

## Artículo original

# Determinación del gen que codifica la enzima APH-(3')-VIa en aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH1139 de origen hospitalario

Elsa Salazar de Vegas<sup>a,\*</sup>, Beatriz Nieves<sup>b</sup>, Militza Guzmán<sup>a</sup>, Luzmila Albarado<sup>a</sup>, Indira Lárez<sup>a</sup>, Diorelis González<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Venezuela. <sup>b</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Recibido 2 de febrero de 2012; aceptado 13 de septiembre de 2012

**Resumen:** El objetivo de este trabajo fue evaluar el fenotipo de resistencia y la presencia del gen aminoglucósido-O-fosfotransferasa-3'-VIa (*aph*-(3')-VIa) en 23 aislamientos identificados como *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, provenientes de neonatos y soluciones parenterales, administradas a los mismos, en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA). Para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se probaron seis aminoglucósidos mediante la prueba de difusión en agar (amikacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, dibekacina y neomicina), así como kanamicina y estreptomycin por dilución en agar. Todos los aislamientos resultaron resistentes a estreptomycin, más del 90% de los mismos mostraron resistencia ante amikacina, gentamicina y tobramicina, y el 82,6% fue resistente a netilmicina y dibekacina. Se detectó el gen *aph*-(3')-VIa en 15 aislamientos de los neonatos y en 2 provenientes de las soluciones parenterales. Debido al elevado porcentaje de aislamientos resistentes a los aminoglucósidos, así como la presencia del gen *aph*-(3')-VIa en *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, el uso de estos antimicrobianos como monoterapia debe ser restringido en el IAHULA y es necesario vigilar continuamente la diseminación genética de dicha resistencia.

**Palabras clave:** *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, aminoglucósidos, *aph*-(3')-VIa.

## Determination of the gene which codifies the APH-(3')-VIa enzyme in *Acinetobacter* 13TU:RUH1139 isolates of nosocomial origin

**Abstract:** The purpose of this work was to evaluate the resistance phenotype and the presence of aminoglycoside-O-phosphotransferase-3'-VIa (*aph*-(3')-VIa) in 23 isolates identified as *Acinetobacter* 12TU:RUH 1139, obtained from neonates and parenteral solutions administered to them, at the Neonatal High Risk Unit (NHRU) of the Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA). Six aminoglycosides were examined for determination of antimicrobial susceptibility by the agar-diffusion test (amikacin, gentamycin, tobramycin, netilmycin, dibekacin, and neomycin), as well kanamycin and streptomycin by the agar-dilution test. All the isolates were streptomycin resistant, and over 90% of them showed resistance to amikacin, gentamycin, and tobramycin, and 82.6% was resistant to netilmycin and dibekacin. Gene *aph*-(3')-VIa was detected in 15 isolates from neonates and in 2 from the parenteral solutions. Due to the high percentage of aminoglycoside-resistant isolates, as well as the presence of the gene *aph*-(3')-VIa in *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, the use of these antimicrobials as monotherapy should be restricted at the AUHLA, and it is necessary to constantly survey the genetic dissemination of this resistance.

**Keywords:** *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, aminoglycosides, *aph*-(3')-VIa.

\* Correspondencia:  
E-mail: elsazul2003@cantv.net

### Introducción

Se ha demostrado que los porcentajes de resistencia en *Acinetobacter* sp. han aumentado de manera alarmante en las unidades de cuidados intensivos, en numerosos hospitales a nivel mundial [1-5]. Frecuentemente se ha

publicado información sobre el fenómeno de resistencia a los antimicrobianos, incluyendo a los aminoglucósidos, en *A. baumannii*, sin embargo, es escaso lo reportado para otras genoespecies [4,6,7-9]. Particularmente en el país, la resistencia de *Acinetobacter* sp. a los aminoglucósidos, se ha ubicado en porcentajes que van de 25 a 100% [10-14],

y son limitados los estudios publicados que determinan los mecanismos que confieren tal resistencia en dicho patógeno intrahospitalario.

