



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Acinetobacter baumannii*
AISLADAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS,
CRECIENDO EN FORMA LIBRE Y FORMANDO BIOPELÍCULAS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado ante la
Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller
Joseline María Puma Riggio, como requisito parcial para
optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Yusibeska Ramos

Asesor académico: Dra. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela
Agosto, 2015

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. Resumen	xi
2. Introducción	2
2.1. Infecciones causadas por bacterias.	2
2.1.1. Patógeno nosocomial: <i>Acinetobacter baumannii</i>.	3
2.1.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>Acinetobacter baumannii</i>.	6
2.1.3. Formación de biopelículas.	9
2.2. Alternativa de tratamiento: antibióticos.	13
2.2.1. Tipos de antibióticos.	13
2.2.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.	14
3. Antecedentes	18
3.1. Antecedentes internacionales.	18
3.2. Antecedentes nacionales.	24
4. Objetivos	26
4.1. Objetivo general.	26
4.2. Objetivos específicos.	26
5. Materiales y métodos	27
5.1 Metodología general.	27
5.2. Materiales.	28
5.2.1. Reactivos.	28
1. Peróxido de hidrógeno.	28
2. Reactivo de Kovacs.	28
3. Buffer de corrida TBE 1X.	28
4. Buffer de carga 1X.	28
5. <i>Taq</i> DNA Polimerasa.	28
6. Iniciadores.	28
5.2.2. Medios de cultivo.	29
1. Caldo tripticasa de soya.	29
2. Agar LB.	29

3. Agar MacConkey.	29
4. Agar Mueller-Hinton.	30
5.2.3. Cepas bacterianas.	30
5.3. Métodos	31
5.3.1. Corroboración microbiológica y molecular de cepas de <i>A. baumannii</i> .	31
5.3.1.1. Pruebas bioquímicas.	31
1. Tinción Gram.	31
2. Prueba de la Catalasa.	32
3. Prueba de la Oxidasa.	32
5.3.1.2. Pruebas microbiológicas.	32
1. Crecimiento en agar LB a 44 °C.	32
2. Crecimiento en agar MacConkey a 37 °C.	32
5.3.1.3. Pruebas moleculares.	32
1. Aislamiento de DNA genómico de cepas de <i>A. baumannii</i> .	32
2. Detección molecular del gen 16S con iniciadores universales mediante PCR.	33
3. Detección molecular del gen 16S con iniciadores especies específicos mediante PCR.	33
4. Detección molecular de la presencia de integrones clase 1 mediante PCR.	33
5. Electroforesis en geles de agarosa.	34
5.3.2. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre, mediante el método de dilución en placas.	35
5.3.3. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre, mediante el método de difusión en disco.	35
5.3.4. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en biopelícula.	36
6. Resultados	38
6.1. Corroboración bioquímica, microbiológica y molecular de cepas de <i>A. baumannii</i> .	38
6.2. Determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre.	43
6.2.1. Placas de agar suplementadas con antibióticos.	43
a) Evaluación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre, mediante la metodología de dilución en placas.	43
b) Evaluación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre, mediante la metodología de dilución en placas.	46
6.2.2. Metodología de difusión en disco o antibiograma.	49

a) Evaluación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre, mediante la metodología de difusión en disco.	50
b) Evaluación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre, mediante la metodología de difusión en disco.	53
c) Comparación del efecto de los antibióticos amikacina y tetraciclina sobre las cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre.	57
6.3. Determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en biopelículas.	58
6.3.1 Evaluación del efecto del antibiótico amikacina en biopelículas formadas por cepas de <i>A. baumannii</i> .	59
a) <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes.	59
b) <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del SN.	62
c) <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la UTI.	66
6.3.2 Evaluación del efecto del antibiótico tetraciclina en biopelículas formadas por cepas de <i>A. baumannii</i> .	69
a) <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes.	69
b) <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del SN.	73
c) <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la UTI.	76
6.3.3 Comparación del efecto de los antibióticos amikacina y tetraciclina sobre las cepas de <i>A. baumannii</i> creciendo en forma libre y formando biopelículas.	79
7. Discusión	82
8. Conclusiones	99
9. Bibliografía	100

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Iniciadores utilizados en la identificación molecular de las cepas de <i>A. baumannii</i> .	29
Tabla II. Nomenclatura y procedencia de las cepas de <i>A. baumannii</i> utilizadas en este estudio.	31
Tabla III. Condiciones de amplificación del gen 16S con iniciadores universales y especies específicos y de los integrones clase 1, en cepas de <i>A. baumannii</i> .	34
Tabla IV. Concentraciones de antibióticos utilizadas en la determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos mediante el método de dilución en placas.	35
Tabla V. Evaluación bioquímica y microbiológica de las cepas de <i>A. baumannii</i> analizadas.	39
Tabla VI. Detección del gen 16S y de integrones clase 1 en las cepas de <i>A. baumannii</i> .	42
Tabla VII. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> , mediante el método de dilución en placas.	44
Tabla VIII. Determinación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> , mediante el método de dilución en placas.	47
Tabla IX. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> , mediante el método de difusión en disco.	52
Tabla X. Determinación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> , mediante el método de difusión en disco.	55
Tabla XI. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.	60
Tabla XII. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.	61
Tabla XIII. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.	63
Tabla XIV. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de <i>A.</i>	

<i>baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.	65
Tabla XV. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.	66
Tabla XVI. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.	68
Tabla XVII. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.	70
Tabla XVIII. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.	72
Tabla XIX. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.	74
Tabla XX. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.	75
Tabla XXI. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.	77
Tabla XXII. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.	78
Tabla XXIII. Comparación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de <i>A. baumannii</i> , creciendo en forma planctónica y en forma de biopelícula.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en <i>Acinetobacter baumannii</i> .	8
Figura 2. Etapas de la formación de una biopelícula.	11
Figura 3. Mecanismos de resistencia antimicrobiana por una biopelícula madura.	12
Figura 4. Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas.	16
Figura 5. Registro fotográfico de la tinción Gram de las cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes y ambiente del HUC.	38
Figura 6. Registro fotográfico de la amplificación por PCR con iniciadores universales de una región del gen 16S del DNA de cepas de <i>A. baumannii</i> .	40
Figura 7. Registro fotográfico de la amplificación por PCR con iniciadores especie específicos de una región del gen 16S del DNA de cepas de <i>A. baumannii</i> .	41
Figura 8. Registro fotográfico de la detección por PCR de integrones clase 1 en cepas de <i>A. baumannii</i> .	41
Figura 9. Distribución del fenotipo de resistencia a amikacina (30 µg/mL) en las cepas de <i>A. baumannii</i> , obtenidos mediante el método de placas suplementadas con antibiótico.	46
Figura 10. Distribución del fenotipo de resistencia a tetraciclina (30 µg/mL) en las cepas de <i>A. baumannii</i> , obtenidos mediante el método de placas suplementadas con antibiótico.	49
Figura 11. Registro fotográfico de la técnica de difusión en disco (antibiograma) en las cepas de <i>A. baumannii</i> .	50
Figura 12. Distribución del fenotipo de resistencia a amikacina (30 µg/mL) en las cepas de <i>A. baumannii</i> , obtenidos mediante el método de difusión en disco.	53
Figura 13. Distribución del fenotipo de resistencia a tetraciclina (30 µg/mL) en las cepas de <i>A. baumannii</i> , obtenidos mediante el método de difusión en disco.	57
Figura 14. Registro fotográfico de la evaluación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de <i>A. baumannii</i> formando biopelículas en microplacas de 96 pozos.	59

Figura 15. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora.	60
Figura 16. Evaluación de la resistencia al antibiótico amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas.	62
Figura 17. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora.	64
Figura 18. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas.	65
Figura 19. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora.	67
Figura 20. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas.	68
Figura 21. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora.	70
Figura 22. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas.	72
Figura 23. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora.	74
Figura 24. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24	

horas.	76
Figura 25. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora.	77
Figura 26. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas.	79
Figura 27. Estructura general de integrones clase 1.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	<i>A. baumannii</i> proveniente de paciente
AK	Amikacina
AN	<i>A. baumannii</i> proveniente del Servicio de Neonatología
AU	<i>A. baumannii</i> proveniente de la Unidad de Terapia Intensiva
°C	Grados centígrados
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DNA	Ácido desoxiribonucleico
HUC	Hospital Universitario de Caracas
DO	Densidad óptica
LB	Medio Luria-Bertani
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
µg	microgramo
mL	mililitro
µg	microlitro
min	minutos
mV	milivoltios
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nm	nanómetro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rDNA	Ácido desoxiribonucleico ribosomal
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
SN	Servicio de Neonatología
TE	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTI	Unidad de Terapia Intensiva

1. RESUMEN

Las infecciones bacterianas representan un problema de salud que continúa incrementando en el tiempo. Estas infecciones se presentan principalmente en centros hospitalarios, particularmente en las Unidades de Terapia Intensiva (UTI), generando no solo complicaciones a nivel de salud, sino también gastos económicos considerables. Entre los patógenos generalmente asociados a estas infecciones se encuentra *Acinetobacter baumannii*, un cocobacilo Gram negativo capaz de habitar superficies bióticas y abióticas mediante la formación de biopelículas, comunidades de microorganismos altamente especializadas, capaces de adherirse a una superficie y secretar una matriz de exopolisacárido que los envuelve, convirtiéndose en consorcios altamente resistentes a los antimicrobianos, particularmente a los antibióticos que constituyen el principal tratamiento para las infecciones bacterianas. Desafortunadamente, el uso indiscriminado de estos antimicrobianos ha conllevado a la aparición de cepas resistentes a estos agentes. Es por ello que el objetivo de este trabajo consistió en evaluar y comparar el fenotipo de resistencia a los antibióticos amikacina y tetraciclina sobre cepas de *A. baumannii*, creciendo en forma libre y formando biopelículas.

Al evaluar el fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, de las 30 cepas analizadas 13 fueron resistentes amikacina (30 µg/mL) y 20 fueron resistentes a tetraciclina (30 µg/mL). La mayor proporción de cepas resistentes tanto a amikacina como a tetraciclina, fueron provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales internados en la Unidad de Terapia Intensiva de Hospital Universitario de Caracas. Al evaluar el fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina en bacterias formando biopelículas, se encontró que la totalidad de las cepas (30) presentaron resistencia a las 4 concentraciones de antibióticos ensayadas. Los resultados obtenidos en este estudio, permiten sugerir que el éxito de colonización de las cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes y del ambiente del HUC, está mediado por los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos, así como mediante la habilidad que posee este microorganismo para formar biopelículas en distintas superficies y por tiempo prolongado.

Este estudio representa el primer aporte a nivel nacional que compara el fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de importancia clínica en dos formatos de crecimiento, encontrándose que las cepas de procedencia nosocomial son más resistentes y responden pobremente al tratamiento.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Infecciones causadas por bacterias.

Las bacterias son microorganismos que se encuentran presentes en el ambiente y algunas de ellas representan agentes patógenos para el ser humano. Entre estos patógenos se encuentran los que originan las infecciones nosocomiales, aquellas que aparecen 48 horas después del ingreso de un paciente a un centro hospitalario y que no estaban presentes al momento de ingreso (Pujol y Limón, 2013). Estas infecciones atacan mayormente a pacientes inmunocomprometidos internados en las Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de los centros de salud, llegando a afectar anualmente a 1.7 millones de personas, causar 99.000 muertes y \$ 4,5 billones en excesos de costos de atención médica. Este tipo de infecciones se encuentra entre las principales causas de mortalidad y de aumento de morbilidad en pacientes hospitalizados, agravando la discapacidad funcional y la tensión emocional del paciente (Buffet-Bataillon y col., 2012).

La terapia para el tratamiento de estas infecciones es realizada con antibióticos, compuestos de origen natural capaces de eliminar microorganismos (Madigan y col., 2004). A pesar de la eficiencia de este tratamiento, su uso indiscriminado tanto en la práctica clínica, como veterinaria y la agricultura, ha conllevado a la aparición de cepas resistentes, las cuales constituyen la causa principal por la que el número de procesos infecciosos ha aumentado con el paso de los años (Patwardhan y col., 2008).

Este fenómeno de resistencia bacteriana, plantea una amenaza grave y creciente en la salud debido a que limita paulatinamente las posibilidades de emplear antimicrobianos efectivos, para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En la actualidad, uno de los principales problemas hospitalarios es la resistencia bacteriana a los antimicrobianos y de manera más relevante, la presencia de estos determinantes de resistencia, en elementos genéticos extracromosomales, como moléculas plasmídicas con potencial conjugativo, que pueden ser transferidos a otras cepas bacterianas susceptibles del mismo ambiente, e incrementar la resistencia (Guariglia y col., 2008).

El incremento de las bacterias resistentes a antimicrobianos ha conllevado al desarrollo de diversos brotes de infecciones nosocomiales y entre las principales bacterias Gram negativas aisladas de este tipo de infecciones se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter baumannii* (Palomar y col., 2013).

2.1.1 Patógeno nosocomial: *Acinetobacter baumannii*.

Acinetobacter baumannii, un cocobacilo Gram negativo, no motil, no fermentador y aeróbico estricto. Representa un patógeno causante de infecciones nosocomiales, principalmente en pacientes internados en las UTI (Fournier y Richet, 2006; Pour y col., 2011). Entre las infecciones causadas por *A. baumannii*, se encuentran neumonía, infecciones del tracto urinario, septicemia, bacteremia y meningitis. De este modo, es considerada como una de las principales especies relacionada a los brotes de infecciones nosocomiales (Abdi-Ali y col., 2014; Peleg

y col., 2012). Entre los lugares que han reportado brotes nosocomiales relacionados con la presencia de *A. baumannii*, se encuentran Brooklyn, Chicago, el noreste de Indiana, Detroit, así como ciudades en Europa, América del Sur, África, Asia y el Medio Oriente (Munoz-Price y Weinstein, 2008). A su vez, estudios epidemiológicos han relacionado la acción de este patógeno en enfermedades infecciosas, como lo son la fibrosis quística, periodontitis, infecciones en la sangre e infecciones en el tracto urinario. Esto se debe a la habilidad de *A. baumannii* de habitar y crecer sobre distintas superficies bióticas y abióticas, que incluyen a los dispositivos médicos (Abdi-Ali y col., 2014). Sin embargo, este patógeno también puede causar infecciones prolongadas de manera asintomática, por lo que el control de los brotes infecciosos, causados por *A. baumannii*, requiere la erradicación total de esta bacteria del ambiente hospitalario (Pour y col., 2011).

Las 17 especies pertenecientes al género *Acinetobacter* han sido aisladas de diferentes ambientes, entre los que se encuentran muestras clínicas, comida, agua y suelos. Esto demuestra la habilidad que poseen estas especies para habitar ambientes de amplios rangos tanto de temperatura como de pH, destacando a su vez sus mínimos requerimientos nutricionales (Munoz-Price y Weinstein, 2008; Vila y col., 2007). En el ambiente clínico, esto representa un riesgo aún mayor debido a que las bacterias pueden colonizar superficies como camas, sábanas, almohadas, historias, catéteres, instrumentos quirúrgicos, así como la piel del personal que trabaja en los centros de salud (Gayoso y col., 2014; Vila y col., 2007).

Existe una particularidad entre dos de estas especies, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Acinetobacter baumannii*, las cuales se presentan como un complejo denominado *ACB*, y que comúnmente son aisladas en conjunto, pero a su vez son difíciles de diferenciar a nivel bioquímico en el laboratorio. Sin embargo, *A. calcoaceticus* es un microorganismo mayormente aislado del ambiente y raramente se encuentra asociado a infecciones humanas (Martí y col., 2011). Por lo tanto, debido a la dificultad de la identificación de estas cepas mediante pruebas bioquímicas y microbiológicas, es necesaria la aplicación de técnicas moleculares que permitan alcanzar este objetivo, entre las cuales se encuentra la técnica de *PCR* (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual permite la amplificación de un gen o un fragmento de DNA conocido, específico del microorganismo en estudio, proveniente de muestras de diversas fuentes (Luque y Herráez, 2001).

La importancia epidemiológica de *A. baumannii* radica en su notable capacidad para desarrollar resistencia a antibióticos y para ser reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos que pueden ser transferibles, especialmente en los ambientes hospitalarios (Patwardhan y col., 2008). Esta bacteria se caracteriza por tener la capacidad de recibir material genético foráneo, mediante el cual puede adquirir genes que codifican para mecanismos de resistencia a antibióticos. El material genético puede ser adquirido a través de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran: 1) transducción: implica la transferencia de genes de una bacteria a otra, mediada por un virus; 2) conjugación: permite la transferencia de material genético contenido en moléculas

plasmídicas, a través de una hebra sexual; 3) transformación: corresponde a la transferencia de genes a partir del DNA desnudo de una bacteria, a otra bacterias que lo recibe y lo incorpora en su genoma; y 4) transposición: implica el movimiento de una sección de DNA, conocido como transposón, que puede contener genes que codifican para la resistencia a antimicrobianos, así como otros genes casetes unidos para la expresión de un promotor en particular (Cabrera y col., 2007). Como consecuencia *A. baumannii* puede desarrollar, a largo plazo, mutaciones que le confieran resistencia a estos agentes o a diversas condiciones adversas, aunado a la expresión de factores de virulencia que le permiten la colonización de diversas superficies (Hernández y col., 2010; Lee y col., 2007).

Por lo tanto, es posible citar algunos de los factores que le atribuyen el éxito a este patógeno: (1) la habilidad para la formación de biopelículas, así como la resistencia a la desecación en superficies abióticas, (2) la habilidad de colonizar y crecer en las células epiteliales del ser humano (3) los diversos mecanismos de resistencia a antibióticos que posee y por último (4) la capacidad de recibir material genético foráneo, a través de la transferencia horizontal de genes, que le permite sobrevivir frente a diferentes presiones (Cerqueira y Peleg, 2011).

2.1.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos en *Acinetobacter baumannii*.

Existen diversos factores que pueden favorecer el desarrollo de la resistencia a antimicrobianos en las cepas de *A. baumannii* (figura 1), entre los que se encuentran la adquisición de elementos genéticos extracromosomales como lo son plásmidos, transposones e integrones, que pueden contener genes

que codifican para mecanismos involucrados en la resistencia a antibióticos. Otro mecanismo que le confiere resistencia a las bacterias es la inactivación enzimática, capaz de degradar agentes antimicrobianos como los β -lactámicos (*AmpC*, β -lactamasas tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHZ}, *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} y metalo- β -lactamasas) (Fournier y Richet, 2006; Maragakis y Perl, 2008). Otro mecanismo incluye la expresión de bombas de eflujo (*adeABC*, *adeIJK*, *adeFGH*, *adeXYZ*, *abeM*, *abeS*, *AmvA*), proteínas transportadoras involucradas en la expulsión de sustratos tóxicos del interior al exterior de la célula. En bacterias, estas proteínas están altamente conservadas y pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en un plásmido. Se han reportado 5 superfamilias, cada una de las cuales agrupan bombas específicas para agentes individuales, acompañados de otras responsables de la expulsión de múltiples sustancias (Ramos, 2014). El acceso reducido a las dianas bacterianas (*caro*, *oprD*) también representa un mecanismo de resistencia, debido a que actúa en conjunto disminuyendo la afinidad por agentes antimicrobianos o regulando funciones celulares como las bombas de eflujo y la deficiencia en la acción de las porinas (Fournier y Richet, 2006; Maragakis y Perl, 2008). A su vez, se destaca la resistencia intrínseca que puedan presentar estas bacterias, asociada a la baja permeabilidad de la membrana externa frente a algunos agentes antibacterianos (Vila y col., 2007). En un estudio genómico comparativo de una cepa multirresistente del género *Acinetobacter*, se encontró la presencia de una “isla de resistencia” que contiene 45 genes de resistencia, que al parecer fueron adquiridos de cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Escherichia* (Maragakis y Perl, 2008).

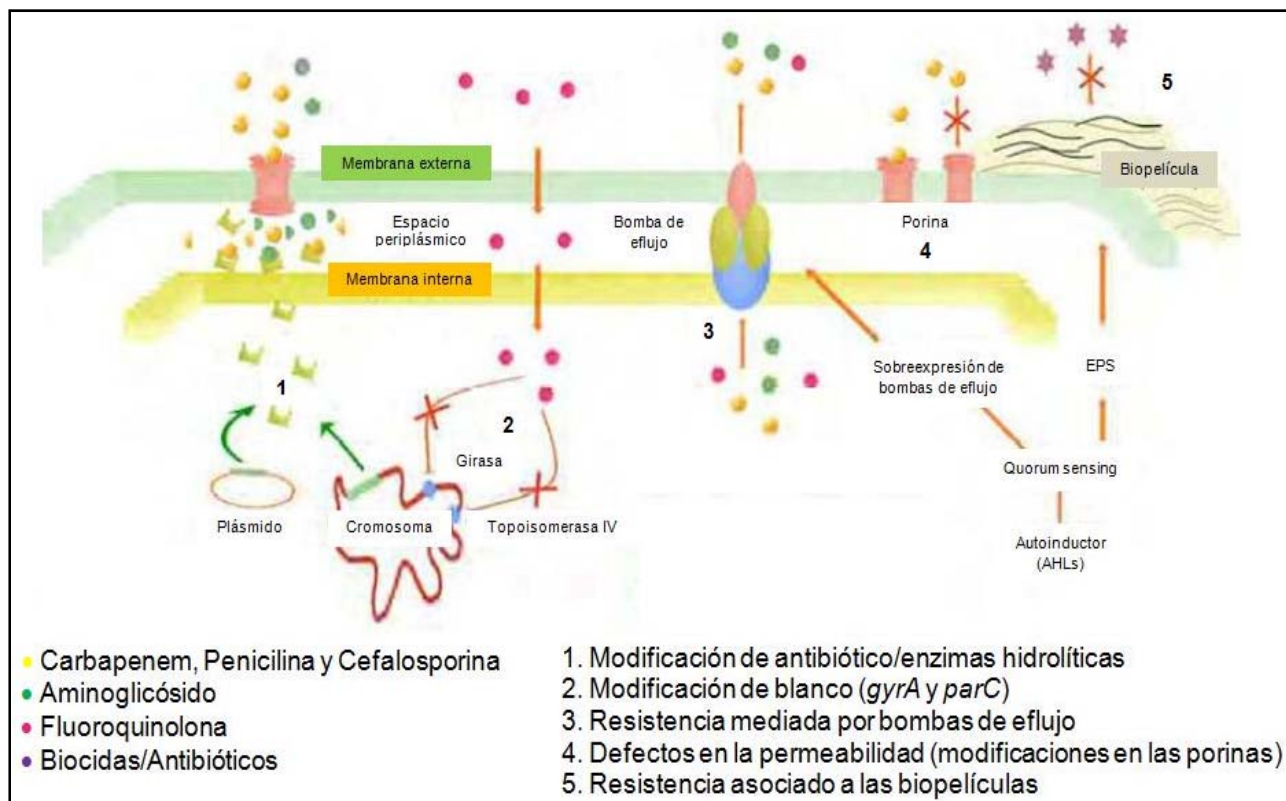


Figura 1. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *Acinetobacter baumannii*. Los números hacen referencia a los diversos mecanismos que confieren resistencia a la bacteria frente a agentes antimicrobianos (Tomado y modificado de Prashanth y col., 2012).

El potencial genético que poseen las cepas de *A. baumannii* para portar y transferir los genes que codifican para la resistencia a antibióticos, representa una amenaza aún mayor para el sistema de salud. Actualmente, esta bacteria es considerada como uno de los patógenos nosocomiales más peligrosos en cuanto a su tratamiento y posterior control de la infección (Li y col., 2007; Peleg y col., 2012). El uso continuo de antibióticos como único tratamiento eficaz para las infecciones bacterianas, ha contribuido al desarrollo de la resistencia a estos agentes antimicrobianos y en consecuencia han dado pie a la aparición de cepas de *A. baumannii* no solo multirresistentes, las cuales no son susceptibles a la acción de antibióticos de primera generación, incluyendo β -lactámicos, quinolonas

y aminoglicósidos, sino también la presencia de cepas panresistentes las cuales no presentan susceptibilidad a ninguno de los antibióticos descritos, incluyendo la colistina y la polimixina (Magiorakos y col., 2011).

2.1.3 Formación de biopelículas.

Otra característica de *A. baumannii* es la habilidad que posee para formar una biopelícula, una comunidad altamente especializada de microorganismos los cuales son capaces de adherirse a una superficie y secretar una matriz de exopolisacárido que los envuelve. Las células que conforman la biopelícula poseen un fenotipo diferente al que presentan las mismas células cuando crecen en su forma planctónica (de vida libre), al igual que las interacciones entre las células difieren en ambas formas de crecimiento (Abdi-Ali y col., 2014; Longo y col., 2014). Esto sugiere que las diferencias entre ambas formas de crecimiento están ligadas a actividades metabólicas (Yeom y col., 2013).

La matriz de exopolisacárido secretada por las bacterias está constituida por carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas (Gaddy y Actis, 2010). Ésta genera un ambiente que proporciona las condiciones ideales para su desarrollo, permitiendo el intercambio de material genético entre los microorganismos que conforman la biopelícula (Martí y col, 2011). Adicionalmente, representa un mecanismo de protección frente a ambientes adversos, así como durante la infección a un hospedador. En consecuencia, cuando las bacterias se encuentran formando parte de una biopelícula, son más resistentes a agentes antibacterianos como los antibióticos (Espinal y col., 2012; Longo y col., 2014).

