

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CONVENCIONAL DE AISLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS

Gabriel González ¹, Howard Takiff ²

RESUMEN: *Introducción:* *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) es la especie más comúnmente identificada en el género *Acinetobacter* asociado a infecciones nosocomiales, bacteriemia, neumonía e infecciones de la piel y el tracto urinario. Unos pocos clones son actualmente responsables de la diseminación en todo el mundo. Desafortunadamente, la resistencia a múltiples antibióticos es una característica común entre estos clones debido a su naturaleza adaptativa inigualable. *Métodos:* Se estudiaron un total de 327 aislamientos no duplicados de *Acinetobacter* spp. a partir de muestras clínicas provenientes del Hospital Dr. José María Vargas, Hospital Domingo Luciani y Centro Médico de Caracas. La identificación molecular fue llevada a cabo mediante amplificación y secuenciación del gen *rrs*. La susceptibilidad de los aislados a imipenem y meropenem, fue determinada empleando en método de dilución en agar, siguiendo los lineamientos del CLSI. Los genes que codifican carbapenemasas (*bla*_{KPC-like}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-143}) y de *ISAb1* se investigaron mediante PCR utilizando cebadores específicos y posterior secuenciación. Con el objeto de identificar la presencia de clones de *A. baumannii* circulantes se utilizó el análisis de secuencias de nucleótidos repetidos en tándem (VNTR). *Resultados:* La geno especie predominante fue *A. baumannii* (93.9%) y la gran mayoría (92,18%) fueron resistentes a carbapenémicos, presentando concentración inhibitoria mínima de 64 a 128 µg/ml para imipenem y de 128 a 256 µg/ml para meropenem. A través de VNTR se logró evidenciar la presencia de 97 complejos MLVA-8. Los tres complejos más numerosos fueron el 28 (VNTR 48330111214), el 38 (VNTR 48330301214) y 17 (VNTR 8833162289). El complejo 38, fue el de mayor permanencia, detectado exclusivamente en el Hospital Dr. Domingo Luciani y recuperado principalmente de la Unidad de terapia intensiva adulto. Sus integrantes eran resistentes a carbapenémicos, no obstante, solo un aislado presentaba el gen *bla*_{OXA-23}. La mayoría de los *A. baumannii* pertenecían a grupos genéticos esporádicos, conformados por menor número de aislados y presentes en solo uno de los tres centros asistenciales evaluados. En alguno de ellos se pudo amplificar los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-72}, *bla*_{OXA-58}, o *ISAb1/bla*_{OXA-51-like}. *Conclusión:* La resistencia a los

carbapenémicos podría estar influenciada ligeramente por la diseminación de los 3 complejos predominantes identificados. Posiblemente, la resistencia está asociada a otros mecanismos enzimáticos no evaluados en el presente estudio o a mecanismos relacionados con la concentración de estos antibióticos dentro de la bacteria. No se detectó la aparición de brotes en los diferentes servicios hospitalarios durante el periodo de estudio.

PALABRAS CLAVE: *Acinetobacter baumannii*, Resistencia a carbapenémicos, Carbapenemasas tipo OXA, ISAb₁, VNTR.

ABSTRACT: *Introduction: Acinetobacter baumannii (A. baumannii) is the most commonly identified species in the genus Acinetobacter, associated with nosocomial infections, bacteremia, pneumonia, and skin and urinary tract infections. A few clones are currently responsible for worldwide dissemination. Unfortunately, resistance to multiple antibiotics is a common feature among these clones due to their unmatched adaptive nature. Methods: A total of 327 unduplicated isolates of Acinetobacter spp were studied from clinical samples from the Doctor José María Vargas Hospital, Domingo Luciani Hospital, and Caracas' Medical Centre. Molecular identification was developed by amplification and sequencing of the rrs gene. Susceptibility of the isolates to imipenem and meropenem was determined using the agar dilution method, following CLSI guidelines. The genes encoding carbapenemases (blaKPC-like, blaVIM-like, blaOXA-23-like, blaOXA-24-like, blaOXA-51-like, blaOXA-58, and blaOXA-143) and ISAb₁ were investigated by PCR using specific primers and subsequent sequencing. In order to identify the presence of circulating A. baumannii clones, tandem nucleotide repeat sequence analysis (VNTR) was used. Results: The predominant genospecies was A. baumannii (93.9%), and the great majority (92.18%) were resistant to carbapenems, presenting minimum inhibitory concentrations from 64 to 128 µg/ml for imipenem and from 128 to 256 µg/ml for meropenem. The presence of 97 MLVA-8 complexes was evidenced through VNTR. The three most numerous complexes were 28 (VNTR 48330111214), 38 (VNTR 48330301214), and 17 (VNTR 8833162289). Complex 38 was the most persistent, detected exclusively at the Dr. Domingo Luciani Hospital and recovered mainly from the adult intensive care unit. Its members were resistant to carbapenems; nonetheless, only one isolate had the blaOXA-23 gene. Most of the A. baumannii belonged to sporadic genetic groups, made up of fewer isolates and present in only one of the three healthcare*

centers evaluated. In some of them, *blaOXA-23*, *blaOXA-72*, *blaOXA-58*, or *ISAb1/blaOXA-51*-like genes could be amplified. Conclusion: Resistance to carbapenems could be slightly influenced by the dissemination of the 3 predominant complexes identified. Possibly, the resistance is associated with other enzymatic mechanisms not evaluated in the present study or mechanisms related to the concentration of these antibiotics within the bacteria. No outbreaks were detected in the different hospital services during the study period.

KEY WORDS: *Acinetobacter baumannii*, Carbapenem resistance, OXA-type Carbapenemases, *ISAb1*, *VNTR*.

INTRODUCCION

Las infecciones por *A. baumannii* están documentadas mundialmente reportándose numerosos brotes nosocomiales causados por este microorganismo.

El control de estas infecciones resulta extremadamente difícil debido a la elevada capacidad de *A. baumannii* para persistir en el ambiente hospitalario y por su frecuente multirresistencia a los antibióticos. Es por tanto habitual que los brotes epidémicos deriven hacia situaciones endémicas si no se toman rápidamente las medidas de control adecuadas.

Estas características hacen de *A. baumannii* un patógeno con capacidad suficiente de llegar a comprometer la salud pública de un

¹ Licenciado en Bioanálisis. Doctor en Ciencias mención Microbiología. Coordinador del Servicio de laboratorio. Centro Médico Dr. Hernández Cisneros. Porlamar. Edo. Nueva Esparta. Venezuela. ORCID:0009-0000-4562-0607

² Medical Doctor. PhD en Epidemiología Molecular. Jefe del laboratorio de Genética Molecular. CMBC, IVIC. Caracas. Venezuela. ORCID: 0000-0002-0480-0860

país en ausencia de dichas medidas de control¹. Sin duda alguna, el seguimiento epidemiológico y microbiológico de este patógeno constituye una herramienta fundamental para el control de la infección nosocomial.