La presencia de enzimas inactivantes de los aminoglucósidos, la alteración del sitio de unión al ribosoma y las bombas de flujo son mecanismos que se han descrito en bacterias resistentes a estos antimicrobianos, siendo el mecanismo enzimático el principalmente encontrado en *Acinetobacter* sp. [15-19]. Existen tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y cada tipo transfiere un grupo funcional a la estructura de este antibiótico, inactivándolo completamente; ellas son: aminoglucósido O-nucleotidiltransferasa, N-acetiltransferasa y O-fosfotransferasa. Estas enzimas se pueden encontrar en plásmidos, asociadas a transposones e integrones y, ocasionalmente, pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano [9,15,20-22].

La amikacina se ha considerado el aminoglucósido más activo para tratar infecciones por *A. baumannii*, sin embargo, su actividad se ha visto limitada por la presencia de la enzima aminoglucósido-O-fosfotransferasa-3'-VIa (APH-3'-VIa), entre otras, cuyo gen se ha detectado en dicha especie en algunas partes del mundo, incluyendo Venezuela [1,23-25]. En un estudio realizado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, se identificó un brote epidémico causado por *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139 que mostró fenotipos de resistencia ante diferentes familias de antimicrobianos, incluyendo a los aminoglucósidos, donde llamaron la atención los altos porcentajes de cepas resistentes a amikacina y gentamicina, sin embargo, no se hizo referencia sobre los mecanismos que median dicha resistencia [26]. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia del gen aminoglucósido-O-fosfotransferasa-3'-VIa (*aph*-(3')-VIa) en aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139 resistentes a aminoglucósidos, obtenidos de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA).

## Materiales y métodos

**Aislamientos bacterianos:** En el presente estudio se incluyeron 21 aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139 de muestras clínicas de neonatos hospitalizados y otros 2 cultivados de soluciones parenterales de la UARN del IAHULA, durante enero de 1998 a abril de 1999, previamente identificados bioquímicamente y molecularmente [26]. Los mismos se encontraban preservados a -20 °C en caldo infusión cerebro corazón con 50% de glicerol en el Laboratorio de Bacteriología Clínica del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

Se probó la viabilidad y pureza de los aislamientos conservados cultivándolos en caldo infusión cerebro corazón y posteriormente en agar MacConkey. Los medios de cultivo fueron incubados durante toda la noche a 35 °C y luego se observó el crecimiento bacteriano. Con la finalidad de verificar que los cultivos correspondían a *Acinetobacter* sp., las colonias con características de no fermentadoras

se identificaron a nivel de género mediante el método bioquímico convencional [26,27].

**Susceptibilidad antimicrobiana:** La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión en agar, siguiendo las recomendaciones descritas por Bauer *et al.* [28] y por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) [29]. Entre los agentes antimicrobianos utilizados se incluyeron: tobramicina (10 µg), netilmicina (10 µg), dibekacina (10 µg) y neomicina (30 µg). Además se probaron amikacina (30 µg) y gentamicina (10 µg) con el objeto de corroborar los resultados reportados previamente en dichas cepas [26]. Para kanamicina y estreptomycin se prepararon placas de agar Müller Hinton con una concentración de 30 µg/mL de cada uno de los antibióticos respectivamente, siguiendo el método de dilución en agar descrito por Murray *et al.* [30]. Se utilizaron los puntos de corte recomendados para *Acinetobacter* sp. por el CLSI [29]. Las cepas utilizadas como control fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Determinación de *aph*-(3')-VIa por PCR:** La detección del gen *aph*-(3')-VIa se llevó a cabo por PCR, siguiendo los procedimientos descritos por Ploy *et al.* [23] y Vila *et al.* [24].

Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, la cual se desarrolló con un volumen final de 50 µL. Específicamente, en cada tubo de PCR se colocó buffer para PCR 2X más MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L (Roche, Basel, Switzerland), 400 µmol/L de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µmol/L de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (Roche, Basel, Switzerland), 2 U de Taq polimerasa (Roche, Basel, Switzerland) y agua bidestilada estéril para completar 25 µL; los otros 25 µL correspondieron a la muestra de ADN extraído por ebullición (2-3 colonias mezcladas en agua bidestilada estéril y hervida por 10 minutos). Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes anteriormente citados, excepto el ADN. Como control positivo se incorporó la cepa *A. baumannii* cepa F 14, portadora del gen *aph*-(3')-VIa, donada por el Dr. Jordi Vila [24].