El paso inicial para la formación de una biopelícula consiste en la adhesión de una célula individual a una superficie, la cual depende de factores externos como son la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes, así como de factores intrínsecos regulados por las bacterias que codifiquen las funciones motrices, la sensibilidad ambiental y otras proteínas (Ramos, 2014). Posteriormente, la célula comienza a crecer y a dispersarse por la superficie, generando la formación de microcolonias, a través de un mecanismo de regulación altamente especializado denominado *quorum sensing*, mediante el cual las bacterias perciben señales en relación a la densidad celular y como consecuencia, pueden conducir la formación de la biopelícula hasta su maduración (Gaddy y Actis, 2010).

Este proceso sigue cinco etapas que han sido identificadas (figura 2): (1) unión de las bacterias entre sí, mediante uniones electrostáticas y una adhesión reversible de las células a la superficie, (2) una posterior unión irreversible mediada por sustancias exopoliméricas, que pierden su motilidad y comienza la formación de las microcolonias, (3) el inicio de la maduración, acompañado de la producción de la matriz de exopolisacárido, (4) la segunda fase de la producción de la matriz de exopolisacárido, junto al desarrollo final de la colonia en la biopelícula madura y (5) la dispersión de las células motiles, de vuelta al estadio planctónico, las cuales se dispersan y colonizan una nueva superficie (Ramos, 2014).

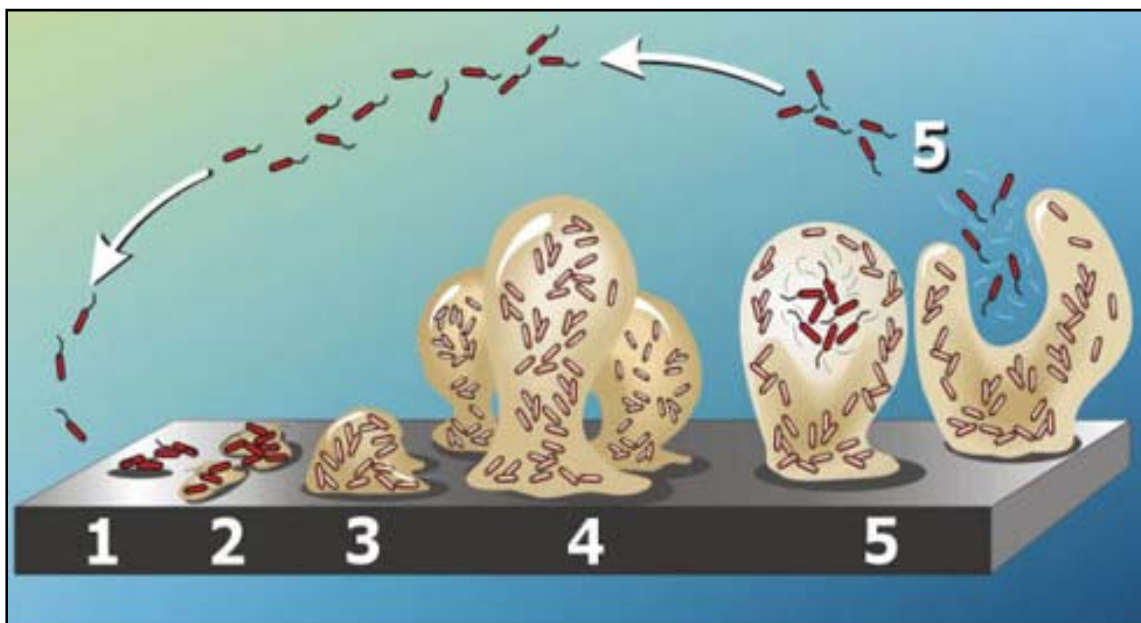


Figura 2. Etapas de la formación de una biopelícula. **1.** Unión de las bacterias y adhesión reversible a la superficie. **2.** Unión irreversible de las células a la superficie. **3.** Primera fase de maduración con la excreción del exopolisacárido. **4.** Segunda fase de maduración, hasta la formación de la biopelícula madura. **5.** Fase de dispersión en la que las células motiles vuelven a la fase planctónica (Tomado y modificado de Ramos, 2014).

La formación de biopelículas bacterianas es considerada como un factor de virulencia o patogenicidad (Lee y col., 2007; Wroblecka y col., 2008). Las infecciones causadas por bacterias formando biopelículas, son difíciles de erradicar debido a la resistencia multifactorial que presenta esta estructura hacia diversos agentes antibacterianos como antibióticos y biocidas, productos del sistema inmunológico, luz UV, metales tóxicos, exposición a ácidos, desecación y fagocitosis (Lee y col., 2007; Shin y col., 2009). Entre los diversos factores (figura 3), se destaca la barrera físico-química que ejerce la matriz de exopolisacárido que envuelve a las bacterias de esta comunidad, impidiendo que el antibiótico difunda hacia el interior y en consecuencia no sea capaz de alcanzar su diana. Adicionalmente, por la limitación de los nutrientes dentro de la biopelícula, la cinética de crecimiento de las bacterias es diferente, generando una disminución del tiempo de generación y las bacterias poseen un menor tamaño y una menor

permeabilidad a los antibióticos. A su vez, la producción de enzimas que son capaces de inactivar a los antibióticos son liberadas al exterior celular, pero quedan embebidas en la matriz lo que permite que degraden al agente antibacteriano antes de que este entre en contacto con las células. Igualmente, la pared celular de las bacterias que conforman una biopelícula se encuentra modificada y presenta bombas de eflujo más especializadas, capaces de expulsar al agente antimicrobiano del interior al exterior celular, antes de que pueda ejercer su efecto. En cuanto a las condiciones generales dentro del microambiente generado por las biopelículas, estas pueden variar en cuanto a pH, presión parcial de oxígeno (pO_2), presión parcial de dióxido de carbono (pCO_2), niveles de hidratación y otros aspectos capaces de alterar los efectos producidos por los antibióticos (Ramos, 2014).

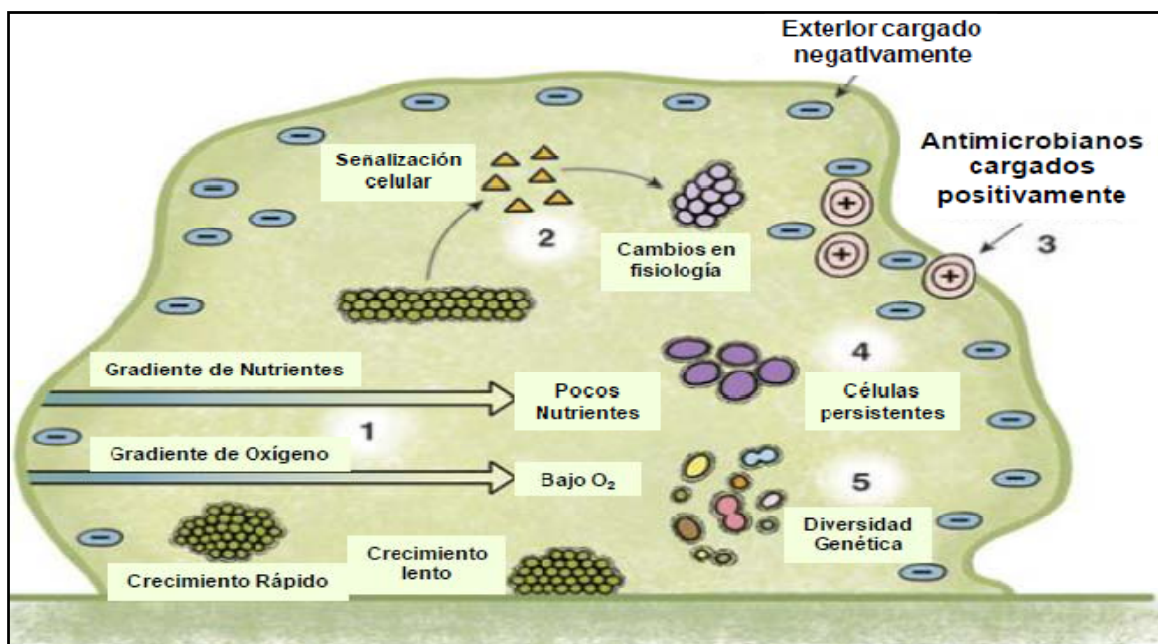


Figura 3. Mecanismos de resistencia antimicrobiana por una biopelícula madura. Esta resistencia puede deberse a la barrera fisicoquímica que representa el exopolisacárido, al estado de crecimiento lento, a enzimas degradadoras de antibióticos, a la alteración en la pared celular o por transferencia horizontal de genes que confieren resistencia (Tomado de Ramos, 2014).

2.2 Alternativa de tratamiento: antibióticos.

Los antibióticos comprenden el tratamiento para las infecciones causadas por bacterias, entre las que se encuentran las infecciones nosocomiales. Estos fármacos poseen la capacidad de inhibir o causar la muerte de una amplia variedad de bacterias y pueden ser producidos mediante procesos industriales, con el fin de maximizar su producción (Madigan y col., 2004).

2.2.1 Tipos de antibióticos.

Existe una gran cantidad de antibióticos, los cuales pueden ser clasificados por sus mecanismos de acción sobre las bacterias. Entre las clases de antibióticos existen subclases, que se diferencian principalmente en cuanto a su estructura química (Madigan y col., 2004).

Entre las opciones de tratamiento para las infecciones causadas por *A. baumannii* están los antibióticos del tipo β -lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas y tetraciclinas, de particular interés para este estudio los aminoglicósidos y las tetraciclinas. Entre los antibióticos aminoglicósidos, se encuentra la amikacina (AK), que posee en su estructura un anillo ciclohexano y aminoazúcares. El mecanismo de acción de estos agentes antibacterianos consiste en la unión a la subunidad ribosomal 30S y la interferencia de la síntesis proteica. Esta interferencia puede originarse directamente sobre la síntesis de proteínas, o también puede generarse causando errores en la lectura de la información genética que es transportada por el mRNA. Los antibióticos aminoglicósidos poseen un efecto bactericida, por lo que logran la destrucción de la bacteria. A su

vez, son considerados altamente eficientes contra bacterias Gram negativas (Prescott, 2002).

Por otra parte, la tetraciclina (TE) pertenece al grupo de antibióticos de las tetraciclinas, cuya estructura básica consiste en cuatro anillos de naftaceno a los que pueden estar unidos diferentes cadenas de radicales, que dan origen a diversos antibióticos, pertenecientes a este mismo grupo de antimicrobianos (Madigan y col., 2004). El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en inhibir la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de la bacteria. Los antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas son considerados de amplio espectro, por lo que actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, rickettsias, clamidias y micoplasmas. Sin embargo, el efecto que ejercen sobre estos microorganismos es considerado bacteriostático, por lo que su uso único no garantiza la muerte de las bacterias (Prescott, 2002).

2.2.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Algunas enzimas producidas por las bacterias, poseen la capacidad de actuar sobre el antibiótico al modificar su estructura, generando así la inactivación de este agente antimicrobiano. En el caso de los antibióticos aminoglicósidos (figura 4), se puede dar mediante la modificación de los grupos hidroxilo o amino del antibiótico, mediante la producción de enzimas como acetiltransferasas (AACs, por sus siglas en inglés) por una reacción de acetilación, nucleotidiltransferasas (ANTs, por sus siglas en inglés) por una reacción de adenilación y fosfotransferasas (APHs, por sus siglas en inglés) por una reacción de

fosforilación. Estos antibióticos también actúan causando una lectura errada del mRNA generando así la producción de proteínas defectuosas (Espinal y col., 2011; Tafur y col., 2008).

Por otra parte, en el caso de los antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas (figura 4), el mecanismo de acción radica en la unión reversible del antimicrobiano a la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la unión del aminoacil-tRNA (Chopra y Roberts, 2001). Por lo tanto, es necesario que el antimicrobiano atraviese la membrana con el fin de llevar a cabo esta interacción, tomando en cuenta que el acceso de los antibióticos a las dianas de las bacterias puede ser limitado mediante la acción de las porinas, las cuales se encuentran ubicadas en la membrana externa, por lo que constituyen un obstáculo de entrada a la célula para estos agentes antibacterianos (Munoz-Price y Weinstein, 2008). A su vez, existen bombas de eflujo relacionadas con la resistencia a tetraciclina, las cuales poseen la capacidad de bombear múltiples ligandos, como antibióticos y metales tóxicos, al exterior de la célula. La sobreexpresión de estas bombas de eflujo confiere una mayor resistencia a la tetraciclina (Chopra y Roberts, 2001).

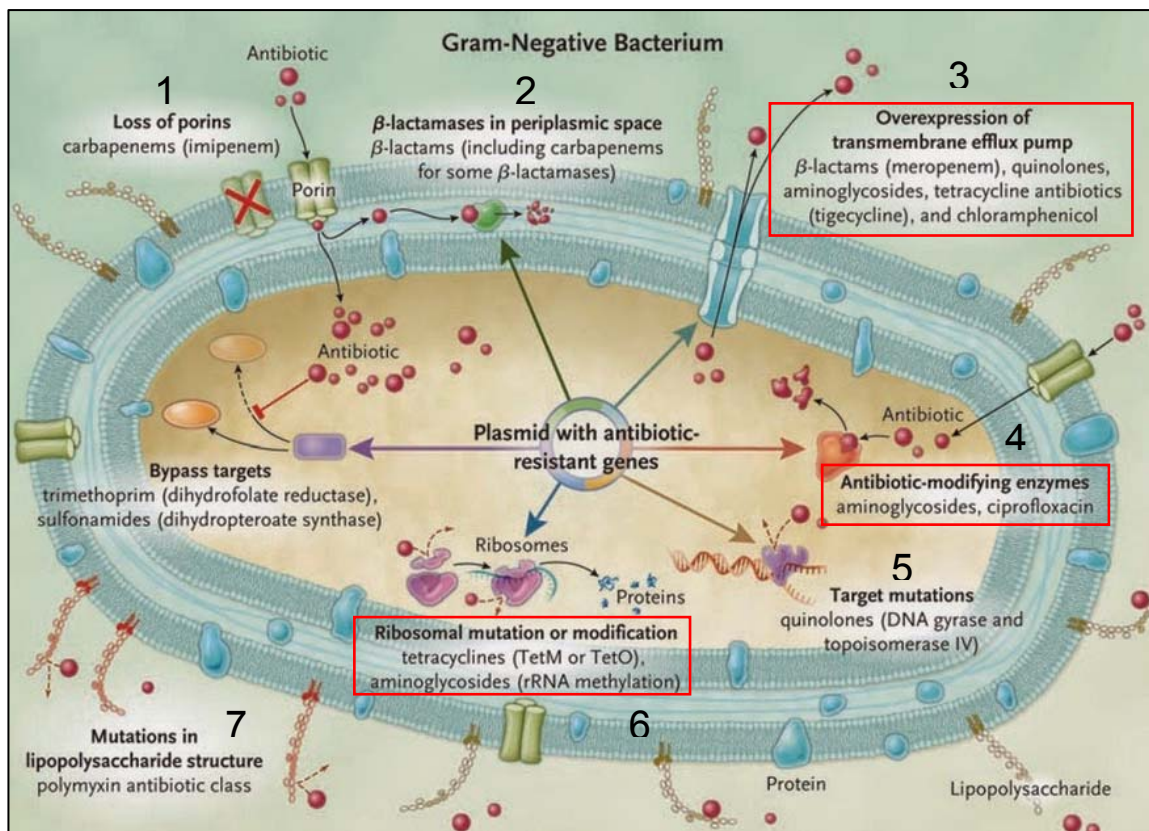


Figura 4. Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas. (1) Pérdida de porinas, lo que reduce la entrada de los fármacos a través de la membrana celular; (2) presencia de β -lactamasas en el espacio periplásmico que degradan los antibióticos β -lactámicos; (3) sobreexpresión de las bombas de eflujo las cuales expulsan los fármacos antes de que causen algún efecto; (4) presencia de enzimas modificadoras de antibióticos las cuales impiden la interacción de éste con su blanco; (5) mutaciones del blanco que previenen la unión del antibiótico a su sitio de acción; (6) mutaciones o modificaciones a nivel ribosomal lo que previene que el antibiótico se una e inhiba la síntesis de proteínas; (7) mutaciones en la estructura lipopolisacárida. Resaltados en rojo los de principal importancia para este estudio (Tomado y modificado de Peleg y Hooper, 2010).

Es innegable que *A. baumannii* representa una amenaza para el sistema de salud debido a su relación directa con los brotes de las infecciones nosocomiales, las cuales no solo empeoran considerablemente el estado de salud del paciente, sino que a su vez promueven su estadía en los centros hospitalarios generando un costo económico adicional.

El uso de antibióticos de manera indebida y por tiempo prolongado no solo para el tratamiento de las infecciones nosocomiales, sino para las infecciones bacterianas en general, favorece la aparición y desarrollo de cepas resistentes que se convierten en responsables de la persistencia de estas infecciones en el ambiente clínico. El incremento de las cepas resistentes a estos agentes antimicrobianos impide el uso de este tratamiento, debido a que limita las opciones mediante las cuales la infección pueda ser erradicada. Como consecuencia, la presencia de estos patógenos pueden complicar no solo las terapias utilizadas para el tratamiento de las infecciones bacterianas, sino también otros tratamientos que requiera el paciente.

Por estas razones, es necesario el estudio de esta bacteria para la posterior aplicación de medidas tanto preventivas como de tratamientos, tomando en consideración la formación de biopelículas, debido a que es la forma de crecimiento en la cual esta bacteria se presenta mayormente en el ambiente y que a su vez la favorece en la colonización del ambiente hospitalario, no solo en las superficies inanimadas sino también en la piel del personal que labora en los centros de salud. De este modo, se generaría una aproximación más cercana a su comportamiento, con el fin de desarrollar técnicas y tratamientos efectivos que permitan su erradicación total de los centros de salud. Adicionalmente, el desarrollo no solo de cepas multirresistentes sino también cepas panresistentes, genera un reto aún mayor para el desempeño de estos estudios.

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes internacionales.

A nivel internacional, se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la acción de agentes antimicrobianos como los antibióticos, frente a cepas multirresistentes de *A. baumannii*, no sólo cuando crecen en forma planctónica, sino también cuando se encuentran formando una biopelícula. En República Checa, en el año 2004, Nemec y colaboradores estudiaron la diversidad de los genes de resistencia a antibióticos del tipo aminoglicósidos y su asociación con integrones clase 1, entre clones de cepas de *A. baumannii* presentes en toda Europa. Aislaron un total de 106 cepas de *A. baumannii* multirresistentes de origen clínico y obtuvieron que 102 cepas (96 %) resultaron ser resistentes a al menos uno de los siguientes antibióticos: kanamicina, gentamicina, tobramicina, netilmicina o amikacina y al menos un gen de resistencia fue detectado en 101 cepas (95 %). A su vez, cepas con los genes *aphA1*, *aacC1* o *aphA6* resultaron ser resistentes a kanamicina, gentamicina o kanamicina+amikacina, respectivamente, mientras que el gen *aadB* fue asociado a la resistencia a kanamicina, gentamicina y tobramicina. De este modo, 89 cepas (84 %) presentaron una combinación de dos a cinco diferentes genes de resistencia y encontraron un total de 12 combinaciones diferentes (Nemec y col., 2004).

Posteriormente en el año 2007 en Italia, Zarrilli y colaboradores, estudiaron la epidemiología molecular de un brote causado por cepas multirresistentes de *A. baumannii*. Aislaron 74 cepas de esta bacteria de un hospital universitario de este país y 45 cepas adicionales fueron obtenidas de pacientes. Obtuvieron que 69 de

las primeras 74 cepas analizadas presentaron una resistencia a todos los antibióticos utilizados que incluyen: ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, cefalosporinas de amplio espectro, carbapenems, fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Adicionalmente obtuvieron cepas denominadas tipo 1 y tipo 1a con resistencia a imipenem y rifampicina, resistencia intermedia a meropenem, susceptibilidad a sulfato de colistina y que a su vez albergaron un integrón clase 1 de 2,2-kb. La cepa denominada tipo 2, presentó susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos utilizados y resistencia intermedia a piperacilina-tazobactam y rifampicina. Adicionalmente, demostraron la presencia de un casete de gen *aacA4*, involucrado en la resistencia a amikacina, tobramicina y netilmicina, un casete de *orfX*, que codifica para un producto desconocido y una casete del gen *bla_{OXA-20}*, involucrado en la resistencia a la oxacilina (Zarrilli y col., 2007).

En Polonia, en el año 2008, Wroblewska y colaboradores, evaluaron la producción de biopelículas por cepas de *A. baumannii* aisladas de dos hospitales de cuidados de tercer nivel. Aislaron 24 cepas de un hospital A y 10 cepas provenientes de pacientes internados en un hospital B. Como resultado, obtuvieron tres grupos de cepas, que se diferenciaron en cuanto a su habilidad de la formación de biopelículas, estableciendo una clasificación de alta (12%), mediana (41%) y baja (47%) capacidad de producción de biopelículas. La totalidad de las cepas aisladas del hospital A, resultaron sensibles a imipenem, y 23 de ellas resultaron sensibles a meropenem. Por otra parte, las cepas aisladas del hospital B, demostraron diversos patrones de susceptibilidad frente a las carbapenemasas. Por lo tanto, mediante tipificación molecular, demostraron la existencia de tres tipos de cepas de *A. baumannii* aisladas de este hospital. Sin

embargo, no obtuvieron ninguna relación entre la clasificación en cuanto a la formación de biopelículas, la resistencia a carbapenemasas y la ubicación de la obtención de las cepas en los centros hospitalarios (Wroblewska y col., 2008).

Posteriormente, en Francia en el año 2011, Martí y colaboradores estudiaron la formación de biopelículas por cepas de diversas especies del género *Acinetobacter*, en interfaces sólido-líquido, así como aire-líquido. Para ello, recolectaron cepas de *A. baumannii* (64), *A. johnsonii* (34), *A. Iwoffii* (26), *A. radioresistens* (20), *Acinetobacter* Genoespecies 3 (46), *Acinetobacter* Genoespecies 13TU (60), *A. calcoaceticus* (10) y *A. junii* (5). Las cepas de especies diferentes a *A. baumannii*, fueron recolectadas principalmente de pacientes con infecciones provenientes de catéteres y de la piel de pacientes externos de la UTI. La formación de biopelículas en la interface sólido-líquido, se presentó con mayor frecuencia para ambas temperaturas (25 °C y 37 °C) en cepas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* Genoespecies 3 y *Acinetobacter* Genoespecies 13TU, que en cepas de *A. johnsonii*, *A. radioresistens* y *A. Iwoffii*. En los estudios de la interface aire-líquido, la formación de biopelículas se presentó con mayor frecuencia para ambas temperaturas (25 °C y 37 °C) en cepas de *A. baumannii* y *Acinetobacter* Genoespecies 13TU, que en cepas de *A. johnsonii*, *A. radioresistens*, *A. Iwoffii*, y *Acinetobacter* Genoespecies3. Obtuvieron que *A. baumannii* es la especie de este género con la mayor habilidad para la formación de biopelículas en los ambientes hospitalarios (Martí y col., 2011).

En España en el año 2012, Espinal y colaboradores estudiaron el efecto de la formación de biopelículas de *A. baumannii* en superficies abióticas, con el fin de demostrar si la creación de estas comunidades estaría asociada a la prevalencia

de este patógeno en los centros hospitalarios. Los autores, seleccionaron 2 cepas productoras y 2 cepas no productoras de biopelículas. Encontraron una mayor supervivencia en las superficies abióticas para las cepas formadoras de biopelículas (36 días) que para las cepas no formadoras de biopelículas (15 días) (Espinal y col., 2012).

En Estados Unidos, en el año 2013, Sanchez y colaboradores estudiaron la formación de biopelículas por cepas de origen clínico y la implicación que pudieran tener sobre infecciones crónicas. Para ello, utilizaron 205 cepas seleccionadas al azar, recolectadas de pacientes mediante los procesos de cuidados rutinarios. Estas muestras incluyeron cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*. Obtuvieron que la habilidad que presentan las cepas para formar biopelículas, se encuentra relacionada con la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir en los ambientes hospitalarios, así como en los dispositivos médicos y quirúrgicos. Adicionalmente, del total de cepas utilizadas en el estudio, el 61,4% presentó la capacidad de formar biopelículas en un grado igual o mayor al presentado por la cepa utilizada como control positivo (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228). Las cepas analizadas de *S. aureus* (91%), *P. aeruginosa* (83%), *K. pneumoniae* (76%) y *A. baumannii* (55%), presentaron una densidad celular media en su formación de biopelículas, mientras que las cepas de *E. coli* (13%) formaron biopelículas pero con una densidad celular baja (Sanchez y col., 2013).

En el año 2014 en Jordania, Obeidat y colaboradores estudiaron las principales características biológicas de cepas de *A. baumannii*, provenientes tanto del ambiente clínico, como de vías respiratorias de pacientes. Recolectaron

74 cepas del ambiente de tres UTI para adultos y 64 cepas del tracto respiratorio de 142 pacientes. Sin embargo, utilizaron 8 cepas representativas de cada grupo (proveniente del ambiente y proveniente de pacientes) para llevar a cabo este estudio, tomando en cuentas las siguientes características: susceptibilidad de estas cepas creciendo en forma planctónica frente a antibióticos, así como la presencia de genes específicos de metalo- β -lactamasas y genes tipo OXA. También evaluaron la capacidad de las cepas de crecer frente a diferentes temperaturas y pH, así como la habilidad para la formación de biopelículas. Las 16 cepas estudiadas poseen el gen tipo *bla*_{OXA-51}, así como una distribución similar en relación a los genes de resistencia β -lactamasa. En cuanto a las condiciones de temperatura, las 16 cepas fueron capaces de crecer entre el rango de 18 - 45 °C. Sin embargo, las cepas provenientes del ambiente lograron crecer en agua con un rango de pH de 4,5 - 8 y temperatura de 18 - 24 °C durante 23 días, mientras que las cepas provenientes de pacientes lograron crecer en agua con un rango de pH de 5,5 a 8, también durante 23 días. Finalmente, no encontraron diferencia en la capacidad para la formación de biopelículas entre las cepas de ambas procedencias (Obeidat y col., 2014).

