

PRIMER AISLAMIENTO EN AMÉRICA DEL NORTE DE
Acinetobacter baumannii MULTIRESISTENTE PORTADOR DE
*bla*_{OXA-72} PLASMÍDICA.

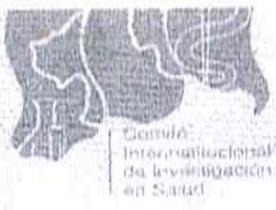
Turrubiartes-Martínez EA¹, Tamayo-Legorreta EM², Cerda-Ramos L³, Flores-Santos A³, Tovar-Oviedo J⁴, Silva-Sánchez J², Niño-Moreno P.¹

¹Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Facultad de Ciencias Químicas UASLP. ²Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. ³Laboratorio de Microbiología Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto." ⁴Laboratorio de Microbiología Facultad de Ciencias Químicas UASLP.

cd_alex2@hotmail.com

RESUMEN.

Objetivo. Identificar y caracterizar molecularmente genes que codifican para carbapenemasas clase D en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. **Materiales y métodos.** La identificación bacteriana y la susceptibilidad antimicrobiana se realizaron con el equipo Phoenix (Becton Dickinson Company). El análisis filogenético de las cepas bacterianas se realizó por Electroforesis en gel de campos pulsados y la identificación de los genes que codifican para carbapenemasas por la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos para cada familia (OXA23, OXA24, OXA51 y OXA58) y posteriormente una secuenciación automatizada. La localización genómica se realizó mediante hibridación tipo southern previa extracción de plásmidos por kit comercial. **Resultados** Todos los aislamientos fueron multiresistentes, pertenecían a un solo grupo clonal (A) con dos subtipos (A1/A2) y amplificaron para el gen *bla*_{OXA-72}, miembro de la familia de *bla*_{OXA-24} y que difieren en la proteína que codifican en la sustitución de un solo aminoácido. Los aislamientos contienen un plásmido de aproximadamente 12 Kb y los resultados de la hibridación tipo southern indican que el gen *bla*_{OXA-72} se localiza en él. Dentro del contexto genético se encontró las secuencias XerC/XerD flanqueando a *bla*_{OXA-72} que según la literatura están involucrados en la movilización de secuencias cortas de ADN. Adicionalmente se amplificó la secuencia IS*AbaI* que no está asociada a *bla*_{OXA-51} (cromosómica). **Conclusión** La producción de carbapenemasas de clase D fue el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos por *Acinetobacter baumannii*, siendo este el primer reporte en América del Norte de *Acinetobacter baumannii* multiresistente portador de *bla*_{OXA-72} plasmídica. **Palabras clave:** *Acinetobacter*, carbapenemasas

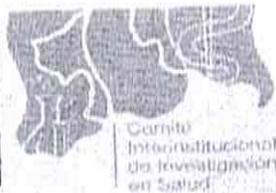


INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales representan hoy en día un problema mundial de enorme importancia clínica y epidemiológica al ser una de las principales causas del aumento de la morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados. *Acinetobacter baumannii* ha emergido en los últimos años como un importante patógeno nosocomial por su marcada habilidad de adquirir determinantes de resistencia motivo por el cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo incluyó en la lista de los microorganismos objeto de vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario.

El género *Acinetobacter* incluye varias especies con morfología cocobacilar, Gram negativas, aerobias estrictas, no fermentadoras, oxidasa negativas e inmóviles y de amplia distribución en el ambiente, de los cuales *A. baumannii* es la especie más representativa. Dentro de los antimicrobianos más utilizados en la contención de *A. baumannii* se encuentran los carbapenémicos sin embargo, su eficacia se ha visto comprometida por la producción de carbapenemasas clase D también llamadas β -lactamasas tipo OXA. Existen nueve subgrupos de OXAs de los cuales cuatro se encuentran presentes en *Acinetobacter baumannii*: OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58.

Estas enzimas poseen un sitio activo de serina y actúan hidrolizando los carbapenémicos. El mecanismo catalítico de las β -lactamasas tipo OXA es a través de la formación de un intermediario acil en la serina catalítica que posteriormente es desacilado para producir la inactivación del antibiótico mediante la hidrólisis del enlace C-N del anillo β -lactámico. Dentro del contexto genético de los genes que codifican para estas enzimas, se sabe que existen elementos genéticos móviles como las secuencias de inserción (IS) encontradas río arriba o río abajo de estos genes y cuya importancia radica en poseer regiones que sobre-expresan los genes de resistencia. Las IS se han asociado a *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-51} (esta última corresponde a una carbapenemasa intrínseca del género *Acinetobacter*).



De los mecanismos de resistencia en *A. baumannii* es el enzimático el de más fácil diseminación en el medio hospitalario, porque la mayoría de los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en plásmidos y con esto puede ocurrir una transferencia horizontal de resistencia. En los últimos años, este mecanismo ha despertado un enorme interés a nivel mundial por su importancia en la transmisión de resistencia entre bacterias, estableciendo cepas de patógenos multiresistentes que pueden complicar de forma importante el desenlace clínico del paciente infectado.