La amplificación se realizó en un termociclador automatizado (MJ Mini Cycler®, Bio-Rad, CA, USA), el cual se programó para una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, seguido por una temperatura de unión de 55 °C por 1 minuto y extensión de 72 °C por 1 minuto durante 30 ciclos; la temperatura de extensión final fue de 72 °C durante 10 minutos.

Con el objeto de confirmar que se trataba del gen *aph*-(3')-VIa, los productos de amplificación fueron recuperados del gel de agarosa al 2% y se purificaron con el kit Wizard® System SVG Clean Up (Promega Corporation, Fitchburg, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas utilizando el kit V 3.1 BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y analizados en un

secuenciador automatizado de ADN (Abi Prism 377, Perkin Elmer, Emeryville, CA, USA). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación del gen fueron: APH1: 5'-ATACAGAGACCACATACAGT-3' y APH2: 5'GGACAATCAATAATAGCAAT-3'.

*Análisis estadístico:* Se calcularon los porcentajes de distribución de los fenotipos más observados según los agentes antimicrobianos, así como los porcentajes de sensibilidad, valores intermedios y resistencia de los aislamientos de *Acinetobacter* 13TH:RUH 1139.

**Resultados**

Para el momento en que se realizó la recolección de las muestras, *Acinetobacter* sp. ocupaba el primer lugar de aislamiento en la Unidad de Cuidados Intensivos A (UCI-A) y el cuarto en la UARN.

La figura 1 muestra la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, donde se puede observar que todos mostraron resistencia a estreptomycin; se corroboró que el 95,6% de los aislamientos fueron resistentes ante amikacina y gentamicina, mientras que para la tobramicina resultó resistente el 91,3%;

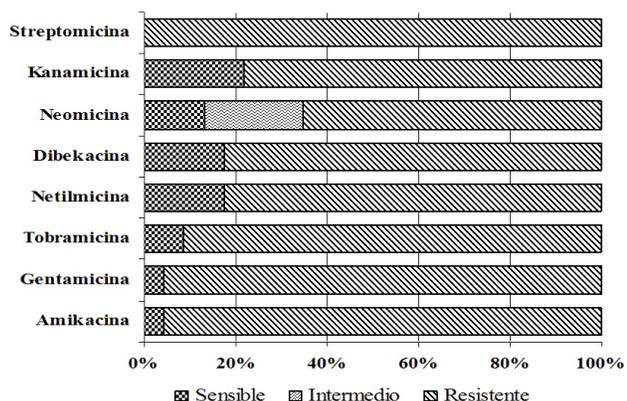


Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de los 23 aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139 de pacientes hospitalizados en el IAHULA con infección intrahospitalaria (Enero 1998 a abril 1999).

netilmicina y dibekacina estuvieron inactivos ante el 82,6% de los aislados; y el 73,9% y 65,2% de los mismos fueron resistentes ante kanamicina y neomicina, respectivamente.

Con el análisis de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana se encontraron cinco patrones diferentes, los cuales se designaron arbitrariamente con números romanos (I hasta V), estableciendo que dos fenotipos eran diferentes cuando presentaran resistencia a por lo menos dos