También en el año 2014 en Irán, Abdi-Ali y colaboradores evaluaron la formación de biopelículas y la resistencia a imipenem y ciprofloxacina entre cepas de *A. baumannii* de origen clínico. Utilizaron 75 cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes internados en dos centros hospitalarios y determinaron el rango de adherencia de las células de *A. baumannii*, así como la habilidad de las mismas para la formación de biopelículas, encontrando que bajo agitación, el 22 % de las cepas analizadas fue capaz de formar biopelículas, mientras que un 23 % de las

mismas cepas analizadas no formaron biopelículas bajo esta condición. A su vez, en este mismo ensayo, solo el 18 % logró la formación de una biopelícula de clasificación moderada, mientras que el 42% desarrolló biopelículas consideradas como débiles. En contraparte, en el estudio realizado sobre microplacas de titulación, el 18 % de las cepas analizadas, fueron capaces de formar una biopelícula clasificada como fuerte, mientras que el 47 % formaron biopelículas consideradas como débiles. En cuanto a la resistencia a antibióticos, los resultados obtenidos arrojaron que el 92 % de las cepas son resistentes a ciprofloxacina, mientras que el 68 % de las cepas son resistentes a imipenem (Abdi-Ali y col., 2014).

Igualmente en Irán, en el año 2014, Nowroozi y colaboradores evaluaron la resistencia a diversos antibióticos, particularmente ciprofloxacina (genes *gyrA* y *parC*) y tetraciclina (gen *tetB*), en aislados de *A. baumannii* asociados a infecciones nosocomiales. Los autores trabajaron con 2500 cepas aisladas durante el periodo Diciembre 2010 y Agosto 2011, las cuales fueron obtenidas a partir de muestras de secreciones respiratorias, orina, heridas, esputo y sangre de pacientes recluidos en un hospital de Teherán. Encontraron una resistencia del 100 % hacia amikacina, ciprofloxacina, co-trimoxazole, ceftazidime y ceftriaxone. A su vez, el 86 % de las cepas presentó resistencia frente a gentamicina y tetraciclina. En la totalidad de las cepas analizadas, obtuvieron mutaciones de los genes *gyrA* y *parC*, involucrados en la resistencia a quinolonas (ciprofloxacina). Por su parte, el gen *tetB*, que codifica para una bomba de eflujo involucrada en la resistencia a tetraciclina, sólo fue obtenido en el 86 % de las cepas que presentaron resistencia a este antibiótico (Nowroozi y col., 2014).

3.2 Antecedentes nacionales.

La resistencia de las bacterias a los agentes antimicrobianos representa un problema a nivel mundial. Sin embargo, en Venezuela son pocos los estudios que se han realizado en relación a este tema. Principalmente, la resistencia es estudiada en bacterias de origen hospitalario, las cuales son más propensas a estar en contacto con agentes antimicrobianos como antibióticos y desinfectantes. En el año 2010, Chalbaud realizó la caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales, con el fin de establecer las posibles fuentes de transmisión de los agentes causales de estas infecciones. Para ello, tomó muestras de dos zonas del Hospital Universitario de Caracas (HUC), que incluyeron la UTI y el Servicio de Neonatología (SN). El muestreo fue realizado a partir de diversas superficies del ambiente de ambos lugares. Adicionalmente, se recolectaron cepas provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales, previamente identificadas por el Laboratorio de Bacteriología del HUC. Las especies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter baumannii*, corresponden a los principales agentes causantes de las infecciones nosocomiales en este centro hospitalario. Igualmente, se determinó periodos de tiempo de persistencia de estos patógenos en el ambiente hospitalario siendo para *S. maltophilia* de 2 a 4 meses, para *P. aeruginosa* 5 meses, e indirectamente debido a su alta distribución, 9 meses para *A. baumannii* (Chalbaud, 2010).

Posteriormente, en el año 2014 Ramos evaluó la resistencia a agentes desinfectantes con agente activo QAC (compuestos de amonio cuaternario), en

cepas de origen clínico, tanto de *Acinetobacter baumannii* como de *Stenotrophomonas maltophilia* creciendo en forma libre y formando biopelículas. Utilizó 50 cepas de *A. baumannii* y 15 cepas de *S. maltophilia*, provenientes tanto de pacientes con infecciones nosocomiales, como del ambiente del SN y la UTI del HUC. Del total de las cepas evaluadas, el 49 % fue capaz de crecer en presencia del desinfectante a una concentración del 10 % y durante 15 min. De este total de cepas, 6 corresponden a *S. maltophilia* y 26 a *A. baumannii*. A su vez, 9 fueron aisladas de pacientes y 23 del ambiente hospitalario (Ramos, 2014).

Adicionalmente, el total de las cepas evaluadas, sin distinciones en cuanto a su procedencia, resultaron ser productoras de biopelículas clasificadas como fuertes. Como consecuencia, cuando estas cepas se encuentran creciendo en una biopelícula, son capaces de resistir al desinfectante en presentaciones de concentrado y diluido al 50 % por un período de hasta 24 h. Este estudio corresponde al primer avance realizado en el país, en el cual se compara la resistencia a desinfectantes en cepas bajo dos formas de crecimiento, arrojando como resultado que cuando las bacterias forman parte de una biopelícula son resistentes al desinfectante (Ramos, 2014).

Los estudios mencionados forman parte del primer paso para el desarrollo de proyectos que permitan describir y entender los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias, que les confieren la capacidad de mantenerse presente en el ambiente hospitalario. Por esta razón, este estudio busca comparar el fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *A. baumannii* no sólo cuando crecen en forma planctónica, sino también cuando forman parte de una biopelícula.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el fenotipo de resistencia de cepas de *Acinetobacter baumannii*, provenientes de pacientes y del ambiente del HUC, creciendo en forma libre y formando biopelículas, frente a antibióticos de tipo aminoglicósido y tetraciclina.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1. Corroborar microbiológicamente y molecularmente la identificación de las cepas de *A. baumannii* de origen clínico y ambiental.

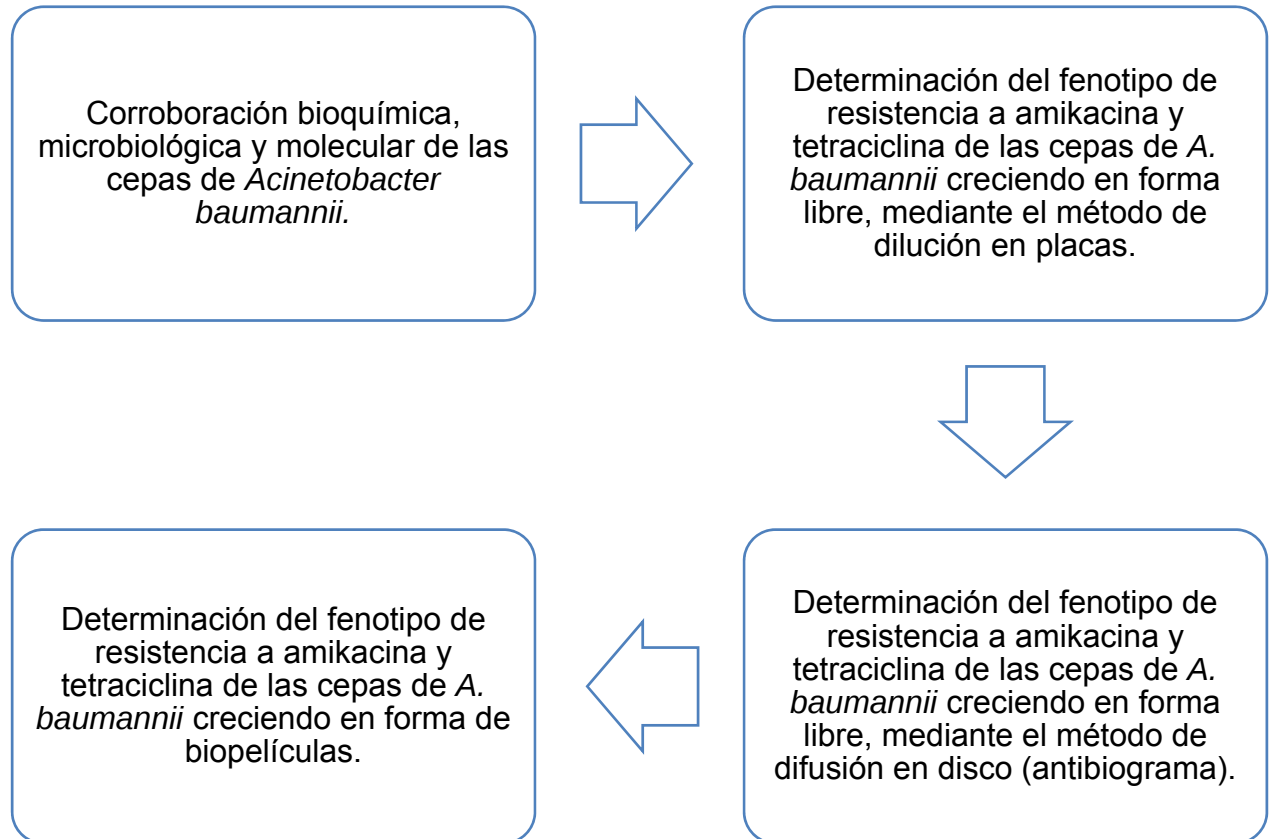
4.2.2. Evaluar la resistencia de las cepas de *A. baumannii* de origen clínico y ambiental, creciendo en forma libre, frente a antibióticos de tipo aminoglicósido y tetraciclina.

4.2.3. Evaluar la resistencia de las cepas de *A. baumannii* de origen clínico y ambiental, creciendo en forma de biopelícula, frente a antibióticos de tipo aminoglicósido y tetraciclina.

4.2.4. Comparar el fenotipo de resistencia a antibióticos de tipo aminoglicósido y tetraciclina, entre células creciendo en forma libre y células creciendo en forma de biopelícula.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Metodología general



5.2 Materiales

5.2.1 Reactivos

1. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2): reactivo empleado para la realización de la prueba catalasa para las cepas analizadas, el cual permite determinar la presencia de enzimas catalasas, que catalizan la descomposición de este reactivo en oxígeno y agua.

2. Reactivo de Kovacs (diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TPD) al 1%, solución incolora): reactivo empleado para la realización de la prueba oxidasa para las cepas analizadas, el cual permite determinar la presencia de enzimas oxidasas y confiere un color lavanda, el cual se oscurece gradualmente a color púrpura negruzco, frente a las cepas que presentan reacción positiva a esta prueba.

3. Buffer de corrida TBE 1X (Tris-HCl 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M, pH8).

4. Buffer de carga 1X (Azul de bromofenol 0,25 %, Xilenecyanol 0,25 % y Glicerol 30 % en agua).

5. Taq DNA polimerasa: DNA polimerasa termoestable que posee una actividad 5'→3' y actividad endonucleasa 5'. Está suplementada con buffer de reacción *Thermo Pol* 10X, que contiene un detergente no iónico que incrementa la actividad enzimática durante largos períodos de incubación.

6. Iniciadores

Los iniciadores utilizados para la corroboración molecular y la detección de integrones clase 1 en las cepas de *A. baumannii* analizadas en este estudio, se muestran en la tabla I.

Tabla I. Iniciadores utilizados en la identificación molecular de las cepas de *A. baumannii*.

Gen	Iniciador	Secuencia (5'--- 3')	Tamaño	Referencia
16S DNA	U1	CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG	996 pb	Lu y col., 2000
	U2	ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC		
16S DNA	16S F	GACGTACTCGCAGAATAAGC	426 pb	Li Lin y col., 2009
	16S R	TTAGTCTTGCGACCGTACTC		
Integrones clase 1	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	1000 pb	Levesque y col., 1995
	3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA		

5.2.2 Medios de cultivo

1. Caldo Trypticasa de Soya (Peptona de caseína 17 g, peptona de harina de soya 3 g, D(+)-glucosa 2,5 g, cloruro de sodio 5 g, hidrógeno fosfato dipotásico 2,5 g): caldo rico utilizado para el desarrollo de microorganismos que no son exigentes. Está constituido por extracto de carne y peptona de gelatina lo que proporciona los nutrientes necesarios para el cultivo de una gran variedad de microorganismos.

2. Agar LB (Tryptona 10 g, extracto de levadura 5 g y cloruro de sodio, pH=7): agar rico, que contiene los nutrientes suficientes que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos que no son exigentes. El agar le confiere la capacidad de soporte al medio.

3. Agar MacConkey (Peptona 17 g, pluripectona 3 g, lactosa 10 g, sales biliares 1,5 g, cloruro de sodio 5 g, agar 13,5 g, rojo neutro 0,03 g y cristal violeta 0,001%): medio de cultivo selectivo y diferencial. La presencia de las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, pero a su vez, permiten el desarrollo de bacterias Gram negativas. Adicionalmente, la lactosa y el

rojo neutro permiten establecer una diferencia en relación a la fermentación de lactosa. Las bacterias Gram negativas capaces de fermentar la lactosa, se presentan como colonias de color rojo o rosadas mediante un viraje de color producto de cambios en el pH, mientras que las bacterias Gram negativas incapaces de fermentar dicho azúcar, se presentan como colonias incoloras.

4. Agar Mueller-Hinton (Infusión de carne 300 g, peptona ácida de caseína 17,5 g, almidón 1,5 g, agar 15 g): medio de cultivo utilizado para la evaluación de resistencia o susceptibilidad de microorganismos frente a antibióticos. Utilizando discos de antibióticos comerciales, se realiza un antibiograma que proporciona halos alrededor de cada disco, cuya medida determina el fenotipo de resistencia pudiendo ser clasificado en resistente, intermedio o sensible.

5.2.3 Cepas bacterianas

Las 30 cepas de *Acinetobacter baumannii* utilizadas en este estudio (tabla II), fueron aisladas tanto de pacientes como del ambiente del SN y de la UTI del HUC, en el período comprendido entre Junio 2006 y Julio 2007. Entre las cepas evaluadas, se encuentran algunas provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales internados en la UTI, las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Bacteriología del HUC. Otras cepas fueron aisladas de distintas superficies inanimadas del SN, entre las cuales se encuentran: incubadoras, estetoscopios, historias, barandas, tubos, fregaderos, mesón de recepción, jabón, monitor, nebulizador, nevera, estante, timbre, carro de cura, puerta, autoclave, peso, esterilizador y ventilador. Estos aislados fueron obtenidos, analizados y tipificados por la Dra. Adriana Chalbaud (Chalbaud, 2010).

Tabla II. Nomenclatura y procedencia de las cepas de *A. baumannii* utilizadas en este estudio.

Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia
AB2	Pacientes UTI	AN1	Ambiente SN	AU4	Ambiente UTI
AB4	Pacientes UTI	AN2	Ambiente SN	AU7	Ambiente UTI
AB7	Pacientes UTI	AN4	Ambiente SN	AU8	Ambiente UTI
AB8	Pacientes UTI	AN5	Ambiente SN	AU14	Ambiente UTI
AB9	Pacientes UTI	AN6	Ambiente SN	AU15	Ambiente UTI
AB10	Pacientes UTI	AN7	Ambiente SN	AU20	Ambiente UTI
AB12	Pacientes UTI	AN8	Ambiente SN	AU21	Ambiente UTI
AB15	Pacientes UTI	AN10	Ambiente SN	AU23	Ambiente UTI
AB16	Pacientes UTI	AN14	Ambiente SN	AU34	Ambiente UTI
AB17	Pacientes UTI	AN17	Ambiente SN	AU35	Ambiente UTI

AB: *A. baumannii* aislada de pacientes internados en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI); AN: *A. baumannii* aislada del ambiente del Servicio de Neonatología (SN); AU: *A. baumannii* aislada del ambiente de la UTI.

5.3 Métodos

5.3.1 Corroboración bioquímica, microbiológica y molecular de cepas de *A. baumannii*.

5.3.1.1 Pruebas bioquímicas

1. Tinción Gram

Se agregó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se fijó una colonia, luego se agregaron unas gotas de cristal violeta y se esperó 1 min. Se lavó la preparación con agua destilada, se agregaron gotas de Lugol y se esperó 1 min. Se lavó la preparación con una mezcla de alcohol:acetona (7:3) y se esperaron 20 s. Nuevamente se lavó con agua destilada y se agregaron unas gotas de Safranina, dejando actuar por 30 s. Finalmente se observó la preparación al microscopio, utilizando aceite de inmersión, con el aumento de 100X. Las bacterias Gram negativas se apreciaron con una coloración roja.

2. Prueba de la Catalasa

Bajo condiciones de esterilidad, se agregó una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. Con un palillo estéril se tomó una muestra de una colonia y se puso en contacto con el reactivo. La presencia de burbujas indicó un resultado positivo, que corresponde a la presencia de enzimas catalasas.

3. Prueba de la Oxidasa

Bajo condiciones de esterilidad, se agregó una gota del reactivo de Kovacs en un papel de filtro. Con un palillo estéril se tomó una muestra de una colonia y se rayó sobre el papel de filtro. La ausencia de cambios en la coloración, indicó un resultado negativo.

5.3.1.2 Pruebas microbiológicas

1. Crecimiento en agar LB a 44°C

Bajo condiciones de esterilidad, las cepas se sembraron por agotamiento en placas de agar LB y se incubaron en la estufa a 44 °C durante 24 h.

2. Crecimiento en agar MacConkey a 37 °C

Bajo condiciones de esterilidad, las cepas se sembraron por agotamiento en placas de agar MacConkey y se incubaron en la estufa a 37 °C durante 24 h.

5.3.1.3 Pruebas moleculares

1. Aislamiento de DNA genómico de cepas de *A. baumannii*.

El aislamiento de DNA se obtuvo a través del método de Levesqué y col. (1995). Para ello, se tomaron 200 µL de un cultivo bacteriano crecido toda la noche y se agregaron 800 µL de agua Mili-Q. Esta dilución se colocó a baño de

maría en agua hirviendo durante 10 min. La muestra se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min y se sirvieron alícuotas de 500 µL.

2. Detección molecular de una región del gen 16S con iniciadores universales mediante PCR.

Para verificar la calidad del DNA aislado, se realizó una PCR universal para bacterias, amplificando una región de la subunidad 16S del DNA de 996 pb, mediante la preparación de una mezcla de reacción de PCR con agua, buffer, dNTPs, iniciadores y *Taq* polimerasa en sus respectivas concentraciones y siguiendo un programa de ciclos determinado (tabla III).

3. Detección molecular de una región del gen 16S con iniciadores especies específicos mediante PCR.

Para verificar la identificación de *A. baumannii*, se realizó una PCR con iniciadores especie específicos, amplificando una región de la subunidad 16S del DNA de 426 pb, mediante la preparación de una mezcla de reacción de PCR con agua, buffer, dNTPs, iniciadores y *Taq* polimerasa en sus respectivas concentraciones y siguiendo un programa de ciclos determinado (tabla III).

4. Detección molecular de la presencia de integrones clase 1 mediante PCR.

La detección de los integrones clase 1 se realizó mediante una PCR con iniciadores 3C'y 5C', mediante la preparación de una mezcla de reacción de PCR con agua, buffer, dNTPs, iniciadores y *Taq* polimerasa en sus respectivas concentraciones y siguiendo un programa de ciclos determinado (tabla III).

Tabla III. Condiciones de amplificación del gen 16S con iniciadores universales y especies específicos y de los integrones clase 1, en cepas de *A. baumannii*.

Gen	Iniciadores	Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
16S	Universales	Calentamiento	95 °C	3 min	1
		Desnaturalización	95 °C	30 s	
		Hibridación	57 °C	60 s	30
		Extensión	68 °C	60 s	
		Extensión final	68 °C	5 min	1
16S	Especie específicos	Calentamiento	95 °C	3 min	1
		Desnaturalización	95 °C	30 s	
		Hibridación	55 °C	60 s	30
		Extensión	68 °C	60 s	
		Extensión final	68 °C	5 min	1
Integrones clase 1	5'CS y 3'CS	Calentamiento	95 °C	3 min	1
		Desnaturalización	95 °C	30 s	
		Hibridación	50 °C	60 s	30
		Extensión	68 °C	60 s	
		Extensión final	68 °C	5 min	1

5. Electroforesis en geles de agarosa.

Para la visualización de los productos obtenidos mediante PCR, se realizó una corrida en geles de agarosa al 1,2 %, en TBE 1X, con buffer de carga 1X, utilizando como referencia el marcador de tamaño 1kb plus de la marca *New England*. Para preparar el gel, se pesó la agarosa de acuerdo a las condiciones respectivas, se disolvió en buffer TBE 1X y se le agregó bromuro de etidio. Se colocaron los peines y se dejó solidificar el gel. Se colocó dentro de la cámara de electroforesis y se le agregó buffer de corrida TBE 1X. Las muestras analizadas se mezclaron con el buffer de carga y se sembraron en los bolsillos, acompañadas del marcador de tamaño y los controles positivo y negativo. Se realizó la corrida a 100 mV por aproximadamente 40 min. Finalmente, se visualizó el gel en un equipo de fotodocumentación Gel Doc 1.000 (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, CA).

5.3.2 Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante el método de dilución en placas.

Para la determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de *A. baumannii*, se prepararon placas de agar LB suplementadas con las distintas concentraciones de antibióticos a evaluar. Bajo condiciones de esterilidad, se sembraron las cepas por agotamiento en el medio suplementado con antibiótico y las placas se incubaron en la estufa a 37 °C durante 24 h.

El criterio de elección de las concentraciones de los antibióticos empleadas, se basó en la concentración de uso clínico de los mismos, la mitad y el doble de dicha concentración (tabla IV) (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2007).

Tabla IV. Concentraciones de antibióticos utilizadas en la determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina, mediante el método de dilución en placas.

Antibióticos	Concentraciones (µg/mL)		
	½[uso]	[uso]	2[uso]
Amikacina	15	30	60
Tetraciclina	15	30	60

½[uso]: mitad de la concentración a la que se utiliza el antibiótico; [uso]: concentración a la que se utiliza el antibiótico; 2[uso]: doble de la concentración a la que se utiliza el antibiótico.

5.3.3 Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante el método de difusión en disco.

Para la determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos, se preparó agar Mueller-Hinton para la realización de antibiogramas. Para ello, se ajustó la

densidad óptica de los cultivos bacterianos a 0,9 U (3×10^8 ufc/mL). Utilizando un hisopo estéril se sembró un césped bacteriano, rayando sobre el medio en tres direcciones diferentes. Se situaron los discos de antibióticos equidistantes sobre el medio y las placas se incubaron en la estufa a 37 °C durante 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se midió el halo de inhibición de crecimiento bacteriano formado alrededor de cada disco y se determinó el fenotipo de cada cepa, de acuerdo al diámetro del halo formado, según los criterios descritos por *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

5.3.4 Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de *A. baumannii* creciendo en biopelícula.

Para la determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos en este formato de crecimiento, se utilizaron microplacas de 96 pozos para el desarrollo de las biopelículas. Para ello, se ajustó la densidad óptica de los cultivos bacterianos a 0,9U y se sembraron 200 µL en los pozos de las microplacas, acompañados del control positivo (cultivo bacteriano) y del control negativo (caldo tripticasa de soya). Las microplacas se incubaron a 37 °C sin agitación durante 48 h, con recambio diario del medio de cultivo. Una vez formada la biopelícula, se añadieron los antibióticos a diferentes concentraciones ($\frac{1}{2}$ [uso] = 15 µg/mL; [uso] = 30µg/mL; 2[uso] = 60 µg/mL y 4[uso] = 120µg/mL). Las siembras se realizaron por duplicado y en microplacas distintas para evaluar el efecto del antibiótico a 1 h y 24 h de acción. Para el revelado de las placas, se retiró el medio y se añadieron 200 µL de cristal violeta (0,01 %) en los pozos de la microplaca y se dejó reposar por 30 min, posteriormente se lavó con agua destilada y se añadieron 200 µL de etanol (95 %)

en los pozos de la microplaca y se dejó reposar 30 min. La biomasa formada se cuantificó midiendo la densidad óptica en cada pozo a 630 nm en un lector de placas (BIO-RAD Modelo 550).

El punto de corte para los valores de densidad óptica (DO) obtenidos, se definió como 3 desviaciones estándar por encima del valor de la densidad óptica del control negativo (DOc). Cada cepa fue clasificada como productora de una biopelícula débil si la $DO \leq 2(DOc)$, productora de una biopelícula moderada si $2(DOc) < DO \leq 4(DOc)$ y productora de una biopelícula fuerte si la $DO \geq 4(DOc)$ (Passerini y col., 2007)

6. RESULTADOS

6.1 Corroboración bioquímica, microbiológica y molecular de cepas de *A. baumannii*.

Con la finalidad de realizar la corroboración de la identificación de las cepas de *A. baumannii* utilizadas en este estudio, se realizaron tanto pruebas bioquímicas como microbiológicas que incluyeron: tinción Gram, prueba de la catalasa y oxidasa, crecimiento en agar LB a 44 °C y en agar MacConkey a 37 °C (sección de materiales y métodos, apartado 5.3.1.1 y 5.3.1.2), los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.

