit. *Burns*. 2003;29:303-6.
5. **BERGOGNE-BÉREZIN E, TOWNER K J.** *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:148-65.
 6. **BOU G, CERVERO G, DOMÍNGUEZ A, QUEREDA C, MARTÍNEZ-BELTRÁN J.** Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -Lactamases. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3299-305.
 7. **BROWN S, AMYES S.** The sequences of seven classes D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:326-8.
 8. **COSTA SF, WOODCOCK J, GILL M, WISE R, BARONE A, CAIAFFA H, LEVIN A ET AL.** Outer-membrane proteins pattern and detection of β -lactamase in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *I J Antimicrob Agents*. 2000;13:175-82.
 9. **DALLA-COSTA L, COELHO J, SOUZA H ET AL.** Outbreak of carbapenem resistance *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3403-6.
 10. **DOQUIER J, LUZZARO F, AMICOSANTE G, TONIOLO A, ROSSOLINI G.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PER-1 extended spectrum serine β -Lactamase and VIM-2 metallo- β -Lactamase. *Emerg Inf Dis*. 2001;7:910-1.
 11. **FERNÁNDEZ-CUENCA F, MARTÍNEZ M, CONEJO M, AYALA J, PEREA E, PASCUAL A.** Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:565-74.
 12. **HÉRITIER C, POIREL L, LAMBERT T, NORDMANN P.** Contribution of acquired carbapenem hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3198-202.
 13. **HERRUZO R, PINTADO R, REY J, GARCÍA V.** Complicaciones infecciosas de los enfermos quemados. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. 1988; Herruzo R, Pintado R, Rey J, García V. Complicaciones infecciosas de los enfermos quemados. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. 1988;14: 2 - 12
 14. **LEE K, LIM Y, YONG D, YUM JH, CHONG Y.** Evaluation of the Hodge test and the Imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating Metallo- β -Lactamase producing isolates of the *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4623-9.
 15. **LIMANSKY AS, MUSSI MA, VIALE A.** Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4776-8.
 16. **LINARES-RODRÍGUEZ JF, MARTÍNEZ-MENÉNDEZ JL.** Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23: 86-93.
 17. **LÓPEZ-OTSOA F, GALLEGU L, TOWNER KJ, TYSALL L, WOODFORD N, LIVERMORE DM.** Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol*. 2003;40:4741-3.
 18. **NISHIO H, KOMATSU M, SHIABATA N ET AL.** Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the kinki region of Japan. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5256-63.
 19. **NORDMANN P, POIREL L.** Emerging carbapenemase in gram-negatives aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:321-31.
 20. **PATERSON D, RICE L, BONOMO RA.** Rapid method of extraction and analysis of extend-spectrum β -lactamases from clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7: 697-711.
 21. **PELLEGRINO FL, TEXEIRA L, CARVLHAO S ET AL.** Occurrence of multidrug-resistant *P. aeruginosa* clone in different hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2420-4.
 22. **POIREL L, MARQUÉ S, HÉRITIER C, SEGONDS C, CHABANON G, NORDMANN P.** OXA-58 a novel class D β -Lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:202-8.
 23. **RODRÍGUEZ-BAÑO J, PASCUAL A ET AL.** Bacteremias por *Acinetobacter baumannii*: características clínicas y pronósticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21:242-7.
 24. **SANDERS C, SANDERS W, MOLAND E.** Characterization of β -lactamases in situ on polyacrylamide gels. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;30: 951-2.
 25. **TENOVER F, ARBEIT R, GOERING R ET AL.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33: 2233-9.
 26. **TOLEMAN MA, BIEDENBACH D, BENNETT R, JONES N, WALSH TR.** Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *blaIMP-13*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:583-90.
 27. **QUELLE L, CATALANO M.** Efficacy of two DNA fingerprinting methods for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;39:215-23.
 28. **WALSH T, TOLEMAN M, POIREL L, NORDMANN P.** Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:306-25.
 29. **WISPLINGHOFF H, PERBIX W, SEIFERT H.** Risk factor for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study in burned patients. *Clin Infect Dis*. 1999;28:59-66.
 30. **WONG T, LING M, SONG C.** Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit- clinical risk factors and prognosis. *Burns*. 2002;28:349-57.