La Organización Mundial de la salud ha puesto de manifiesto que si no se hace frente al fenómeno de la resistencia bacteriana se corre el riesgo de no alcanzar en 2015 los objetivos de desarrollo del milenio en materia de salud. La rápida comprensión de los mecanismos moleculares que generan esta resistencia es de suma importancia, además en México la información disponible al respecto es muy limitada.

OBJETIVO

Identificar y caracterizar molecularmente genes que codifican para carbapenemasas clase D en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio.

Se realizó un análisis cuantitativo, descriptivo y observacional con un periodo de recolección de muestras clínicas de diciembre de 2009 a marzo 2010. Se incluyeron en el estudio aquellos aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Las características clínicas de los aislamientos como tipo de muestra, servicio hospitalario de procedencia y diagnóstico de los pacientes se obtuvieron a partir de los informes clínicos.

Identificación y susceptibilidad.

La identificación bacteriana y la susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó con el equipo automatizado Phoenix (Becton Dickinson Company, EUA) y confirmados con el

equipo MicroScan (Siemens Healthcare, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Genotipificación de *Acinetobacter baumannii*.

El análisis filogenético de las cepas bacterianas se realizó por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés). El ADN fue obtenido según el método descrito por Kaufmann y digerido con 25 IU de *Apal* a 37°C durante toda la noche y los fragmentos de restricción se separaron con el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), en geles de agarosa al 1 % y visualizadas con bromuro de etidio, el análisis de fragmentos de restricción se realizó de acuerdo con los criterios de Tenover *et al* y el software GelCompar II.

Actividad de carbapenemasa.

Se realizó una extracción de proteínas totales mediante sonicación. La cuantificación de proteínas totales en el sobrenadante se determinó empleando un NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, EUA). La medición de la hidrólisis de Imipenem (150 mM) se realizó a una $\lambda = 299$ nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda EUA).

Identificación de genes: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-58-like} y *bla*_{OXA-51}

Los genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24 like}, *bla*_{OXA-58-like} y *bla*_{OXA-51} se identificaron por PCR con oligonucleótidos específicos para cada familia de carbapenemasas según lo descrito por Carlone *et al.*, 1986. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1% en TAE 1X y visualizados con bromuro de etidio, posteriormente fueron secuenciados de manera automatizada en la Unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La conversión de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó con el programa Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>). Los alineamientos múltiples de los nucleótidos y aminoácidos se efectuaron en el programa ClustalW del paquete GCG (Genetics Computer Group) usando como secuencias de referencias los números de acceso para

expasy C7FB02, Q9LAP2, Q2TR58 y Q5QT35 para bla_{OXA-24} , bla_{OXA-23} , bla_{OXA-58} y bla_{OXA-51} respectivamente.

Identificación de: IS*Abal* Y SU ASOCIACIÓN CON bla_{OXA-51}

La identificación de IS*Abal* se realizó por PCR con los oligonucleótidos: sentido 5'-ATG-ACA-CAT-CTC-AAT-GAG-TTA-T-3' y anti-sentido 5'-AAT-GAT-TGG-TGA-CAA-TGA-AG-3'. La asociación de IS*Abal* con bla_{OXA-51} se determinó con el oligonucleótido sentido de IS*Abal* y el oligonucleótido antisentido de bla_{OXA-51} .

Perfil de plásmidos: localización genómica de carbapenemasas: Se realizó la extracción de plásmidos de acuerdo al procedimiento recomendado en el kit de extracción de miniprep (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems - Promega A1330). Posteriormente se realizó una hibridación tipo southern utilizando el sistema Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Características clínicas de los aislamientos.

En este estudio *A. baumannii* originó un brote nosocomial bacteriano en el Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" de la ciudad de San Luis Potosí. Se incluyeron 45 aislamientos de *A. baumannii*, el 82% correspondieron a muestras de pacientes y 18% a aislados del personal de salud y válvulas de suministro de oxígeno medicinal. Los aspirados traqueales tuvieron la mayor prevalencia de *A. baumannii* (36%) dentro de las muestras biológicas analizadas. *A. baumannii* fue aislado de diversas unidades de servicios médicos claro indicio de diseminación en todo el centro hospitalario. Los resultados muestran que las manos del personal tuvieron un importante papel en la diseminación del brote, datos que concuerdan con lo reportado por Dijkshoorn y cols. quienes identificaron que el principal vector para la diseminación de *A. baumannii* en un hospital, es un paciente colonizado y que la diseminación ocurre por diversas maneras, la más común es a través de las manos del personal de salud.

Susceptibilidad antimicrobiana.