Las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas provenientes tanto de pacientes como de los ambientes del SN y de la UTI del HUC, corresponden a cocobacilos Gram negativos (figura 5), con reacción positiva a la prueba de la catalasa y reacción negativa a la prueba de la oxidasa. Adicionalmente, las cepas presentaron crecimiento en medio LB a 44°C, temperatura característica de la especie *baumannii* y crecimiento en agar MacConkey a 37°C, lo que las clasifica como bacterias Gram negativas y no fermentadoras de lactosa (tabla V). Estos resultados concuerdan con los datos reportados previamente por Chalbaud en el año 2010.

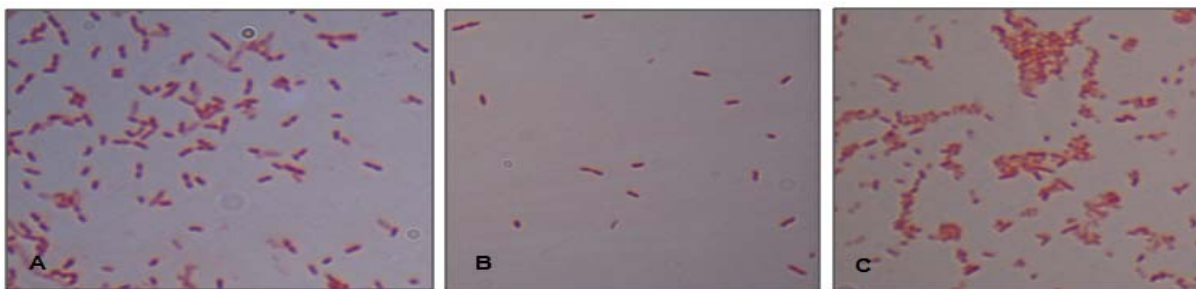


Figura 5. Registro fotográfico de la tinción Gram de las cepas de *A. baumannii* provenientes de (A) pacientes, (B) ambiente del SN y (C) ambiente de la UTI del HUC. Cocobacilos Gram negativos, teñidos de color rojo debido a la safranina, colorante de contraste utilizado para la tinción Gram.

Tabla V. Evaluación bioquímica y microbiológica de las cepas de *A. baumannii* analizadas.

Cepa	Procedencia	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	Agar LB (44°C)	Agar MacConkey (37°C)
AB2	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB4	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB7	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB8	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB9	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB10	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB12	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB15	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB16	Pacientes	GN	+	-	+	+
AB17	Pacientes	GN	+	-	+	+
AN1	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN2	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN4	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN5	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN6	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN7	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN8	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN10	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN14	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AN17	Servicio de Neonatología	GN	+	-	+	+
AU4	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU7	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU8	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU14	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU15	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU20	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU21	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU23	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU34	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+
AU35	Unidad de Terapia Intensiva	GN	+	-	+	+

Tinción Gram: (GN) Bacterias Gram negativas; **Catalasa y Oxidasa:** (+) Positivo, (-) Negativo; **Crecimiento LB (44°C) y Crecimiento MacConkey (37°C):** (+) Crecimiento bacteriano.

Con la finalidad de complementar los resultados obtenidos a través de las pruebas bioquímicas y microbiológicas, se analizaron las 30 cepas de *A. baumannii* mediante pruebas moleculares para corroborar la identificación de las

mismas (tabla VI). Entre las pruebas realizadas se encuentran la amplificación por PCR con iniciadores universales y especie específicos de una región del gen 16S, así como la detección de integrones clase 1 (sección de materiales y métodos, apartado 5.3.1.3). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 6 - 8.

En la figura 6 se muestra una banda de 996 pb, correspondiente a la amplificación con iniciadores universales de una región del gen 16S del DNA ribosomal de las cepas de *A. baumannii*, que permitió corroborar el aislamiento del material genético, la integridad del mismo y su procedencia bacteriana, debido a que esta región pertenece a un gen esencial conservado en todos los géneros bacterianos.

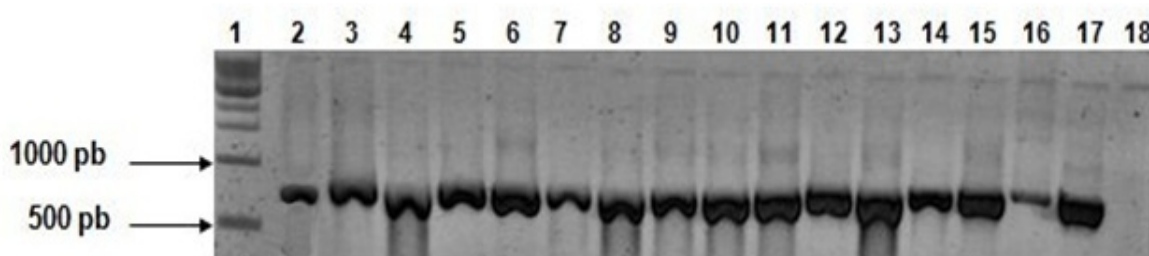


Figura 6. Registro fotográfico de la amplificación por PCR con iniciadores universales de una región del gen 16S del DNA de cepas de *A. baumannii*. Carril 1: marcador de tamaño 1 kb; cepas carril 2: AB2; carril 3: AB8; carril 4: AB9; carril 5: AB16; carril 6: AB17; carril 7: AN2; carril 8: AN4; carril 9: AN5; carril 10: AN8; carril 11: AN10; carril 12: AU8; carril 13: AU15; carril 14: AU21; carril 15: AU34, carril 16: AU35; carril 17: control positivo; carril 18: control negativo.

En la figura 7 se muestra una banda de 426 pb, correspondiente a la amplificación con iniciadores especie específicos de una región del gen 16S del DNA ribosomal de las cepas de *A. baumannii*, que permitió la verificación de la identificación de las cepas hasta el nivel de la especie, debido a que esta región es altamente conservada en bacterias de la especie *baumannii*.

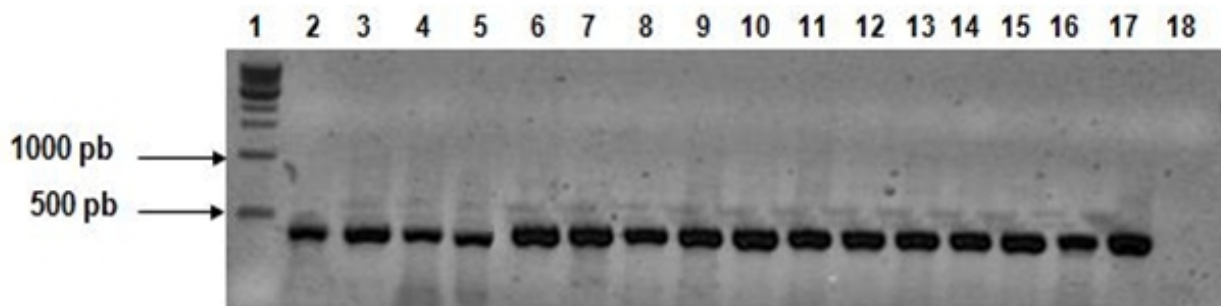


Figura 7. Registro fotográfico de la amplificación por PCR con iniciadores especie específicos de una región del gen 16S del DNA de cepas de *A. baumannii*. Carril 1: marcador de tamaño 1 kb; cepas carril 2: AB2; carril 3: AB8; carril 4: AB9; carril 5: AB16; carril 6: AB17; carril 7: AN2; carril 8: AN4; carril 9: AN5; carril 10: AN8; carril 11: AN10; carril 12: AU8; carril 13: AU15; carril 14: AU21; carril 15: AU34, carril 16: AU35; carril 17: control positivo; carril 18: control negativo.

En la figura 8 se muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a integrones clase 1, que contienen regiones variables de diferentes tamaños (entre 100 y 2000 pb) correspondientes a los casetes genéticos que codifican para la resistencia a antimicrobianos en cepas de *A. baumannii*. Estos elementos genéticos son uno de los marcadores moleculares presentes en cepas multirresistentes de origen clínico.

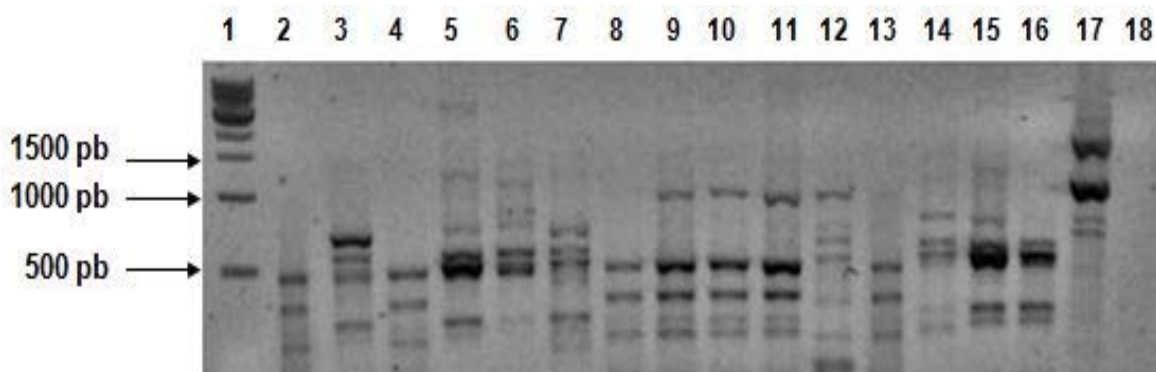


Figura 8. Registro fotográfico de la detección por PCR de integrones clase 1 en cepas de *A. baumannii*. Carril 1: marcador de tamaño; cepas carril 2: AB2; carril 3: AB8; carril 4: AB9; carril 5: AB16; carril 6: AB17; carril 7: AN2; carril 8: AN4; carril 9: AN5; carril 10: AN8; carril 11: AN10; carril 12: AU8; carril 13: AU15; carril 14: AU21; carril 15: AU34, carril 16: AU35; carril 17: control positivo; carril 18: control negativo.

Tabla VI. Detección del gen 16S y de integrones clase 1 en las cepas de *A. baumannii*.

Cepa	Gen 16S (iniciadores universales)	Gen 16S (iniciadores especie específicos)	Integrones clase 1 (5'CS y 3'CS)
AB2	+	+	+
AB4	+	+	+
AB7	+	+	+
AB8	+	+	+
AB9	+	+	+
AB10	+	+	+
AB12	+	+	+
AB15	+	+	+
AB16	+	+	+
AB17	+	+	+
AN1	+	+	+
AN2	+	+	+
AN4	+	+	+
AN5	+	+	+
AN6	+	+	+
AN7	+	+	+
AN8	+	+	+
AN10	+	+	+
AN14	+	+	+
AN17	+	+	+
AU4	+	+	+
AU7	+	+	+
AU8	+	+	+
AU14	+	+	+
AU15	+	+	+
AU20	+	+	+
AU21	+	+	+
AU23	+	+	+
AU34	+	+	+
AU35	+	+	+

(+): Presencia del gen

Una vez corroborada la identificación de las cepas en estudio, se procedió a evaluar la acción de los antibióticos amikacina y tetraciclina, los cuales son comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones causadas por *A.*

baumannii. Con la finalidad de determinar el fenotipo de resistencia a antibióticos de las cepas creciendo en forma libre, se utilizaron dos metodologías: la siembra en placas de agar suplementadas con distintas concentraciones de antibiótico y la metodología de difusión en disco o antibiograma.

6.2 Determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre.

6.2.1 Placas de agar suplementadas con antibióticos.

Con la finalidad de evaluar el fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, se suplementaron placas de agar LB con distintas concentraciones de los antibióticos y se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, lo que corresponde a resistencia y sensibilidad de las bacterias respectivamente (sección de materiales y métodos, apartado 5.3.2). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas VII y VIII.

a) Evaluación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante la metodología de dilución en placas.

Al evaluar el fenotipo de resistencia a amikacina de las cepas de *A. baumannii* mediante esta metodología, se encontraron los resultados mostrados en la tabla VII.

De las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, solo AB10 fue sensible a la concentración de 30 µg/mL de amikacina, que es la concentración utilizada para ensayos clínicos, mientras que el resto de las cepas pudieron crecer en presencia de esta concentración. Las cepas AB2, AB7, AB8, AB9, AB12 y

AB15 fueron capaces de crecer al doble de esta concentración de amikacina (60 µg/mL) (tabla VII).

En cuanto a las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN, solo AN7 presentó resistencia a amikacina (30 µg/mL), mientras que las 9 cepas restantes (AN1, AN2, AN4, AN5, AN6, AN8, AN10, AN14 y AN17) fueron sensibles a esta concentración. Entre estas cepas sensibles, 4 de ellas (AN2, AN6, AN10 y AN17) presentaron sensibilidad a todas las concentraciones de amikacina evaluadas (tabla VII).

Las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI, presentaron la siguiente distribución: 7 cepas (AU4, AU7, AU8, AU14 AU15, AU20 y AU35) sensibles a amikacina (30 µg/mL) y 3 cepas (AU21, AU23 y AU34) resistentes a esta concentración. Solo AU23 pudo crecer en presencia de la concentración más alta de amikacina ensayada (60 µg/mL) (tabla VII).

Para estos experimentos se utilizó como control la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PB3), la cual fue previamente reportada como resistente a amikacina por Chalbaud en el año 2010.

Tabla VII. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante el método de dilución en placas.

Cepa	Crecimiento a diferentes concentraciones			Fenotipo
	15 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	
AB2	+	+	+	Resistente
AB4	+	+	-	Resistente
AB7	+	+	+	Resistente
AB8	+	+	+	Resistente
AB9	+	+	+	Resistente
AB10	+	-	-	Sensible
AB12	+	+	+	Resistente
AB15	+	+	+	Resistente
AB16	+	+	-	Resistente

AB17	+	+	-	Resistente
AN1	+	-	-	Sensible
AN2	-	-	-	Sensible
AN4	+	-	-	Sensible
AN5	+	-	-	Sensible
AN6	-	-	-	Sensible
AN7	+	+	-	Resistente
AN8	+	-	-	Sensible
AN10	-	-	-	Sensible
AN14	+	-	-	Sensible
AN17	-	-	-	Sensible
AU4	+	-	-	Sensible
AU7	-	-	-	Sensible
AU8	-	-	-	Sensible
AU14	+	-	-	Sensible
AU15	-	-	-	Sensible
AU20	-	-	-	Sensible
AU21	+	+	-	Resistente
AU23	+	+	+	Resistente
AU34	+	+	-	Resistente
AU35	-	-	-	Sensible
PB3	+	+	+	Resistente

(+): Crecimiento bacteriano; (-): Ausencia de crecimiento bacteriano. En **negrita** se destaca la concentración de uso del antibiótico, a partir de la cual se determinó el fenotipo de resistencia a amikacina. Como control se utilizó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PB3) previamente reportada como resistente a amikacina. Los datos del crecimiento bacteriano corresponden a resultados de valores triplicados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, la proporción de cepas sensibles a 30 µg/mL de amikacina (17) es mayor a la proporción de cepas resistentes a dicha concentración (13). La distribución de los fenotipos indica que la mayor cantidad de cepas resistentes a amikacina fueron provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales (9), mientras que la mayor cantidad de cepas sensibles a este antibiótico fueron provenientes del ambiente del SN (9) y del ambiente de la UTI (7) (figura 9).

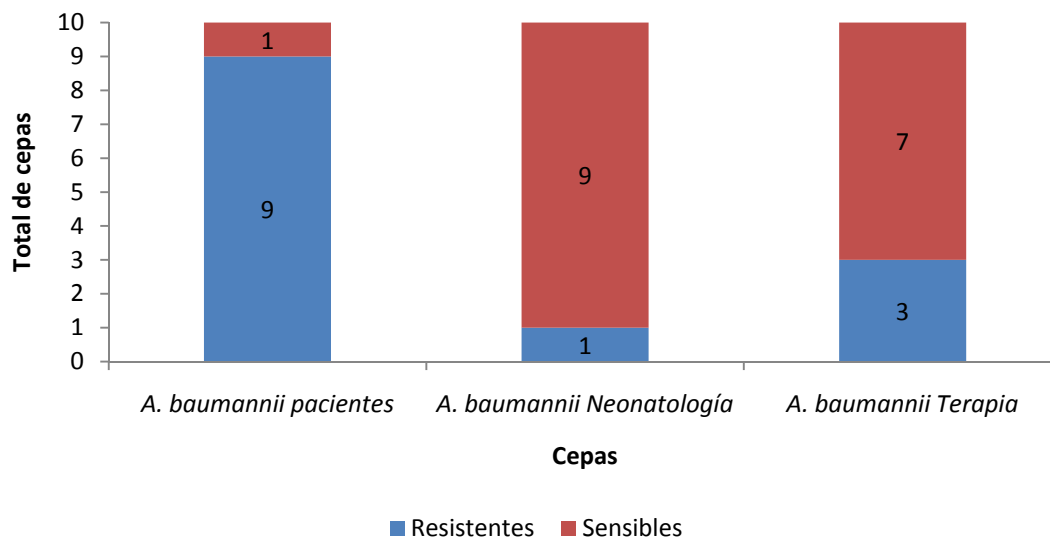


Figura 9. Distribución del fenotipo de resistencia a amikacina (30 µg/mL) en las cepas de *A. baumannii*, obtenidos mediante el método de placas suplementadas con antibiótico.

b) Evaluación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante la metodología de dilución en placas.

Con la finalidad de comparar el efecto de otro antibiótico empleado como terapia contra este microorganismo, se utilizaron placas de agar suplementadas con diferentes concentraciones de tetraciclina (tabla VIII).

De las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, 8 de ellas (AB2, AB4, AB7, AB9, AB12, AB15, AB16 y AB17) fueron resistentes a 30 µg/mL de tetraciclina, la cual es la concentración utilizada a nivel clínico. En este grupo de cepas se destaca el comportamiento de 5 de ellas (AB4, AB7, AB12, AB16 y AB17) que fueron capaces de crecer en presencia de todas las concentraciones de tetraciclina ensayadas. Por el contrario, las cepas AB8 y AB10 mostraron

sensibilidad a las 3 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas (tabla VIII).

En cuanto a las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN, hay una distribución equitativa entre los fenotipos. La mitad de las cepas (AN1, AN2, AN5, AN14 y AN17) resultaron ser resistentes a 30 µg/mL de tetraciclina, destacando que AN1 y AN5 pudieron crecer inclusive en presencia de la mayor concentración de tetraciclina empleada (60 µg/mL), mientras que la otra mitad de las cepas (AN4, AN6, AN7, AN8, y AN10) presentaron sensibilidad a la concentración de uso de tetraciclina (30 µg/mL) (tabla VIII).

De las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI, AU14, AU15 y AU35 fueron sensibles a 30µg/mL de tetraciclina, mientras que el resto de las cepas (AU4, AU7, AU8, AU20, AU21, AU23 y AU34) presentaron resistencia a esta concentración (tabla VIII).

Igualmente, para estos experimentos se utilizó como control la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PB3), la cual fue previamente reportada como resistente a tetraciclina por Chalbaud en el año 2010.

Tabla VIII. Determinación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante el método de dilución en placas.

Cepa	Crecimiento a diferentes concentraciones			Fenotipo
	15 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	
AB2	+	+	-	Resistente
AB4	+	+	+	Resistente
AB7	+	+	+	Resistente
AB8	-	-	-	Sensible
AB9	+	+	-	Resistente
AB10	-	-	-	Sensible
AB12	+	+	+	Resistente
AB15	+	+	-	Resistente
AB16	+	+	+	Resistente

AB17	+	+	+	Resistente
AN1	+	+	+	Resistente
AN2	+	+	-	Resistente
AN4	-	-	-	Sensible
AN5	+	+	+	Resistente
AN6	-	-	-	Sensible
AN7	-	-	-	Sensible
AN8	-	-	-	Sensible
AN10	+	-	-	Sensible
AN14	+	+	-	Resistente
AN17	+	+	-	Resistente
AU4	+	+	+	Resistente
AU7	+	+	-	Resistente
AU8	+	+	-	Resistente
AU14	-	-	-	Sensible
AU15	+	-	-	Sensible
AU20	+	+	+	Resistente
AU21	+	+	+	Resistente
AU23	+	+	-	Resistente
AU34	+	+	+	Resistente
AU35	-	-	-	Sensible
PB3	+	+	+	Resistente

(+): Crecimiento bacteriano; (-): Ausencia de crecimiento bacteriano. En negrita se destaca la concentración de uso del antibiótico, a partir de la cual se determinó el fenotipo de resistencia a tetraciclina. Como control se utilizó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PB3) previamente reportada como resistente a tetraciclina. Los datos del crecimiento bacteriano corresponden a resultados de valores triplicados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, la proporción de cepas resistentes a 30 µg/mL de tetraciclina (20) es mayor a la proporción de cepas sensibles a dicha concentración (10). La distribución de los fenotipos indica que la mayor cantidad de cepas resistentes a tetraciclina fueron provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales y del ambiente de la UTI, mientras que en el grupo de cepas provenientes del ambiente del SN se obtuvo una distribución equitativa entre ambos fenotipos (figura 10).

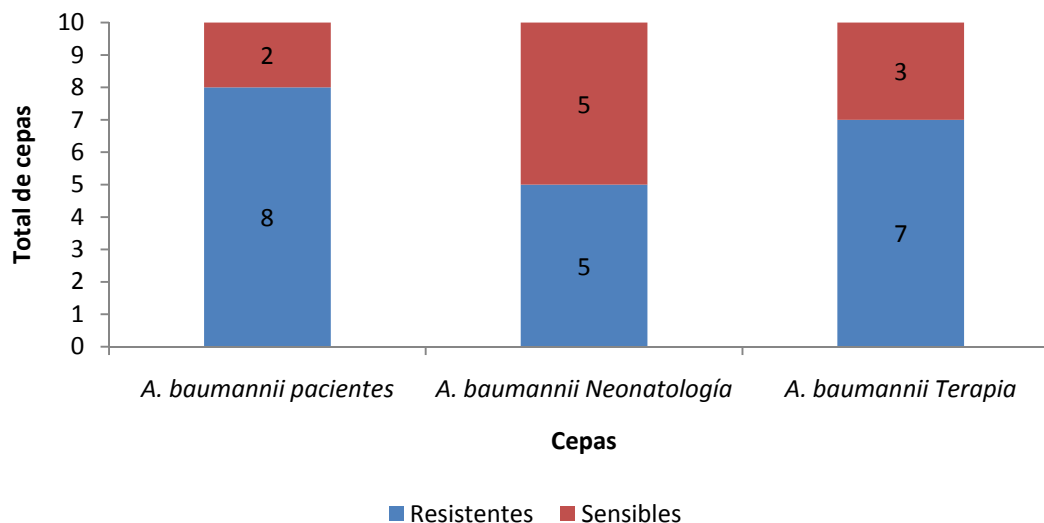


Figura 10. Distribución del fenotipo de resistencia a tetraciclina (30 µg/mL) en las cepas de *A. baumannii*, obtenidos mediante el método de placas suplementadas con antibiótico.

Al comparar el efecto de los antibióticos evaluados sobre las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, se encontró que bajo esta metodología existe una mayor proporción de cepas resistentes al antibiótico tetraciclina (20) que a la amikacina (13), destacando que hay una proporción de estas cepas que es resistente a ambos antibióticos (11), provenientes en su mayoría de pacientes con infecciones nosocomiales (tablas VII y VIII).

6.2.2 Metodología de difusión en disco o antibiograma.

Con la finalidad de evaluar la susceptibilidad a los antibióticos amikacina y tetraciclina a través de una forma rápida y sencilla, se llevó a cabo la metodología de difusión en disco. Para ello, se promovió el crecimiento de un césped bacteriano, sobre el cual se colocaron discos suplementados con la concentración de uso de los antibióticos y se evaluó la formación de halos de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de cada disco (sección de materiales y métodos, apartado 5.3.3). Esta metodología permitió obtener un fenotipo resistente,

intermedio o sensible, a los antibióticos ensayados, de acuerdo al diámetro del halo formado, lo que permite diseñar un tratamiento adecuado para las infecciones causadas por las bacterias en estudio. Los resultados obtenidos mediante esta metodología se muestran en las tablas IX y X.

En la figura 11 se muestra la técnica de difusión en disco, con cepas de *A. baumannii* (AB8, AN5 y AU4) en presencia de discos de amikacina (30 µg/mL) y discos de tetraciclina (30 µg/mL).

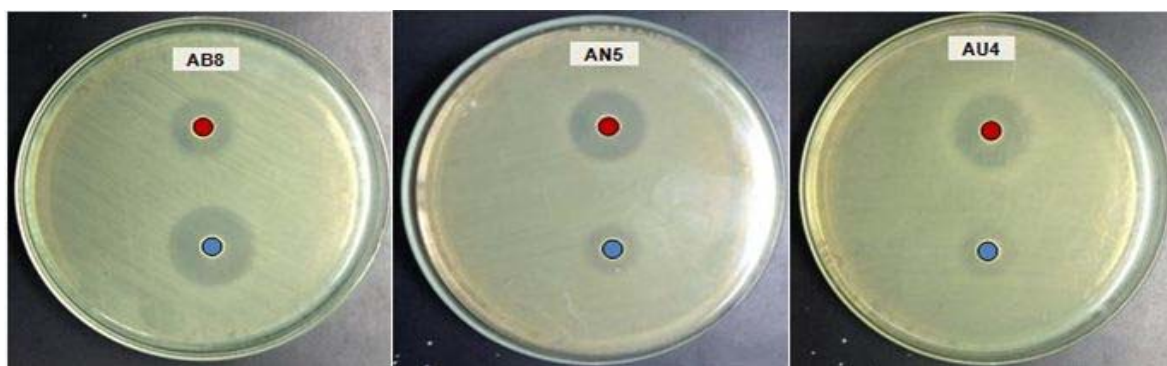


Figura 11. Registro fotográfico de la técnica de difusión en disco (antibiograma) en las cepas de *A. baumannii*. En color rojo: discos de amikacina, en color azul: discos de tetraciclina. Cepa AB8: resistente a amikacina y sensible a tetraciclina; cepa AN5: sensible a amikacina, resistente a tetraciclina; cepa AU8: sensible a amikacina y resistente a tetraciclina.

a) Evaluación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante la metodología de difusión en disco.