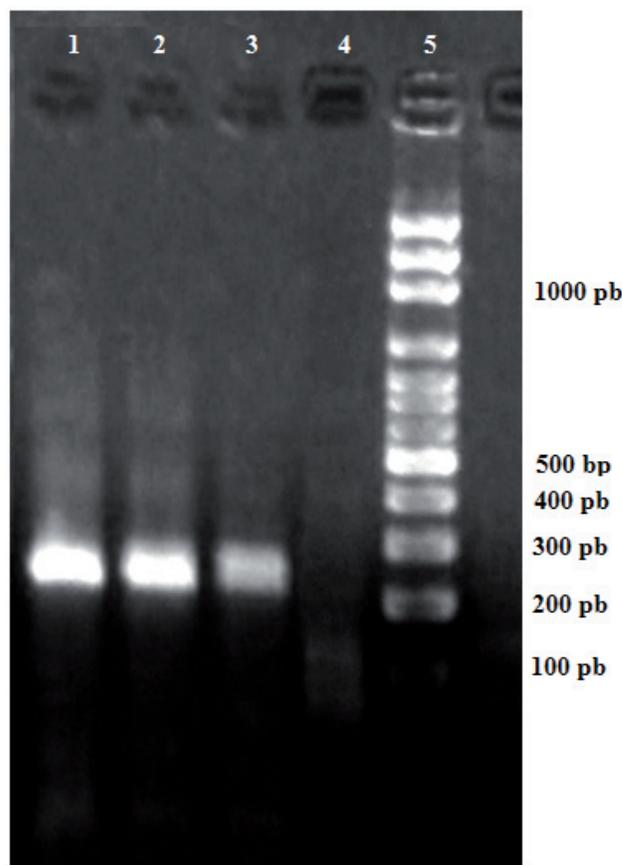


Figura 2. Producto de amplificación por PCR del gen *aph(3')-VIa* en *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139. Electroforesis en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio. Carril 1: aislamiento de neonato; Carril 2: aislamiento de solución parenteral; Carril 3: *A. baumannii* cepa F 14; Carril 4: Control negativo; Carril 5: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder (Bioneer, Korea).

Tabla 1. Distribución de enzimas inactivantes de aminoglucósidos según el fenotipo encontrado en *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, aislados de pacientes de la UARN, con infección intrahospitalaria (Enero 1998 a abril 1999).

Patrones (Fenotipos)	Agentes antimicrobianos								Cepas (%)	Gen <i>aph(3')-VIa</i> (%)
	AN	GN	NN	Net	Dbk	K	St	Neo		
I	R	R	R	R	R	R/S*	R	R/I	82,6	73,9
II	S	R	S	S	S	S	R	S	4,3	-
III	R	R	R	S	S	S	R	S	4,3	-
IV	R	R	R	S	S	S	R	R	4,3	-
V	R	S	S	S	S	R	R	S	4,3	-

AN: amikacina; GN: gentamicina; NN: tobramicina; Net: netilmicina; Dbk: dibekacina; K: kanamicina; St: estreptomycin; Neo: neomicina; R: resistente; I: intermedio; S: sensible; S\*: dos cepas sensibles a kanamicina, pero resistentes a los demás aminoglucósidos (Ia).

antimicrobianos. El fenotipo I fue el más observado (82,61%) y estuvo representado por todos aquellos aislamientos que mostraron resistencia a todos los aminoglucósidos probados en este estudio, destacándose que en este fenotipo se ubicaron dos aislamientos sensibles a kanamicina, pero resistentes a los demás aminoglucósidos (Tabla 1).

En la figura 2 se muestra el producto de amplificación por PCR de un aislado proveniente de un neonato y otro de solución parenteral. De 19 cepas de *Acinetobacter* 13TU:RUH1139 que mostraron el fenotipo I, se detectó el gen *aph*-(3')-VIa en 17 (73,91%): 15 se aislaron de neonatos y dos de soluciones parenterales.

La secuencia del producto amplificado, de aproximadamente 235 pb, coincidió en un 100% con la secuencia del gen *aph*-(3')-VIa [31].

## Discusión

Los diagnósticos de laboratorio, basados en el cultivo y diferenciación de especies de *Acinetobacter*, muestran dificultades en el momento de la identificación, particularmente por lo atípico de los resultados de las pruebas bioquímicas y perfiles enzimáticos. Una de las pruebas fisiológicas, considerada como determinante en la diferenciación de *A. baumannii* de otras genoespecies, es el crecimiento a 44 °C [27,32,33], sin embargo, algunos investigadores han descrito excepciones, reportando que *Acinetobacter* genoespecies 3, 13TU, y particularmente, la cepa RUH 1139 pueden crecer a esta temperatura [9,26,34-40]. También se ha reportado que es necesaria la identificación a nivel de especie, ya que se han encontrado diferencias entre ellas, en cuanto a su localización, tipo de infección y sensibilidad a los agentes antimicrobianos [40].

*Acinetobacter* genoespecie 13TU recientemente ha sido reclasificada como *A. nosocomialis* [40], sin embargo, la cepa *Acinetobacter* RUH 1139, no ha sido incluida aún como una genoespecie, pero, debido a su homología con *Acinetobacter* genoespecie 13TU, se ha considerado que ambas podrían estar relacionadas (*Acinetobacter* 13TU:RUH 1139) [39].

