



**CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DEL GEN  
*bla*<sub>OXA-23</sub> EN AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS DEL COMPLEJO  
*ACINETOBACTER BAUMANNII-CALCOACETICUS***

Vivian Marcela Moreno Mejía

Proyecto de Tesis de Maestría para optar al título de  
Magíster Scientiae en Microbiología

Dirigido por:  
José Ramón Mantilla Anaya  
Químico Farmacéutico, M.Sc.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
POSGRADO INTERFACULTADES EN MICROBIOLOGÍA  
BOGOTÁ, D.C. Mayo de 2010**

*Dedico este trabajo a Dios mi fortaleza en el camino, a Germán, Sofía y Paula que son la luz de mi vida , a mis Padres y hermanos Esperanza y Rigoberto , David, Diana por que con su incondicional amor y apoyo no me permitieron decaer en los momentos difíciles.*

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor José Ramón Mantilla Anaya, Director de esta tesis, por la oportunidad que me brindó para formarme como investigadora en el grupo de Epidemiología Molecular, su enseñanzas, paciencia y constante apoyo durante este proceso.

A las profesoras Emilia María Valenzuela y María Teresa Reguero, por sus valiosas enseñanzas y consejos durante este trabajo.

A Ingrid Yamile Pulido por su constante asesoría, amistad y consejos.

A mis compañeros del grupo de Epidemiología Molecular: Alexis, Andrea Hernández, Olga, Victoria, Vanessa, Pilar, Luisa, Yamile, Andrea Najjar. Por su amistad, constante apoyo y colaboración.

A mis compañeros del Instituto de Biotecnología: Patricia, Jorge, Natalia, Paula y John por su colaboración.

A todas las personas que trabajan en el instituto que de una u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo: Yolanda, Erlida, Oscar y Deisy.


A todo el personal de Postgrado Interfacultades de Microbiología: especialmente la profesora Marta Fontanilla y Socorro Prieto, porque siempre estuvieron dispuestas a escuchar y ayudar.

A todos mis compañeros de la maestría: que hicieron de estos dos años agradables, por todos los momentos vividos y por su apoyo en los momentos difíciles: Alexandra, Oscar, Carolina, Mery, Julieth, Yenny, Sebastian, Carlos, Carolina Vizcaino, Sebastian.

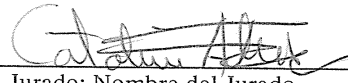
**NOTA DE ACEPTACIÓN**

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el  
(colocar la fecha en que sustento-aprobó)

En constancia firman:



Jurado: Nombre del Jurado  
Departamento  
Universidad



Jurado: Nombre del Jurado  
Departamento *Biotecnología*  
Universidad *Nacional de Colombia*



Director de Tesis  
Universidad

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	3
TABLA DE CONTENIDO .....	4
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	13
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>15</b>
2.1 GENERALIDADES DEL Complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>	15
2.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL COMPLEJO <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> A CARBAPENÉMICOS.....	16
2.2.1 Mecanismos enzimáticos.....	18
2.2.1.1 Carbapenemasas.....	18
2.2.1.2. Carbapenemasas tipo OXA.....	20
2.2.1.2.1 Familia OXA-23.....	21
2.2.1.2.2 Familia OXA-24.....	21
2.2.1.2.3 Familia OXA-51.....	21
2.2.1.2.4 Familia OXA-58.....	21
2.2.2 Mecanismos no enzimáticos.....	21
2.2.2.1 Disminución de permeabilidad de la membrana externa.....	21
2.2.2.2 Aumento de la expulsión del antibiótico por activación de bombas de eflujo.....	22

2.2.2.3 Modificaciones del sitio blanco del antibiótico.....	23
2.3. Elementos genéticos móviles.....	23
2.3.1 Plásmidos.....	23
2.3.2 Secuencias de Inserción.....	24
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	27
3.3 MATERIAL BIOLÓGICO .....	27
3.4 EVALUACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA PARA LA SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS .....	27
3.4.1 Suceptibilidad a antibióticos .....	28
3.4.2 Detección de carbapenemasas de clase D por PCR.....	28
3.5 DETERMINACIÓN DE PERFILES PLASMÍDICOS .....	30
3.5.1 Extracción de plásmidos de aislamientos resistentes a carbapenémicos. ....	30
3.6 DETECCIÓN DE PLASMIDOS PORTADORES DEL GEN <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .....	30
3.6.1 Detección por PCR del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> en ADN plasmídico.....	30
3.6.2 Detección de plásmidos portadores del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> por hibridización. ...	31
3.6.2.1 Construcción de sonda marcada con digoxigenina específica para búsqueda del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> y 16S rRNA .....	32
3.6.2.2 Clonación del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .....	32
3.6.2.3 Transferencia y fijación de ADN plasmídico en membrana de Nylon.....	32
3.6.2.4 Hibridización con sonda marcada con digoxigenina específica para el gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .....	33
3.6.2.5 Decoloración y deshibridización.....	33
3.6.2.6 Rehibridización .....	33

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS.....	34
4.1.1 Características fenotípicas.....	34
4.1.2 Características genéticas .....	35
4.2 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DEL GEN <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .....	38
4.3. DETECCIÓN DEL GEN <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> EN DNA PLASMÍDICO .....	41
4.3.1 Detección de plásmidos portadores del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> en aislamientos del complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> .....	41
4.3.2 Hibridización con sonda específica para búsqueda del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> en ADN plasmídico .....	42
4.3.3 Hibridización con sonda específica para búsqueda del gen 16S rRNA.....	43
5. DISCUSIÓN .....	45
6.CONCLUSIONES.....	49
7. BIBLIOGRAFÍA.....	50
8. ANEXOS.....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Dendrograma de $\beta$ -lactamasas tipo OXA.....	20
<b>Figura 2</b>	Estructura de una secuencia de inserción.....	24
<b>Figura 3</b>	Estructuras genéticas involucradas en la movilización y sobreexpresión del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .....	25
<b>Figura 4</b>	Esquema del diseño experimental.....	26
<b>Figura 5</b>	Perfil de resistencia de los aislamientos del complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> .....	34
<b>Figura 6</b>	Amplificación de los genes <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> .....	36
<b>Figura 7</b>	Perfiles plasmídicos.....	38
<b>Figura 8</b>	Perfiles plasmídicos.....	39
<b>Figura 9</b>	Amplificación de los genes <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> sobre DNA plasmídico extraído.....	40
<b>Figura 10</b>	Electroforesis DNA plasmídico nativo y digerido con S1 transferido para hibridización.....	41
<b>Figura 11</b>	Membrana hibridizada con sonda específica para búsqueda del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .....	42
<b>Figura 12</b>	Membrana hibridizada con sonda específica para búsqueda del gen 16S rRNA.....	43

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Mecanismos enzimáticos de resistencia reportados para el complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> .....	17
<b>Tabla 2.</b>	Mecanismos no enzimáticos de resistencia reportados para el complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> .....	17
<b>Tabla 3</b>	Carbapenemasas reportadas en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	19
<b>Tabla 4</b>	Iniciadores utilizados para amplificación de los genes <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> .....	29
<b>Tabla 5</b>	Condiciones de Amplificación de los genes <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> - <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> .....	29
<b>Tabla 6</b>	Iniciadores utilizados para amplificación del gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	31
<b>Tabla 7</b>	Número y porcentaje de aislamientos estudiados codificantes de de enzimas carbapenemasas de clase D .....	35
<b>Tabla 8</b>	Aislamientos clonales y no clonales seleccionados en los 4 hospitales.....	37
<b>Tabla 9</b>	Descripción del tamaño de plásmidos presentes en aislamientos seleccionados del complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> .....	39

## RESUMEN

Diferentes especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* se han convertido en la actualidad en un problema epidemiológico, fundamentalmente por la rápida diseminación de aislamientos multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo (4, 42). Esto ocurre gracias a la capacidad de adquisición de determinantes genéticos que le proveen de resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles en el mercado(44).

Entre estos determinantes el más diseminado a nivel mundial es el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> que codifica la producción de una carbapenemasa de clase D que le provee resistencia a carbapenémicos(40). En Colombia ha sido informada la existencia de este gen en aislamientos causantes de infección, que se han catalogado como endémicos de algunas instituciones y otros como causantes de brotes epidémicos (31, 54, 56, 38). En estos estudios se ha concluido que el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos es debido a la producción de la carbapenemasa OXA-23 y se ha considerado que el gen codificante de esta enzima se encuentra ampliamente diseminado en Colombia, por lo cual es pertinente conocer las características del ambiente genético de este gen y los factores que puedan estar facilitando la diseminación de este gen de resistencia.

En este estudio se analizó una población de 112 aislamientos del Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* clonales y no clonales resistentes a carbapenémicos, portadores del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> y provenientes de 4 hospitales de tercer nivel de atención en Colombia. Mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó la búsqueda de carbapenemasas de clase D. En el 99% de los aislamientos se detectó el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>; en el 91% el gen *bla*<sub>OXA-51</sub>, y solo en un aislamiento (0,9%) el gen *bla*<sub>OXA-58</sub>. En ninguno de los aislamientos estudiados se obtuvo amplificado para el gen *bla*<sub>OXA-24</sub>. El análisis electroforético del ADN plasmídico mostró la presencia de plásmidos con tamaños moleculares que oscilaron entre 1.3 Kpb y 35 Kpb y se evidenció, 19 perfiles plasmídicos diferentes que representan a los 10 grupos clonales estudiados y a los 58 aislamientos que no pertenecían a grupos clonales. Para identificar los plásmidos portadores del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> se utilizó la estrategia de hibridización “Southern Blot”. En ninguno de los aislamientos estudiados se encontró el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> localizado en bandas plasmídicas, lo que nos indica que estas estructuras no están participando en la diseminación de este gen en los cuatro hospitales estudiados.

## INTRODUCCIÓN

El complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* ha emergido durante las tres últimas décadas en diferentes partes del mundo, como un patógeno oportunista responsable de infecciones severas. Sus más importantes representantes son las especies de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genomoespecie 3, *Acinetobacter* genomoespecie 13 TU y *Acinetobacter calcoaceticus* (1, 44). Las tres primeras especies han sido involucradas en infecciones humanas tales como: neumonías asociadas a ventilación mecánica, bacteriemia, endocarditis, meningitis e infecciones del tracto urinario (1, 3, 44).

Las especies patógenas del complejo se han convertido en un problema clínico por su habilidad de adquirir determinantes genéticos de resistencia y por la proliferación de aislamientos hospitalarios con resistencia a múltiples antibióticos (multirresistentes). Para el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por estos organismos multirresistentes se recomienda el uso de carbapenémicos (3, 4, 44). Sin embargo, cada vez son más frecuentes los aislamientos nosocomiales resistentes a este grupo de antibióticos; adicionalmente en Latinoamérica, las tasas de resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos tienden a ser mucho más elevadas que en Estados Unidos y Europa (5).

El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, esta dado por la producción de enzimas hidrolíticas tipo  $\beta$ -lactamasas. La primera de estas enzimas se reportó por primera vez en 1985 en Edimburgo, Escocia, se denominó ARI-1 y se encontró codificada en un plásmido, actualmente esta enzima es llamada OXA-23 y es la más diseminada entre los aislamientos del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* a nivel mundial (44, 51).