Los patrones de resistencia a los antibióticos varían de país a país, destacando algunas regiones con alta prevalencia de *A. baumannii* multiresistente. En algunas áreas geográficas se reporta susceptibilidad exclusiva a antibacterianos de amplio espectro como los carbapenémicos (imipenem y meropenem), siendo estos junto con las polimixinas, la última opción terapéutica para los pacientes infectados por *A. baumannii* previamente tratados con otros antibióticos. Mientras que en otros países la resistencia comprende todos los antimicrobianos comercialmente disponibles^{2,3}. El principal mecanismo de resistencia de *A. baumannii* frente a la acción bactericida de los carbapenémicos es la producción de carbapenemasas. Estas enzimas son del tipo β -lactamasas que degradan los antibióticos β -lactámicos

(cefalosporinas y carbapenémicos) en compuestos inertes, por tal motivo estas enzimas son el blanco de los diversos estudios de resistencia bacteriana a esas drogas. Hasta la fecha, poco se conoce sobre la presencia de los genes que codifican estas enzimas (carbapenemasas) en las cepas locales de *A. baumannii*, así como de los diferentes elementos móviles involucrados en la transmisión horizontal de dichos genes de resistencia⁴. El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre diversos aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva⁵. Por consiguiente, es necesario evaluar la presencia de los posibles clones de

A. baumannii que pudieran estar presente en nuestros hospitales debido a que se ha documentado previamente que la diseminación de clones de resistencia de *A. baumannii* está relacionado con la aparición de cepas multirresistentes lo que conlleva al incremento de la resistencia a los antibióticos⁶. VNTR (del inglés "variable number of tandem repeats"), es un método mediante cual se identifican secuencias de nucleótidos repetidos en tándem, estos segmentos de ADN han generado interés en algunos investigadores quienes mencionan su aplicación práctica en tipificación epidemiológica. Pourcel *et al.*⁷ llevaron a cabo un estudio comparativo entre VNTR y PFGE. Estos investigadores demostraron el poder discriminativo, estabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos empleando 8 marcadores de VNTR. Además, de la excelente concordancia con los resultados obtenidos con PFGE. El objetivo de este estudio fue investigar la epidemiología molecular y las características de resistencia a los carbapenémicos de aislados clínicos

de *A. baumannii* en tres hospitales de la ciudad de Caracas-Venezuela. Además de evaluar si este microorganismo se encontraba en situación endémica o provocando brotes epidémicos.

MÉTODOS

Cepas bacterianas

Entre septiembre de 2008 y agosto de 2009 se obtuvieron un total de 327 aislamientos de *Acinetobacter* spp., a partir de muestras clínicas provenientes de 3 centros hospitalarios en la ciudad de Caracas: Hospital Dr. José María Vargas, Hospital Domingo Luciani y Centro Médico de Caracas. Las cepas se revivieron a partir de viales congelados (-20°C) contentivos de glicerol-caldo infusión cerebro corazón (Himedia) y sembradas en placas de agar Mac Conkey y agar Nutritivo (Himedia), para garantizar la viabilidad y su pureza, además de observar las características de las colonias. Estos aislados no duplicados de *Acinetobacter* spp. fueron identificados a nivel de género por el laboratorio de Microbiología del

Centro Médico Dr. Hernández Cisneros (Porlamar, Edo. Nva. Esparta) utilizando el sistema Microscan Walkaway Siemens Healthcare Diagnostics⁸. La identificación de *A. baumannii* se confirmó mediante la amplificación por PCR del gen *rrs* que codifica a la subunidad 16S del ARN ribosomal⁹.

Identificación molecular de las cepas

La amplificación del gen *rrs* fue llevado a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se emplearon un par de oligonucleótidos, 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1510R (5'-GGTTACCTTTGTTACGACTT-3') descritos y diseñados previamente¹⁰. La banda resultante, de 1500 pb, aproximadamente, fue detectada por transiluminación con luz ultravioleta (FOTO/Prep) y documentada fotográficamente. Los productos de PCR, previamente purificados (QIAquick® - QIAGEN), fueron enviados a la unidad de estudios genéticos y forenses (UEGF) del

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para ser secuenciadas. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas disponibles en el GenBank haciendo un BLAST para la identificación definitiva de la especie *Acinetobacter baumannii*⁹.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

La susceptibilidad de los aislados a imipenem y meropenem (Merck), fueron determinadas empleando en método de dilución en agar. Las Concentraciones Inhibitorias Minimas (CIM) se determinaron e interpretaron de acuerdo con los métodos y puntos de corte definidos por el CLSI¹¹. El rango de concentraciones ensayadas fue de 1 a 256 µg/ml. Las cepas de control de calidad fueron *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Todas estas cepas fueron facilitadas por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Cebadores	Blanco	Secuencia (5'-3')	N° pb	Referencia
KPC-F	<i>bla_{KPC-2}</i>	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GC	880	12
KPC-R		GGT CGT GTT TCC CTT TAG CC		
VIM-F	<i>bla_{VIM-}</i>	ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC	780	13
VIM-R		TGC TAC TCA ACG ACT GAG CG		
OXA23-F	<i>bla_{Oxa23-like}</i>	GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG	1058	13
OXA23-R		TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG		
OXA24-F	<i>bla_{Oxa24-like}</i>	GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA	825	13
OXA24-R		TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT		
OXA51-F	<i>bla_{Oxa51-like}</i>	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353	14
OXA51-R		TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
OXA58-F	<i>bla_{Oxa58-like}</i>	CGA TCA GAA TGT TCA AGC GC	528	15
OXA58-R		ACG ATT CTC CCC TCT GCG C		
OXA143-F	<i>bla_{Oxa143}</i>	AGT TAA CTT TCA ATA ATT G	825	16
OXA143-R		TTG GAA AAT TAT ATA ATC CC		
ISAb1-F	<i>ISAb1</i>	CAC GAA TGC AGA AGT TG	549	17
ISAb1-R		CGA CGA ATA CTA TGA CAC		
ISAb1 F	<i>ISAb1/bla_{OXA-23-like}</i>	CAC GAA TGC AGA AGT TG	1600	14
OXA-23R		TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG		
ISAb1 F	<i>ISAb1/bla_{OXA-51-like}</i>	CAC GAA TGC AGA AGT TG	1200	14
OXA-51R		TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
ISAb1 F	<i>ISAb1/bla_{OXA-58}</i>	CAC GAA TGC AGA AGT TG		14
OXA-58R		ACG ATT CTC CCC TCT GCG C		

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes que codifican para las principales β -lactamasas que hidrolizan carbapenémicos.

Fuente: Elaboración propia.