Al evaluar el fenotipo de resistencia a amikacina de las cepas de *A. baumannii* mediante esta metodología, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla IX. De las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, solo AB10 presentó un diámetro de halo correspondiente al fenotipo sensible a la concentración del disco de amikacina (30 µg/mL), mientras que las cepas AB2, AB4, AB7, AB9, AB12, AB15, AB16 y AB17 presentaron halos con diámetros

menores de 14 mm, lo que las clasifica con un fenotipo resistente a la concentración de amikacina ensayada (tabla IX). Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la metodología de dilución en placas, a excepción de la cepa AB8 (tabla VII).

En cuanto a las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN, las cepas AN1, AN2, AN4, AN5, AN6, AN8, AN10, AN14 y AN17 presentaron halos con diámetros iguales o mayores a 17 mm, correspondientes al fenotipo sensible a la concentración de 30 µg/mL de amikacina (tabla IX). Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la metodología de dilución en placas, a excepción de la cepa AN7 (tabla VII).

En relación a las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI, las cepas AU21, AU23 y AU34 presentaron halos con diámetros menores a 14 mm, lo que las clasifica con un fenotipo resistente a 30 µg/mL de amikacina, mientras que las cepas AU4, AU7, AU8, AU15, AU20 y AU35 presentaron halos con diámetros iguales o mayores a 17 mm por lo que fueron clasificadas de fenotipo sensible en presencia de la concentración de amikacina ensayada (tabla IX). Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la metodología de dilución en placas, a excepción de la cepa AU14 (tabla VII).

Las cepas AB8, AN7 y AU14 presentaron un fenotipo intermedio, lo que difiere con el fenotipo obtenido mediante la metodología de dilución en placas, en la cual las cepas AB8 y AN7 fueron clasificadas con un fenotipo resistente, mientras que la cepa AU14 presentó un fenotipo sensible (tabla VII). Los resultados obtenidos en cada grupo de cepas concuerdan con los datos reportados previamente por Chalbaud en el año 2010.

Para estos experimentos se utilizó como control la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PB3), la cual fue previamente reportada como resistente a amikacina por Chalbaud en el año 2010.

Tabla IX. Determinación del fenotipo de resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante el método de difusión en disco.

Cepas	Diámetro del halo (mm)	Fenotipo
AB2	10	Resistente
AB4	12	Resistente
AB7	11	Resistente
AB8	15	Intermedio
AB9	11	Resistente
AB10	18	Sensible
AB12	12	Resistente
AB15	13	Resistente
AB16	13	Resistente
AB17	11	Resistente
AN1	18	Sensible
AN2	17	Sensible
AN4	18	Sensible
AN5	17	Sensible
AN6	21	Sensible
AN7	15	Intermedio
AN8	17	Sensible
AN10	19	Sensible
AN14	18	Sensible
AN17	17	Sensible
AU4	17	Sensible
AU7	18	Sensible
AU8	17	Sensible
AU14	15	Intermedio
AU15	20	Sensible
AU20	19	Sensible
AU21	11	Resistente
AU23	13	Resistente
AU34	13	Resistente
AU35	17	Sensible
PB3	12	Resistente

Se muestran los valores de resultados obtenidos por triplicado. Los criterios utilizados: halos ≤ 14 mm = resistente; halos 15-16 mm = intermedio; halos ≥ 17 mm = sensible.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que de las 30 cepas evaluadas, 16 de ellas fueron sensibles a 30 µg/mL de amikacina, 11 fueron resistentes a dicha concentración y las 3 cepas restantes presentaron un fenotipo intermedio en presencia de la concentración de amikacina ensayada. La mayor proporción de cepas sensibles fueron provenientes de los 2 ambientes ensayados SN (9) y UTI (6), mientras que la mayor proporción de cepas resistentes fueron provenientes de pacientes (8) (figura 12).

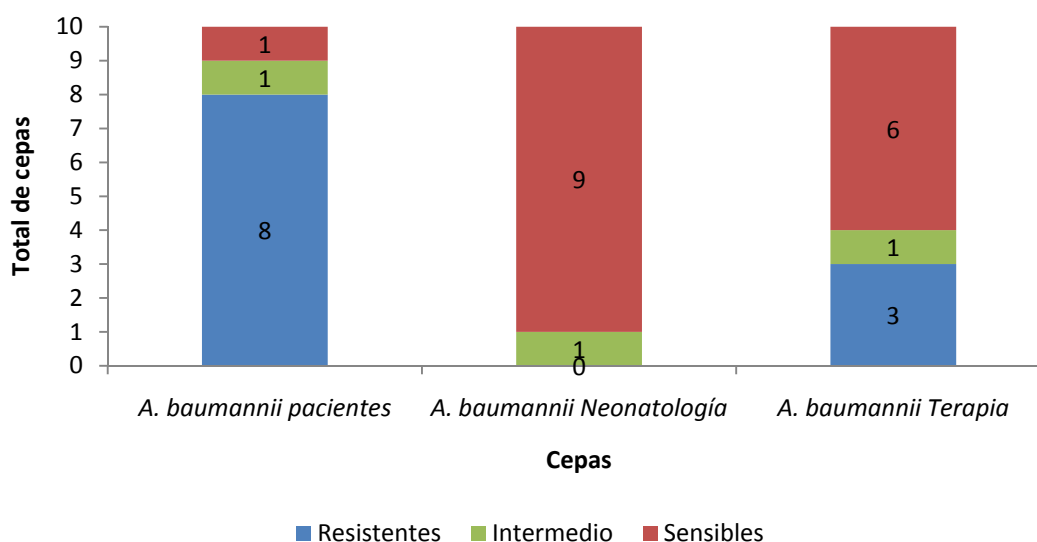


Figura 12. Distribución del fenotipo de resistencia a amikacina (30 µg/mL) en las cepas de *A. baumannii*, obtenidos mediante el método de difusión en disco.

b) Evaluación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante la metodología de difusión en disco.

Esta metodología permitió evaluar simultáneamente el fenotipo de resistencia a 2 de los antibióticos de importancia en el tratamiento de las

infecciones causadas por *A. baumannii*. Los resultados obtenidos al evaluar el fenotipo de resistencia a tetraciclina se muestran en la tabla X.

De las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, solo la cepa AB8 presentó un diámetro de halo correspondiente al fenotipo sensible en presencia de la concentración del disco de tetraciclina (30 µg/mL), mientras que las cepas AB2, AB4, AB7, AB9, AB12, AB16 y AB17 presentaron halos con diámetros menores a 11 mm, por lo que fueron clasificadas como resistentes a dicha concentración de tetraciclina (tabla X). Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la metodología de dilución en placas a excepción de las cepas AB10 y AB15 (tabla VIII).

En cuanto a las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN, se obtuvo una distribución equitativa entre el número de cepas sensibles y resistentes a tetraciclina. Las cepas AN1, AN5, AN14 y AN17 presentaron halos con diámetros iguales o menores a 11 mm, lo que las clasifica con un fenotipo resistente en presencia de la concentración del disco de tetraciclina (30 µg/mL), mientras que las cepas AN4, AN7, AN8 y AN10 presentaron halos con diámetros iguales o mayores a 15 mm, correspondiente al fenotipo sensible (tabla X). Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la metodología de dilución en placas a excepción de las cepas AN2 y AN6 (tabla VIII).

En relación a las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI, las cepas AU14 y AU35 fueron sensibles a 30 µg/mL de tetraciclina, mientras que las cepas AU4, AU8, AU21, AU23 y AU34 presentaron halos con diámetros menores a 11 mm, correspondientes al fenotipo resistente (tabla X). Estos

resultados concuerdan con los obtenidos mediante la metodología de dilución en placas, a excepción de las cepas AU7, AU15 y AU20 (tabla VIII).

Las cepas AB10, AB15, AN2, AN6, AU7, AU15 y AU20 presentaron un fenotipo intermedio, lo que difiere con el fenotipo obtenido mediante la metodología de dilución en placas, en la cual las cepas AB15, AN2, AU7 y AU20 fueron clasificadas como resistentes, mientras que las cepas AB10, AN6 y AU15 fueron clasificadas como sensibles (tabla VIII). Los resultados obtenidos en cada grupo de cepas concuerdan con los datos reportados previamente por Chalbaud en el año 2010.

Para estos experimentos también se utilizó como control la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PB3), la cual fue previamente reportada como resistente a tetraciclina por Chalbaud en el año 2010.

Tabla X. Determinación del fenotipo de resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, mediante el método de difusión en disco.

Cepas	Diámetro del halo (mm)	Fenotipo
AB2	10	Resistente
AB4	10	Resistente
AB7	10	Resistente
AB8	19	Sensible
AB9	10	Resistente
AB10	12	Intermedio
AB12	10	Resistente
AB15	13	Intermedio
AB16	09	Resistente
AB17	10	Resistente
AN1	10	Resistente
AN2	12	Intermedio
AN4	15	Sensible
AN5	09	Resistente
AN6	13	Intermedio
AN7	19	Sensible
AN8	16	Sensible

AN10	15	Sensible
AN14	09	Resistente
AN17	11	Resistente
AU4	09	Resistente
AU7	12	Intermedio
AU8	10	Resistente
AU14	16	Sensible
AU15	13	Intermedio
AU20	12	Intermedio
AU21	09	Resistente
AU23	10	Resistente
AU34	10	Resistente
AU35	18	Sensible
PB3	11	Resistente

Se muestran los valores de resultados obtenidos por triplicado. Los criterios utilizados: halos ≤ 11 mm = resistente; halos 12-14 mm = intermedio; halos ≥ 15 mm = sensible.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* evaluadas, 16 de ellas fueron resistentes a 30 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina, 7 fueron sensibles a dicha concentración y las 7 cepas restantes presentaron un fenotipo intermedio en presencia de la concentración de tetraciclina ensayada. En este caso, la mayor proporción de cepas sensibles fueron provenientes de los dos ambientes analizados (SN y UTI), mientras que en relación a las cepas resistentes, se obtuvo una distribución similar entre los 3 grupos de cepas (figura 13).

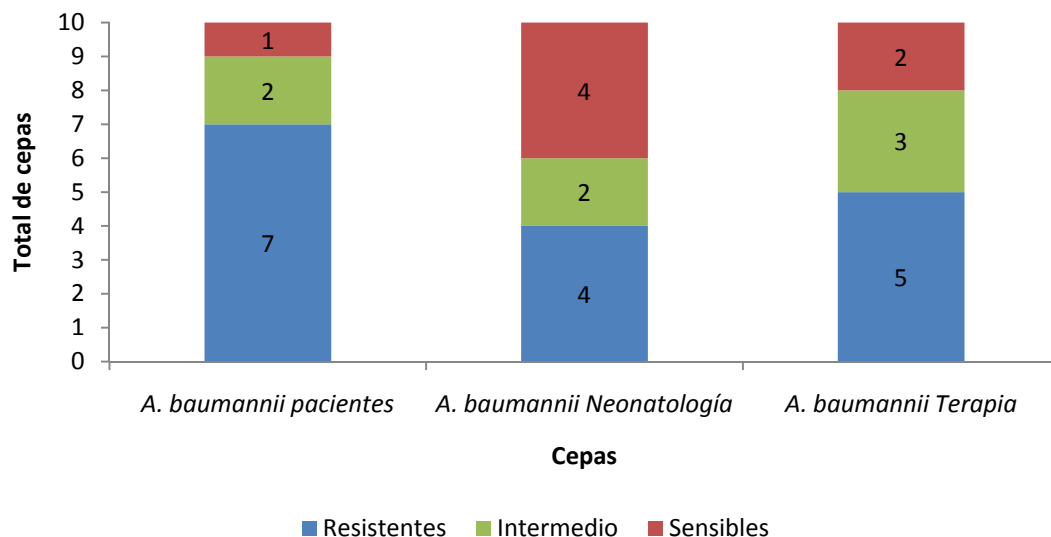


Figura 13. Distribución del fenotipo de resistencia a tetraciclina (30 µg/mL) en las cepas de *A. baumannii*, obtenidos mediante el método de difusión en disco.

Al comparar los resultados obtenidos mediante esta metodología, se encontró que existe una mayor proporción de cepas resistentes a tetraciclina (16) que a amikacina (11), destacando que hay una proporción de estas cepas que es resistente a ambos antibióticos (10), que provienen en su mayoría de pacientes con infecciones nosocomiales (tablas IX y X).

c) Comparación del efecto de los antibióticos amikacina y tetraciclina sobre las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre.

Una vez obtenidos los fenotipos de resistencia a amikacina y tetraciclina en cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, es posible comparar el efecto de estos 2 antibióticos sobre dichas cepas. De las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas, 17 de ellas presentaron sensibilidad a la concentración de amikacina utilizada (figura 12), mientras que 10 de las cepas presentaron sensibilidad a la concentración de tetraciclina utilizada (figura 13). Estos datos permiten sugerir que la amikacina representa un antibiótico más eficaz para el tratamiento de las

infecciones causadas por las bacterias analizadas en este estudio, debido a que existe una mayor proporción de cepas que son sensibles a su acción en este formato de crecimiento.

6.3 Determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *A. baumannii* creciendo en biopelículas.

Una vez obtenidos los fenotipos de resistencia a los antibióticos amikacina y tetraciclina en las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, se procedió a determinar el fenotipo de resistencia cuando las bacterias forman parte de una biopelícula. Para ello, se promovió la formación de estas asociaciones en microplacas de 96 pozos que posteriormente fueron expuestas a distintas concentraciones de amikacina y tetraciclina, que incluso cuádruplicaban el valor de la concentración de uso de ambos antibióticos (sección de materiales y métodos, apartado 5.3.4).

En la figura 14 se muestra el resultado obtenido al promover la formación de biopelículas de las cepas *A. baumannii*, para la evaluación del fenotipo de resistencia a antibióticos.

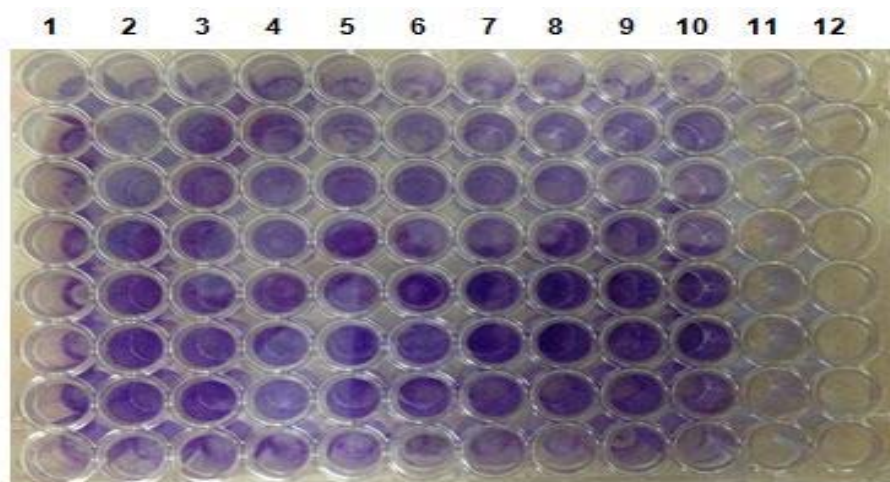


Figura 14. Registro fotográfico de la evaluación del fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *A. baumannii* formando biopelícula en microplacas de 96 pozos. Columnas 1 y 2: control positivo (biopelícula sin antibiótico); columnas 3 y 4: exposición a 15 µg/mL; columnas 5 y 6: exposición a 30 µg/mL; columnas 7 y 8: exposición a 60 µg/mL; columnas 9 y 10: exposición a 120 µg/mL; columnas 11 y 12: control negativo (medio de cultivo).

De acuerdo a los criterios descritos previamente (sección de materiales y métodos, apartado 5.3.4), las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas en este estudio fueron catalogadas como formadoras de biopelículas fuertes (tablas XI - XXII).

6.3.1 Evaluación del efecto del antibiótico amikacina en biopelículas formadas por cepas de *A. baumannii*.

a) *A. baumannii* provenientes de pacientes.

Al evaluar la susceptibilidad de estas cepas formadoras de biopelículas en presencia de distintas concentraciones de amikacina, se encontró que las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes resultaron ser resistentes a las 4 concentraciones de amikacina a las que fueron expuestas por 1 h. Los valores de DO de todas las cepas evaluadas no presentaron diferencias entre la condición control (biopelícula sin antibiótico) y la exposición a las distintas concentraciones de amikacina ensayadas (tabla XI). Estos valores se mantuvieron en el mismo

orden de magnitud, lo que sugiere que las bacterias formando biopelículas pudieron mantener la viabilidad en presencia de todas las concentraciones de amikacina utilizadas (figura 15).

Tabla XI. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Amikacina 15 µg/mL	Amikacina 30 µg/mL	Amikacina 60 µg/mL	Amikacina 120 µg/mL
AB2	2,04	2,03	1,98	1,93	1,92
AB4	1,65	1,62	1,61	1,58	1,53
AB7	1,96	1,94	1,93	1,88	1,84
AB8	1,72	1,68	1,67	1,58	1,55
AB9	1,80	1,79	1,77	1,71	1,70
AB10	1,94	1,84	1,82	1,74	1,68
AB12	1,41	1,40	1,38	1,35	1,33
AB15	1,42	1,41	1,40	1,31	1,29
AB16	1,76	1,73	1,72	1,69	1,67
AB17	1,96	1,94	1,93	1,91	1,89

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,13; Tiempo de exposición: 1 hora.

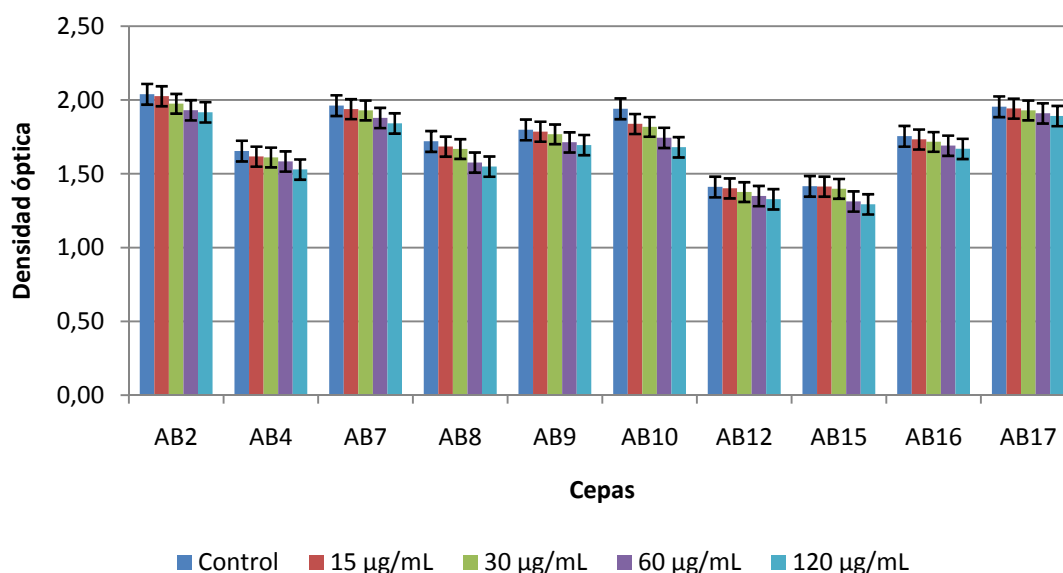


Figura 15. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora. Control: cepa sin antibiótico.

Con la finalidad de evaluar el efecto del tiempo en la resistencia a amikacina cuando las cepas de *A. baumannii* crecen en forma de biopelícula, las microplacas se incubaron por 24 h y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla XII. Se encontró que las cepas AB8 y AB10 presentaron una disminución en los valores de DO de 18,7 % y 12,2 % respectivamente, en comparación con la condición control (biopelícula sin antibiótico), mientras que las cepas AB4 y AB9 presentaron una disminución de 2,5 % y 1,8 % respectivamente (tabla XII). Al comparar los valores de DO de la condición control con los de la mayor concentración de amikacina utilizada (120 µg/mL), se encontró que las cepas AB7, AB8 y AB10 presentaron una variación en los valores de DO de 25,7 %, 22,7 % y 22,8 % respectivamente, mientras que las cepas AB12 y AB15 presentaron una disminución de 14,2 % y 14,1 % respectivamente. Al igual que en la condición de 1 hora, todas las cepas provenientes de pacientes fueron capaces de permanecer viables a todas las concentraciones de amikacina ensayadas, después de 24 horas de exposición (figura 16).

Tabla XII. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Amikacina 15 µg/mL	Amikacina 30 µg/mL	Amikacina 60 µg/mL	Amikacina 120 µg/mL
AB2	2,13	2,12	2,00	1,88	1,84
AB4	1,65	1,62	1,61	1,52	1,34
AB7	1,92	1,89	1,77	1,55	1,43
AB8	1,75	1,64	1,42	1,38	1,35
AB9	1,82	1,81	1,79	1,67	1,55
AB10	1,96	1,83	1,72	1,56	1,51
AB12	1,55	1,46	1,41	1,39	1,33
AB15	1,58	1,51	1,44	1,39	1,35
AB16	1,85	1,74	1,72	1,64	1,57

AB17	1,96	1,92	1,73	1,61	1,59
------	------	------	------	------	------

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,12; Tiempo de exposición: 24 horas.

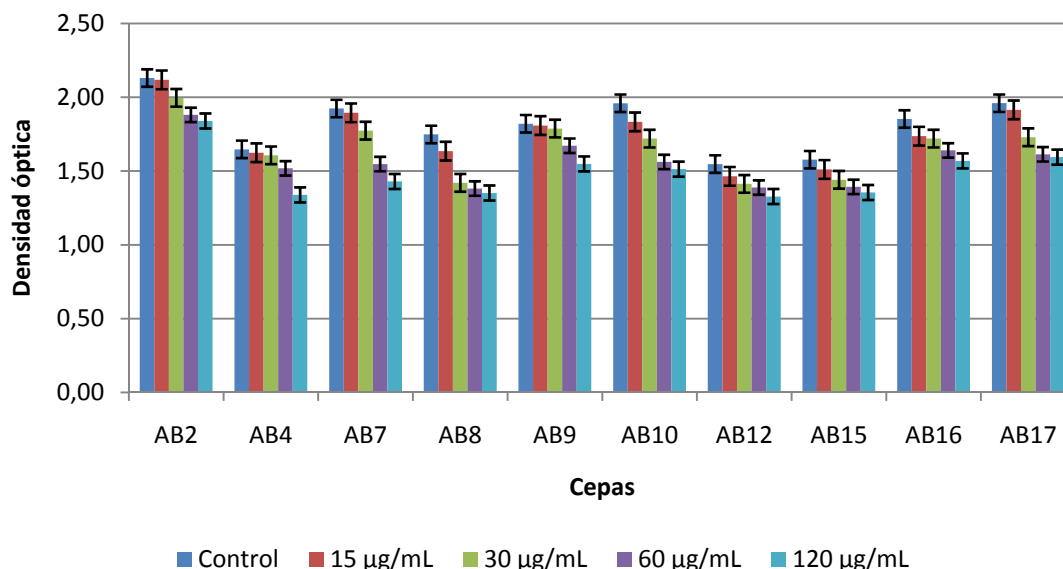


Figura 16. Evaluación de la resistencia al antibiótico amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas. Control: cepa sin antibiótico.

b) *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN.

Las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN resultaron ser resistentes a las 4 concentraciones de amikacina a las que fueron expuestas por 1 h. En la tabla XIII se muestran los valores de DO obtenidos en todas las condiciones ensayadas. Al comparar la condición control con la concentración de 30 µg/mL de amikacina, las cepas AN1, AN7 Y AN10 presentaron una disminución en los valores de DO de 9,3 %, 4,7 % y 7,1 % respectivamente, mientras que las cepas AN4 y AN14 presentaron una disminución en los valores de DO de 1,7 % y 1,1 % respectivamente. Al comparar los valores de DO de la condición control y la mayor concentración de amikacina ensayada (120 µg/mL), las cepas AN1, AN7 y

AN17 presentaron una variación de 17,4 %, 12,8 % y 24,9% respectivamente, mientras que las cepas AN4 y AN14 presentaron una disminución de 7,4 % y 4,3 % respectivamente. A pesar de las diferencias mencionadas, ninguna representa cambios en el orden de magnitud de los resultados obtenidos, por lo que se puede sugerir que las bacterias pudieron mantener la viabilidad en presencia de las diferentes concentraciones de amikacina evaluadas (figura 17).

Tabla XIII. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Amikacina 15 µg/mL	Amikacina 30 µg/mL	Amikacina 60 µg/mL	Amikacina 120 µg/mL
AN1	2,58	2,36	2,34	2,29	2,13
AN2	2,53	2,50	2,48	2,45	2,32
AN4	2,28	2,26	2,24	2,21	2,11
AN5	2,49	2,44	2,37	2,32	2,19
AN6	1,75	1,72	1,71	1,62	1,46
AN7	2,97	2,85	2,83	2,81	2,59
AN8	2,42	2,40	2,38	2,36	2,21
AN10	2,12	1,99	1,97	1,96	1,94
AN14	2,79	2,76	2,75	2,72	2,66
AN17	1,63	1,61	1,58	1,55	1,23

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,12; Tiempo de exposición: 1 hora.