En investigaciones realizadas en Colombia por el grupo de Epidemiología Molecular de la Infección Nosocomial de la Universidad Nacional de Colombia, se relacionó la resistencia a carbapenémicos con la producción de  $\beta$ -lactamasas codificadas por el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, el cual se encontró asociado con la secuencia de inserción IS*Aba*1, que le provee de un promotor fuerte, para la sobreexpresión de este gen (6, 7, 31). Así mismo en otro estudio realizado por el centro internacional de entrenamiento e investigaciones médicas (CIDEIM) se reportó la presencia de OXA-23 y además se estableció su localización tanto a nivel cromosomal como plasmídico, en poblaciones “clónales” de diferentes hospitales de Colombia (38).

Los reportes de epidemias causadas por el complejo *A. baumannii-calcoaceticus* productor de OXA-23 se han incrementado en todo el mundo (2, 4, 15, 24, 26, 30, 40, 42), y la coexistencia de elementos genéticos móviles como plásmidos y secuencias de inserción asociados a este gen (3, 8, 41, 44), han sugerido que pueden ser los responsables de la diseminación de este gen de resistencia a otras bacterias (3, 8, 19, 43). Es por esto que en este estudio se plantea realizar una caracterización de los plásmidos que codifican el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en aislamientos del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* procedentes de cuatro hospitales colombianos, para estudiar el papel que pueden tener estas estructuras en la diseminación de dicho determinante genético en estas instituciones de salud de nuestro país.

Este estudio aportará información a los hospitales estudiados, y a las instituciones encargadas de la vigilancia epidemiológica de la resistencia, para que evalúen las medidas de control hasta ahora empleadas. De otro lado se determinará si hay diseminación del gen entre aislamientos clónales y no clónales mediada por plásmidos específicos, lo cual aportará una mejor comprensión de la dinámica de diseminación de la resistencia a carbapenémicos en Colombia.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones y brotes nosocomiales causadas por especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* se han incrementado en las últimas tres décadas, asociando a estos microorganismos con una mortalidad aproximada del 30% (3).

Los carbapenémicos (imipenem, meropenem) han sido los antibióticos escogidos para el tratamiento de infecciones severas causadas por especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* multirresistentes. Sin embargo, la efectividad de estos antibióticos, ha disminuido por la aparición de cepas resistentes en todo el mundo, dejando muy pocas opciones terapéuticas y comprometiendo severamente la salud del paciente (35, 40).

Existen diferentes mecanismos asociados con la resistencia a carbapenémicos en aislamientos del complejo *A. baumannii-calcoaceticus*; entre ellas se encuentran la producción de carbapenemasas, la pérdida, disminución o cierre de porinas en membrana externa, alteraciones de las proteínas de unión a penicilina (PBP) y la sobreexpresión de sistemas de eflujo. Entre estos el mecanismo de producción de enzimas carbapenemasas juega un papel importante en la resistencia a carbapenémicos de aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. Estas enzimas incluyen  $\beta$ -lactamasas de la clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas (IMP, VIM, SIM) y de la clase D tipo OXA, que incluye las familias OXA-23, 24, 58 y 51 (32, 33, 35, 36, 40).

Estudios previos realizados por el grupo de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia detectaron en poblaciones del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* la presencia del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> asociado a IS*Aba1* (6, 7, 31) y se propuso que la diseminación de esta resistencia podría obedecer a la localización de estos genes en plataformas tales como los plásmidos, más que la participación de cepas específicas diseminadas en los hospitales.

En contraste otros estudios atribuyen la diseminación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> a la dispersión clonal de determinadas cepas del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (38). Es entonces pertinente investigar si el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> de los aislamientos incluidos en este estudio, se encuentra localizado en plásmidos y si la diseminación de este determinante genético de resistencia puede estar asociada con estas plataformas de movilización.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. El gen *bla*<sub>OXA-23</sub> detectado en aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* obtenidos de cuatro hospitales Colombianos, se encuentra codificado en plásmidos?
2. ¿Qué características comparten los plásmidos portadores del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> de los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* estudiados?
3. Cuáles de los plásmidos presentes en aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* resistente a carbapenémicos, participan en la diseminación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en los cuatro hospitales incluidos en este estudio?

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las características de los plásmidos portadores del gen *bla<sub>OXA-23</sub>*, asociados con la diseminación de la resistencia a carbapenémicos, en aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* de cuatro hospitales colombianos.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* con base en fenotipos y genotipos establecidos.
- Determinar los perfiles plasmídicos presentes en aislamientos seleccionados del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* con resistencia a carbapenémicos.
- Identificar los plásmidos portadores del gen *bla<sub>OXA-23</sub>* en los diferentes perfiles obtenidos de aislamientos del Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* de cuatro hospitales Colombianos.

## 2. MARCO TEORICO

Una de las grandes contribuciones a la medicina moderna fue el desarrollo de efectivos tratamientos antimicrobianos (20). Con la introducción de los antibióticos en los años 30 hubo una marcada disminución de enfermedades causadas por bacterias. Desafortunadamente ya en 1940 se reportó una enzima denominada penicilinas, capaz de hidrolizar la penicilina (20), presentándose fallas en el tratamiento terapéutico de infecciones intrahospitalarias (20). Desde entonces las compañías farmacéuticas han respondido con la creación de nuevos antibióticos semisintéticos, con mejor actividad antibacteriana pero subsecuentemente las bacterias han respondido con la adquisición de genes, que confieren resistencia a dichos antibióticos (20, 22) .

Los principios Darwinianos de evolución entre la población bacteriana son evidentes, provocando la selección y diseminación en todo el mundo de cepas multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* capaces de resistir a la acción de una gran variedad de antibióticos, incluyendo carbapenémicos (35, 36, 43), que han sido los antibióticos betalactámicos de mayor actividad, capaces de evadir la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana (5, 40, 42).

Esta situación se hace más compleja con la adquisición y diseminación de elementos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción, que son capaces de movilizar y así diseminar gran cantidad de genes que confieren resistencia a los diferentes grupos de antibióticos (19, 20, 22).

### 2.1 Generalidades del Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

Debido a la difícil diferenciación por sus características fenotípicas de las especies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* genomoespecie 3 y *Acinetobacter* genomoespecie 13 TU, se ha propuesto referirse a estas cuatro especies con el nombre de Complejo *Acinetobacter baumannii- Acinetobacter calcoaceticus*. Las especies *A. baumannii*, *A. genomoespecie 3* y *A. genomoespecie 13 TU*, son las especies más implicadas en infecciones hospitalarias (44).

Las especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* son bacilos gramnegativos, no fermentadores, catalasa positivo, oxidasa negativo, no móviles,

aerobios y resistentes a la desecación (1, 3, 42, 44). Este complejo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, mayoritariamente en agua y suelo. También se ha aislado de personas sanas a partir de la piel y faringe. Este grupo de microorganismos es capaz de sobrevivir en superficies de implementos hospitalarios por largos periodos (13, 42, 44).

Diferentes especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* han venido emergiendo, desde los años setenta como agente etiológico de infecciones tales como bacteriemia, neumonía, meningitis, infecciones del tracto urinario, e infecciones en heridas quirúrgicas en todo el mundo (1, 3, 35, 44). Este microorganismo ocasiona infecciones especialmente en pacientes inmunocomprometidos, con ventilación mecánica, falla vascular o respiratoria, y que se encuentran internados principalmente en unidades de cuidado intensivo. Además ha sido reportado en heridas de personal militar y en heridas de pacientes quemados (15).

Estos microorganismos se han convertido en una amenaza a nivel hospitalario por su difícil tratamiento, ya que ha adquirido resistencia a diversos grupos de antibióticos de uso hospitalario, incluyendo carbapenémicos que hasta el momento eran los antibióticos de elección para tratar infecciones causadas por aislamientos multirresistentes (3, 8, 26, 44).

## **2.2 Mecanismos de resistencia del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* a carbapenemicos.**

La resistencia de los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* a carbapenémicos es producto de la combinación de diferentes mecanismos, que pueden ser o bien inherentes a la especie es decir resistencia intrínseca o natural; o resistencia adquirida que se obtiene por la transferencia de elementos móviles como plásmidos y transposones, que transportan información genética de una bacteria a otra o por modificaciones o mutaciones puntuales en genes blanco (5, 47).

Los principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos que han sido descritos en el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* se relacionan en la tabla 1 y 2, subdivididos en los de tipo enzimático y los no enzimáticos.

**Tabla 1:** Mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

<b>ENZIMAS REPORTADAS</b>	<b>CLASIFICACION SEGÚN AMBLER</b>	<b>UBICACIÓN</b>
TEM, PER-1, SHV	Clase <b>A</b>	cromosomal o plasmídico
IMP, VIM, SIM	Clase <b>B</b> metalo- $\beta$ -lactamasa	formando parte de integrón de clase 1
AmpC (ADC)	Clase <b>C</b>	cromosomal
OXA de los grupos 23,24,51,58.	Clase <b>D</b>	Cromosomal ,plasmídico

**Tabla 2:** Mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenémicos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

<b>MECANISMOS NO ENZIMATICOS</b>	<b>REPORTES</b>
cambios en Proteínas de unión a penicilina (PBP)	Ausencia PBP de 73 kDa.
Sobreexpresión de Bombas de flujo	Familia de bombas de eflujo tipo RND (Resistencia-nodulación-división) AdeABC
Disminución en el número de porinas por pérdida o reducción en la expresión.	Perdida de CarO 29 kDa. Reducción de OMPs 22 y 33 kDa. OMPs 44-47 y 37 kDa. OprD 43 kDa.

### 2.2.1 Mecanismos enzimáticos

En este mecanismo se da la modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas. Los sistemas enzimáticos más conocidos son las betalactamasas, que actúan rompiendo el anillo betalactámico (5, 35, 40). Actualmente la producción de carbapenemasas, se ha reconocido como el mecanismo más prevalente en el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* resistente a carbapenémicos (40).

#### 2.2.1.1 Carbapenemasas

Son enzimas  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos: Estas enzimas han sido clasificadas en 2 tipos según AMBLER (5, 17, 40):

**Clase D** son las  $\beta$ -lactamasas tipo oxacilinasas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, entre ellas han sido descritas en *Acinetobacter baumannii* los grupos OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA -58 (17, 40, 49).

**Clase B:** corresponden a las metalo- $\beta$ -lactamasas, que presentan en su sitio activo zinc como cofactor, y se caracterizan por hidrolizar además de carbapenémicos la mayoría de los betalactámicos a excepción de aztreonam; son ejemplos de estas enzimas (IMP, VIM, SPM-1, GIM-1); de las cuales las enzimas VIM y IMP han sido descritas en *Acinetobacter baumannii* (3, 39, 40). Hasta el momento estas metalo- $\beta$ -lactamasas no han sido reportadas en cepas de *Acinetobacter baumannii* en Colombia (6, 38). Tabla 3.

**Tabla 3: Carbapenemasas reportadas en *A.baumannii***

<b><math>\beta</math>-lactamasa</b>	<b>Clasificación AMBLER</b>	<b>Codificada</b>	<b>Origen Geográfico</b>
IMP-1	B	Plásmido	Italia, Japón, Corea del sur
IMP-2	B	Plásmido	Italia, Japón
IMP-4	B	No especificado	Hong Kong
IMP-5	B	No especificado	Portugal
IMP-6	B	No especificado	Brasil
IMP-11	B	No especificado	Japón
VIM-2	B	Plásmido	Corea del Sur
SIM-1	B	No especificado	Corea del Sur
<b>OXA-23</b>	D	Plásmido/Cromosomal	Diseminada en Europa, Polinesia, Brasil, Iraq, Tahití, China, Corea, Pakistán, Colombia, Estados Unidos.
<b>OXA-24</b>	D	Cromosomal/plásmido	España, Bélgica, Francia, Portugal, Estados Unidos.
<b>OXA-25</b>	D	Cromosomal	España
<b>OXA-26</b>	D	Cromosomal	España
<b>OXA-27</b>	D	No especificado	Singapur
<b>OXA-40</b>	D	Cromosomal	Francia, España, Portugal
<b>OXA-58</b>	D	Plásmido/cromosomal	Reino Unido, Francia, España, Turquía, Rumania, Grecia, Australia, Rumania, Iraq, Argentina, Kuwait, Estados Unidos.