Análisis de carbapenemasas por PCR

Los genes que codifican para las principales β -lactamasas que hidrolizan carbapenémicos, fueron detectados por PCR amplificando la región codificante completa de cada gen y se usaron pares de iniciadores específicos (Tabla 1). Como control de calidad para las reacciones de PCR se utilizaron, una cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC cuya característica de carbapenemasa fue evaluada mediante detección fenotípica, y cedida por el laboratorio de Bacteriología del Hospital Dr. Domingo Luciani. Caracas; una cepa de *Pseudomona aeruginosa* productora de VIM proporcionada por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Caracas, cepas *A. baumannii* FER productora de OXA23, *A. baumannii* CLA productora de OXA 40, y *A. baumannii* BMBF98 productor de OXA143, adquiridas en el Servicio de Bacteriología-Virología-Higiene-Parasitología. Hospital Central Universitario de Bicetre-Francia.

Las bandas, fueron, detectadas por transiluminación con luz ultravioleta (FOTO/Prep) y

documentada fotográficamente. Los productos de PCR, previamente purificados (QIAquick® - QIAGEN), fueron enviados a la unidad de estudios genéticos y forenses (UEGF) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para ser secuenciadas. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), haciendo un BLAST para confirmar la presencia de dichos genes en las cepas *A. baumannii* analizadas.

Número variable de repeticiones en tándem (VNTR)

Para la identificación de las secuencias de nucleótidos repetidos en tándem o VNTR, un panel de 8 marcadores VNTR (Abaum_2240, Abaum_3530, Abaum_3002, Abaum_1988, Abaum_2240, Abaum_2336, Abaum_0845 y Abaum_3468) fueron utilizados en el presente estudio, los cuales habían sido previamente descritos y diseñados por Pourcel *et al.*⁷. Como control positivo se utilizó la cepa AYE (GenBank N° CU459141) adquirida en el Servicio de Bacteriología-

Virología-Higiene-Parasitología. Hospital Central Universitario de Bicetre-Francia. Tomando en cuenta la variabilidad intrínseca de VNTRs, Pourcel *et al.*⁷ sugirieron dos criterios para designar aislados de *A. baumannii* pertenecientes al mismo complejo MLVA-8: perfil idéntico obtenido empleando los denominados VNTR grande (Abaum_3530, Abaum_3002, Abaum_2240, Abaum_1988) y un máximo de tres diferencias de no más de dos repetidos empleando los VNTR cortos (Abaum_0826, Abaum_0845, Abaum_2396, Abaum_3468). 2 µL de los amplificadores de los loci Abaum_3530, Abaum_3002, Abaum_2240 y Abaum_1988, fueron corridos en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5g/ml) en buffer TBE 1X, durante aproximadamente 5 horas a 70 voltios. Se utilizó un indicador de peso molecular de 100 pb (BioLabs). El producto obtenido de los marcadores VNTR Abaum_2240, Abaum_2336, Abaum_0845 y Abaum_3468 fue analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). 2 µL del

producto amplificado fueron colocados en geles de poliacrilamida preparados al 10% para el locus Abaum_0826, al 12% para Abaum_2396, y al 14% para Abaum_0845 y Abaum_3468. La corrida electroforética fue llevada a cabo en buffer TBE 1X, durante aproximadamente 2 horas 30 minutos, a 70 voltios. Se utilizó un indicador de peso molecular de 50 pb (BioLabs) para los amplificadores de los loci Abaum_0826 y de 25 pb (Promega) para los loci Abaum_2396, Abaum_0845, Abaum_3468. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5g/ml) durante 45 segundos y enjuagados con agua durante 1 minuto. Posteriormente las bandas fueron fotografiadas (FOTO/Prep) siendo transiluminadas con luz ultravioleta. El tamaño de las bandas fue determinado usando el sistema biométrico BioRad Software.

Recolección de datos epidemiológicos

La información sobre el tipo de muestra (catéteres, traqueotomo, drenaje, sonda y/o heridas) y servicio

de dónde provenía la muestra (UCI, Cirugía, Neurocirugía, Traumatología, etc.) fue obtenida del libro de registro de los servicios de laboratorio de los hospitales participantes en el estudio.

RESULTADOS

Identificación molecular de aislados clínicos de *Acinetobacter*

El uso de iniciadores específicos permitió la obtención de amplificadores de 1500 pb, los cuales posteriormente fueron secuenciados y analizados mediante el programa BLAST. A través de este procedimiento se logró evidenciar que 307 (93.9%) de las secuencias presentaron un 100% de similitud con la secuencia nucleotídica correspondientes a *A. baumannii*. De estos aislados, 6 fueron recuperados del Hospital Vargas, 17 del Centro Médico Caracas y 284 en el Hospital Dr. Domingo Luciani

Distribución de los aislados clínicos de *A. baumannii* según el tipo de muestra y servicio hospitalario

Los 307 aislados clínicos de *A. baumannii* fueron aislados a partir de

diversos tipos de muestras. La secreción bronquial (n:87) fue el tipo de muestra donde logró recuperarse principalmente (28%), seguido de secreciones de herida (n:72) en un 24%, punta de catéter (n:40) en 13%, sangre (n:36) 12%, secreción abdominal (n:19) 6% y escara (n:13) 4%. En menor número fue recuperado a partir de otros tipos de muestras: secreciones de úlceras (n: 8), esputo (n: 6), secreción traqueal y orina (n: 4), absceso, líquido pleural y tejido óseo (n: 3), quemaduras y líquido sinovial (n: 2), tubo torácico, tejido graso, sonda, secreción gástrica y pie diabético (n: 1). Según el servicio hospitalario donde provenían las muestras, la Unidad de Terapia Intensiva Adultos (n:105) fue el servicio donde se logró recuperar el mayor número de aislados clínicos de *A. baumannii* (34%), seguido de los servicios de Cirugía 2 (n:23) 7%, Unidad de Cuidados Intensivos de Neurocirugía (n:22) 7%, Cirugía 3 (n:21) 7%, Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (n:20) 6%, Traumatología (n:14) 5%, y Medicina A (n:11) 4%. Este microorganismo también fue aislado a partir de

muestras provenientes de otros servicios hospitalarios pero en menor frecuencia: Unidad de Terapia Intensiva Neonatal (n: 9), Cirugía 1, Emergencia de Adultos, y Pacientes Ambulatorios (n: 8), Medicina B (n: 7), Cirugía Plástica, Hospitalización y Pediatría B (n: 6), Cirugía Pediátrica (n: 5), Gastroenterología, Neurocirugía, Ortopedia, y Reanimación (n: 4), Observación (n: 3), Ginecología, Pediatría A y Urología (n: 2), Emergencia Pediátrica, Medicina Interna y Triage (n: 1).

Frecuencia de aislamiento clínicos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos

Se encontró que, de los 307 aislados de *A. baumannii*, 283 (92,18%) fueron resistentes tanto a imipenem como a meropenem exhibiendo CIM elevadas, mientras que los 24 aislamientos (7,82%) restantes mostraron sensibilidad a estos antibióticos. Para imipenem, 79 aislados presentaron una CIM de 64 µg/ml, 2 aislados de 32 µg/ml, 192 aislados de 128 µg/ml, 9 aislados de 256 µg/ml y un solo aislado presentó

una CIM \geq 256 µg/ml. Para el meropenem, 210 aislados presentaron una CIM de 128 µg/ml, 55 aislados de 256 µg/ml y en uno $>$ 256 µg/ml.