En la susceptibilidad antimicrobiana de *A. baumannii* se ensayaron diferentes antimicrobianos y se observó que todos los aislamientos de *A. baumannii* resultaron resistentes a todos los antibióticos ensayados como lo son amikacina, gentamicina, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, piperacilina-tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicina, cirpofloxacino, levofloxacino y trimethoprim-sulfamethoxazol

55

Genotipificación de *A. baumannii*

El análisis de la genotipificación demostró que los aislamientos de *A. baumannii* estaban genéticamente relacionados y que pertenecían a un grupo clonal predominante (Λ) con dos subtipos ($\Lambda 1/\Lambda 2$) Indicando una diseminación clonal en los pacientes del hospital.

Identificación de: *bla_{OXA-51}* E IS*Aba1*

La caracterización molecular del género *Acinetobacter* se determinó con la presencia del gen *bla_{OXA-51}*. Los resultados indican que todos los aislamientos amplificaron para este gen. Adicionalmente, se determinó el elemento genético IS*Aba1* y su posible asociación con *bla_{OXA-51}*. La secuencia IS*Aba1* estuvo presente en todos los aislados pero sin asociación a *bla_{OXA-51}*. Lo que indica que la resistencia a carbapenémicos es debida a otra familia diferente a la sobreproducción de OXA-51 (cromosómica).

Identificación de carbapenemasas de clase D.

De los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de infecciones por *A. baumannii* son los carbapenémicos los que presentan el mayor espectro antimicrobiano. Los resultados de los ensayos de fenotipificación e hidrólisis de imipenem nos sugirieron la posible presencia de carbapenemasas como mecanismo enzimático de resistencia. Con el objeto de identificar el tipo de carbapenemasa presente en estos aislamientos y que explicaran los resultados de hidrólisis de imipenem se realizaron los ensayos de PCR para los genes que codifican para las familias de β -lactamasas de tipo OXA descritas en *A. baumannii*: *bla_{OXA-58-like}*, *bla_{OXA-23-like}* y *bla_{OXA-24-like}*. Los resultados

mostraron únicamente la amplificación de *bla_{OXA-24-like}* con un producto de PCR de 828 pb.

El análisis de la secuencia del producto amplificado indicó que correspondía a la carbapenemasa de clase D, OXA-72, miembro de la familia de OXA-24 y que difiere de la misma en el cambio de un solo aminoácido (glicina por ácido aspártico en la posición número 299). La primer enzima OXA-72 identificada en *A. baumannii* fue en Tailandia en 2004 (GenBank AY739646) y posteriormente en China, Corea, Taiwán, Francia, Italia, Brasil y España. Hasta el momento no ha sido reportada en América del Norte. De acuerdo a Po-Liang Lu y cols los aislamientos productores de OXA-72 son más resistentes a carbapenémicos que aquellos aislamientos con IS*Abal* río arriba de OXA-51. Aún, cuando en esta clona identificamos elementos del tipo IS*Abal* nuestros resultados demostraron que estas secuencias no se asociaban a OXA-51 u OXA-72 indicando que la expresión de *bla_{OXA-72}* y *bla_{OXA-51}* no es impulsada por el promotor presente en esta secuencia de inserción lo que concuerda con el reporte de Mugnier DP y cols.

Perfil de plásmidos: localización genómica de carbapenemasas.

Se identificó un plásmido de aproximadamente 12 Kb y los resultados de la hibridación tipo southern indican que el gen *bla_{OXA-72}* se localiza en él. Dentro del contexto genético se encontró las secuencias XerC/XerD flanqueando a *bla_{OXA-72}* que según la literatura están involucrados en la movilización de secuencias cortas de ADN. En este punto, los reportes en la literatura muestran este mecanismo como la vía principal en la transmisión horizontal de la resistencia a antimicrobianos entre las bacterias en el ambiente hospitalario.

Dentro de nuestros objetivos a corto plazo se encuentra realizar la caracterización molecular de mecanismos de resistencia alternos ya que nuestros aislamientos también mostraron elevada resistencia a otros antimicrobianos que no son hidrolizados por OXA-72. La resistencia bacteriana es un problema a nivel mundial con gran

importancia en América latina, que presenta valores de resistencia mayores a los reportados en América del norte, Europa y Asia Pacífico. Esto, hace evidente la importancia de nuestro estudio como una estrategia en la detección, reporte y vigilancia de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos por patógenos multiresistentes.

CONCLUSIÓN.

La producción de carbapenemasas de clase D fue el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos por *Acinetobacter baumannii*, siendo este el primer reporte en América del Norte de *Acinetobacter baumannii* multiresistente portador de blaOXA-72 plasmídica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Manual para la vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales SSA disponible en Internet en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manuales/Man-Nosocomial/Man-Noso.htm>
- 2.- Peleg AY *et al.* *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;21(3):538-82.
- 3.- Turton, J. *et al* 2006. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett. 258:72-77
- 4.- Zarrilli R, *et al.* Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. Clin Microbiol Infect. 2007 May;13(5):481-9