### 2.2.1.2 Carbapenemasas tipo OXA

Son  $\beta$ -lactamasas de clase D según Ambler que poseen en su centro activo una serina. Inicialmente fueron descritas como  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar oxacilina y cloxacilina, y el de ser pobremente inhibidas por ácido clavulánico y EDTA; en 1993 fue reportada su actividad carbapenemasa en *Acinetobacter baumannii* (39, 40, 52).

Poseen una actividad de hidrólisis sobre carbapenémicos de hasta cien a mil veces menos que las metalobetalactamasas, pero las bacterias logran hacer resistencia, especialmente en el caso del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> cuando se encuentran asociado a elementos IS*Aba1* corriente arriba, que le proveen de un promotor fuerte para su sobreexpresión (18); combinando la acción de estas enzimas con otros mecanismos como sobreexpresión de bombas de eflujo, disminución de porinas son las responsables del fenómeno de resistencia a carbapenémicos (5, 8, 44).

De acuerdo a su secuencia estas enzimas se han clasificado en cuatro grupos o familias; las variantes de cada grupo presentan un 92% de homología y entre grupos se observan diferencias entre el 40 y el 70%. Ver figura 1 (40, 49).

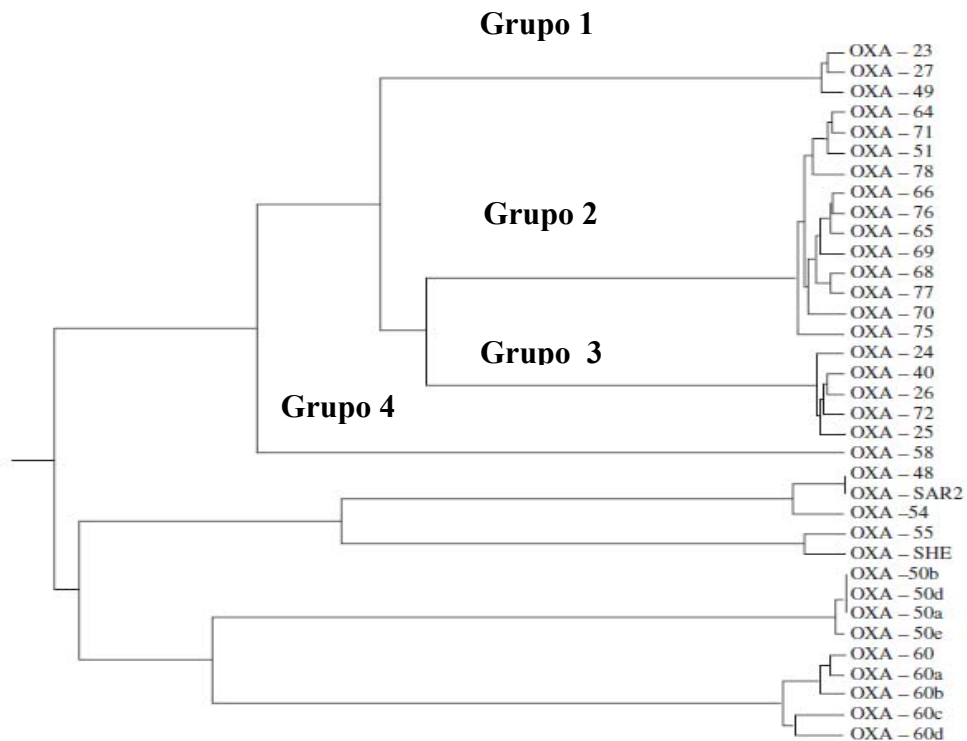


Figura 1 : Dendrograma de  $\beta$ -lactamasas tipo OXA

#### **2.2.1.2.1. Familia OXA-23**

En este grupo además de la OXA-23 se encuentran las variantes OXA-27, OXA-49 que poseen de 2 a 5 aminoácidos diferentes. En la actualidad se ha reportado este gen contenido en el cromosoma y en plásmidos y se ha reportado asociado a elementos ISAb<sub>1</sub>, ISAb<sub>4</sub> (12, 13, 18, 19, 40, 41, 44, 49).

#### **2.2.1.2.2. Familia OXA-24**

Se ubican en este grupo las variantes OXA-25, OXA-26, OXA-40, y OXA-72, cuya secuencia se diferencia por la sustitución de 1 a 5 aminoácidos; los genes que codifican para enzimas de este grupo han sido encontrados tanto en estructuras plasmídicas como en cromosoma, pero aun no ha sido reportada su asociación con secuencias de inserción (12, 13, 39, 44, 49).

#### **2.2.1.2.3. Familia OXA-51**

Este grupo está compuesto por varias enzimas (ver figura 1). Estas enzimas son características de *Acinetobacter baumannii*, y están codificadas a nivel cromosomal; han sido reportadas en todo el mundo y se han encontrado asociadas a elementos ISAb<sub>1</sub>, ISAb<sub>9</sub> (12, 13, 21, 39, 44, 49)

#### **2.2.1.2.4. Familia OXA-58**

Es el cuarto grupo de enzimas tipo OXA informadas en especies del género *Acinetobacter*, con un sólo miembro, OXA-58 la cual fue inicialmente identificada en Francia en 2003 codificada en plásmido y, se ha encontrado asociada a elementos ISAb<sub>1</sub>, ISAb<sub>2</sub>, ISAb<sub>3</sub>, IS1008 (12, 25, 36, 44, 49).

### **2.2.2 Mecanismos no enzimáticos**

#### **2.2.2.1 Disminución de la permeabilidad de la membrana externa:**

La disminución de la permeabilidad en la membrana está dada por la baja expresión de porinas o proteínas que forman canales llenos de agua, embebidos en la membrana externa, que regulan la entrada de moléculas hidrofílicas incluyendo antibióticos, o cambios en su conformación pueden impedir el paso

de antibióticos hidrofílicos como los carbapenémicos, que sólo logran pasar a través de estas. (3, 5, 24, 35, 50)

En *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos se ha reportado la pérdida de una proteína de membrana (OMP) de 29 kDa designada CarO; (40, 44) igualmente se ha informado la disminución de la expresión de proteínas OMP de 22, 33, 36 kDa. Pérdidas de las OMP de 47-44 y 37 kDa conllevan al fenotipo de resistencia se han reportado en la ciudad de Nueva York (40,44).

#### **2.2.2.2 Aumento de la expulsión del antibiótico por activación de bombas de eflujo :**

Las bombas de eflujo son sistemas de transporte que protegen la célula de sustancias tóxicas y su sobreexpresión está asociada con un fenotipo de multiresistencia, operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo que se evita que el antibiótico llegue a su sitio de acción (48, 50, 58 ). Estudios demuestran que la sobreexpresión de estos sistemas, producen una reducción en la acumulación del antibiótico y por ende un aumento en los valores de concentración mínima inhibitoria (58).

En *Acinetobacter baumannii* han sido reportados principalmente sistemas de eflujo tipo AdeABC (resistencia-modulación-división), implicados con resistencia a betalactámicos, como carbapenémicos; también se han visto implicados en resistencia a aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclina, fluoroquinolonas, trimetoprim y bromuro de etidio (40, 42, 44, 58).

Este sistema de eflujo está compuesto por tres componentes: AdeB componente transmembranal, AdeA proteína de fusión de membrana interna, y AdeC forma de OMP, codificado en cromosoma y regulado por, un sistema de dos componentes : sensor quinasa (AdeS) y un regulador de respuesta (AdeR), mutaciones en este sistema regulatorio ha sido asociado con sobreexpresión de la bomba; recientemente se ha reportado, la disrupción a cambio de la mutación que también produce el mismo efecto (40,44).

Existen otros sistemas de eflujo reportados en *Acinetobacter baumannii* que no intervienen en la resistencia a carbapenémicos como son: Tet(A) y Tet (B) perteneciente a la familia MFS (Superfamilia mayor facilitador) , intervienen en la resistencia a tetraciclina y minociclina; AbeM pertenece a la familia MATE (Familia de expulsión de compuestos tóxicos ) incrementan los resultados de

concentraciones mínimas inhibitorias para norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina y gentamicina (37, 48, 58).

### **2.2.2.3 Modificación del sitio blanco del antibiótico:**

Las modificaciones estructurales de los PBP, sitio de acción de los carbapenémicos provocan una reducción en la afinidad del antibiótico. La reducción de la afinidad del antibiótico por los PBP se ha asociado con la resistencia a Imipenen (con MIC > 4 mg/L). La ausencia de una PBP de 73.5 kDa en conjunción con la producción de carbapenemasas también provoca resistencia a carbapenémicos (40, 48).

Estudios han descrito que existen aproximadamente 12 patrones de PBPs mutadas en *Acinetobacter baumannii* que se correlacionan con fenotipos de multirresistencia a betalactámicos (40).

## **2.3 Elementos genéticos móviles**

Estos elementos permiten a la población bacteriana, enriquecer su genoma y desarrollar habilidades para sobrevivir en medios hostiles, continuamente las bacterias pueden cambiar y adaptarse en innumerables ocasiones a sustancias tóxicas como desinfectantes, tóxicos químicos y antibióticos (27, 28, 29).

Existen dos tipos de elementos genéticos móviles principalmente: elementos que pueden moverse de una célula bacteriana a otra (plásmidos conjugativos), elementos que pueden moverse de una molécula de ADN a otra molécula de ADN o en diferentes sitios de la misma (transposones) (22).

### **2.3.1 Plásmidos**

Son pequeñas moléculas circulares de DNA capaces de existir de forma independiente respecto al cromosoma del huésped, pueden movilizar gran cantidad de genes de una célula bacteriana a otra, esto es llamado transferencia horizontal, estos pueden ser conjugativos específicamente cuando los plásmidos portan genes que codifican la formación del Pili sexual en la bacteria, que le permite transferir la copia de sí mismo a otras bacterias(22).

Los plásmidos son plataformas que poseen arreglos de genes, utilizados por las bacterias para sobrevivir en condiciones especiales del ambiente o en presencia de sustancias letales, además de conferir resistencia a condiciones ambientales particulares, también confieren resistencia a sustancias tóxicas y metales pesados(22).

En *Acinetobacter* sp se ha demostrado la diseminación por transferencia horizontal de genes que codifican para betalactamasas de clase D tipo OXA-23 diseminada en todo el mundo y OXA-58; (9) estas enzimas han sido reportadas en estructuras plasmídicas de diferentes tamaños y están involucradas en epidemias a nivel global (9).

El gen *bla*<sub>OXA-23</sub> ha sido reportado en un estudio de aislamientos resistentes a carbapenémicos que pertenecen a 2 clones circulantes en Europa provenientes de 15 países, se encontró dicho gen en plásmidos de 7 Kb , 25 Kb y 150 Kb en un total de 9 aislamientos; (19) Otros estudios han encontrado la presencia del gen que codifica para la betalactamasa OXA-58 flanqueado por 2 secuencias de inserción (IS) que le proveen de 2 promotores independientes para la sobreexpresión de este gen, en un plásmido de 11 Kb llamado pTVICU53 (36).