Tipificación genética mediante el análisis de secuencias de nucleótidos repetidos en tándem (VNTR)

El amplificado del *loci* Abaum_3530 en los aislados clínicos de *A. baumannii* permitió observar un polimorfismo de 6 bandas, cuyos tamaños correspondían a 4, 5, 6, 7, 8 y 9 repetidos (Figura 1). En cuanto a los *loci* Abaum_3002 y Abaum_2240 el producto amplificado originó un patrón de 3 bandas en cada uno de ellos. Las 3 diferentes bandas obtenidas del amplificado del *loci* Abaum_3002 tenían un tamaño que correspondían a 7, 8 y 9 repetidos y las del *loci* Abaum_2240 eran de 2, 3 y 4 repetidos. La amplificación del *loci* Abaum_1988 produjo un polimorfismo de 4 bandas cuyos tamaños correspondían a 3, 4, 5 y 10 repetidos.

El polimorfismo evidenciado en el *loci* Abaum_0826 fue de 13 bandas,

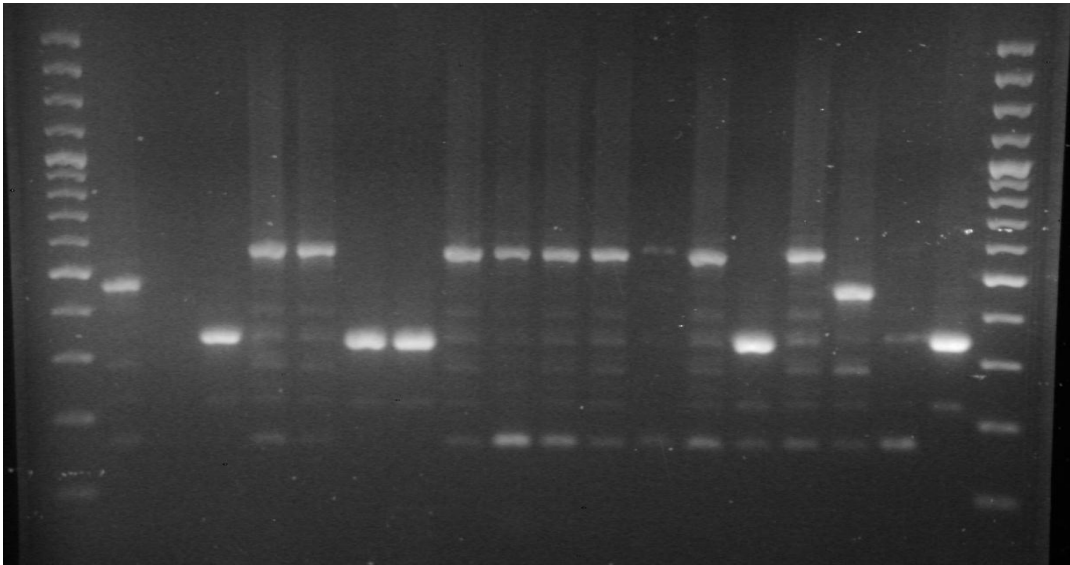


Figura 1. Registro fotográfico (gel de agarosa al 2%). Se observa el polimorfismo en un grupo de aislados de *A. baumannii* producto de la amplificación del *loci* Abaum_3530. Control Positivo (cepa AYE). El número de repetidos se encuentra señalado debajo de cada banda.

Fuente: Elaboración propia.

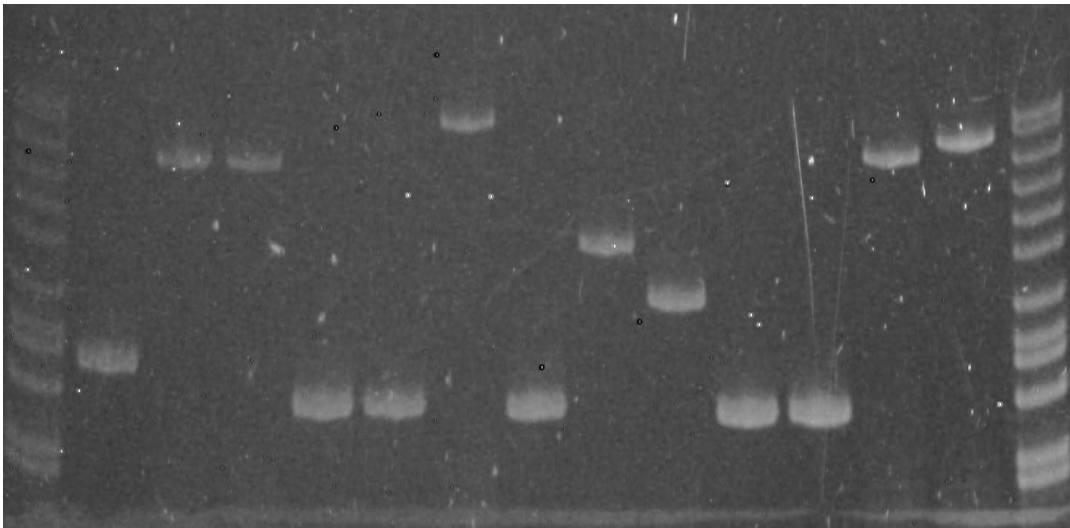


Figura 2. Registro fotográfico de un gel de poliacrilamida al 13% donde se observa el polimorfismo obtenido del amplificado del *loci* Abaum_2396 evaluado en un grupo de aislados clínicos de *A. baumannii*. El número de repetidos se encuentra señalado debajo de cada banda.

Fuente: Elaboración propia.

cuyo tamaño correspondían a 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 29, 33 y 35 repetidos. En el *loci* Abaum_0845 se observaron 15 bandas de 2, 5, 11, 13, 15, 19, 20, 21, 27, 29, 30, 31, 35, 45 y 48 repetidos. El *loci* Abaum_2396 originó 12 bandas de 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 21, 23, 25 27 y 28 repetidos (Figura 2) y el *loci* Abaum_3468 el polimorfismo observado fue 6 bandas de 9, 11, 14, 16, 18 y 22 repetidos.