En el presente estudio, los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos ante los aminoglucósidos ensayados, mostraron inactividad de la estreptomina ante los aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139; el principal mecanismo de resistencia descrito que afecta particularmente a este antimicrobiano es la alteración de los sitios de unión ribosómica [15]. También se obtuvieron elevados porcentajes de aislamientos resistentes a neomicina, netilmicina y dibekacina; dicho resultado llama la atención, ya que estos antimicrobianos no se emplean como tratamiento de rutina en los neonatos atendidos en la UARN del IAHULA. Igualmente, se obtuvo en más del 90% de los aislamientos resistencia ante amikacina, gentamicina y tobramicina. La amikacina o gentamicina asociados a un betalactámico es el tratamiento más frecuentemente utilizado en el servicio de neonatología del IAHULA para tratar las infecciones de estos pacientes en UARN; este

hecho posiblemente haya incidido en el incremento de aislamientos resistentes.

Diversos investigadores han informado resultados similares a los encontrados en esta investigación ante amikacina, gentamicina y tobramicina, pero en aislamientos reportados como *Acinetobacter* sp. [5,10,11,13,41,42]. En la bibliografía consultada se encontró un estudio realizado por Lim *et al.* en Korea [6], quienes encontraron resistencia en aislamientos de *Acinetobacter* genoespecie 13TU ante amikacina (78%), gentamicina (89%) y tobramicina 78(%). Resultados similares a los reportados en este trabajo se encontraron en un estudio realizado en Irak [4], donde aislaron microorganismos del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, obteniendo altos porcentajes de resistencia a gentamicina (92%), tobramicina (86%) y amikacina (52%).

En los aminoglucósidos, a diferencia de lo que ocurre con la familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la resistencia encontrada ante alguno de ellos no indica que frente a todos los demás también se presente resistencia. Lo que si está comprobado es que una enzima puede modificar la estructura química de algunos aminoglucósidos; también se ha encontrado la coexistencia de varias enzimas inactivantes en el mismo aislamiento y/o la combinación de mecanismos de resistencia, como por ejemplo, la presencia de enzimas y una bomba de expulsión [43,44]. Al respecto, recientemente se publicó una investigación sobre una bomba de expulsión en un aislamiento de *Acinetobacter* 13TU, la cual contribuye a la multirresistencia descrita en el mismo [44].

La inactivación de los aminoglucósidos por la producción de enzimas modificantes es el mecanismo más frecuente y ampliamente investigado en *Acinetobacter* sp. [19,22,45,46]. En la actualidad se puede deducir el posible mecanismo enzimático involucrado a partir de la presencia de un fenotipo de resistencia observado en un antibiograma, el cual puede ser identificado mediante técnicas moleculares [47]. Por esta razón, se utilizó el mayor número de aminoglucósidos disponibles en el laboratorio, encontrando que el fenotipo de resistencia I se obtuvo en el 82,61% de los aislamientos estudiados, lo cual indica que los mismos producen más de una enzima. Particularmente, la producción de una acetil transferasa (AAC) suele inactivar a la gentamicina en *A. baumannii*; entre estas se han descrito la AAC-(3)-II, que confiere resistencia a kanamicina, tobramicina, gentamicina y netilmicina; la AAC-(6')-I proporciona resistencia para kanamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina; la AAC-(2') inactiva gentamicina, tobramicina y netilmicina y la AAC-(3')-I confiere resistencia a gentamicina [48].

En el caso de las enzimas adeniltransferasas, la ANT-(2'')-I confiere resistencia a kanamicina, tobramicina y gentamicina y la ANT-(3'') a estreptomina. Las aminoglucósido-fosfotransferasas (APH), específicamente, la APH-(2') inactiva gentamicina, kanamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina, y la APH-(3') confiere resistencia a kanamicina y amikacina [49-52]. Particularmente, la APH-(3')-VI confiere resistencia principalmente a amikacina, pero también a kanamicina, gentamicina, neomicina e isepamicina [19,24].