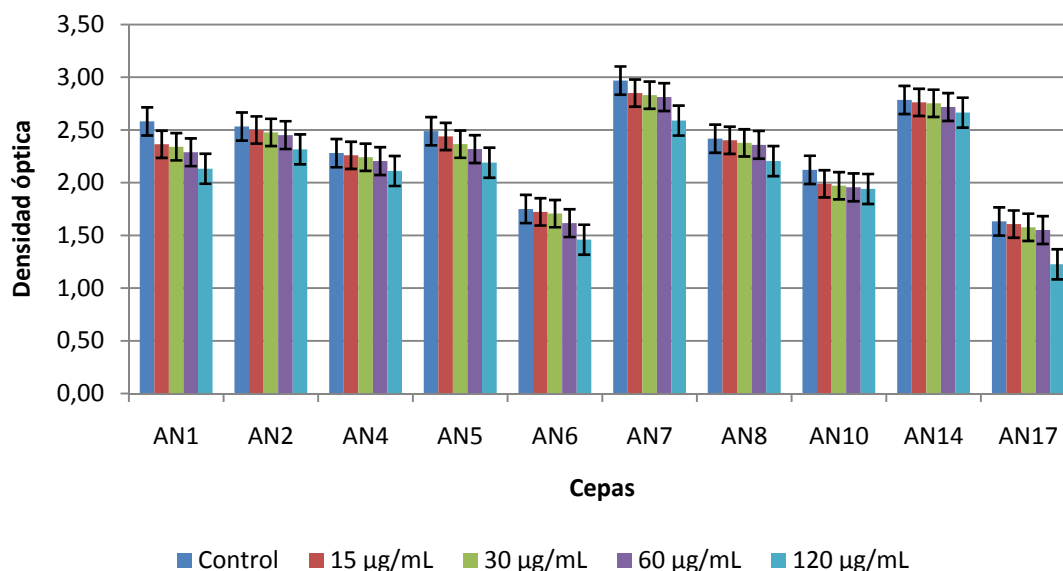


Figura 17. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora. Control: cepa sin antibiótico.

Al extender el tiempo de exposición (24 h) de las biopelículas a las distintas concentraciones de amikacina evaluadas, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla XIV. En este caso, todas las cepas presentaron una disminución en los valores de DO, al comparar con la condición control. Particularmente, al comparar con la condición de 30 µg/mL de amikacina, se encontró que los valores de DO de las cepas AN5, AN7 y AN8 disminuyeron en 15,5 %, 12,5 % y 13,3 % respectivamente, mientras que en las cepas AN1 y AN2 los valores de DO disminuyeron en 6,3 % y 4,4 % respectivamente. A pesar de la disminución en los valores de DO mencionados, estos no representan ni un orden de magnitud, por lo que se puede sugerir que las bacterias pudieron mantener la viabilidad en presencia de las diferentes concentraciones de amikacina ensayadas por 24 h (figura 18).

Tabla XIV. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Amikacina 15 µg/mL	Amikacina 30 µg/mL	Amikacina 60 µg/mL	Amikacina 120 µg/mL
AN1	2,75	2,62	2,58	2,14	1,96
AN2	2,62	2,58	2,50	2,42	2,27
AN4	2,38	2,26	2,11	1,94	1,39
AN5	2,59	2,42	2,19	1,87	1,53
AN6	2,02	1,98	1,79	1,56	1,18
AN7	3,12	2,86	2,73	2,58	2,34
AN8	2,53	2,41	2,19	1,86	1,44
AN10	2,23	2,12	1,95	1,68	1,43
AN14	2,96	2,72	2,68	2,44	2,11
AN17	1,76	1,63	1,52	1,39	1,31

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,13; Tiempo de exposición: 24 horas.

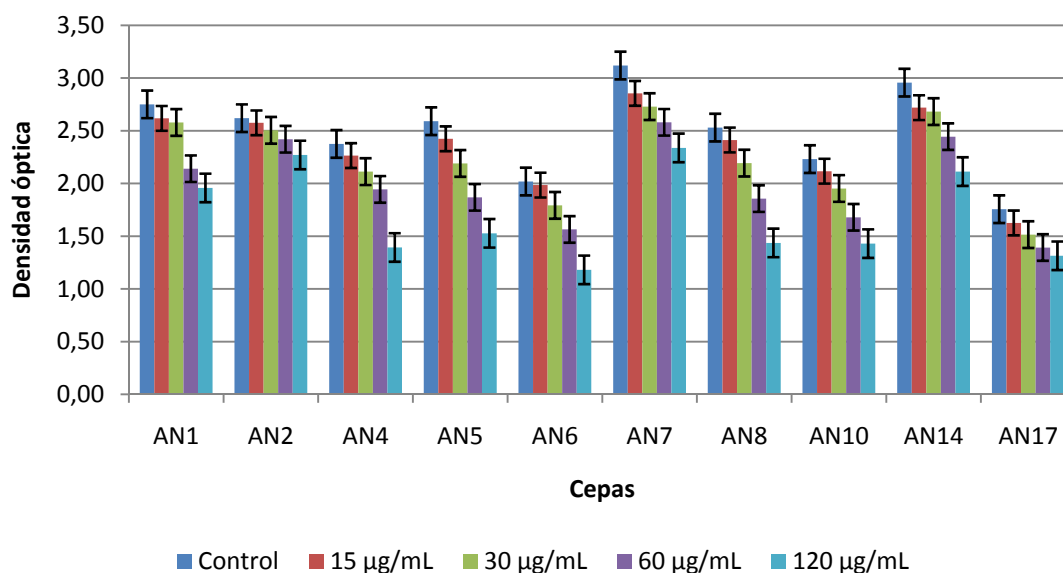


Figura 18. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas. Control: cepa sin antibiótico.

c) *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI.

Las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI resultaron ser resistentes a las 4 concentraciones de amikacina a las que fueron expuestas por 1 h. Los valores de DO de todas las cepas no presentaron diferencias entre la condición control y las distintas concentraciones de amikacina ensayadas (tabla XV). No hubo variación en el orden de magnitud de los valores obtenidos, lo que sugiere que las bacterias mantuvieron la viabilidad en presencia de las 4 concentraciones de amikacina evaluadas (figura 19).

Tabla XV. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Amikacina 15 µg/mL	Amikacina 30 µg/mL	Amikacina 60 µg/mL	Amikacina 120 µg/mL
AU4	2,56	2,51	2,50	2,46	2,42
AU7	2,49	2,43	2,38	2,35	2,31
AU8	2,29	2,26	2,24	2,21	2,17
AU14	1,75	1,73	1,72	1,69	1,67
AU15	2,12	1,99	1,97	1,95	1,93
AU20	2,79	2,77	2,74	2,71	2,67
AU21	2,36	2,36	2,34	2,32	2,31
AU23	2,48	2,47	2,45	2,42	2,40
AU34	2,26	2,24	2,23	2,19	1,98
AU35	2,57	2,55	2,53	2,50	2,48

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,11; Tiempo de exposición: 1 hora.

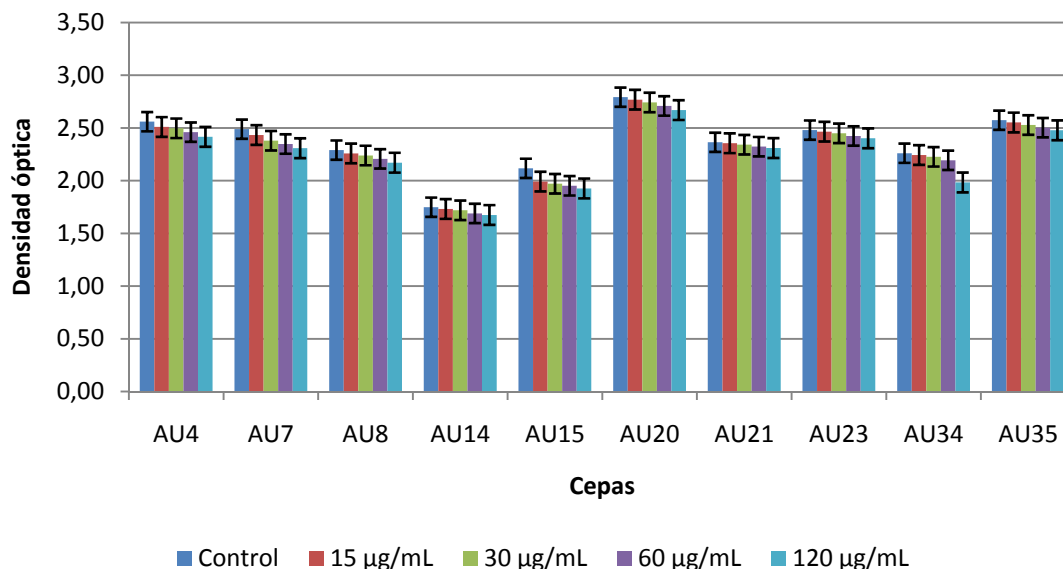


Figura 19. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora. Control: cepa sin antibiótico.

Al incrementar a 24 h el tiempo de exposición de las biopelículas a las diferentes concentraciones de amikacina ensayadas, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla XVI. Al comparar con 30 µg/mL de amikacina, se encontró que las cepas AU15 y AU35 presentaron una disminución en los valores de DO de 4,7 % y 7 % respectivamente, mientras que las cepas AU4 y AU23 presentaron una disminución en los valores de DO de 1,3 % y 1 % respectivamente. Al comparar los valores de DO de la condición control con los de la mayor concentración de amikacina evaluada (120 µg/mL), las cepas AU15 y AU35 presentaron una disminución de 25,2 % y 20,3 % respectivamente, mientras que las cepas AU4 y AU21 presentaron una disminución de 11,1 % y 10,5 % respectivamente. A pesar de las diferencias mencionadas, los valores de DO se mantuvieron en el mismo orden de magnitud, lo que sugiere que las 10 cepas provenientes del ambiente de la UTI fueron resistentes a las distintas

concentraciones de amikacina a las que fueron expuestas por 24 h, cuando las bacterias se encontraron creciendo en biopelículas (figura 20).

Tabla XVI. Evaluación de la susceptibilidad a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Amikacina 15 µg/mL	Amikacina 30 µg/mL	Amikacina 60 µg/mL	Amikacina 120 µg/mL
AU4	2,79	2,77	2,75	2,63	2,48
AU7	2,66	2,65	2,56	2,34	2,25
AU8	2,33	2,30	2,23	1,98	1,84
AU14	1,94	1,81	1,76	1,64	1,51
AU15	2,39	2,37	2,28	2,11	1,79
AU20	2,83	2,81	2,74	2,67	2,43
AU21	2,52	2,48	2,44	2,39	2,26
AU23	2,56	2,55	2,53	2,29	2,17
AU34	2,37	2,34	2,31	2,18	1,93
AU35	2,74	2,71	2,54	2,37	2,18

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,13; Tiempo de exposición: 24 horas.

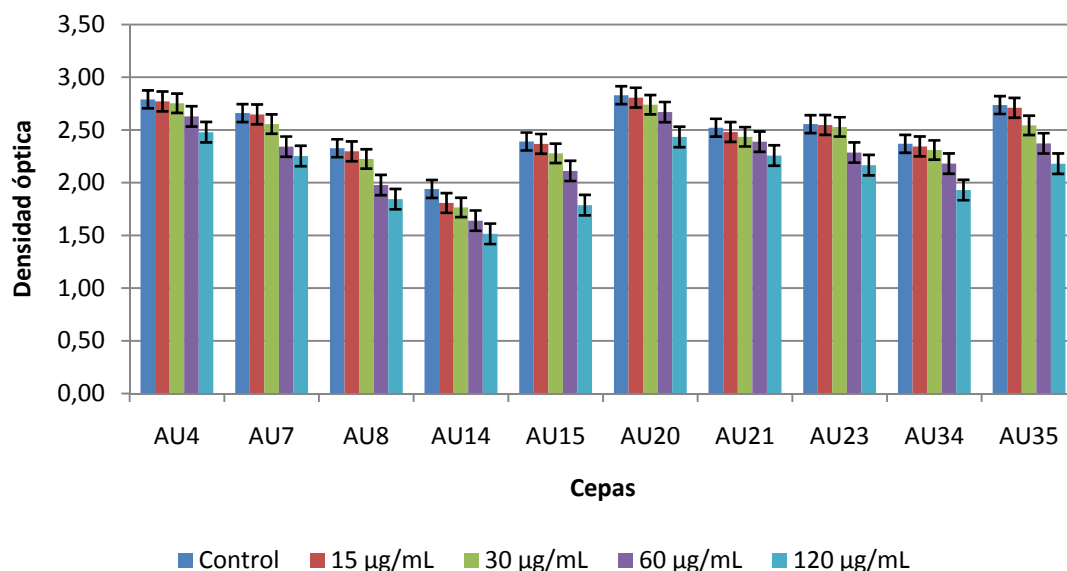


Figura 20. Evaluación de la resistencia a amikacina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas. Control: cepa sin antibiótico.

6.3.2 Evaluación del efecto del antibiótico tetraciclina en biopelículas formadas por cepas de *A. baumannii*.

Una vez evaluado el efecto de la amikacina sobre las bacterias formando biopelículas, se procedió a evaluar el efecto de la tetraciclina sobre las bacterias en este formato de crecimiento. Igualmente fueron expuestas a diferentes concentraciones de este antibiótico por 1 h y 24 h, cuádruplicando el valor de la concentración de uso del mismo. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas XVII-XXII.

a) *A. baumannii* provenientes de pacientes.

Las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes resultaron ser resistentes a las 4 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas por 1 h. Las cepas AB7, AB8 y AB10 presentaron una disminución en los valores de DO de 9,3 %, 5,2 % y 4,9 % respectivamente, al comparar la condición control (biopelícula sin antibiótico) y la condición de 30 µg/mL de amikacina, mientras que las cepas AB9, AB15 y AB16 presentaron una disminución en los valores de DO de 2,6 %, 2,6 % y 2,8 % respectivamente, entre dichas condiciones. Al comparar los valores de DO de la condición control con los obtenidos en la mayor concentración de tetraciclina evaluada (120 µg/mL), se encontró que las cepas AB7, AB8 y AB10 también presentaron la mayor variación en los valores de DO, disminuyendo en 12 %, 9,9 % y 17, 8% respectivamente, mientras que el resto de las cepas AB2, AB4, AB9, AB12, AB15, AB16 y AB17 presentaron una disminución en los valores de DO entre el 6 y 8 % (tabla XVII). Destacando que las disminuciones mencionadas no representan una diferencia ni en un orden de magnitud, es posible sugerir que las bacterias formando biopelículas mantuvieron

la viabilidad en presencia de las 4 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas por 1 h (figura 21).

Tabla XVII. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Tetraciclina 15 µg/mL	Tetraciclina 30 µg/mL	Tetraciclina 60 µg/mL	Tetraciclina 120 µg/mL
AB2	1,83	1,81	1,77	1,73	1,67
AB4	1,60	1,54	1,52	1,48	1,43
AB7	2,17	2,12	1,97	1,94	1,91
AB8	1,98	1,93	1,87	1,82	1,78
AB9	1,73	1,71	1,68	1,65	1,63
AB10	1,86	1,83	1,77	1,59	1,53
AB12	1,65	1,62	1,57	1,55	1,52
AB15	1,56	1,54	1,52	1,47	1,42
AB16	1,59	1,57	1,54	1,48	1,43
AB17	1,73	1,71	1,67	1,62	1,59

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,11; Tiempo de exposición: 1 hora.

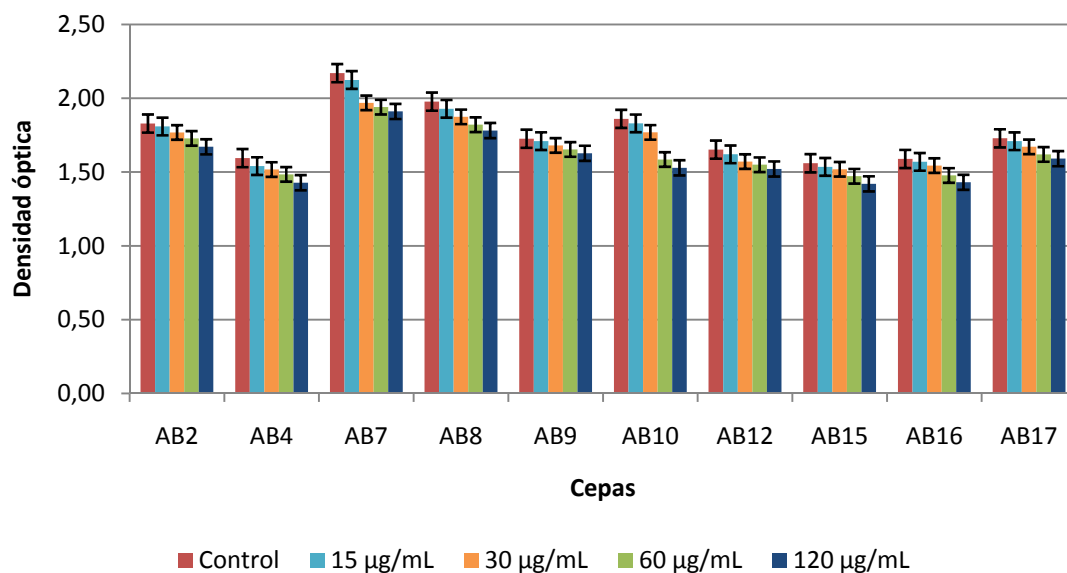


Figura 21. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora. Control: cepa sin antibiótico.

Igual que con el antibiótico amikacina, se evaluó el efecto del tiempo por lo que las microplacas se incubaron durante 24 h, con las diferentes concentraciones de tetraciclina evaluadas. Al incrementar el tiempo de incubación, se encontró que las cepas AB2, AB7 y AB8 fueron las que presentaron la mayor variación en los valores de DO disminuyendo en 14,6 %, 14,7 % y 18,3 % respectivamente, al comparar con la condición de 30µg/mL de tetraciclina (tabla XVIII), mientras que los valores de DO de las cepas AB15, AB16 y AB17 disminuyeron en 5 %, 4,6 % y 4,2 % respectivamente. Al comparar los valores de DO de la condición control con los de la mayor concentración de tetraciclina utilizada (120 µg/mL), se encontró que también las cepas AB2, AB7 y AB8 fueron las que presentaron la mayor variación en los valores de DO disminuyendo en 25,7 %, 35,5 % y 49,4 % respectivamente, mientras que las cepas AB12 y AB16 presentaron la menor variación disminuyendo en 10,8 % y 14,6 % respectivamente. A pesar de las diferencias encontradas entre estos valores, las 10 cepas provenientes del ambiente de la UTI fueron resistentes a las 4 concentraciones de tetraciclina ensayadas cuando se encontraron creciendo en biopelícula, por lo que se puede sugerir que las bacterias mantuvieron su viabilidad al ser expuestas al antibiótico por 24 h (figura 22).

Tabla XVIII. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Tetraciclina 15 µg/mL	Tetraciclina 30 µg/mL	Tetraciclina 60 µg/mL	Tetraciclina 120 µg/mL
AB2	2,19	1,94	1,87	1,68	1,62
AB4	1,88	1,85	1,75	1,63	1,36
AB7	2,28	2,16	1,94	1,79	1,47
AB8	2,24	2,17	1,83	1,33	1,13
AB9	1,89	1,82	1,77	1,53	1,51
AB10	1,95	1,92	1,85	1,63	1,49
AB12	1,75	1,72	1,65	1,62	1,56
AB15	1,81	1,79	1,72	1,67	1,42
AB16	1,95	1,92	1,86	1,82	1,66
AB17	1,84	1,92	1,86	1,65	1,43

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,14; Tiempo de exposición: 24 horas.

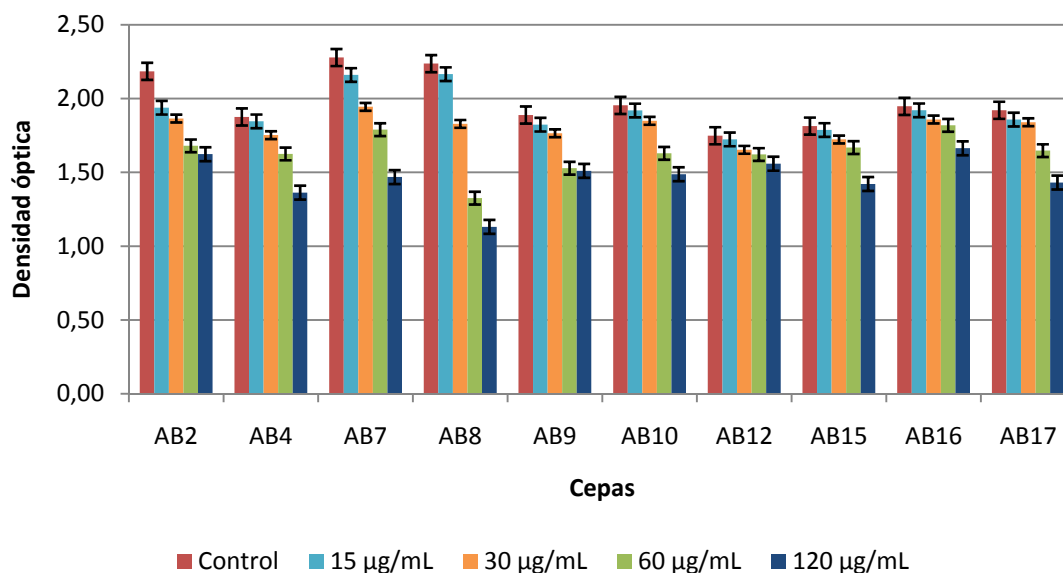


Figura 22. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas. Control: cepa sin antibiótico.

b) *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN.

Las 10 cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN resultaron ser resistentes a las 4 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas por 1 h. Al comparar los valores de DO de la condición control y la concentración de uso de la tetraciclina (30 µg/ml), las cepas AN5 y AN7 presentaron una disminución en los valores de DO de 9,7 % y 18,2 % respectivamente, mientras que las cepas AN2 y AN10 fueron las que presentaron la menor variación disminuyendo en 3,9 % y 3,3 % respectivamente (tabla XIX). Al evaluar el efecto de la concentración del antibiótico, se encontró que las cepas AN7 y AN10 presentaron la mayor variación en los valores de DO entre la condición control y la mayor concentración de tetraciclina empleada (120 µg/ml), obteniéndose diferencias de 20,6 % y 20,5 % respectivamente entre dichas condiciones, mientras que las cepas AN4 y AN14 presentaron la menor variación disminuyendo en 15,7 % y 12,7 % respectivamente (tabla XIX). Los valores de DO de todas las condiciones permanecen en el mismo orden de magnitud, lo que permite sugerir que las bacterias formando biopelículas mantuvieron la viabilidad en presencia de las 4 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas por 1 h (figura 23).

Tabla XIX. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Tetraciclina 15 µg/mL	Tetraciclina 30 µg/mL	Tetraciclina 60 µg/mL	Tetraciclina 120 µg/mL
AN1	2,27	2,21	2,12	1,85	1,78
AN2	2,22	2,21	2,13	1,96	1,83
AN4	1,68	1,63	1,52	1,46	1,42
AN5	2,18	2,12	1,97	1,84	1,82
AN6	1,59	1,54	1,42	1,37	1,24
AN7	2,36	2,31	1,93	1,94	1,88
AN8	1,86	1,77	1,73	1,68	1,59
AN10	2,39	2,34	2,26	2,12	1,85
AN14	1,85	1,82	1,74	1,74	1,61
AN17	2,02	1,89	1,83	1,78	1,72

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,14; Tiempo de exposición: 1 hora.

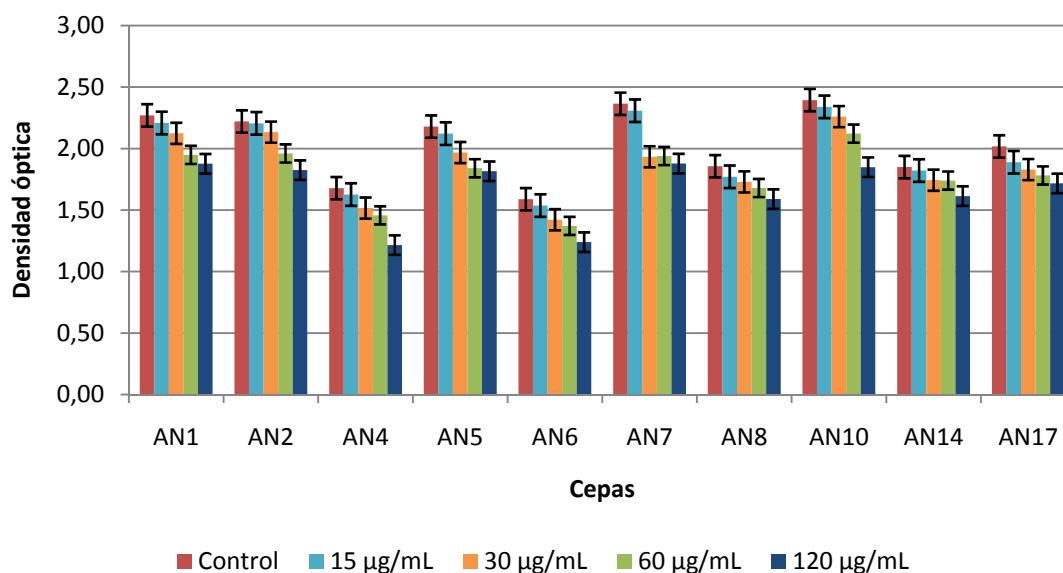


Figura 23. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora. Control: cepa sin antibiótico.