Cada aislado clínico de *A. baumannii* presentó un código el cual era el producto del valor numérico que se le había asignado a cada banda según el número de repetidos obtenido por cada uno de los marcadores VNTR que habían sido evaluados. De esta forma se lograron agrupar los aislados relacionados genotípicamente según del código resultante. De los 307 aislados de *A. baumannii* recolectados en los 3 centros hospitalarios que participaron en el estudio, fueron diferenciados 97 complejos MLVA-8 a los cuales se le dio a cada complejo obtenido una numeración del 1 al 97. Los complejos MLVA-8 más numerosos fueron, el patrón 28 conformado por

33 aislados clínicos de *A. baumannii* cuyo código obtenido era VNTR 48330111214, el 38 constituido por 29 aislados (48330301214); y el complejo 17 el cual agrupaba 27 (8833162289). Otros complejos MLVA-8 evidenciados fueron: el número 13 (8833102289) conformado por 17 aislados; el complejo 8 (8033142289) y el complejo MLVA-8 número 82 (483324111014) constituidos por 8 aislados cada uno; y los complejos 16 (8833162259) y el 19 (8833242219) los cuales estaban formados por siete aislados de *A. baumannii* cada uno (Tabla 2).

Seguido a estos grupos estaban los complejos 15, 27, 41, 72 y 76 conformados por seis aislados cada uno y los complejos 14, 54 y 58 los cuales estaban conformados por cinco aislados por grupo. Los complejos 25, 37, 51, 60, 61 y 71, estaban conformado por 4 aislamientos y el 7, 21, 42, 47, 50, 59, 81, 85, y 86 por tres. En cuanto a los complejos 2, 40, 45, 56, 65, 70, 73, 78 y 93 constaban de dos aislamientos cada uno, mientras que el resto estaba conformado de un aislado por grupo. El complejo 38, fue

Marcadores VNTR											
Cepa	MLVA	3530	3002	2240	1988	0826	0845	2396	3468	VNTR	N°
110R	28	4	8	3	3	0	11	12	14	48330111214	33
25R	38	4	8	3	3	0	30	12	14	48330301214	29
183R	17	8	8	3	3	16	2	28	9	8833162289	27
6V	13	8	8	3	3	10	2	28	9	8833102289	17
88R	8	8	0	3	3	14	2	28	9	8033142289	08
56R	82	4	8	3	3	24	11	10	14	483324111014	08
171R	16	8	8	3	3	16	2	25	9	8833162259	07
33A	19	8	8	3	3	24	2	21	9	8833242219	07

Tabla 2. Complejos MLVA-8 de *A. baumannii* con mayor número de aislados genéticamente relacionados según el código VNTR obtenido.

Fuente: Elaboración propia.

el grupo con mayor período de permanencia (Septiembre, Noviembre 2008-Agosto 2009), siendo detectado exclusivamente en el Hospital Dr. Domingo Luciani. Según el servicio donde provenían las muestras, el complejo fue recuperado principalmente de la Unidad de Terapia Intensiva Adultos. También se aisló en la Unidad de Cuidado intensivo Neurocirugía, Pediatría B, Traumatología, Cirugía 2, Cirugía 3, Medicina A y Neurocirugía.

Los integrantes de este grupo eran resistentes a los carbapenémicos evaluados, pero solo un aislado

presentaba el gen *bla*_{OXA-23} cuyo gen no portaba la secuencia de inserción IS*Aba1* aguas arriba y la misma procedía de la Unidad de Terapia Intensiva Adultos. El segundo complejo de mayor permanencia fue el 28, todos los aislados que lo conforman fueron recuperados del Hospital Dr. Domingo Luciani en los meses de Septiembre-Noviembre de 2008 y en Enero-Julio de 2009 especialmente en la Unidad de Terapia Intensiva Adultos. Otros servicios involucrados fueron los de Medicina A, Unidad de Cuidados Intensivos Neurocirugía, Unidad de

Terapia Intensiva Pediátrica, Cirugía 3, Traumatología, Cirugía 2, Reanimación, Triage y Pediatría B. Los integrantes de este grupo eran resistentes a los carbapenémicos evaluados, pero no se detectaron los genes que codifican para las diferentes carbapenemasa. Estos aislados solo portaban el gen intrínseco *bla_{OXA51-like}*. Los aislados clínicos del complejo 17 fueron recuperados en su totalidad del Hospital Dr. Domingo Luciani durante los meses de Octubre, Noviembre 2008, Febrero, Marzo, Mayo-Agosto 2009 en los servicios de Traumatología, Cirugía Pediátrica, Cirugía 3, Cirugía Plástica, Medicina B, Pediatría A, Unidad de Cuidado Intensivo Neurocirugía, Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica, Ortopedia y principalmente en la Unidad de Terapia Intensiva Adultos. Los integrantes de este grupo eran resistentes a los carbapenémicos evaluados y portaban los genes *bla_{OXA51-like}*, sin embargo, solo un aislado portaba el gen *bla_{OXA-58}* que codifican para carbapenemasa OXA58 procedente de la Unidad de Terapia Intensiva Adultos. En el

complejo 13, cuarto grupo de mayor permanencia, la mayoría de los aislados provinieron del Hospital Dr. Domingo Luciani, con la excepción de un aislado cuya procedencia era el Hospital Vargas de Caracas. Los mismos fueron recuperados en Septiembre 2008 y entre Enero a Mayo 2009 en los servicios de Unidad de terapia Intensiva Adulto, Cirugía 2 y Cirugía 3, Cirugía pediátrica, Unidad de terapia Intensiva Pediátrica, Unidad de terapia Intensiva Neonatal, Medicina A, Ambulatorio y Gastroenterología. A diferencia de los grupos genéticos anteriores, en todos los 17 aislados que forman parte de este complejo fue detectado la presencia del gen que codifica para la carbapenemasa OXA-58 además de los genes intrínsecos *bla_{OXA51-like}*. La mayoría de estos aislamientos provinieron de la Unidad de Terapia Intensiva Adultos y Cirugía 2.

El resto de los complejos MLVA-8, estaban conformados por un número menor o igual a 8 aislados clínicos y con un período de permanencia menor. Sin embargo, algunos de ellos estuvieron presentes en dos de los

tres centros asistenciales evaluados. El complejo 72, al igual que el 13, fue identificado tanto en el Hospital Vargas como en el Dr. Domingo Luciani. Mientras que los complejos 15, 51, 54 y 60 estuvieron presentes en el Centro Médico de Caracas y en el Hospital Dr. Domingo Luciani. De los aislados que formaban parte del complejo 15, en uno de ellos estuvo presente el gen que codifica para OXA-58, y en otro del grupo genético 54 se evidenció la presencia del complejo IS*Aba1*/OXA-51, los mismos provenían del Hospital Dr. Domingo Luciani. En los complejos 3, 29, 39, 40, 56, 73, 79, 86 y 87, y en la mayoría de los aislados del complejo 41 fue amplificado el gen *bla*_{OXA-23}. Además, este gen estuvo presente en un aislado del complejo 59 y en dos del complejo 61. Todos los aislamientos provenían del Hospital Dr. Domingo Luciani, principalmente de la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica y Unidad de Terapia Intensiva Neonatal. Los aislados de los complejos 2, 6, 32, 47, 66, 87 y uno del complejo 15 portaban el gen

*bla*_{OXA-58}. Los aislados que conformaban estos complejos provenían de los tres hospitales en estudio siendo la Unidad de terapia Intensiva Adultos básicamente el origen de estos aislados. El complejo 87 estuvo conformado por un aislado clínico en el que se pudo evidenciar la presencia simultánea de los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58}. El mismo fue recuperado en el Hospital Dr. Domingo Luciani el mes de Enero 2009 en el servicio de Cirugía 1. El complejo 49 conformado por un aislado proveniente del Centro Médico de Caracas en el mes de Noviembre 2008 y donde se logró amplificar el gen *bla*_{OXA-72}. La presencia del gen que codifica para el elemento de inserción IS*Aba1* localizado aguas arriba del gen *bla*_{OXA-51-like}, fue evidenciado en el complejo 52 y en ciertos aislados de los complejos 25, 54, 59, 61 y 70 (Tabla 3). En dos aislados del complejo 61, el gen *bla*_{OXA-23} estuvo presente asociado al elemento de inserción IS*Aba1*, coexistiendo con *bla*_{OXA-51-like}.