En el presente estudio se encontró que 17 de los 19 aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, que mostraron el fenotipo de resistencia I, resultaron portadores del gen que codifica para la enzima APH-(3')-VIa, lo cual explica, en gran parte, la resistencia observada ante amikacina, gentamicina y kanamicina; esto permite suponer que otros genes de resistencia pudieran estar presentes en dichos aislamientos. Por su parte, Vila *et al.* en España [26] y Salazar *et al.* en Venezuela [25], también encontraron el gen que codifica para esta enzima pero en aislados de *A. baumannii*, cuyas secuencias coincidieron con las de este estudio, siendo interesante mencionar que los aislados de *A. baumannii* utilizados por Salazar *et al.* [25] fueron obtenidos de la UCI-A del mismo hospital de donde se obtuvieron los aislados de *Acinetobacter* 13TU:RUH1139. También es importante resaltar que 18 de los 23 aislamientos incluidos en el presente estudio constituyeron un clon epidémico en una investigación previa [26], de los cuales 15 albergaron el gen *aph*-(3')-VIa, mientras que los 5 restantes formaron un clon no epidémico y sólo 2 portaban el gen, es decir, en ambos clones se detectó dicho gen; esto indica que el mismo se encuentra en un elemento genético móvil (plásmido, transposón, integrón, cassette) [53,54], que se está diseminando en dicho hospital entre especies de *Acinetobacter* y quizás entre otros géneros bacterianos, lo cual es altamente preocupante. Este hallazgo constituye el primer reporte que se hace en Venezuela sobre la presencia del gen *aph*-(3')-VIa en una genoespecie distinta a *A. baumannii*.

El espectro de la actividad antimicrobiana de la amikacina es el más amplio de todo el grupo de aminoglucósidos, además tiene peculiar resistencia ante las enzimas inactivantes de aminoglucósidos; este antimicrobiano es especialmente útil en hospitales donde prevalecen microorganismos resistentes a gentamicina y tobramicina [46].

En un estudio de resistencia a aminoglucósidos, en aislados clínicos de *A. baumannii* en el norte de España, encontraron las enzimas ANT (2''), AAC (6')-I y APH (3')-VI, afirmando que la resistencia mostrada ante amikacina se debía a las enzimas acetil o fosfotransferasa antes mencionadas [1].

Según la bibliografía consultada, la presencia de la enzima APH-(3')-VIa, se ha detectado sólo en aislamientos de *Acinetobacter*, sin embargo, en otros géneros se han identificado enzimas similares, como es el caso de la APH-(3')-Ia en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, así como la presencia de la enzima APH-(3') en cepas de *Enterococcus* spp. [46,55].

Adicionalmente, se buscó la presencia de los genes *aac*-(6')-I y *ant*-(3')-I en los aislamientos objeto del estudio, los cuales no fueron detectados (datos no mostrados); esto hace pensar que la resistencia a los aminoglucósidos encontrada en estos aislados se debió a la producción de otras enzimas no probadas en este estudio, a la disminución de la permeabilidad de la membrana a estos antimicrobianos o, en su defecto, a un sistema de expulsión activa, por lo que se recomienda la búsqueda de otras enzimas, así como de

otros mecanismos de resistencia ya mencionados [19,44].

Debido al auge que ha venido tomando el género *Acinetobacter* a nivel hospitalario, se hace necesario el uso racional de antibióticos como parte fundamental de las medidas de prevención contra el surgimiento de infecciones causadas por estos microorganismos, además de la realización de estudios microbiológicos periódicos para la determinación de otros agentes causales y su resistencia antimicrobiana, ya que esto podría ser útil en la optimización de la terapia empírica aplicada, especialmente, a los pacientes inmunocomprometidos.

Particularmente, los aminoglucósidos no deben ser seleccionados como terapia única de primera elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter* sp. Estos se deben guardar para aquellos casos donde el tratamiento con otros antimicrobianos no ha dado resultados satisfactorios y cuando los estudios microbiológicos demuestran su actividad frente al agente causal, ya que, el uso indiscriminado de aminoglucósidos puede ser perjudicial para un paciente por su nefrotoxicidad y ototoxicidad [46,56,57]. Se recomienda la combinación de un aminoglucósido más un betalactámico, que además de generar efectos sinérgicos, favorece el retraso en la aparición de resistencia.

## Conclusión

Debido a la resistencia observada ante los aminoglucósidos, así como la presencia del gen *aph*-(3')-VIa en aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, se concluye que el uso de los aminoglucósidos debe evitarse como monoterapia y supeditarse al reporte de susceptibilidad antimicrobiana. También se recomienda vigilar continuamente la diseminación genética de dicha resistencia.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto de investigación individual aprobado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (N° CI-2-0404-1366/07).