### 2.3.2 Secuencias de inserción y transposones

Son esencialmente genes saltarines ya que tienen la propiedad de movilizarse intermolecularmente, es decir de cromosoma a plásmido o viceversa (22).

Una secuencia de inserción (IS) esta definida como pequeños segmentos de DNA que codifican el gen de la transposasa (TnpA) necesario para realizar la transposición, el cual se encuentra flanqueado por dos secuencias invertidas repetidas (22) ver figura 2 .

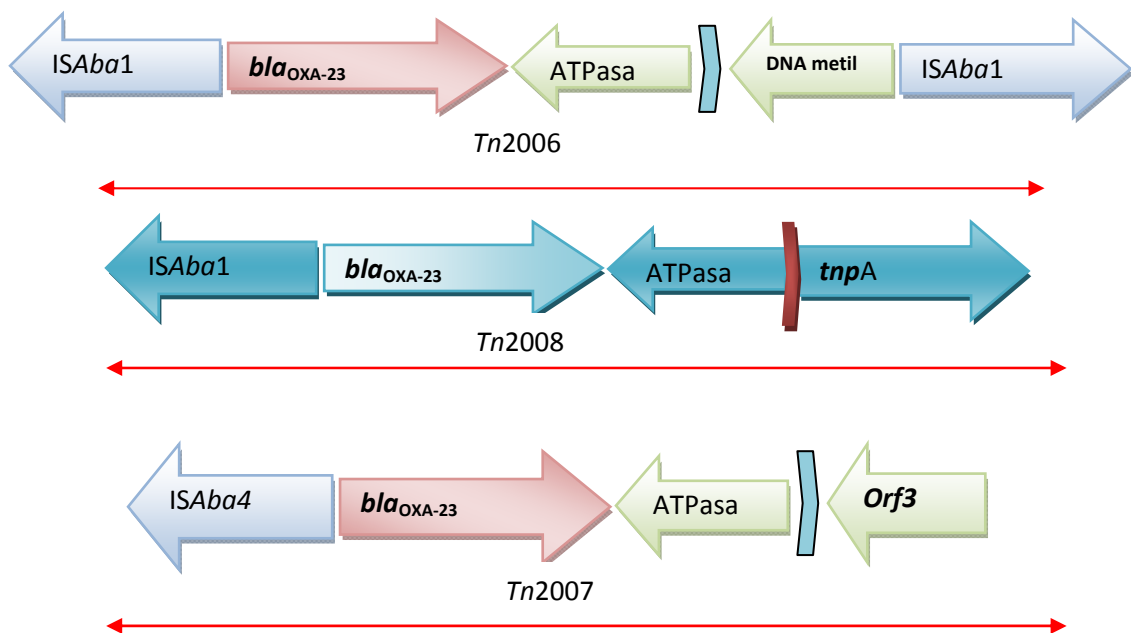


**Figura 2: Esquema de secuencia de inserción (IS)**

Los transposones compuestos poseen una región central que puede contener gran variedad de genes que codifican resistencia a diferentes antibióticos flanqueado por dos secuencias de inserción que permiten la transposición de dicha estructura.

La importancia de los elementos IS para la resistencia a carbapenémicos de *Acinetobacter* sp ha sido apreciada recientemente, estos elementos poseen dos funciones: primero codifican una transposasa que permite la movilización y segundo pueden contener regiones promotoras que dan sobre expresión a los determinantes genéticos ubicados corriente abajo (22, 44).

El elemento más comúnmente encontrado en *acinetobacter* sp asociado al gen *bla<sub>OXA-23</sub>* es la IS*Aba1* (41), parece ser relativamente único de *Acinetobacter* sp (44), recientemente se han descrito diferentes estructuras tipo transposón que pueden estar involucradas en la diseminación del gen *bla<sub>OXA-23</sub>*, ver figura 3. (19)



**Figura 3: Estructuras genéticas involucradas en la movilización y sobreexpresión del gen *bla<sub>OXA-23</sub>*.** El transposón Tn2006 formado por dos elementos IS*Aba1* flanqueando el gen *bla<sub>oxa-23</sub>*, un gen que codifica para una ATPasa y DNAMetilasa; el Tn2008 formado por una IS*Aba1* corriente arriba del gen *bla<sub>OXA-23</sub>*, seguido por un gen que codifica para una ATPasa y un gen que codifica para una transposasa; el Tn2007 formado por una IS*Aba4* corriente arriba del gen *bla<sub>OXA-23</sub>* seguido por un gen que codifica para una ATPasa y un *orf3*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

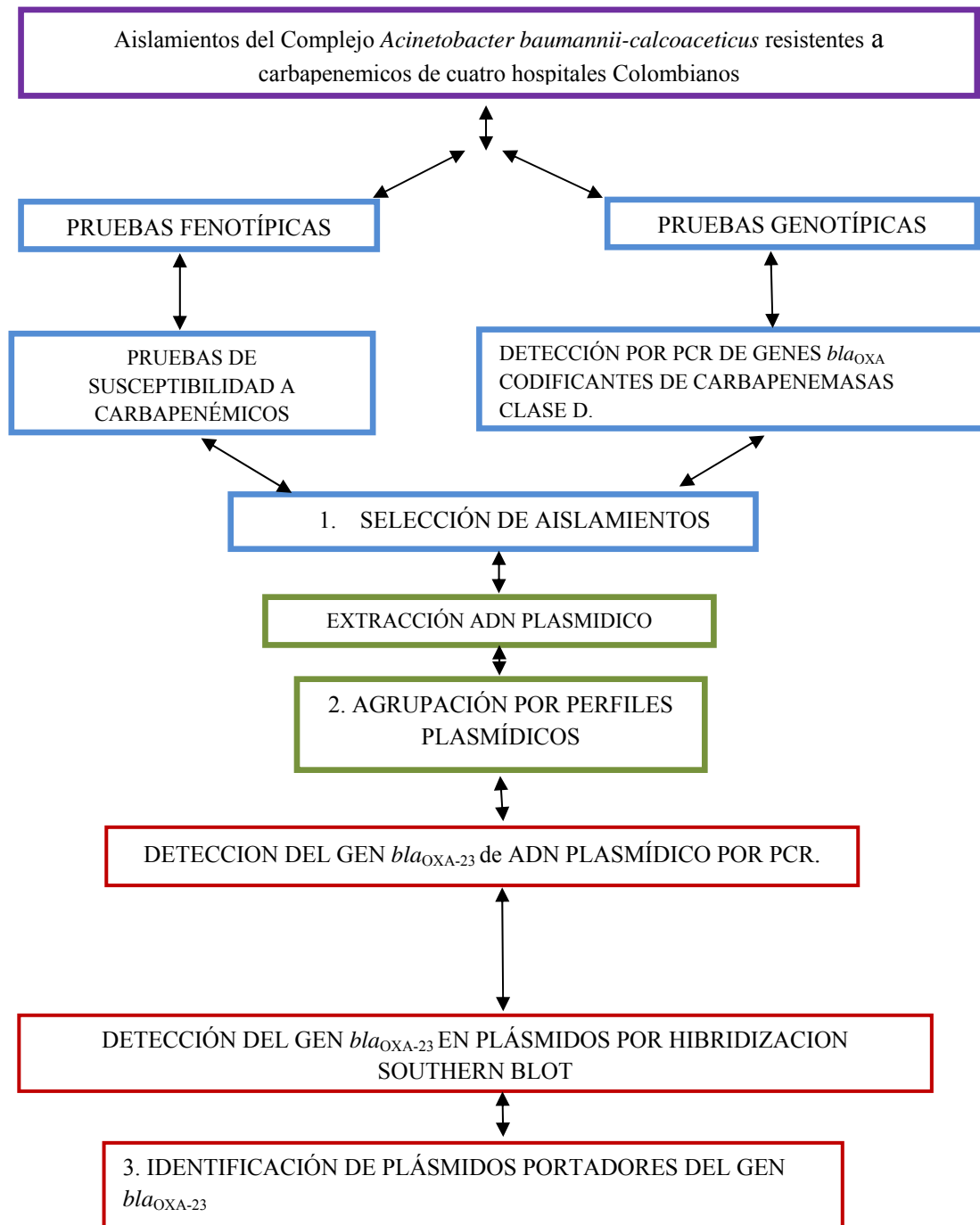


Figura 4 : Esquema del diseño experimental

### **3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Esta investigación corresponde un estudio de tipo descriptivo en el cual por medio de ensayos moleculares se caracterizaron los plásmidos presentes en aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* resistentes carbapenémicos.

### **3.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

Los aislamientos bacterianos utilizados en este proyecto corresponden a aislamientos recolectados a partir de abril de 2004 a octubre de 2009 en cuatro hospitales Colombianos de tercer nivel de atención y comprenden 139 aislamientos complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* resistentes a imipenem y un aislamiento de *Acinetobacter baumannii* sensible a imipenem. Estos aislamientos fueron identificados a través del sistema automatizado VITEK (Biomerieux France), Actualmente se encuentran criopreservados a -70C haciendo parte del cepario del grupo de epidemiología molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

Los aislamientos incluidos en el estudio comprenden aislamientos causantes de infecciones intrahospitalarias en su mayoría, otros se asociaron con colonización y, una menor proporción fueron aislados de objetos inanimados durante la misma época de recolección. Un aislamiento sensible a imipenem se utilizó como control en algunos ensayos. Los aislamientos fueron obtenidos de: hemocultivos, secreciones traqueales, infecciones de heridas, punta de catéter, y secreciones varias.

### **3.4 EVALUACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA PARA LA SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS**

Para la escogencia de los aislamientos a los que se les determinó el perfil plasmídico se consideraron como criterios de selección el patrón de

susceptibilidad antibiótica, la detección del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> y el genotipo determinado por el procedimiento REP-PCR obtenido por anteriores investigaciones realizadas por el grupo de Epidemiología Molecular de la Universidad Nacional del Colombia (55, 57).

### **3.4.1 Susceptibilidad a antibióticos**

La susceptibilidad a diferentes antibióticos se realizó mediante la técnica de difusión en agar con sensidiscos comerciales suministrados por Difco y de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute). Se evaluó la sensibilidad frente a cefotaxima, ceftazidima, piperacilina-tazobactam, aztreonam, imipenem, meropenem, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina, gentamicina, y ciprofloxacina. Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controles, siguiendo las recomendaciones dadas por el CLSI (6).

### **3.4.2 Detección de carbapenemasas de clase D por PCR**

Para confirmar la presencia de betalactamasas de clase D tipo OXA (carbapenemasas) en la población total, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR “por siglas en ingles”) , en un termociclador iCycler® de Bio-Rad laboratories. En la reacción se utilizó *Taq* ADN polimerasa de Invitrogen® y ADN total bacteriano , obtenido por lisis por ebullición según protocolo establecido en el laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo 2).

Para la detección de los determinantes genéticos *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa PCR multiplex, mediante condiciones previamente estandarizadas y con iniciadores generales, descritos por Woodford en 2006 (14). Los iniciadores se detallan en la tabla 4 y las condiciones de amplificación utilizadas se resumen en la tabla 5.