VNTR	MLVA	Servicio	Mes	Hosp	OXA51	OXA23	OXA72	OXA58	OXA143	ISAb1/51	ISAb1/23	KPC	VIM
40330111014	25	UTIA	MAR	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
40330111014	25	C3	MAR	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG	NEG
40330111214	25	UTIA	AGO	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
40330111214	25	UTIA	AGO	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88331821214	52	EA	OCT	HV	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG	NEG
88331922526	54	ORTPED	FEB	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88331922716	54	C2	OCT	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88332122514	54	AMB	MAR	CMC	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88332122516	54	UCIN	JUN	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG	NEG
88333022716	54	C2	OCT	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88332422714	59	C3	MAR	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88332422716	59	C2	ABR	HDL	POST	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG
88332422716	59	C2	JUN	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG	NEG
88332722516	61	TRAUM	MAR	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88332722518	61	UTIP	SEP	HDL	POST	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG
88332722718	61	UTIP	SEP	HDL	POST	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG
88332922516	61	TRAUM	MAY	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG	NEG
403324271214	70	UTIP	AGO	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
403324291314	70	UTIA	AGO	HDL	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	POST	NEG	NEG	NEG
78251421316	49	AMB	NOV	CMC	POST	NEG	POST	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Tabla 3. Características epidemiológicas de los complejos 49, 25, 52, 54, 59, 61, y 70 en los cuales OXA-72 y OXA-51/ISAb1 estuvieron presentes.

Fuente: Elaboración Propia

DISCUSIÓN

Desde que en 1986 se estableciera la nueva taxonomía del Género *Acinetobacter*, *A. baumannii* se ha convertido en un patógeno nosocomial formidable, de difícil control y tratamiento, siendo la geno especie de mayor importancia clínica por ser la más frecuentemente aislada y causante de brotes epidémicos en los hospitales de todo el mundo¹⁸. En nuestro estudio, empleando la técnica de amplificación y secuenciación del gen *rrs*, se pudo encontrar que la geno especie predominante de los 327 aislados clínicos analizados fue *A. baumannii* (93.9%). De forma similar Chuang *et al.*⁴ en Taiwán, lograron recuperar la especie *A. baumannii* en el 88,7% de los casos. Más cerca de nuestra frontera, Hernández *et al.*¹⁹ realizaron en Colombia un estudio de identificación genómica de aislados clínicos de *Acinetobacter* y reportaron que el 86,3% de sus aislados correspondían a la especie *A. baumannii*.

En pacientes colonizados por *A. baumannii* sometido a los procedimientos que rompen la

barrera mucocutánea, este microorganismo aprovecha “las puertas” que abren para ocasionar la infección²⁰. En este estudio, el 28% de los aislados de *A. baumannii* que lograron recuperarse provenían de muestras de secreción bronquial. Estos resultados son muy similares a los documentos en Bolivia por Fernández *et al.*²¹ donde el 27% de los *A. baumannii* provenían de secreciones obtenidas del tracto respiratorio inferior. Los hallazgos obtenidos en el presente estudio divergen con los reportados por Donnarumma *et al.*²² quienes hallaron que el 47,5% de los *A. baumannii* había sido recuperado en muestras de secreción bronquial. En las Unidades de Cuidados Intensivos confluyen, como en ningún otro sitio del hospital, los factores de riesgo para la adquisición de las infecciones causadas por *A. baumannii*. Estos servicios tienen la mayor densidad de pacientes y de personal asistencial del hospital, en ella se realizan el mayor número de procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos por paciente y, finalmente se produce la mayor presión con antimicrobianos

por metro cuadrado de superficie del hospital²³. En el presente estudio, el mayor número de aislados clínicos de *A. baumannii* provenían de pacientes reclusos en la Unidad de Terapia Intensiva Adultos (34%) y en menor porcentaje de otros servicios. Resultados similares, a los del presente estudio, fueron reportados por Sinha *et al.*²⁴ en un estudio conducido en Bangalore, India, donde el 38% de los *A. baumannii* fueron recuperados de pacientes admitidos en la Unidad de Cuidados Intensivos. No obstante, discrepan con los reportados por Karah *et al.*²⁵ quienes hallaron que el mayor número de los aislados de *A. baumannii* provenían de pacientes reclusos en el Servicio de Medicina Interna (47%), seguido de la Unidad de Cuidados Intensivos (20%).

La resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos (imipenem, meropenem) se ha ido incrementando en las últimas tres décadas, llegando a alcanzar hasta un 100% en países como India² y China³. En este estudio, también pudimos observar un alto porcentaje de resistencia a los carbapenémicos (92,18%) en los

aislados clínicos de *A. baumannii* evaluados. Estos resultados son similares a los de Cuaical *et al.*²⁶ quienes reportaron que los aislados de *A. baumannii* recuperados de diferentes centros hospitalarios de la ciudad de Caracas presentaban un 95% de resistencia a imipenem y meropenem. No obstante, existen reportes en los que porcentajes de resistencia a estos antibióticos son relativamente bajos. Endo *et al.*⁵ reportaron porcentaje de resistencia a imipenem de 13,4% en un estudio conducido en Japón. Es posible que el alto porcentaje de resistencia a los carbapenémicos que exhibieron los aislados clínicos de *A. baumannii* analizados sea el resultado de una presión selectiva consecuencia del uso indiscriminado de estos antibióticos, ya que la mayoría de los aislados provenían de las Unidades de Cuidado Intensivos.