Al evaluar el efecto de la tetraciclina por 24 h sobre las biopelículas formadas por las cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del SN, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla XX. Al evaluar la condición de 30

µg/mL de tetraciclina, las cepas AN1 y AN7 presentaron la mayor variación en los valores de DO al disminuir en 18,2 % y 20,4 % respectivamente, mientras que las cepas AN5 y AN6 presentaron la menor variación disminuyendo en 4,6 % y 5 % respectivamente, al comparar con la condición control (biopelícula sin antibiótico). Al comparar los valores de DO con los de la mayor concentración de tetraciclina utilizada (120 µg/mL), se encontró que las cepas AN7, AN8 y AN10 presentaron una disminución en los valores de DO de 43,5 %, 42,7 % y 41,5 % respectivamente, mientras que la cepa AN6 presentó una disminución del 20 %. Adicionalmente, se encontró que todas las cepas presentaron valores de DO similares al comparar la condición control (biopelícula sin antibiótico) y la menor concentración de tetraciclina utilizada (15µg/mL). Sin embargo, las 10 cepas de este grupo fueron capaces de mantener la viabilidad en presencia de las concentraciones de tetraciclina utilizadas (figura 24).

Tabla XX. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.

Cepas	Densidad óptica (630nm)				
	Control	Tetraciclina 15 µg/mL	Tetraciclina 30 µg/mL	Tetraciclina 60 µg/mL	Tetraciclina 120 µg/mL
AN1	2,43	2,38	1,99	1,63	1,54
AN2	2,38	2,35	2,13	1,74	1,62
AN4	1,92	1,91	1,55	1,34	1,12
AN5	2,25	2,21	2,15	1,87	1,69
AN6	1,85	1,83	1,76	1,62	1,48
AN7	2,69	2,64	2,14	1,75	1,52
AN8	2,25	2,13	1,86	1,57	1,29
AN10	2,38	2,29	2,02	1,64	1,39
AN14	2,12	1,94	1,82	1,66	1,59
AN17	2,32	2,18	1,94	1,82	1,65

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,12; Tiempo de exposición: 24 horas.

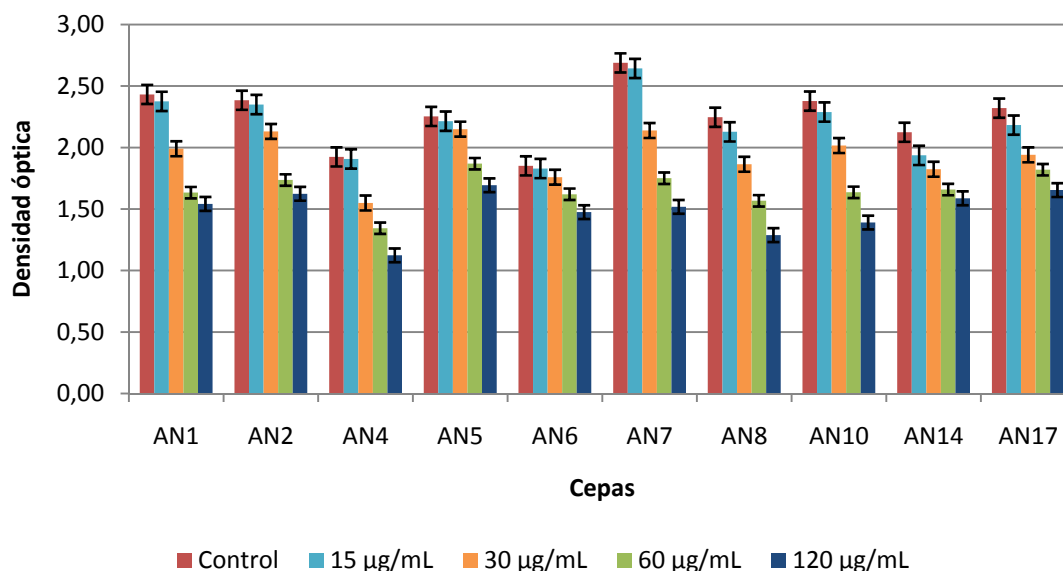


Figura 24. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente del Servicio de Neonatología, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas. Control: cepa sin antibiótico.

c) *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI.

Al evaluar el efecto de la tetraciclina en las biopelículas formadas por las cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la UTI, se encontró que las 10 cepas son resistentes a las 4 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas por 1 h. Las cepas AU7 y AU21 presentaron la mayor variación en los valores de DO entre la condición control y la concentración de 30 µg/mL siendo 7,4 % y 7,8 % respectivamente, mientras que las cepas AU8 y AU20 presentaron una disminución de 2,4 % y 2,3 % respectivamente. Al comparar los valores de DO de la condición control con la mayor concentración de tetraciclina empleada (120 µg/mL), también las cepas AU7 y AU21 presentaron la mayor variación de los valores de DO disminuyendo en 19 % y 20,3 % respectivamente, mientras que en las cepas AU15 y AU20 la disminución alcanzada fue del 8,3 % y 5,8 % respectivamente (tabla XXI). Estas variaciones en los valores de DO obtenidos, no

llegan a disminuir en un orden de magnitud, lo que sugiere que las bacterias formando biopelículas mantuvieron la viabilidad en presencia de las 4 concentraciones de tetraciclina a las que fueron expuestas por 1 h (figura 25).

Tabla XXI. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 1 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Tetraciclina 15 µg/mL	Tetraciclina 30 µg/mL	Tetraciclina 60 µg/mL	Tetraciclina 120 µg/mL
AU4	2,44	2,42	2,36	2,27	2,19
AU7	2,46	2,40	2,28	2,17	1,99
AU8	2,32	2,31	2,26	2,14	1,97
AU14	1,79	1,76	1,64	1,58	1,53
AU15	2,37	2,32	2,29	2,24	2,17
AU20	2,64	2,61	2,58	2,53	2,49
AU21	2,15	2,05	1,98	1,76	1,71
AU23	2,29	2,24	2,16	1,96	1,92
AU34	2,27	2,23	2,18	1,96	1,92
AU35	2,54	2,51	2,47	2,38	2,33

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,12; Tiempo de exposición: 1 hora.

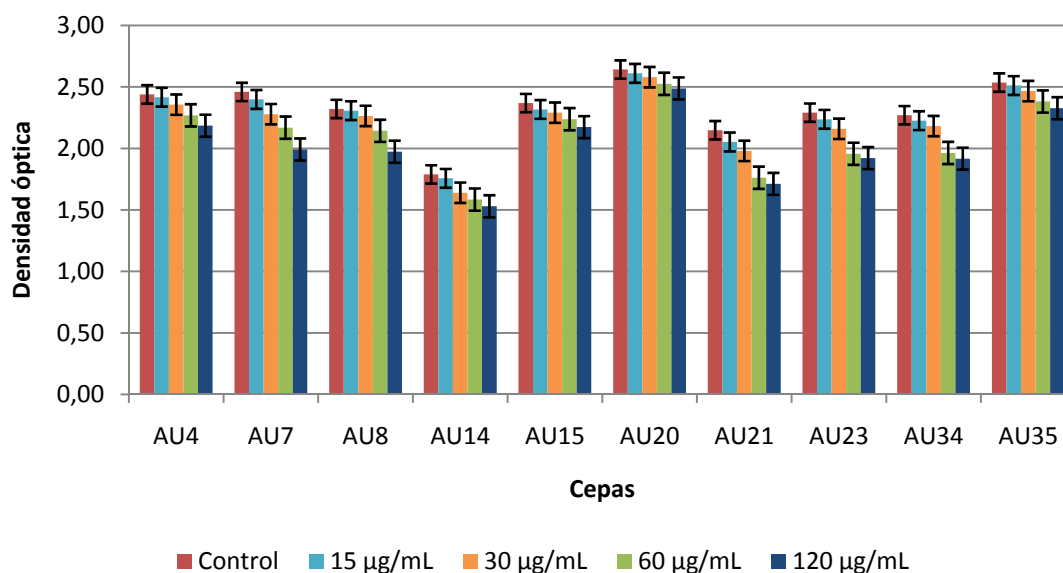


Figura 25. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 1 hora. Control: cepa sin antibiótico.

Al extender el tiempo de exposición de la tetraciclina (24 h) sobre las biopelículas formadas por las cepas provenientes del ambiente de la UTI, se encontró que las cepas AU4, AU15 y AU23 presentaron una disminución en los valores de DO correspondientes a 11,7 %, 11,6 % y 12,9 % respectivamente, al comparar la condición control y la exposición a 30 µg/mL de tetraciclina, mientras que las cepas AU8, AU20 y AU34 presentaron una disminución en los valores de DO de 4,4 %, 3,7 % y 3,8 % respectivamente (tabla XXII). Al comparar la condición control y la exposición a 120 µg/mL de tetraciclina, las cepas AU4, AU15 y AU35 presentaron la mayor variación en los valores de DO disminuyendo 33,7 %, 28,1 % y 25,3 % respectivamente, mientras que el valor de DO de la cepa AU8 disminuyó en 8,4 %. A pesar de las diferencias obtenidas en los valores de DO, las 10 cepas de este grupo fueron resistentes y mantuvieron la viabilidad al estar en presencia de las 4 concentraciones de tetraciclinas utilizadas en este experimento por 24 h (figura 26).

Tabla XXII. Evaluación de la susceptibilidad a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en forma de biopelículas y expuestas al antibiótico por 24 h.

Cepas	Densidad óptica (630 nm)				
	Control	Tetraciclina 15 µg/mL	Tetraciclina 30 µg/mL	Tetraciclina 60 µg/mL	Tetraciclina 120 µg/mL
AU4	2,64	2,58	2,33	2,11	1,75
AU7	2,78	2,71	2,63	2,46	2,38
AU8	2,49	2,43	2,38	2,32	2,28
AU14	1,99	1,93	1,83	1,64	1,48
AU15	2,63	2,49	2,33	2,14	1,89
AU20	2,73	2,70	2,63	2,43	2,22
AU21	2,44	2,34	2,27	2,11	1,84
AU23	2,46	2,34	2,14	1,86	1,87
AU34	2,48	2,44	2,39	2,28	2,14
AU35	2,76	2,63	2,51	2,35	2,06

Se muestran los valores de resultados obtenidos por cuadruplicado. Control: cepa sin antibiótico; Punto de corte: 0,14; Tiempo de exposición: 24 horas.

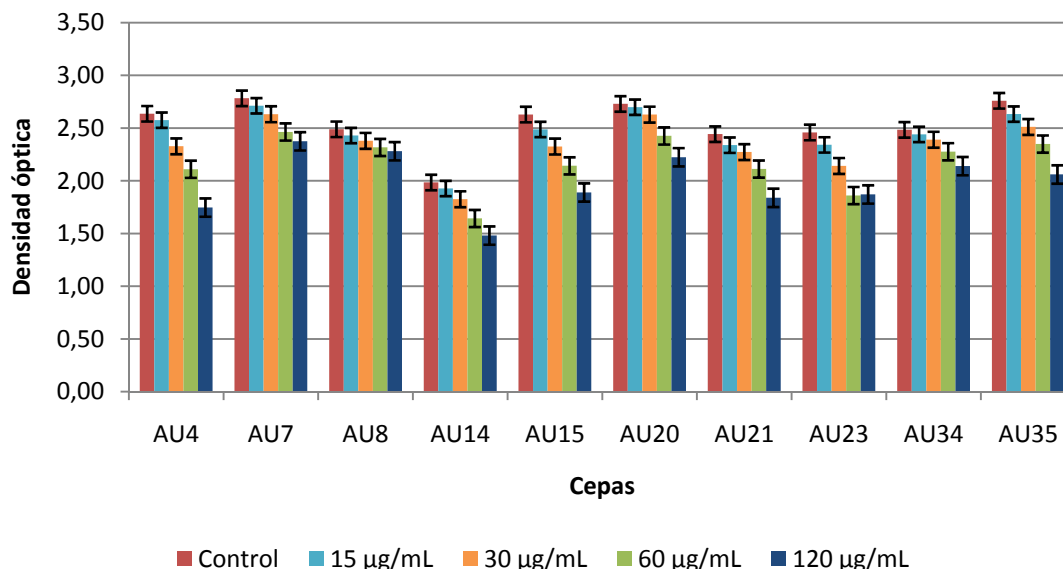


Figura 26. Evaluación de la resistencia a tetraciclina en cepas de *A. baumannii* provenientes del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva, creciendo en biopelículas y expuestas a distintas concentraciones del antibiótico por 24 horas. Control: cepa sin antibiótico.

6.3.3 Comparación del efecto de los antibióticos amikacina y tetraciclina sobre las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre y formando biopelículas.

Como se muestra en la tabla XXIII, del total de cepas de *A. baumannii* analizadas creciendo en forma libre (30), 13 cepas fueron capaces de crecer en presencia de la concentración de uso de amikacina (30 µg/mL), mientras que 17 cepas fueron sensibles a dicha concentración. En cuanto a la evaluación del efecto de tetraciclina (30 µg/mL) sobre las cepas de *A. baumannii* en el mismo formato de crecimiento, se encontró que de las 30 cepas analizadas, 20 cepas fueron capaces de resistir a la acción de este antibiótico, mientras que 10 cepas presentaron sensibilidad a dicha concentración. Al evaluar el efecto de estos dos antibióticos sobre las 30 cepas de *A. baumannii* creciendo en biopelículas, se

encontró que todas fueron capaces de resistir a la acción tanto de amikacina como de tetraciclina en diferentes concentraciones (15 µg/mL; 30 µg/mL; 60 µg/mL y 120 µg/mL).

El conjunto de resultados obtenidos al evaluar el efecto de los antibióticos sobre las cepas de *A. baumannii* creciendo en biopelículas, permite sugerir que la agrupación de las bacterias en estas asociaciones confiere mayor resistencia a amikacina y tetraciclina, durante los tiempos de exposición ensayados (1 h y 24 h), ya que en este formato de crecimiento las 30 cepas analizadas fueron resistentes a concentraciones de 120 µg/ml, que cuadriplica el valor de la concentración de uso en forma planctónica.

Tabla XXIII. Comparación del fenotipo de resistencia a amikacina y tetraciclina de las cepas de *A. baumannii*, creciendo en forma planctónica y en forma de biopelícula.

Antibiótico	Fenotipo	<i>A. baumannii</i> pacientes	<i>A. baumannii</i> Neonatología	<i>A. baumannii</i> Terapia
Amikacina			Planctónico	
	Resistente	9	1	3
	Sensible	1	9	7
			Biopelícula	
	Resistente	10	10	10
	Sensible	0	0	0
Tetraciclina			Planctónico	
	Resistente	8	5	3
	Sensible	2	5	7
			Biopelícula	
	Resistente	10	10	10
	Sensible	0	0	0

Los resultados obtenidos en este estudio, representan un aporte a la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias de importancia clínica, cuando estas se encuentran creciendo en biopelículas. Dado que dichas asociaciones representan una ventaja para las bacterias que se encuentran dentro de ellas, estos resultados representan una aproximación de como es el comportamiento de las bacterias en el ambiente hospitalario. En el futuro, su comprensión permitirá el desarrollo de terapias de antibióticos eficaces para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.

Tomando en cuenta todos los aspectos que contribuyen a la formación y permanencia de las biopelículas en los centros de salud, es necesario realizar estudios que engloben la mayor cantidad de factores que se encuentran relacionados, con la finalidad de impedir la formación de las biopelículas, así como erradicar su presencia y poder tratar las infecciones causadas.

Particularmente, los datos obtenidos en este estudio permiten sugerir que el éxito de colonización de las cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes y del ambiente del HUC, está mediado por los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos, así como mediante la habilidad que posee para formar biopelículas en distintas superficies y por tiempo prolongado.

7. DISCUSIÓN

Las infecciones bacterianas representan un problema para la salud de los individuos debido a que aumentan la morbilidad y mortalidad de los pacientes afectados. Entre las principales causas por las cuales las tasas de infecciones bacterianas en general han ido incrementando con el paso de los años, se encuentra el fracaso en la terapia utilizada contra estas infecciones. Este fracaso ocurre como consecuencia del uso inadecuado de los antimicrobianos como agentes terapéuticos, que conlleva a la aparición de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos, como antibióticos, antisépticos y desinfectantes. El uso continuo de estos agentes en los hospitales, conlleva a la muerte de microorganismos sensibles y a la selección de microorganismos resistentes. Es por ello que las bacterias que normalmente residen en los hospitales presentan un elevado patrón de resistencia a diversos antimicrobianos. En general, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes están asociadas a las mayores tasas de mortalidad intrahospitalaria, así como las estadías prolongadas en los centros de salud (Buffet-Bataillon y col., 2012).

Acinetobacter baumannii es uno de los patógenos más exitosos en la colonización de ambientes hospitalarios debido a su habilidad innata de resistir a la desecación, a los desinfectantes y a su gran capacidad de adquirir o desarrollar resistencia a los antimicrobianos (Ramos y Alonso, 2013). Es un cocobacilo Gram negativo, no fermentador de glucosa que en las últimas dos décadas ha incrementado su acción como patógeno oportunista involucrado en numerosas infecciones nosocomiales. La capacidad de colonizar diversos ambientes así como

la versatilidad en su metabolismo, ha influido en el incremento del número de infecciones que puede causar, siendo responsable del desarrollo de enfermedades como: sepsis, neumonías, meningitis, infecciones del tracto urinario, peritonitis e infecciones de piel y tejidos blandos. Estas infecciones aparecen como brotes, dominados por clones epidémicos con multirresistencia a los antibióticos que causan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Las Unidades de Cuidados Intensivos son los lugares más frecuentes para el aislamiento de este microorganismo. De acuerdo al Centro para el Control y la prevención de Enfermedades de los EEUU (CDC, por sus siglas en inglés), *A. baumannii* es responsable del 80 % de la infecciones generales causadas por este género en la población general de Estados Unidos. Las tasas de mortalidad que se le pueden atribuir a este microorganismos van de 32 % a 52% a nivel mundial, llegando a ser hasta del 64 % en pacientes con meningitis causada por *A. baumannii* (Halachev y col., 2014).

Se ha encontrado que los agentes antimicrobianos más efectivos contra las infecciones causadas por las especies del género *Acinetobacter* incluyen: carbapenemes, cefalosporinas, penicilinas anti-pseudomonales, monobactamicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulbactamicos y polimixinas. Sin embargo, actualmente se han reportado cepas de *A. baumannii* con resistencia a todos ellos, superando la denominación de multirresistente a panresistente (Lin y Lan 2014).

El fenómeno de resistencia bacteriana plantea una amenaza grave en el sistema de salud debido a que limita las posibilidades de emplear antimicrobianos efectivos para el tratamiento de las infecciones. Actualmente, unos de los

principales problemas asociados al ambiente hospitalario es la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, así como la presencia de estos determinantes de resistencia en elementos genéticos extracromosomales, que pueden ser transferidos a otras cepas bacterianas susceptibles del mismo ambiente y en consecuencia poder incrementar la resistencia.

La mayoría de los estudios realizados en cuanto a la evaluación de la resistencia de las bacterias a diversos agentes antimicrobianos, se han llevado a cabo cuando las bacterias se encuentran creciendo en forma libre o planctónica. A pesar de que los resultados generados por este tipo de ensayos ha permitido conocer la respuesta de un microorganismo ante un antimicrobiano, una extrapolación más directa de esta respuesta se puede obtener estudiando el efecto de estos antimicrobianos en la forma como el microorganismo permanece en el ambiente y particularmente en el ambiente hospitalario, que es a través de la formación de biopelículas. Es ahí donde radica la importancia de este tipo de estudios que permiten comparar el efecto del mismo antimicrobiano en dos formas de crecimiento diferentes.

Partiendo de esta premisa, en este trabajo se evaluó el fenotipo de resistencia a los antibióticos amikacina y tetraciclina, que constituyen parte de la terapia empleada para tratar las infecciones causadas por *A. baumannii*, en cepas aisladas del HUC, en dos formatos de crecimiento: en forma libre y en biopelículas.

Mediante la realización de pruebas bioquímicas, microbiológicas y moleculares, fue posible obtener como resultado que las 30 cepas estudiadas resultaron ser cocobacilos Gram negativos, no fermentadores, catalasa positivos y

oxidasa negativos, con una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C pero con la capacidad de crecer hasta 44 °C (tabla V). Estos resultados concuerdan con los datos reportados previamente por Chalbaud en el año 2010 y por Ramos en el año 2014.

Particularmente, la amplificación por PCR con iniciadores universales y especie específicos permitieron corroborar la integridad y procedencia bacteriana del material genético obtenido, así como alcanzar una clasificación hasta el nivel de especie. A su vez, se realizó la detección de integrones clase 1, mediante la amplificación de los extremos conservados de estos elementos extracromosomales, dentro de los cuales se encuentra una región variable que contiene casetes genéticos que codifican para la resistencia a distintos agentes antimicrobianos (figura 8). Estos elementos en particular, son característicos de aislados clínicos debido a que constituyen un mecanismo capaz de conferir diferentes genes de resistencia a agentes antimicrobianos (figura 27) (Levesque y col., 1995). Particularmente, los integrones clase 1 se encuentran estrechamente relacionados con la multirresistencia que le ha sido adjudicada a *A. baumannii* y que le ha permitido permanecer en los ambientes hospitalarios causando un gran número de infecciones (Puentes, 2009).

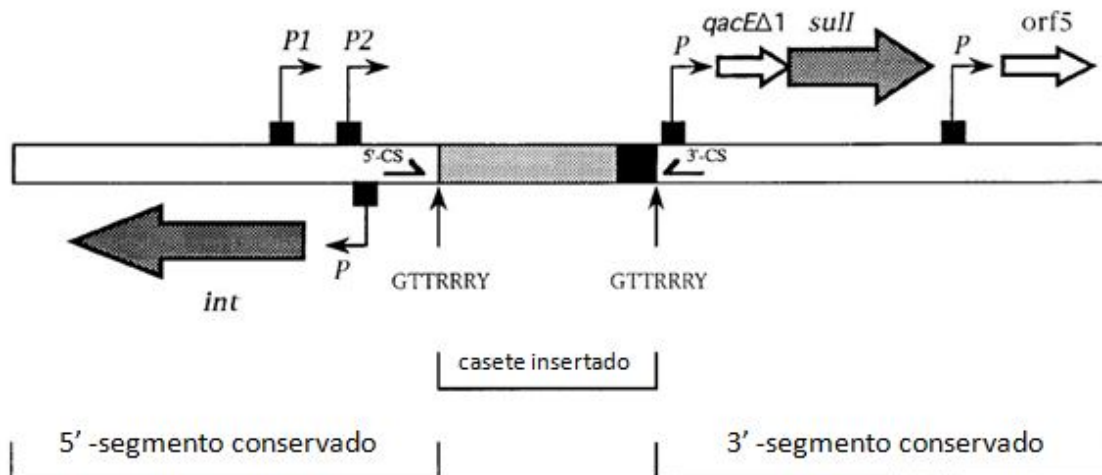


Figura 27. Estructura general de integrones clase 1. Las flechas muestran la dirección de la transcripción. Los oligonucleótidos 5'-CS y 3'-CS son específicos para los segmentos conservados 5' y 3' respectivamente. El casete insertado contiene genes que codifican para los distintos mecanismos de resistencia a antimicrobianos (Tomado y modificado de Levesque y col., 1995).

Una vez verificadas las características bioquímicas, microbiológicas y genéticas de las bacterias en estudio, se procedió a evaluar su relevancia clínica al estudiar el efecto de dos antibióticos empleados para el tratamiento de las infecciones causadas por *A. baumannii* (amikacina y tetraciclina) en la forma en la que tradicionalmente se evalúa, en crecimiento planctónico o de vida libre y de manera novedosa en este estudio, a través de la formación de biopelículas. En este sentido y para determinar el fenotipo de resistencia de las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre en presencia de los antibióticos, se utilizaron dos metodologías: el método de dilución en placas y el método de difusión en disco o antibiograma (materiales y métodos apartados 5.3.2 y 5.3.3).

A través de la metodología de dilución en placas, se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas, 13 de ellas presentaron resistencia a la concentración de uso clínico de amikacina (30 µg/mL), mientras que 17 cepas

presentaron sensibilidad. De las 13 cepas resistentes a esta concentración, 9 fueron provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales (tabla VII). Estos resultados indican que la concentración de amikacina empleada para el tratamiento de las infecciones causadas por estas bacterias no es eficaz sobre todas ellas. Sin embargo, al evaluar el efecto del doble de esta concentración de amikacina (60 µg/mL), se encontró que el número de cepas sensibles aumentó a 23 (tabla VII), lo que permite sugerir que bajo esta condición es posible obtener una mejor respuesta al tratamiento con este antibiótico.

Al evaluar el efecto de la tetraciclina, se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas, 20 presentaron resistencia a la concentración de uso de tetraciclina (30 µg/mL), mientras que 10 cepas presentaron sensibilidad. De las 20 cepas resistentes, 8 fueron provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales y 7 fueron provenientes del ambiente de la UTI (tabla VIII). Esta relación sugiere que la resistencia a tetraciclina es mayor en cepas que han estado expuestas a una presión selectiva, debido a que los pacientes inmunocomprometidos necesitan una mayor cantidad de antimicrobianos con la finalidad de combatir las infecciones, particularmente si son infecciones nosocomiales. Por lo tanto, es posible sugerir que la concentración de tetraciclina utilizada para tratar las infecciones causadas por las cepas de *A. baumannii* estudiadas no garantiza la muerte de todas ellas, pero al aumentar al doble la concentración de tetraciclina utilizada (60 µg/mL), se encontró que las cepas sensibles incrementaron a 19 (tabla VIII), lo que sugiere un efecto más eficaz del antibiótico sobre las cepas estudiadas.