**Tabla 4: Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> (14)**

GEN	INICIADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5´-3´)	REFERENCIA
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	OXA-23 A	DIRECTA	GATCGGATTGGAGAACCAGA	Woodford.2006
	OXA-23 B	INVERSA	ATTTCTGACCGCATTTCAT	Woodford.2006
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	OXA-24 A	DIRECTA	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	Woodford.2006
	OXA-24 B	INVERSA	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	Woodford.2006
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	OXA-51 A	DIRECTA	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	Woodford.2006
	OXA-51 B	INVERSA	TGGATTGCACTTCATCTTGG	Woodford.2006
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	OXA-58 A	DIRECTA	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	Woodford.2006
	OXA-58 B	INVERSA	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	Woodford.2006

**Tabla 5: Condiciones de amplificación de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>**

CICLOS	REPETICIONES	CONDICIONES
<b>Desnaturalización inicial</b>	1	94°C por 5 minutos
<b>Desnaturalización</b>	30	94° C por 1 minuto
<b>Anillamiento</b>	30	52° C por 1 minuto
<b>Extensión</b>	30	72° C por 1 minuto
<b>Extensión final</b>	1	72° C por 5 minutos

Los productos obtenidos por PCR fueron evaluados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X utilizando como marcador de peso molecular (DNA ladder 100pb) de Invitrogen®, y visualizados por transiluminación UV previamente coloreados con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

### **3.5 DETERMINACIÓN DE PERFILES PLASMÍDICOS**

#### **3.5.1 Extracción de plásmidos de aislamientos resistentes a carbapenémicos.**

El ADN plasmídico de aislamientos seleccionados se obtuvo mediante el método lisis alcalina estandarizado en el laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (10) y denominado de ahora en adelante como “termólisis alcalina” el cual fue modificado en este trabajo para obtener un mejor rendimiento de ADN plasmídico desde cepas de *Acinetobacter* sp. En resumen células en fase logarítmica fueron lisadas en solución detergente alcalina a 65°C por 20 minutos y el ADN plasmídico del lisado fue purificado por extracción con solventes orgánicos y precipitación (23). (Ver anexo 3)

Para determinar el tamaño molecular de los plásmidos obtenidos se procedió a su comparación electroforética con los tamaños moleculares de los plásmidos presentes en *Escherichia coli* V517 obtenidos en iguales condiciones procedimentales.

El ADN plasmídico se evaluó por electroforesis convencional en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X bajo las siguientes condiciones de corrida : 30 minutos a 30V, 30 minutos a 45V, 30 minutos a 60V, y finalmente 90 minutos a 75V. Luego fueron coloreados con bromuro de etidio (1 µg/ml) por 30 segundos. El registro fotográfico y digitalización de los plásmidos se realizó mediante el programa Quantity one® y el digitizador Gel Doc® de (Biorad).

### **3.6 DETECCIÓN DE PLASMIDOS PORTADORES DEL GEN**

#### ***bla*<sub>OXA-23</sub>**

#### **3.6.1 Detección por PCR del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en ADN plasmídico.**

Para confirmar la presencia del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en el producto de ADN plasmídico obtenido, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un termociclador iCycler® de Bio-Rad. Se utilizó *Taq* DNA polimerasa de Invitrogen® corp.

Se partió de ADN plasmídico obtenido por termólisis alcalina previamente purificado con solventes, precipitado con Acetato de sodio mM, etanol y diluido 100 veces.

La PCR se realizó en condiciones previamente estandarizadas y con iniciadores generales para la detección del gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, descritos por Woodford en 2006 y se detallan en la tabla 6 (14). Las condiciones de amplificación utilizadas se describen en la tabla 5 (14).

**Tabla 6** Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub>,

GEN	INICIADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5'-3')
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	OXA-23 A	DIRECTA	GATCGGATTGGAGAACCAGA
	OXA-23 B	INVERSA	ATTTCTGACCGCATTTCAT

Los productos obtenidos por PCR fueron evaluados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, utilizando como marcador de peso molecular (DNA ladder 100pb) de Invitrogen®, coloreados con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El registro fotográfico y digitalización de los geles se realizó mediante el programa Quantity one® y el digitalizador Gel Doc® de (Biorad).

### 3.6.2 Detección de plásmidos portadores del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> por hibridización.

Para la detección del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en los diferentes perfiles plasmídicos obtenidos por termólisis alcalina y resueltos por electroforesis, se realizó hibridización de ADN plasmídico por el método de Southern blot, y para tal fin se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Marcación: Construcción de sonda marcada con digoxigenina específica para la búsqueda del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> (ver anexo 4).
- Marcación: Construcción de sonda marcada con digoxigenina específica para la búsqueda del gen 16S rRNA (ver anexo 4). Según metodología (38).

- Construcción de control positivo para la reacción ( plásmido recombinado con el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>) por clonación por el sistema TOPO10 de Invitrogen. (ver anexo 5)
- Transferencia y Fijación: de ADN plasmídico en membrana de Nylon.
- Hibridización y detección
- Decoloración y deshibridización
- Rehibridización.

### **3.6.2.1 Construcción de sonda marcada con digoxigenina específica para búsqueda del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> y 16S rRNA**

El producto obtenido por PCR de la amplificación de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub> y 16S rRNA de un aislamiento positivo para dicho gen y confirmado por secuenciación, fue utilizado como hebra molde para realizar la marcación. Los iniciadores y condiciones utilizadas para amplificar estos genes son descritos en el Anexo 4.

El producto amplificado fue purificado por el método de elución en columna Pure Link de Invitrogen® y posteriormente fue cuantificado por fluorometría por el sistema Qubit de Invitrogen® este producto fue marcado por el método de “random primers” durante 20 horas a 37° C en un termociclador iCycler® de Bio-Rad. Bajo las condiciones establecidas por el fabricante Roche Alemania (52).

### **3.6.2.2 Clonación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> .**

Para obtener un control positivo se construyó un plásmido recombinado con el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, se utilizó para esto una estrategia de clonación usando como vector el plásmido TOPO® Invitrogen, y como inserto, el producto obtenido por PCR del gen *bla*<sub>OXA-23</sub>. Los iniciadores y condiciones utilizadas para amplificar el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> que fue utilizado como inserto son citados en el Anexo 5 (54).

### **3.6.2.3 Transferencia y fijación de ADN plasmídico en membrana de Nylon.**

El ADN plasmídico de representantes de cada perfil escogidos, fue transferido a membranas de nylon por difusión, con solución 20X SSC y un dispositivo de transferencia. (53) Este montaje se dejó por 16 horas para permitir la adherencia del ADN a la membrana.

Se procedió a fijar el ADN transferido por difusión a la membrana de Nylon utilizando exposición a luz ultravioleta por 3 minutos.

#### **3.6.2.4 Hibridización con sonda marcada con digoxigenina específica para el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>**

La membrana fijada fue prehibridizada (la membrana se puso en contacto con la solución de hibridización sin contener la sonda específica para el gen buscado) a 42 °C por 45 minutos, posteriormente se adicionó la solución de hibridización que contiene sonda específica para el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en una concentración de 25ng/ml se dejó 16 horas a 42° C y se realizó la detección siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche, Mannheim, Germany)® las soluciones utilizadas se describen en ( Anexos 6) (52,53).

#### **3.6.2.5 Decoloración y deshibridización**

Posteriormente las membranas fueron decoloradas y deshibridizadas, para la decoloración se adicionó NN-dimetilformamida a 60 ° C, se dejó actuar hasta obtener una membrana limpia, se procedió a deshibridizar sumergiendo la membrana en una solución que contenía NaOH precalentada a 37 ° C por 30 minutos (ver Anexo 6) para retirar la sonda y permitir la rehibridización con sonda específica para búsqueda del gen 16S rRNA.

#### **3.6.2.6 Rehibridización**

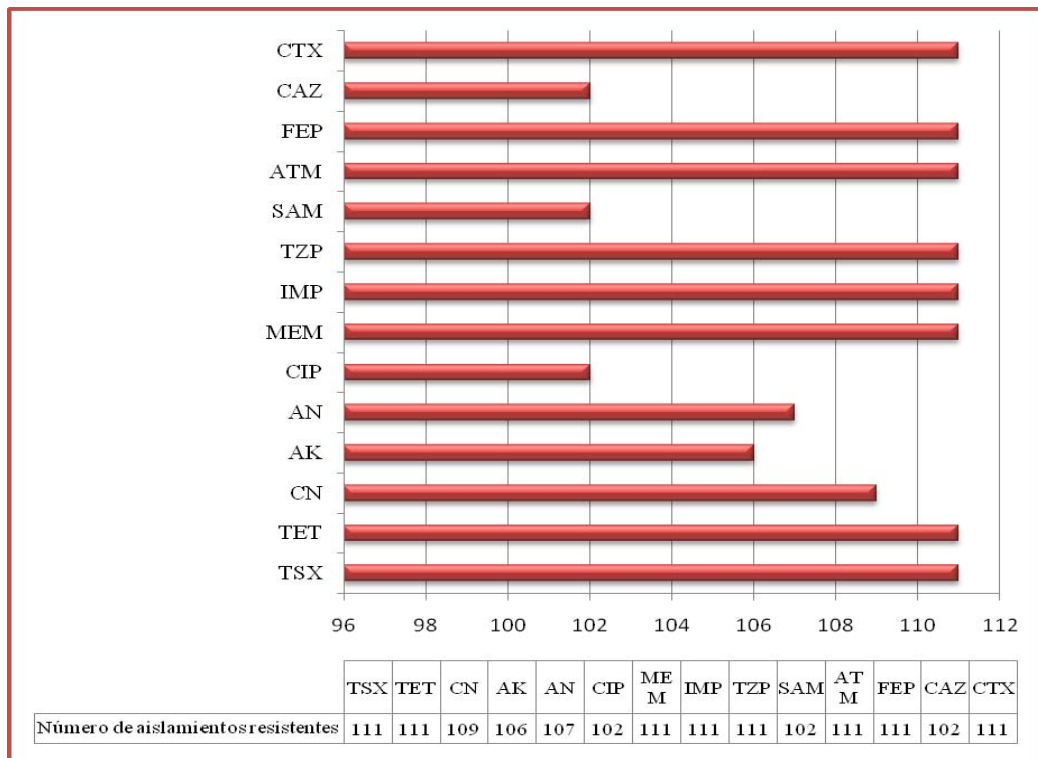
Las membranas deshibridizadas fueron sometidas a hibridización con la sonda marcada con digoxigenina específica para el gen 16S rRNA siguiendo los pasos enumerados anteriormente y evidenciar así la presencia de DNA plasmídico o DNA cromosomal.

Se utilizó como control positivo de la reacción un amplificado de dicho gen, en una concentración de 1 ng. Los resultados fueron confirmados con un montaje por duplicado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS

#### 4.1.1 Características fenotípicas.



**Figura 5: Perfil de resistencia de los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*** : En el recuadro de la parte inferior se observa el número de aislamientos resistentes a cada antibiótico evaluado: **CTX** cefotaxima, **CAZ** ceftazidima, **FEP** ceftazidima, **ATM** aztreonam, **SAM** ampicilina sulbactam, **TZP** piperacilina tazobactam, **IMP** imipenem, **MEM** meropenem, **CIP** ciprofloxacina, **AN** ácido nalidixico, **AK** amikacina, **CN** gentamicina, **TET** tetraciclina, **TSX** trimetropim-sulfametoxazol.

En la figura 5 se observa el número de aislamientos resistentes a los antibióticos evaluados, de los 112 aislamientos: 111 aislamientos (99%) fueron resistentes a cefotaxima, cefepime, aztreonam, piperacilina tazobactam, imipenem, meropenem, tetraciclina y trimetropim-sulfametoxazol; 109 aislamientos (96%) fueron resistentes a gentamicina; 107 aislamientos (95 %) fueron resistentes a ácido nalidixico; 106 aislamientos (94%) fueron resistentes a amikacina, 102

aislamientos (90%) fueron resistentes a ciprofloxacina, 101 aislamientos fueron resistentes a Ampicilina sulbactam (89%).