## Referencias

1. Gallego L, Towner K. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. J Med Microbiol. 2001; 50:71-7.
2. Crespo M. La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. Colomb Med. 2002; 33:179-93.
3. Spence R, Towner K, Henwood C, James D, Woodford N, Livermore D. Population structure and antibiotic resistance of *Acinetobacter* DNA group 2 and 13TU isolates from hospitals in the UK. J Med Microbiol. 2002; 41:1107-12.
4. Davis K, Moran K, McAllister K, Gray P. Multidrug resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. Emerg Infect Dis. 2005; 11:1218-24.

5. Prada G. *Acinetobacter baumannii*: problemático además de multiresistente. *Asoc Colom Infect*. 2006; 10:61-3.
6. Lim Y, Shin K, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:902-5.
7. Doi Y, Wachino J, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, *et al*. Spread of novel aminoglycoside resistance gene *aac(6)-Iad* among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan. *Antimicrob Agent Chemother*. 2004; 48:2075-80.
8. Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, *et al*. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos Gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev Arg Microbiol*. 2011; 43:136-53.
9. Casellas JM. No todos los *Acinetobacter* son iguales en cuanto a patología y tratamiento. Es necesario esmerarse en diferenciarlos. *Gaceta Infectol Microbiol Clín Latamer*. 2012; 2:1-3.
10. Harris B, Martínez A, Rincón G, Romero S, Galué N, Valero K. Resistencia a los aminoglucósidos y fluoroquinolonas de 102 cepas de *Acinetobacter* aisladas durante los años 1996-2000. Memorias del VII Congreso Venezolano de Microbiología "Elsa La Corte Anselmi". Maracaibo, Venezuela; 2000. pp 56.
11. Pedroza R, Cuotto W, Torres O, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* en tres centros hospitalarios. *Rev Fac Med Caracas*. 2002; 25:80-2.
12. Salazar E. Susceptibilidad "in vitro" de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. Trabajo de ascenso. Universidad de Oriente. 2002.
13. Comegna M, Guzmán M, Carmona O, Molina M y Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela: nuevos hallazgos. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2000; 20: 58-63.
14. Briceño I, Suarez M. Resistencia bacteriana en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes. *MEDICRIT*. 2006; 3:30-42.
15. Dámaso D. Antimicrobianos-Aminoglucósidos. Madrid: Ediciones Marketing Pa SA; 1990.
16. Davies J, Wright G. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol*. 1997; 5:234-40.
17. Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol*. 1999; 150:317-22.
18. Azucena E, Mobashery S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist Updat*. 2001; 4:106-17.
19. Vila J, Marcos F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20:304-12.
20. Mingot-Leclarq M, Glupezynski Y, Tulkens P. Aminoglycoside: activity and resistance. *Antimicrob Agent Chemother*. 1999; 43:727-37.
21. Hannecart-Pokorni E, Depuydt F, De Wit L, Van Bossuyt E, Content J, Vanhoof R. Characterization of the 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6)-II* associated with a *sulI*-type integron. *Antimicrob Agent Chemother*. 1997; 41:314-8.
22. Mella S, Sepúlveda M, González G, Bello H, Domínguez M, Zemelman R, *et al*. Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infectol*. 2004; 21:330-8.
23. Ploy MC, Giamarellou H, Bourlioux P, Courvalin P, Lambert T. Detection of *aac(6')*-genes in amikacin-resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. *Antimicrob Agent Chemother*. 1994; 38:2925-8.
24. Vila J, Ruíz J, Navia M, Becerril B, García I, Perea S, *et al*. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:758-61.
25. Salazar E, Nieves B, Ruiz M, Ruiz J, Vila J, Araque M, *et al*. Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isolated in Merida, Venezuela. *Med Sci Monit*. 2007; 13:89-94.
26. Salazar E, Nieves B, Araque M, Velásco E, Ruíz J, Vila J. Outbreak caused by *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27:397-403.
27. Bouvet P, Grimont P. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987; 138:569-78.
28. Bauer A, Kirby M, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *J Clin Pathol*. 1966; 9:436-96.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement M100-S20. Wayne (PA), USA: 2010.
30. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover R H. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1999.