En el presente trabajo, se empleó el método MLVA-8 propuesto por Pourcel *et al.*⁷ para llevar a cabo la tipificación genética de la población de *A. baumannii* en estudio. El posterior análisis permitió la identificación de 97 complejos en los

tres hospitales que participaron, lo cual indica una importante variabilidad genética entre los aislados de *A. baumannii* estudiados. En concordancia con los hallazgos obtenidos, Wang *et al.*⁴ encontraron una significativa diversidad de clones de *A. baumannii*, lográndose detectar 62 pulsotipos en 67 aislados clínicos de *A. baumannii*. Característicamente, y a diferencia de los brotes, las epidemias por *A. baumannii* son policlonales. En este estudio se pudo evidenciar la presencia de tres grupos genéticos mayoritarios, los complejos 28, 38 y el 17, conformados por el 10,7%, 9,4% y 8,8% del total de los aislados analizados, respectivamente. En concordancia con los resultados obtenidos, Chuang *et al.*⁶ mostraron la presencia de tres grupos genéticos los cuales estaban conformados por el 8%, 17,2% y 8,6% de 151 aislados analizados, y los otros 100 aislados distribuidos en los restantes 72 pulsotipos. Los 3 complejos predominantes en la presente investigación solo estuvieron presentes en el Hospital Dr. Domingo Luciani, principalmente en la Unidad

de Terapia Intensiva Adultos. Ninguno se mantuvo de forma continua durante todo el periodo de muestreo, sin embargo, el complejo 38 fue el que se mantuvo en forma continua durante el mayor tiempo (10 meses). Esto podría suponer la presencia de un grupo endémico que persiste en el tiempo como posible agente causante de infección en el Hospital Dr. Domingo Luciani. Dicha persistencia podría estar favorecida por la resistencia a múltiples antibióticos, ya que esta característica dificulta su erradicación y el control de la infección, y a su vez facilita su diseminación, pues el paciente infectado puede servir como reservorio²⁷. Giannouli *et al.*¹⁸ demostraron que la resistencia a carbapenémicos en un hospital de Napoli, Italia era debido a la diseminación de dos clones mayoritarios de *A. baumannii* los cuales portaban el gen *bla*_{OXA-58} localizado a nivel plasmídico. Igualmente, Andriamanantena *et al.*²⁸ hacen referencia a la presencia de dos clones de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en hospitales de Antananarivo,

Madagascar estando presente el complejo IS*Aba*1/OXA23 en todos los aislados que conformaban estos clones. Por el contrario, en este estudio, a pesar que los aislados que conforman los tres complejos predominantes eran resistentes a los carbapenémicos, en ninguno de ellos se detectó la presencia de los genes evaluados asociados con la resistencia enzimática a los carbapenémicos. En base a esto, es posible pensar que en este caso la resistencia podría estar influenciada ligeramente por la diseminación de los 3 complejos debido al bajo porcentaje de aislamientos que conforman estos grupos genéticos con respecto al total de aislados evaluados, a pesar de su presencia durante varios meses en los hospitales que participaron en el estudio. Posiblemente la resistencia a los carbapenémicos, este asociado a otros mecanismos enzimáticos no evaluados en el presente estudio o a mecanismos relacionados con la concentración de estos antibióticos dentro de la bacteria.

Diversos estudios han demostrado que los clones de *A. baumannii*

resistentes a los carbapenémicos pueden diseminarse entre los hospitales de una ciudad²⁹ o en los de un país⁶. En esta investigación, se logró identificar la presencia de dos complejos que fueron aislados en los Hospitales Vargas y Dr. Domingo Luciani y cuatro en el Centro Médico de Caracas y Hospital Dr. Domingo Luciani. Sin embargo, se trataban de grupos genéticos esporádicos de bajo número de aislados, no obstante, en algunos de ellos se logró detectar la presencia de los genes que codifica para IS*Aba*1/OXA-51 y OXA-58. Su diseminación puede ser favorecida por: instalaciones hospitalarias deterioradas, traslado de pacientes colonizados o infectados de un hospital a otro y el personal de salud que labora en varios centros de salud públicos y/o privados quienes pudieran servir de vehículo²⁹.

El significativo número de complejos identificados en nuestra investigación podría ser un hallazgo importante, el cual proporciona una información útil en el control de infecciones causadas por *A. baumannii*. La diversidad de aislados clínicos de *A. baumannii* y el hecho

de que la resistencia a los carbapenémicos podría ser transmitida horizontalmente a través de plásmidos debe conllevar a la aplicación de medidas de control de la infección, tales como la limpieza del medio ambiente hospitalario y la higiene de las manos del personal de salud, las cuales deben de ser reforzadas para reducir la propagación de *A. baumannii*⁶. Los clones multirresistentes de *A. baumannii* pueden hacerse endémicos y persistir en un centro determinado durante años. En la mayoría de los centros predomina un clon, con el que pueden coexistir otros clones esporádicos³⁰. En concordancia con estos autores, en el presente estudio los tres complejos predominantes estuvieron acompañados de otros grupos genéticos conformados por un menor número de aislados clínicos, los cuales se mantuvieron durante un periodo de tiempo menor y algunos clones estuvieron presentes en solo uno de los tres centros asistenciales evaluados. En algunos de ellos se logró amplificar los genes que codifican para las carbapenemasas

OXA-23, OXA-58, OXA-72 y OXA-51-like/ISAba1.

Los brotes epidemiológicos causados por clones de *A. baumannii* productores de carbapenemasas han sido descritos por diversos autores^{3,28}. En Venezuela, Salazar E *et al.*³¹ reportaron la aparición de un brote con una duración de tres meses causado por *Acinetobacter* RUH 1139 en la Unidad Neonatal de alto riesgo del Hospital Universitario de los Andes. Por el contrario, durante la realización de la presente investigación no se logró detectar la aparición de brotes causado por alguno de los clones identificados. No obstante, es necesaria la ejecución de estudios de vigilancia epidemiológica molecular los cuales permitan detectar de forma oportuna la aparición de algún brote y de esta manera tomar las medidas adecuadas de control que limiten la diseminación de dichos clones de resistencia.

CONCLUSIONES

Acinetobacter baumannii (93.9%) fue la especie más frecuentemente identificada mediante estudio de

secuenciación del producto amplificado de la subunidad 16S del ARNr. Siendo las secreciones bronquiales el tipo de muestra donde se logró aislar principalmente, y la Unidad de Terapia Intensiva Adultos el servicio donde se recuperó el mayor número de aislados. La gran mayoría (92,18%) fueron resistentes a los carbapenémicos evaluados, exhibiendo un elevado nivel de resistencia a dichos antibióticos. La resistencia a los carbapenémicos no estuvo medida por la diseminación de clones mayoritarios (28, 38 y 17), en estos tres hospitales durante el período de estudio. Los genes que codifican las diversas carbapenemasas evaluadas no lograron ser detectadas en un elevado número de *A. baumannii* (79,5%) resistentes a los carbapenémicos, no obstante, los genes intrínsecos *bla*_{OXA-51-like} estuvieron presentes en este grupo de cepas.

Hubo una significativa variabilidad genética entre los aislados clínicos de *A. baumannii* analizados, prevaleciendo tres grupos genéticos. Sin embargo, ninguno de estos tres

clones portaba los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-72}, *bla*_{OXA-58}, *ISAba1/bla*_{OXA-51-like}. La mayoría de las cepas aisladas pertenecen a grupos genéticos esporádicos, conformados por un menor número de aislados de *A. baumannii*, y presentes en solo uno de los tres centros asistenciales evaluados. En alguno de ellos se pudo amplificar los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-72}, *bla*_{OXA-58}, o *ISAba1/bla*_{OXA-51-like}.