#### 4.1.2 Características genéticas

En la tabla 7 aparece el número de aislamientos que dio lugar a productos de amplificación por PCR (amplímeros), en el proceso de detección de los genes que codifican para las cuatro familias de carbapenemasas de clase D que han sido encontradas en el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*.

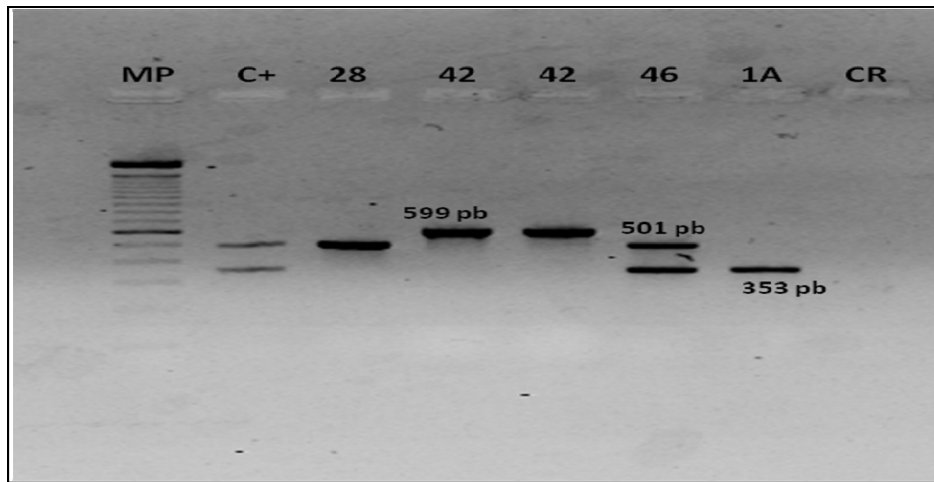
**Tabla 7: Número y Porcentaje de aislamientos estudiados codificantes de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>**

<b>GENES</b>	<i>bla</i> <sub>Oxa-23</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>
Tamaño de amplímero esperado	501 pb	246 pb	353 pb	599 pb
Número de aislamientos positivos	111	0	102	1
Porcentaje	99%	0%	91%	0.89%

En el 99% de los aislamientos resistentes a carbapenémicos se detectó por PCR el gen que codifica para la carbapenemasa OXA-23; en el 91% de los aislamientos se detectó el gen *bla*<sub>OXA-51</sub> y sólo un aislamiento (0,9%) el gen *bla*<sub>OXA-58</sub>. Los tamaños de los amplímeros aparecen en la tabla 7 y en la figura 6. En ninguno de los aislamientos estudiados se obtuvo amplificado para el gen *bla*<sub>OXA-24</sub>.

El producto obtenido de 599 pb proveniente del aislamiento 42 fue secuenciado por los servicios de MacroGen (Corea); la secuencia mostro una similitud del 99% con las secuencias reportadas en las bases de datos públicas de Genbank para el

gen que codifica para la carbapenemasa OXA-58 , que hasta el momento no ha sido reportada en aislamientos de *Acinetobacter* sp. Colombianos.



**Figura 6: Amplificación de genes  $bla_{OXA-23}$ ,  $bla_{OXA-51}$ ,  $bla_{OXA-58}$**  los números en el carril corresponden al número de aislamiento, C+ control positivo (*Acinetobacter baumannii* productor de los genes  $bla_{OXA-23}$ ,  $bla_{OXA-51}$ ) CR control de reactivos, MP marcador de peso molecular (100pb DNA ladder)®Invitrogen; en el carril 4,6 y 7 los números corresponden al tamaño del fragmento de ADN generado por la amplificación de los genes  $bla_{OXA-58}$ ,  $bla_{OXA-23}$  y  $bla_{OXA-51}$  respectivamente.

#### 4.1.3 Selección de aislamientos

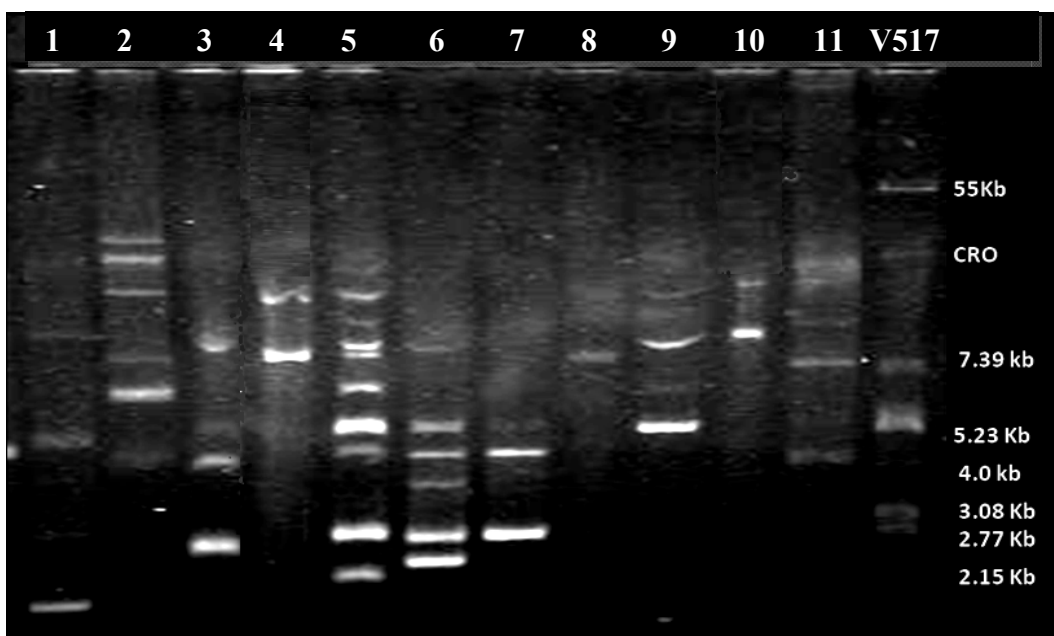
Los resultados obtenidos mediante REP-PCR por anteriores trabajos de investigación realizados por el grupo de Epidemiología Molecular (54, 57) en dos hospitales 1 y 2; los hospitales 3 y 4 fueron genotipificados por dos trabajos de investigación realizados actualmente por el grupo de Epidemiología Molecular que aun no se han culminado; permitieron seleccionar una población de 54 aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* provenientes de diez clones presentes en los hospitales estudiados, y 58 aislamientos que no formaron parte de un clon, citados en la tabla 8.

**Tabla 8: Aislamientos clonales y aislamientos no clonales en los cuatro hospitales evaluados.** Se describe el número de aislamiento especificado por hospital y por tiempo de recolección. Los aislamientos señalados con rojo son aislamientos clonales procesados para extracción de ADN plasmídico, los aislamientos no clonales fueron procesados en su totalidad.

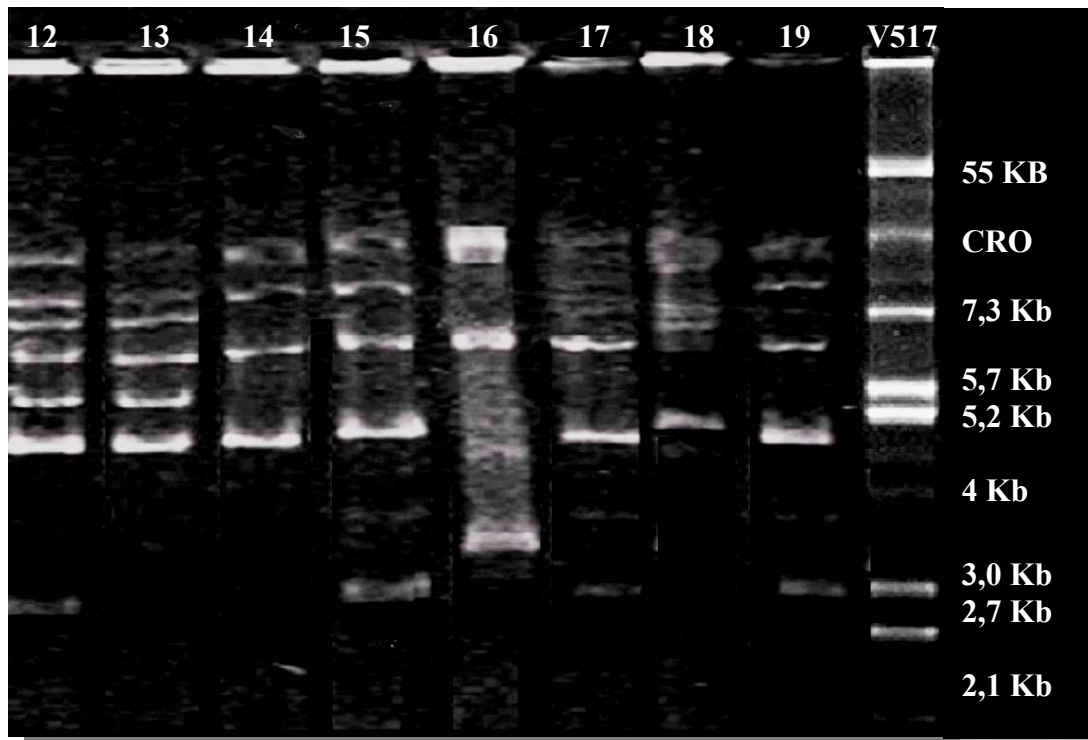
<b>Año de recolección</b>	<b>Clon 1</b>	<b>Clon 2</b>	<b>Clon 3</b>	<b>Aislamientos no clonales</b>
<b>Hospital 1 04-2004- 04-2005</b>	1F, 2F,3F, 4F,5F, 7F, 8F, 11F, 12F, 14F, 16F,17F, 18F, 19F, 20F, 25F, 26F, 27F, 31F.	6F, 9F	21F, 28F, 29F, 30F, 33F.	13F, 42F, 15F.
	<b>Clon 4</b>	<b>Clon 5</b>	<b>Clon 6</b>	<b>Aislamientos no clonales</b>
<b>Hospital 2 08-2004- 05-2005</b>	29S, 30S	19S, 25S, 26S, 27S, 31S	32S, 33S	2S, 3S, 7S, 11S, 13S, 14S, 16S, 17S, 21S, 22S.
	<b>Clon 7</b>	<b>Clon 8</b>	<b>Aislamientos no clonales</b>	
<b>Hospital 3 2007</b>	152, 160, 171	21N, 46N	5B, 6B, 20B, 54, 62, 77-2, 108, 111, 112, 113, 129, 145, 152, 153, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 172, 173, 188, 189, 191, 194, 197, 199, 201, 202, 205, 214, 251-1, 261, 262, 265, 267, 270, 272, 286, 287-1, 288,	
	<b>Clon 9</b>	<b>Clon 10</b>	<b>Aislamientos no clonales</b>	
<b>Hospital 4 01/2009 08/2009</b>	1B, 2A, 2B, 3M, 28B, 29B, 37M, 46M, 53M, 84M, 107M, 137M.	1A, 75M	74M, 114M.	

#### 4.2 EXTRACCION DE PLÁSMIDOS DE AISLAMIENTOS PORTADORES DEL GEN *bla*<sub>OXA-23</sub>

De los 78 aislamientos a los cuales se les realizó la extracción de ADN plasmídico 77 a excepción del aislamiento 62 mostraron que portan uno o más de un plásmido con tamaños entre 1,3 Kpb, y 35 Kpb (kilo pares de bases) (ver tabla 9); se obtuvo un total de 19 perfiles diferentes, enumerados en la figura 7 y 8 del número 1 al 19; en ningún caso se presentaron perfiles similares entre hospitales, es decir cada hospital presento sus perfiles.