31. Martin P, Jullien E, Courvalin P. Nucleotide sequence of *Acinetobacter baumannii aphA-6* gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside modifying enzymes. *Mol Microbiol*. 1988; 2:615-25.
32. Kämpfer P, Tjernberg I, Ursing J. Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J Appl Bacteriol*. 1993; 75:259-68.
33. Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, Cheng AF. Skin carriage of *Acinetobacter* in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:2962-7.
34. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reability of phenotypic test for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:277-82.
35. Dijkshoorn L, Van Dalen R, Van Oyen A, Bijl D, Tjernberg I, Michel MF, Horrevorts AM. Endemic *Acinetobacter* in intensive care units: epidemiology and clinical impact. *J Clin Pathol*. 1993; 46:533-6.
36. Gerner-Smidt P, Tjernberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS*. 1993; 101:826-32.
37. Rivera A, Fernández-Cuenca F, Becerro A, Bou G, Martínez-Martínez L, Pascual A, *et al*. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and  $\beta$ -lactam antibiotics in *Acinetobacter* genospecies 3. *Antimicrob Agent Chemother*. 2004; 48:1430-2.
38. Kilic A, Li H, Mellmann A, Basustaoglu A, Kul M, Senses Z, *et al*. *Acinetobacter septicus* sp. Nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:902-8.
39. Dijkshoorn L, Nemeč A, Vaneechoutte M, and ENEMTI group. Identification of *Acinetobacter* genomic species by means of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA). Disponible en: <http://users.ugent.be/~mvaneech/ARDRA/Acinetobacter.html>. Acceso 30 de mayo 2011.
40. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, *et al*. 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.* 2011; 162:393-404.
41. Carmona O, Guzmán M, Comegna M, Castro J y Grupo Venezolano de Vigilancia de Resistencia Bacteriana. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Periodo Julio 2001-Diciembre 2002. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2003; 23:89-97.
  42. Pinzón J, Mantilla J, Valenzuela E, Fernández F, Alvarez C, Osorio E. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio.* 2006; 10:71-8.
  43. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-modulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:3375-80.
  44. Roca I, Espinal P, Martí S, Vila J. First identification and characterization of an AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter* genospecies 13TU. *Antimicrob Agent Chemother.* 2011; 55:1285-6.
  45. Marcos M. Epidemiología de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. *Enf Inf Microbiol Clin.* 2000; 11:29-33.
  46. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan U. Aminoglycosides versus bacteria-a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci.* 2008; 15:5-14.
  47. Labarca J. Utilización del antibiótico como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: comparación con la epidemiología molecular. *Rev Chil Infect.* 2002; 19:157-60.
  48. Schowcho LR, Schanffner CP, Miller GH, Hare RS, Shaw KJ. Cloning and characterization of a 3-n-aminoglycoside acetyl transferase gene, *aac (3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agent Chemother.* 1995; 39:1790-6.
  49. Le Goffie F, Martel A, Witchitz J. 3N enzymatic acetylation of gentamicin, tobramycin and kanamycin by *Escherichia coli* carrying R factor. *Antimicrob Agent Chemother.* 1974; 6:680-4.
  50. Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993; 57:138-63.
  51. Del Solar E, Garcia A, Bello H, Domínguez M, González G, Zemelman M. Mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos aminoglucósidos en bacilos gramnegativos de hospitales chilenos. *Rev Med Chile.* 1995; 123:293-7.
  52. Zarrilli R, Tripodi M, Popolo A. Molecular epidemiology of high-level amino glycoside-resistant in southern Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56:827-35.
  53. Nemeč A, Dolžani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* 2004; 53: 1233-40.
  54. Domingues S, Harms K, Fricke W, Johnsen P, Da Silva G, Nielsen K. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathogens.* 2012; 8:1-15.
  55. Díaz P, Bello H, Domínguez M, Trabal N, Mella S, Zemelman R y col. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev Med Chil.* 2004; 132:1173-8.
  56. Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:105-15.
  57. Delannoy PY, Boussekey N, Devos P, Alfordari S, Turbelin C, Chiche A, *et al.* Impact of combination therapy with aminoglycosides on the outcome of ICU-acquired bacteraemias. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31:2293-9.