De acuerdo al número de cepas sensibles a la concentración de uso clínico de los antibióticos ensayados en este estudio, es posible sugerir que la amikacina presenta un efecto más eficaz que la tetraciclina sobre las cepas de *A. baumannii* analizadas creciendo en forma libre (figuras 9 y 10). Este resultado concuerda con los obtenidos por Li y colaboradores en el año 2007, que evaluaron la acción de un grupo de antibióticos sobre cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre y como resultado obtuvieron que los antibióticos más eficaces fueron amikacina y colistina (Li y col., 2007).

Los compuestos hidrofóbicos como los aminoglicósidos (amikacina), son capaces de atravesar la membrana externa de las bacterias Gram negativas y así poder alcanzar su blanco en el interior celular, para ejecutar su efecto sobre las bacterias. A pesar de lo efectivo que son este tipo de compuestos, es posible que en las cepas de *A. baumannii* en las que se encontró resistencia a este antibiótico, pudieran estar actuando enzimas capaces de destruirlo como acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas, así como un grupo de enzimas de metiltransferasas del rRNA 16S denominadas ArmA y RmtA, B, C y D, capaces de conferir un alto nivel de resistencia a todo el grupo de antibióticos aminoglicósidos. Particularmente, el gen *armA* parece estar ampliamente extendido y a menudo es encontrado en conjunto con *bla_{OXA-23}* en cepas de *A. baumannii* (Gordon y Wareham, 2010). Los genes que codifican para las enzimas modificadoras de aminoglicósidos pueden estar presentes en plásmidos y transposones. Inclusive, algunos de estos genes se han encontrado en integrones clase 1 presentes en cepas multirresistentes de *A. baumannii*, por lo que se ha propuesto que estos elementos extracromosomales que comprenden regiones variables estables y

conservadas con genes de resistencia, son transferidas comúnmente como parte de la estructura completa del integrón y no como casetes individuales (Nemec y col., 2004). Adicionalmente, se han descrito otros mecanismos de resistencia a los aminoglicósidos como lo es la disminución de la entrada del antibiótico por defectos en la permeabilidad de la membrana externa originados por modificaciones en las porinas, así como alteraciones que se pueden presentar en las proteínas ribosómicas diana sobre las cuales actúan estos antibióticos (Tafur y col., 2008).

Adicionalmente en *A. baumannii* se han caracterizado diversos sistemas de bombas de eflujo que son específicas para agentes individuales, en conjunto con bombas que son responsables de la expulsión de múltiples sustancias. De particular interés para este estudio 2 sistemas pertenecientes a la familia RND (*Resistance Nodulation Division*): AdeABC y AdeIJK, porque confieren resistencia a aminoglicósidos, tetraciclinas, β -lactámicos, cloranfenicol y eritromicina. (Gordon y Wareham, 2010). El aumento en la expresión de estos genes y la actividad de las bombas de eflujo puede verse afectado por una inducción por sustrato, condiciones ambientales o mutaciones presentes en los genes reguladores (Hooper, 2005).

En el caso particular de las bombas de eflujo AdeABC y AdeIJK en un trabajo previo realizado con estas cepas por Ramos en el año 2014, se encontró la expresión de ambos sistemas de eflujo y en el caso particular del AdeABC se obtuvo la expresión diferencial de este sistema en presencia del antibiótico amikacina, por lo que este mecanismo podría ser uno de los responsables de la resistencia alcanzada, destacando que en las 13 cepas resistentes se detectó la

presencia y expresión de los genes que codifican para los componentes de este sistema de eflujo (Ramos, 2014).

En cuanto al efecto de la tetraciclina sobre las cepas de *A. baumannii*, se han descrito 3 mecanismos principales que pudieran estar actuando en la resistencia a este antibiótico: eflujo activo, protección ribosomal e inactivación enzimática (Jara, 2007). Las bombas de eflujo son proteínas capaces de expulsar el antibiótico del interior al exterior celular evitando así su interacción con la célula diana y contribuyen ampliamente a la multirresistencia bacteriana. En la resistencia a tetraciclina se destacan bombas de la súper familia MFS (*Major facilitator superfamily*) que incluye a TetA y TetB, las cuales están codificadas por genes que pueden encontrarse en el cromosoma de la bacteria o en plásmidos presentes tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (Gordon y Wareham, 2010). Este tipo de bombas son de espectro reducido debido a que solo expulsan el antibiótico tetraciclina al espacio periplásmico y pueden conferir grandes niveles de resistencias por la alta velocidad de eflujo, que supera el retorno del antibiótico hacia el citoplasma. Estos sistemas presentes en las bacterias Gram negativas, se han asociado a la resistencia a antimicrobianos de importancia clínica (Coyne y col., 2011).

La protección ribosomal genera el bloqueo de la unión de la tetraciclina a la subunidad 30S del ribosoma, que ha sido explicada por una hipótesis que describe que en condiciones normales los ribosomas tienen una configuración estándar mediante la cual funcionan normalmente, pero que se altera cuando el antibiótico penetra al interior celular (Jara, 2007). Los mecanismos mencionados

previamente, pudieran estar actuando en las cepas de *A. baumannii* de origen clínico que presentaron resistencia a tetraciclina.

Aunque en este estudio solo se evaluó la acción de amikacina y tetraciclina, el resultado obtenido mediante la metodología de dilución en placa arrojó que 11 de las 30 cepas de *A. baumannii* presentaron resistencia a ambos antibióticos, destacando que 8 de ellas fueron provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales y 3 fueron provenientes del ambiente de la UTI (tablas VII y VIII). Estos datos representan un indicativo de la resistencia que pueden adquirir las bacterias al estar en contacto continuo con diversos antimicrobianos, que en consecuencia genera una presión selectiva erradicando las bacterias sensibles y seleccionando aquellas que son capaces de resistir a su acción.

La metodología de dilución en placa permitió apreciar el comportamiento de las cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre en presencia de distintas concentraciones de antibióticos previamente reportadas. Al evaluar la presencia o ausencia del crecimiento bacteriano en cada una de las concentraciones de antibióticos, es posible obtener un rango de valores entre los cuales se encuentre la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano.

En contraste con la metodología anterior, la prueba de difusión en disco permitió obtener un fenotipo resistente, intermedio o sensible. A través de ella, se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas, 11 presentaron resistencia a 30 µg/mL de amikacina, 16 presentaron sensibilidad a esta concentración y 3 cepas fueron catalogadas con un fenotipo intermedio (tabla IX).

Mediante esta metodología también se encontró que de las 30 cepas de *A. baumannii* analizadas, 16 presentaron resistencia a 30 µg/mL de tetraciclina, 7

presentaron sensibilidad a esta concentración y otras 7 cepas fueron catalogadas con un fenotipo intermedio (tabla X). Estos resultados concuerdan con los fenotipos de resistencia de estas cepas en presencia de ambos antibióticos, que fueron reportados por Chalbaud en el año 2010.

Mediante la metodología de difusión en disco se obtuvo que las cepas AB8, AN7 y AU14 fueron catalogadas con un fenotipo intermedio a la concentración de uso de amikacina, mientras que las cepas AB10, AB15, AN2, AN6, AU7, AU15 y AU20 fueron clasificadas con un fenotipo intermedio a la concentración de uso de tetraciclina (tablas IX y X). Si en la prueba de difusión en disco se obtiene un fenotipo de sensibilidad, indica que el antibiótico es eficaz para el tratamiento de las infecciones causadas por el microorganismo en estudio. Por el contrario, si se obtiene un fenotipo de resistencia, indica que el antibiótico no podrá inhibir el crecimiento del microorganismo y en consecuencia no representa un tratamiento eficaz para la infección ocasionada. Sin embargo, si se obtiene un fenotipo intermedio, el antibiótico podría tener un efecto eficaz si se utiliza en concentraciones adecuadas que puedan inhibir el crecimiento del microorganismo, principalmente si la infección se encuentra localizada en lugares en los que el antibiótico puede actuar fisiológicamente concentrado, pero a su vez, es posible que el uso único del antibiótico en estudio no esté en capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y atacar la infección ocasionada (Cantón, 2003). Esta variación se obtiene como consecuencia de la sensibilidad que presenta la técnica que incluye factores que la afectan como: la concentración del disco de antibiótico, la profundidad del agar sobre el cual el antibiótico debe difundir así como la

densidad poblacional del césped bacteriano formado. Aunque es una técnica rápida y sencilla que aporta un resultado de importancia para el tratamiento clínico, la evaluación de la susceptibilidad de las bacterias a distintos antibióticos puede verificarse con la técnica de dilución en placa, la cual arrojará un fenotipo de resistente o sensible mediado por la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante las dos metodologías realizadas en este estudio se complementan entre sí. Es útil llevar a cabo ambas con el fin de obtener un rango de valores que sugieran la CMI del antibiótico sobre las bacterias, así como poder obtener el fenotipo de resistencia hacia un enfoque clínico que permita diseñar una terapia con los antibióticos adecuados para el tratamiento de las infecciones.

El estudio de la población de bacterias en crecimiento planctónico arrojó que la mayoría es sensible a amikacina y resistente a tetraciclina. Este formato de crecimiento es la aproximación experimental que se utiliza principalmente en los laboratorios clínicos. Sin embargo, al evaluar el crecimiento de las bacterias formando biopelículas, se encontró que las 30 cepas de *A. baumannii* provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales y del ambiente hospitalario del HUC, fueron resistentes a ambos antibióticos (tablas XI - XXII).

Al analizar las características de estas biopelículas, se encontró que todas las cepas fueron catalogadas como formadoras de una biopelícula fuerte, al evaluar su crecimiento sobre microplacas de poliestireno (tablas XI - XXII). Estos resultados concuerdan con los datos reportados previamente por Ramos en el año

2014. Igualmente, concuerdan con los datos obtenidos por Lee y colaboradores en el año 2007, quienes evaluaron la habilidad de distintas cepas de *A. baumannii* de adherirse a diversas superficies, entre las que se encuentra el poliestireno, dando como resultado que el total de cepas analizadas (23) fueron capaces de adherirse a dicha superficie exitosamente mediante la formación de biopelículas (Lee y col., 2007). Adicionalmente, Martí y colaboradores en el año 2011, destacaron la habilidad de formar biopelículas de distintas especies del género *Acinetobacter*, haciendo énfasis en que *A. baumannii* es la especie de este género con mayor capacidad de formar biopelículas sobre distintas superficies y por tiempo prolongado (Martí y col., 2011). Sanchez y colaboradores en el año 2013 también encontraron resultados similares en cepas de origen clínico, sugiriendo que la habilidad que presentan las cepas de *A. baumannii* para formar biopelículas, se encuentra relacionada con su capacidad para sobrevivir en los ambientes hospitalarios, particularmente sobre los dispositivos médicos y quirúrgicos, que está mediada por distintos mecanismos celulares entre los que se encuentra el *quorum sensing* (Sanchez y col., 2013).

Al evaluar el fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *A. baumannii* creciendo en biopelículas, se encontró que las 30 cepas fueron capaces de mantener la viabilidad al estar en presencia de las 4 concentraciones crecientes tanto de amikacina como de tetraciclina a las que fueron expuestas (tablas XI - XVI y tablas XVII - XXII respectivamente). Estos resultados difieren con los datos obtenidos al evaluar la acción de los antibióticos sobre las cepas creciendo en forma libre, lo que sugiere que la agrupación de las bacterias en biopelículas, confiere mayor resistencia a antibióticos. Los resultados obtenidos concuerdan

con los reportados por Ramos en el 2014, quien evaluó la resistencia de estas mismas cepas de *A. baumannii* a agentes desinfectantes, obteniendo como resultado que el total de cepas (50) fueron capaces de resistir a la acción del desinfectante, cuando estas se encontraron creciendo en biopelículas (Ramos, 2014).

Entre los factores que pudieran estar involucrados en el aumento de la resistencia de las bacterias cuando estas se encuentran formando biopelículas, se destacan: 1) difusión limitada de los antimicrobianos hacia el interior de la matriz de exopolisacárido, 2) interacción de los agentes antimicrobianos con la matriz de exopolisacárido, 3) resistencia mediada por distintas enzimas, 4) nivel de la actividad metabólica de las bacterias dentro de la biopelícula, 5) adaptación genética, 6) acción de bombas de eflujo y 7) estructura de la membrana externa (Cloete, 2003). Estos aspectos pudieran estar involucrados en la resistencia que presentaron las bacterias formando biopelículas, al estar en presencia de los antibióticos amikacina y tetraciclina. Es por ello que estas asociaciones son consideradas como una estrategia de supervivencia que protege a los microorganismos de la presión ambiental externa y de los efectos de distintos antimicrobianos (Obeidat y col., 2014).

La matriz de exopolisacárido de las biopelículas representa una barrera física para el ingreso de agentes externos al interior de esta asociación. Particularmente, los antibióticos cargados positivamente como los aminoglicósidos (amikacina), pueden quedar atrapados en el exterior de estas comunidades mediante una interacción iónica entre su carga positiva y la carga negativa que posee el exopolisacárido. La viscosidad de esta matriz también puede ejercer una

barrera debido a que sería necesario saturar a la biopelícula con el agente antimicrobiano, para que luego este pudiera ingresar a ejercer su efecto sobre las bacterias. Diversos estudios han demostrado que uno de los factores que contribuye al incremento de la resistencia en biopelículas no es la cantidad de exopolisacárido como tal, sino su interacción con las células y la adhesión a la superficie sobre la cual está formada (Cloete, 2003).

Se ha relacionado la resistencia a tetraciclina con la acción de bombas de eflujo que son capaces de expulsar el antibiótico del interior al exterior celular antes de que este pueda ejercer su efecto. Este mecanismo entra en acción cuando el antibiótico logra traspasar la barrera del exopolisacárido e intenta ingresar a las bacterias más cercanas a la superficie externa, que son las que se encuentran metabólicamente activas. Sin embargo, la sobreexpresión de las bombas de eflujo de las bacterias que se encuentran inmersas en las biopelículas, ha contribuido al incremento en la resistencia a agentes antimicrobianos que le ha sido adjudicada a estas asociaciones (Coyne y col., 2011).

También se le ha adjudicado un factor de virulencia a las biopelículas debido a que los anticuerpos y las células del sistema inmunitario en general no tienen acceso a las bacterias profundamente inmersas en estas asociaciones. Los microorganismos dentro de las biopelículas pueden permanecer metabólicamente inactivos, lo que los hace menos susceptibles a la acción de antimicrobianos. Algunos antibióticos están diseñados para actuar sobre células metabólicamente activas, por lo tanto, estos agentes no pueden ejercer su efecto sobre las células que se encuentran inmersas en el centro de las biopelículas (Betancourth y col., 2004).

Considerando que el mecanismo de acción de los 2 antibióticos utilizados en este estudio radica en su unión a la subunidad ribosomal 30S de la bacteria y a la interferencia de la síntesis de proteínas, éstos no pueden ejercer su efecto sobre las bacterias formando biopelículas, ya que una gran proporción de estas se encuentran metabólicamente inactivas. Este aspecto pudiera estar contribuyendo a la resistencia a amikacina y tetraciclina que presentaron las bacterias creciendo en biopelículas.

Las biopelículas se han considerado como asociaciones de difícil erradicación y como una fuente de infecciones recalcitrantes. Por lo tanto, la importancia médica de los estudios científicos que toman en cuenta este formato de crecimiento, se centra en poder explicar el origen de las infecciones asociadas a equipos médicos y quirúrgicos, así como de las infecciones crónicas, con la finalidad de diseñar estrategias para contrarrestar su permanencia en los centros de salud (Prashanth y col., 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la resistencia a los antibióticos incrementa cuando las bacterias se encuentran formando parte de una biopelícula. Aunque es necesario tomar en cuenta el crecimiento en este formato, debido a que es como las bacterias se encuentran principalmente en el ambiente, los estudios en bacterias creciendo en forma libre también son útiles debido a que generan un primer acercamiento del comportamiento de las mismas en presencia de distintas concentraciones de antibióticos a las que son expuestas, lo cual es de importancia al momento de diseñar una terapia farmacológica para el tratamiento de las infecciones causadas por las bacterias.

Debido a que las biopelículas representan una ventaja selectiva para las bacterias que se encuentran dentro de ellas, es necesario realizar estudios que permitan profundizar en los mecanismos que actúan para conferir el alto nivel de resistencia a los antimicrobianos. Así como también, profundizar en la elaboración de tratamientos eficaces que permitan actuar sobre estas asociaciones de microorganismos, con el fin de combatir su proliferación en los centros de salud.

8. CONCLUSIONES

- Del total de cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, el 57% fue sensible al antibiótico amikacina (30 µg/mL) y el 43% fue resistente. El 94 % de las cepas sensibles fueron provenientes de los ambientes del Servicio de Neonatología y de la Unidad de Terapia Intensiva.
- De las 30 cepas de *A. baumannii* creciendo en forma libre, el 67 % fue resistente a tetraciclina (30 µg/mL) y el 33 % fue sensible. Se encontró una distribución similar de los fenotipos en los 3 grupos de cepas.
- La amikacina ejerció un efecto más eficaz que la tetraciclina sobre las cepas de *A. baumannii* de origen clínico, creciendo en forma libre.
- Las 30 cepas de *A. baumannii* fueron catalogadas como formadoras de biopelículas denominadas como fuerte.
- Las 30 cepas de *A. baumannii* creciendo en forma de biopelículas, fueron resistentes a las 4 concentraciones de amikacina y tetraciclina ensayadas (15 µg/mL, 30µg/mL, 60µg/mL y 120 µg/mL) durante 1 h y 24 h.
- El éxito de la colonización de *A. baumannii* en el HUC, está mediado por la habilidad que posee este microorganismo para formar biopelículas y poder resistir a distintos agentes antimicrobianos.
- Este estudio constituye el primer aporte nacional, al comparar el fenotipo de resistencia a antibióticos en bacterias de origen clínico en dos formatos de crecimiento.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdi-Ali, A., Hendiani, S., Mohammadi, P., Gharavi. 2014. Assesment of Biofilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol.* **7(1)**:e8606.
- Betancourth, M., Botero, J., Rivera, S. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb Med.* **35(3)**: 34-39.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. 2012. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds a critical review. *Int J Antimicrob Ag.* **39**: 381-389.
- Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med.* **38**: 149-158.
- Cantón, R. 2003. Interpretación del antibiograma en la elección del antibiótico y vía de administración. *Rev Clin Esp.* **203(12)**: 608-11.
- Cerqueira, G., Peleg, A. 2011. Insights into *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *IUBMB LIFE.* **63(12)**: 1055-1060.
- Chalbaud, A. 2010. Caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65(2)**: 232-260.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. 26(3).
- Cloete, T. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeter Biodegr.* **51**: 277-282.
- Coyne, S., Courvalin, P., Périchon, B. 2011. Efflux-mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* sp. *Antimicrob Agents Ch.* **55(3)**: 947-953.
- Espinal, P., Martí, S., Vila, J. 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect.* **80**: 56-60.
- Espinal, P., Roca, I., Vila, J. 2011. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-*baumannii* *Acinetobacter*. *Future Microbiol.* **6(5)**: 495-511.
- Fournier, P., Richet, H. 2006. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. *Clin Infect Dis.* **42**: 692-699.
- Gaddy, J., Actis, L. 2010. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* **4**: 273-278.
- Gayoso, C., Mateos, J., Méndez, J., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., Martínez de Ilarduya, O y colaboradores. 2013. Molecular Mechanisms Involved in the Response to Desiccation Stress and Persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* **13**: 460-476.
- Gordon, N y Wareham, D. 2010. Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Ag.* **35**: 219-226.

- Guariglia, V., Rizzolo, K., Ramos, Y., Alonso, G. 2008. Estudios de los determinantes de resistencia y de las propiedades conjugativas de los plásmidos presentes en aislados bacterianos. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **5**: 101-104.
- Halachev, M., Chan, J., Constantinidou, C., Cumley, N., Bradley, C., Smith-Bancks, M., Oppenheim, B. y colaboradores. 2014. Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Birmingham, England. *Genome medicine*. **6**: 70.
- Hernández, A., García, E., Yagüe, G., Gómez, J. 2010. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter* **23(1)**: 12-19.
- Hooper, D. 2005. Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologist. *Healthcare epidemiology*. **40**: 1811-1817.
- Jara, M. 2007. Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias*. **22**: 49-55.
- Lee, H., Koh, Y., Kim, J., Lee, J., Lee, Y., Seol, S., Cho, D. y colaboradores. 2007. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cells surfaces. *Clin Microbiol Infect*. **14(1)**: 49-54.
- Levesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P. 1995. PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrob Agents Ch*. **39(1)**: 185-191

- Li, J., Nation, R., Owen, R., Wong, S., Spelman, D., Franklin, C. 2007. Antibigrams of Multidrug-Resistant Clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising Therapeutic Options for Treatment of Infection with Colistin-Resistant Strains. *Clin Infect Dis.* **45**: 594-598.
- Lin, L., Ling, B., Li, X. 2009. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Ag.* **(33)**: 27-32.
- Lin, M.-F. y Lan, C.-Y. 2014. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases.* **2**: 787-814.
- Longo, F., Vuotto, C., Donelli, G. 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* **37**: 119-127.
- Lu, J., Perng, C., Lee, S., Wan, C. 2000. Use of PCR with Universal Primers and Restriction endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol.* **38(6)**: 2076-2080.
- Luque, J., Herráez, A. 2001. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier, Primera Edición, Madrid, España.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2004. Brock, Biología de los Microorganismos. Pearson Prentice Hall, Décima Edición, Madrid, España.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S. y colaboradores. 2011. Multidrug-resistant, extensive drug-

resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* **18**: 268-281.

- Maragakis, L., Perl, T. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clin Infect Dis.* **46**: 1254-1263.
- Martí, S., Rodríguez-Baño, J., Catel-Ferreira, M., Jouenne, T., Vila, J., Seifert, H., Dé, E. 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC RESEARCH NOTES.* **4(5)**: 1-4.
- Munoz-Price, L., Weinstein, R., 2008. *Acinetobacter* infection. *New Engl JMed.* **358**; **12**: 1271-1281.
- Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* **53**: 1233-1240.
- Nowroozi, J., Sepahi, A., Kamarposhti, L., Razavipour, R., Mazhar, F. 2014. Evaluation of Ciprofloxacin (*gyrA*, *parC* Genes) and Tetracycline (*tetB* Gene) Resistance in Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections. *Jundishapur J Microbiol.* **7(2)**: e8976.
- Obeidat, N., Jawdat, F., Al-Bakri, A., Shehabi, A. 2014. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. *Am J Infect Control.* **42**: 401-404.

- Palomar, M., Alvarez, F., Olaechea, P., López, M., Gimeno, R., García, M., Seijas, I. y colaboradores. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva [en línea]. 2013. Consulta: 31/01/2015.
- Passerini, B., Calenda, M., Vay, C., Franco, M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* from device-associated nosocomial infections. *Revista Argentina de Microbiología*. **39**: 204-212.
- Patwardhan, R.B., Dhakephalkar, P.K., Niphadkar, K.B., Chopade, B.A. 2008. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harboring multiple plasmids. *Indian J Med Res*. **128**: 178-187.
- Peleg, A., de Breij, A., Adams, M., Cerqueira, G., Mocali, S., Galardini, M., Nibbering, P. y colaboradores. 2012. The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. *PLOS ONE*. **7(10)**: e46984.
- Peleg, A., Hooper, D. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med*. **362(19)**: 1804-1813.
- Pour, N., Dusane, D., Dhakephalkar, P., Zamin, F., Zinjarde, S., Chopade, B. 2011. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *Fems Immunol Med Microbiol*. **62**: 328-338.
- Prashanth, K., Makki, A. R., Saranathan, R., Pagal, S., & Vasanth, T. 2012. Antibiotic resistance, biofilms and quorum sensing in *Acinetobacter* species. *INTECH Open Access Publisher*. **8**: 179-212.

- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2002. Microbiología. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. Madrid, España.
- Puentes, L. Caracterización de Integrones Clase I en cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas del Hospital Universitario de Caracas. Tesis de Pregrado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Pujol, M., Limón, E. 2013. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **31(2)**: 108-113.
- Ramos, Y. 2014. Caracterización fenotípica, funcional y molecular de la Resistencia a desinfectantes expresada por aislados de *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Estudio en células libres y en biopelículas. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Ramos, Y., Alonso, G. 2013. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes en bacterias aisladas de ambientes naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. **31**: 130-137.
- Sanchez, C., Mende, K., Beckius, M., Akers, K., Romano, D., Wenke, J. Murray, C. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*. **13(47)**: 1-12.
- Shin, J., Lee, H., Kim, S., Kim, J. 2009. Proteomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* in Biofilm and Planktonic Growth Mode. *J Microbiol*. **47(6)**: 728-735.
- Tafur, J., Torres, A., Villegas, M., 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asoc Colomb Infect*. **12(3)**: 217-226.

- Vila, J., Martí, S., Sánchez-Céspedes, J. 2007. Porins, efflux and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemoth.* **59**: 1210-1215.
- Wroblewska, M., Sawicka-Grzelak, A., Marchel, H., Luczak, M., Sivam, A. 2008. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *Fems Immunol Med Microbiol.* **53**: 140-144.
- Yeom, J., Shin, J., Yang, J., Kim, J., Hwang, G. 2013. ¹H NMR-Based Metabolite Profiling of Planktonic and Biofilm Cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. *PLOS ONE.* **8 (3)**: e57730.
- Zarrilli, R., Casillo, R., Di. Popolo, A., Tripodi, M.-F., Bagattini, M., Cuccurullo, S., Crivaro, V. y colaboradores. 2007. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect.* **13(5)**: 481-489.