**Figura 7:** Perfiles plasmídicos corridos por electroforesis convencional, de izquierda a derecha se observan ADN plasmídico de un representantes por perfil de el número 1 al 11 y a la derecha se observa ADN plasmídico de *Escherichia coli* V517 con sus respectivos tamaños en Kb y DNA cromosomal. (59)



**Figura 8:** Perfiles plasmídicos corridos por electroforesis convencional, de izquierda a derecha se observan ADN plasmídico de un representantes por perfil del 12 al 19 y a la derecha se observa ADN plasmídico de *Escherichia coli* V517 con sus respectivos tamaños en Kb y DNA cromosomal. (59)

**Tabla 9: Descripción del tamaño de plásmidos presentes en aislamientos seleccionados del Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*.**, columna 1 número de perfil, columna 2: hospital al que pertenece el aislamiento, columna 3: tamaño en Kb de los diferentes plásmidos de cada perfil con sus estados conformacionales, columna 4 aislamientos que poseen perfiles iguales.

N° de perfil	N° hospital	Tamaño en Kilobases (kb) de plasmidos y sus diferentes estados conformacionales	Aislamientos con este perfil
1	1	13, 5.3, 2.4, 1.3	6F, 9F
2	1	27, 24, 19, 10, 7.4, 4.3, 3.8, 11, 4.3, 2	15F, 21F, 28F, 29F, 39F, 33F, 42F
3	1	11, 4.3, 2	1F, 2F, 3F, 4F, 5F, 7F, 8F, 11F, 12F, 13F, 14F, 16F, 17F, 18F, 19F, 20F, 25F, 26F, 27F, 31F
4	2	17, 11	3S, 19S, 25S, 26S, 27S, 31S
5	2	17, 13, 11, 8, 6, 5.3, 2.4, 1.8	11S, 13S
6	2	11, 5.3, 4.6, 3.6, 2.4, 1.8	14S
7	2	4.3, 2.2	2S, 7S, 21S, 29S, 30S
8	2	10	16S, 17S, 22S .
9	2	17, 11, 5.3	32S, 33S
10	4	19, 13	1ª, 1B, 2ª, 2B, 3, 28B, 29B, 37M, 46M, 53M, 75M, 84M, 107M, 114M, 137M.
11	4	19, 13, 9.6, 4.3	74M
12	3	33, 16.6, 8.4, 6.6, 5.7, 5.1, 2.7	5B
13	3	33, 17, 8.2, 6.6, 5.7, 5.0	6B
14	3	35, 17, 9, 5.1	20b, 21N, 46N, 54N, 77-2N, 129N, 145N, 188N, 191N, 262N, 265N, 267N, 288N.
15	3	33, 16.6, 6.6, 5.0, 3.3	108N, 111N, 112N, 113N, 152, 153, 160, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172.
16	3	33, 8, 4.3, 3.6	173
17	3	33, 16.6, 7.5, 5.1, 3.1	189N, 194N, 197N, 199N, 201N, 202N
18	3	31, 9.6, 5.1	205
19	3	31, 16.6, 7.4, 4.6, 3.1	214, 251, 270, 272, 286, 287

### 4.3. DETECCION DEL GEN *bla*<sub>OXA-23</sub> EN DNA PLASMÍDICO

Al realizar la amplificación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en ADN plasmídico de los 78 aislamientos seleccionados para realizar extracción por termólisis alcalina, se obtuvo amplificación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en la totalidad de los aislamientos es decir se confirmó la presencia de dicho gen en nuestro producto de extracción es por esto importante confirmar la presencia de este gen en estructuras plasmídicas por hibridación. (ver figura 9)



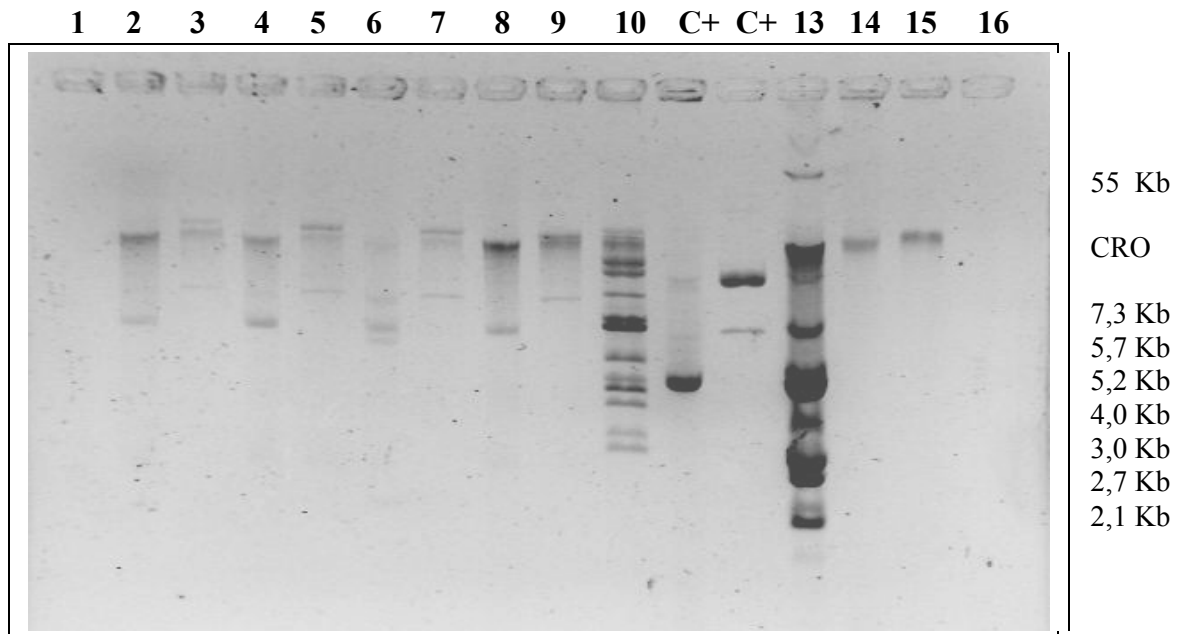
**Figura 9:** Amplificado gen *bla*<sub>OXA-23</sub> a partir de ADN plasmídico, el primer carril se observa Marcador de peso (DNA ladder 100 pb)<sup>®</sup> invitrogen. El número de cada carril corresponde al número de muestra, el aislamiento 62 control negativo (*Acinetobacter baumannii* no productor de OXA-23), en el carril C+ control positivo para el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, CR: control de reactivos.

#### 4.3.1 Detección de plásmidos portadores del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

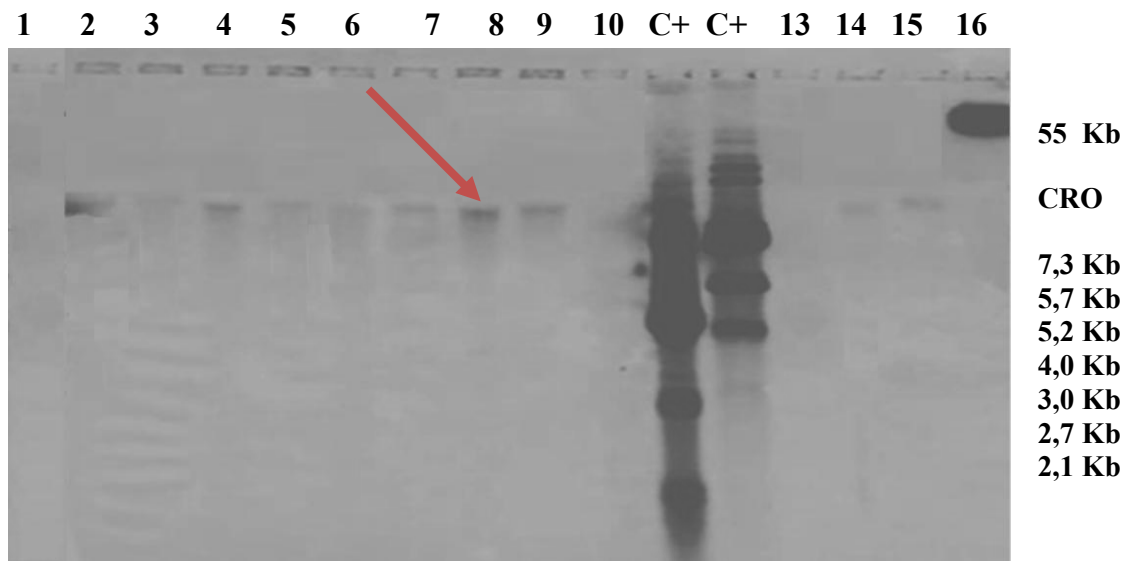
Como se describe en la metodología para realizar este paso fue importante construir un control positivo de la reacción, se obtuvo un plásmido recombinado con el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> con un tamaño de 4.9Kb aproximadamente, correspondiente a 3.9 Kb del vector más 1 Kb del inserto (gen *bla*<sub>OXA-23</sub>), fue denominado Roxa.

### 4.3.2 Hibridización con sonda específica para búsqueda del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en ADN plasmídico

Se obtuvo un resultado positivo de hibridización con el amplificado de dicho gen esto nos demuestra que hay especificidad en la sonda para búsqueda del gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, se observa un resultado positivo de hibridización con el control positivo de reacción (plásmido recombinado con el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> por clonación). En cuanto a nuestros resultados de búsqueda del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en ADN plasmídico de aislamientos provenientes de cuatro hospitales de tercer nivel de Colombia fue negativo, este resultado fue reconfirmado, en algunos aislamientos se observa un barrido que posiblemente es DNA cromosomal esto debe confirmarse al realizar la rehibridización con el gen 16S rRNA. En la figura 9 se observa uno de los geles que fue transferido para su posterior hibridización.



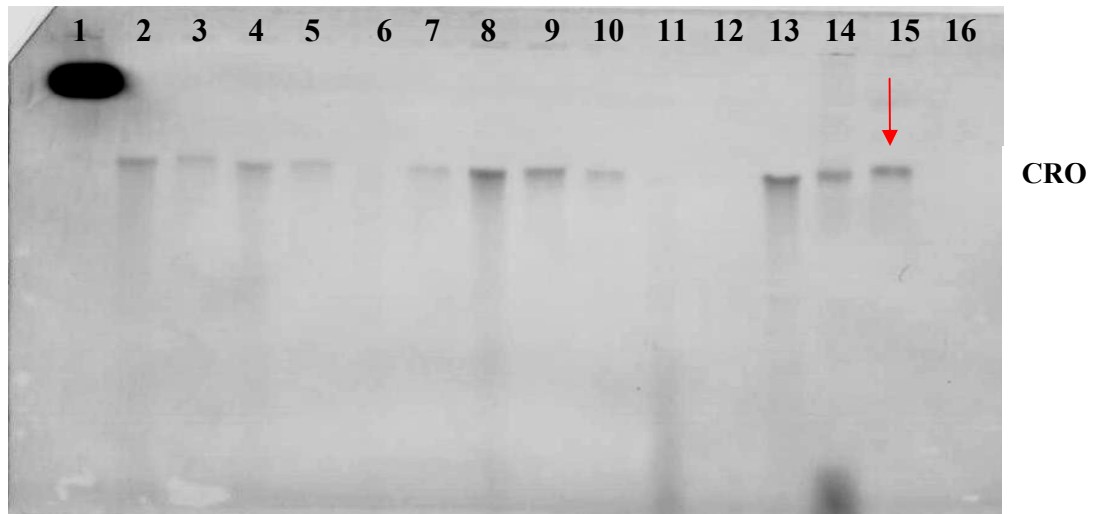
**Figura 10: Electroforesis de ADN plasmídico nativo y digerido con nucleasas S1 transferido para hibridización** En los carriles 2, 4, 6, 8, y 13 ADN plasmídico nativo de los aislamientos 28, 29, 30, 33 y N (control negativo aislamiento de E.coli V517 que no posee el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>) respectivamente. En los carriles 3, 5, 7, 9 y 10 DNA plasmídico digerido con S1 de los aislamientos 28, 29, 30, 33 y N. Carriles 11 y 12 ADN plasmídico Roxa (*bla*<sub>OXA-23</sub> recombinado con TOPO) nativo y digerido con S1. Carriles 14 y 15 ADN cromosomal del aislamiento 29 nativo y digerido con S1. Carril 1 y 16 productos amplificados por PCR (1ng aproximadamente) de los genes 16S rRNA y *bla*<sub>OXA-23</sub> respectivamente.