Logró evidenciarse la diseminación interhospitalaria de grupos relacionados genéticamente de *A. baumannii* entre el Hospital Vargas y el Hospital Dr. Domingo Luciani y entre el Centro Médico de Caracas y Hospital Dr. Domingo Luciani, que pudiera significar la transmisión de unos aislados de un hospital al otro o la existencia de estas cepas en la comunidad. Pero no se detectó la aparición de brotes en los diferentes servicios hospitalarios durante el período de estudio.

Este estudio obtuvo el primer lugar al mejor trabajo en extenso presentado durante el VII Congreso de la Escuela de Bioanálisis, en

conmemoración al 75 Aniversario de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, celebrado en el Hotel Renaissance de la ciudad de Caracas del 11 al 13 de julio de 2024.

REFERENCIAS

1. Bergogne-Bérézin E., and Towner K. 1996. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 9: 148–165.
2. Amudhan S, Sekar U, Kamalanathan A, Balaran S. blaIMP and blaVIM mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. J. Inft. Dev. Ctries. 2012; 6: 757-762.
3. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y and Zhu Y. Molecular Epidemiology of clinical isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter spp.* from Chinese hospitals. Antimicrob. Agents. Chemother. 2007; 51: 4022-4028.
4. Wang X, Qiao F, Yu R, Gao Y, and Zong Z. Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates revealed by a snapshot study. BMC Microbiology. 2013; 13:234-242.
5. Endo S, Yano H, Hirakata Y, Arai K, Kanamori H, Ogawa M, Shimojima M, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M. Molecular epidemiology of carbapenem non-sensitive *Acinetobacter baumannii* in Japan. J. Antimicrob. Chemother. 2012; 67: 1623-1626
6. Chuang Y-Ch, Sheng W-H, Lauderdale T-L, Li Sh-Y, Wang J-Ta, Chen Y-Ch, Chang Sh-Ch. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility and carbapenemase resistance determinants among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. J. Microbiol, Immunol and Infect. 2014; 47: 324-332.
7. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, D'Arezzo S, Imperi F, Vergnaud G, and Visca P. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Sequences in *Acinetobacter baumannii* and Interlaboratory Validation of an Optimized Multiple-Locus VNTR Analysis Typing Scheme. J Clin Microbiol. 2011; 49: 539-548.
8. Villegas M V, Kattan J N, Correa A, Lolans K, Guzman A M, Woodford N, Livermore D, Quinn J P, and the Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombia hospital. Antimicrob. Agents. Chemother. 2007; 51: 2001-2004.

9. Dortet L, Legrand P, Soussy C, and Cattoir V. Bacterial identification, clinical significance and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4471-4478.
10. Ibrahim A, Gerner-Smidt, Liesack W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47:837-841.
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 9th ed., approved standard M2-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
12. Wolter D, Khalaf N, Robledo I, Vázquez G, Santé M, Aquino E, Goering R, Hanson N. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rico medical center hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 1660-1664.
13. Jeon C, Jeong S, Bae I, Kwon S, Lee K, Young D, Lee J, Song J, and Lee S. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:2241-2245.
14. Turton J, Woodford N, Glover J M, Yarde S, Kaufmann M, and Pitt T L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 2974-2976.
15. Héritier C, Poirel L, Lambert T, and Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49:3198-3202.
16. Higgins P, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, and Seifert H. OXA-143, a novel carbapenemhydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 5035-5038.
17. Segal H, Garny S, Elisha G. Is IS_{ABA-1} customized for *Acinetobacter*? FEMS Microbiology Letters. 2005; 243 425–429.
18. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, Amato G, Brisse S, Triassi M, Utili R, and Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. J. Clin. Microbiol. 2010; 48: 1223-1230.

19. Hernández M, Valenzuela E, Pulido I, Reguero M, Restrepo S, Gualtero S, Santofimio D, Ramírez M, Quintero L, Mantilla J. Identificación genómica de aislamientos colombianos de *Acinetobacter baumannii* mediante RFLP-PCR de la región intergenica espaciadora de los genes 16S y 23S rRNA. Rev. Colomb. Biotecnol. 2011; 13: 110-114.
20. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator R. *Acinetobacter baumannii*: a emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012; 3: 243-250.
21. Fernández E., Bustamante Z., Zamora J., Zabalaga S., Pinto J., Funes F., Sevillano E., Umaran A., Gallegos L. 2009. Determinación de Carbapenemasa y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba. BIOFARBO 17(1):30-38.
22. Donnarumma F, Sergi S, Indorato C., Mastromei G., Monmanni R., Nicoletti P., Peeile P., Cecconi D., Mannino R., Bencini S., Fanci R., Bosi A. and Casalone E. Molecular characterization of *Acinetobacter* isolates collected in intensive care units of six hospitals in Florence, Italy, during a 3 year surveillance program: a population structure analysis. J. Clin. Microbio. 2010; 48 (4): 1297-1304.
23. Cisneros J y Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: un patógeno nosocomial de difícil control. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21:221-223.
24. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. The antibiotic resistance profile and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. Indian. J. med. Res. 2007; 126: 63-67.
25. Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Skov G, Sundsfjord A, and Samuelsen O. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter spp.* Blood culture isolates from Norway. J. Antimicrob. Chemother. 2011; 66: 738-744.
26. Cuaical N, Delgado Y, Anzola Y, Marcano D, Torres L. Detección de carbapenemasa tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2012; 32: 95-100.
27. Orquídea J, Mantilla J, Valenzuela E, Fernández F, Álvarez C, Osorio E. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolations from a burns unit in a third level attention hospital in Bogotá. Infectio. 2006; 10: 71-78.
28. Andriamanantena T, Ratsima E, Rakotonirina H, Randrianirina F,

Ramparany L, Carod J-F, Richard V, and Talarmin A. Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2010; 9:17-22.

29. Adams-Haduch J, Onuoha E, Bogdanovich T, Tian G, Marschall J, Urban C, Spellberg B, Rhee D, Halstead D, Pasculle A and Doi Y. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. J. Clin. Microbiol. 2011; 49:3849-3854.

30. Martínez-Martínez L y Calvo J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(Supl 2):25-31.

31. Salazar de Vegas E, Nieves B, Araque M, Velasco E, Ruiz J, Vila J. Outbreak caused by *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit. Infect. Conrol. Hosp. Epidemiol. 2006.27: 397-403.

CORRESPONDENCIA

Gabriel González. Dirección: Centro Médico Dr. Hernández Cisneros. Porlamar. Edo. Nueva Esparta. Teléfono: +58-412-3592074. Dirección de correo electrónico: gagonzal0912@gmail.com