**Figura 11: Membrana hibridizada con sonda específica para el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>** En el carril 16 se observa un resultado positivo, con una fuerte señal de amplificado del gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, en el carril 11 y 12 se observa una fuerte señal producida por la hibridación con el plásmido recombinado (control positivo), en las demás muestra se observa una tenue señal de hibridación sobre una banda de ADN cromosomal. Señalado con rojo. No se observa señal de hibridación con N (control negativo) a pesar de estar en exceso.

#### 4.3.3 Hibridación con sonda específica para búsqueda del gen 16S rRNA

Se obtuvo un resultado positivo de hibridación tenue en la mayoría de los aislamientos a la altura de ADN cromosomal, señalado en las figuras (12) y en algunos aislamientos que presentaron mayor concentración del mismo se observó un barrido.



**Figura 11: resultados obtenidos de rehibridización con sonda específica para el gen 16S rRNA** en aislamientos corridos en el gel de la figura 10 , en el carril 1 amplificado de gen 16S rRNA se observa una fuerte señal como control positivo. En los demás aislamientos se observa una señal de hibridización con el ADN cormosomal presente en el ADN plasmídico extraído y con el ADN cromosomal del aislamiento 29 (Señalada con la flecha roja).

El ADN plasmídico de todos los aislamientos seleccionados fue hibridizado y en ninguno de los casos se observó un resultado positivo de hibridización con la sonda específica para el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> con bandas plasmídicas transferidas, este resultado fue confirmado con una nueva hibridización.

## 5. DISCUSIÓN

Diferentes especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* han emergido en los últimos 30 años como patógenos nosocomiales importantes, puesto que causan enfermedades severas tales como neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteremias, infecciones del tracto urinario, particularmente en pacientes de unidades de cuidado intensivo(3, 42, 44, 48). Las infecciones ocasionadas por este grupo de microorganismos se han convertido en una emergencia epidemiológica debido a la rápida diseminación de aislamientos multirresistentes, (4, 48) Los patrones de susceptibilidad de estos aislamientos en la actualidad muestran resistencia a tres o más grupos de antibióticos (11) incluyendo carbapenémicos que son considerados como los betalactámicos más potentes por su amplio espectro y por su estabilidad a la mayoría de las betalactamasas.(45, 46, 47)

La importancia de los microorganismos de este complejo radica en su difícil manejo, dada su alta capacidad de adquirir genes de resistencia a los diferentes antibióticos, entre ellos los que codifican resistencia a carbapenémicos como los genes *bla<sub>OXA</sub>* (*bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* y *bla<sub>OXA-58</sub>*), que codifican para la producción de enzimas carbapenemasas, de este grupo de enzimas, la más diseminada a nivel mundial incluyendo Colombia es la enzima OXA-23. Estudios realizados por el grupo de Epidemiología Molecular del instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, en hospitales colombianos han asociado la presencia de este determinante genético con la resistencia a carbapenémicos, especialmente cuando se encuentra asociado corriente arriba al elemento *ISAbal1* que le provee de un promotor fuerte para su sobreexpresión. (6, 7, 31, 34).

En este estudio se realizó una selección de 112 aislamientos de los cuales 111 fueron resistentes a carbapenémicos, portadores del gen *bla<sub>OXA-23</sub>*. El propósito fue evidenciar la presencia de dicho gen en estructuras plasmídicas que pudieran estar movilizándolo este determinante genético entre las diferentes especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* en los cuatro hospitales estudiados.

Para tal efecto se realizó una evaluación de sensibilidad de los aislamientos frente a los antibióticos citados en la figura 5 obteniendo un fenotipo en general de multirresistencia (11). En los cuatro hospitales, se observó que aislamientos resistentes a carbapenémicos también expresaron resistencia a otros betalactámicos como son ampicilina, piperacilina, aztreonam y cefalosporinas, esto se correlaciona con la actividad de las carbapenemasas frente a todos los

betalactámicos (9). Sin embargo, no debe ser adjudicado solamente a la existencia de betalactamasas de clase D, ya que se ha demostrado que *A. baumannii-calcoaceticus* posee también otros mecanismos tales como aumento de expresión de sistemas de eflujo, cambios conformacionales en PBP y disminución de expresión de porinas, que en conjunto con la sobreproducción de betalactamasas son los responsables del fenómeno de multirresistencia. (5, 33, 40, 45)

Solo uno de los aislamientos analizados el cual correspondió al número 62 fue sensible a carbapenémicos, pero resistente a otros betalactámicos como cefalosporinas de primera y tercera generación, ampicilina y aztreonam; esto gracias a la posible presencia de una enzima ADC codificada a nivel cromosomal natural en aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, y aunque este aislamiento fue positivo para el gen *bla*<sub>OXA-51</sub> reportado en ADN cromosomal en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (3, 21, 44) es sensible a carbapenémicos posiblemente porque este gen no se encuentra asociado a una secuencia de inserción en este caso *ISAbal* que le permita sobreexpresarse.

En los aislamientos con resistencia a carbapenémicos seleccionados, la totalidad presentaron los genes que codifican para carbapenemasas de clase D, de esta manera un 99% fueron positivos para el gen *bla*<sub>OXA23</sub>, un 91% para el gen *bla*<sub>OXA51</sub> y 0,89% correspondiente a un aislamiento para el gen *bla*<sub>OXA58</sub>; aunque la literatura reporta una mayor afinidad de estas enzimas para hidrolizar imipenem (17), en la población estudiada se observó igual porcentaje de resistencia a meropenem; esto puede estar relacionado con la presencia corriente arriba de un elemento *ISAbal* que le permite sobreexpresar carbapenemasas (44), además de la participación de otros mecanismos que contribuyen a la resistencia a carbapenémicos, como lo han expresado varios informes. (40, 41, 44) El panorama de los cuatro hospitales se correlacionó con lo reportado a nivel mundial, en donde la presencia de carbapenemasas de clase D OXA-23 son el mecanismo más diseminado de resistencia a carbapenémicos entre los aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (19, 40, 41).

El gen que codifica para la producción de esta carbapenemasa *bla*<sub>OXA-23</sub> puede estar ubicado en estructuras genéticas móviles como plásmidos y transposones recientemente descritos, que le proveen de plasticidad para diseminarse entre diferentes aislamientos de la misma especie (8, 19).

En este estudio se analizó el perfil plasmídico de 78 aislamientos seleccionados, como se mencionó en la metodología, se obtuvieron en total 19 perfiles de plásmidos con tamaños que oscilaron entre los 1,3 Kb hasta los 35 Kb. El 99% de los aislamientos presentaron plásmidos. Uno de los aislamientos analizados no presentó plásmidos el cual correspondió al número 62.

No se encontraron perfiles de bandas plasmidiales comunes entre los hospitales. En el hospital 1 se observó un perfil predominante, con un número de aislamientos considerable (20) el cual fue producto de la presencia de un clon endémico persistente que fue aislado posterior a un brote (7). De manera similar se observó en el hospital 4 el predominio de un perfil de bandas plasmidiales comunes con 15 aislamientos que conformaron un clon de 13 integrantes y un clon de dos aislamientos. Lo visto en estos dos hospitales se correlaciona con la afirmación hecha por Zarrilli y colaboradores (9) en los que la diseminación de aislamientos multirresistentes del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* fue primordialmente clonal, con la coexistencia de algunos aislamientos esporádicos diferentes, ya que en los dos hospitales se observó el predominio de un clon con el acompañamiento de clones conformados por menos integrantes, y aislamientos esporádicos no relacionados genéticamente (9). Es de resaltar la similitud del perfil plasmídico de dos clones en el cuarto hospital, lo que se podría correlacionar que la existencia de transferencia genética horizontal.(8)

Los hospitales 2 y 3 presentaron el mayor número de perfiles plasmídicos 6 y 8 respectivamente, y se encontraron aislamientos que poseían un perfil único. En estos dos hospitales especialmente en el 3 llama la atención que aunque los aislamientos no están relacionados genéticamente o se encuentran relacionados parcialmente se pueden observar perfiles conformados hasta por 16 aislamientos, que acarrean el gen *bla<sub>OXA-23</sub>* esto implica que existe movilidad genética ya sea dada por plásmidos conjugativos o por transposones. (9)

En los cuatro escenarios hospitalarios estudiados se evidencio la ubicación del gen *bla<sub>OXA-23</sub>* por hibridización molecular, a nivel cromosomal observando una señal tenue que podría estar dada por el bajo número de copias de dicho gen, en diferentes reportes a nivel mundial este gen ha sido reportado en cromosoma y en plásmido en menor proporción. (9, 38, 40) La ausencia de este gen en estructuras plasmídicas en nuestro estudio sugiere la participación de otras plataformas de diseminación, (61) tales como los transposones, en la actualidad, se han descrito cuatro plataformas capaces de movilizar este gen, estas plataformas han sido reportadas en aislamientos clonales predominantes en Europa (19). A pesar de esto, la diseminación del gen *bla<sub>OXA23</sub>* se explica más por la diseminación de dos clones en 15 países de ese continente. Es necesario que en los aislamientos contemplados en este estudio, se evalúe la participación de otras estructuras de diseminación, en una población que un su mayoría se consideró policlonal.

En este estudio se encontró una posible persistencia de diversos aislamientos multirresistentes en cada una de las instituciones evaluadas, sin que haya evidencia de la participación de plásmidos, ni de diseminación de clones

específicos entre diferentes hospitales; es posible que la diseminación de este gen este asociado más con un proceso de selección de aislamientos que tienen la facilidad de persistir en el ámbito hospitalario, porque han adquirido diferentes determinantes genéticos de resistencia ya sea por otros eventos de transferencia genética como transformación proceso que es frecuente en algunas especies del complejo *Acinetobacter cacoeticus-baumannii* (60).

La prevalencia de este gen en los aislamientos estudiados puede estar más asociada con la ubicuidad y plasticidad genética de dicho gen que se encuentra inmerso en diferentes estructuras móviles como transposones Tn2006, Tn2007 y que pueden estar diseminando este gen en los diferentes aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoeticus* . (19,53) Es importante estudiar otros mecanismos de diseminación para este determinante genético *bla*<sub>OXA-23</sub> tales como transposones y elementos IS.

## 6. CONCLUSIONES

- Las estructuras plasmídicas presentes en aislamientos seleccionados del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* resistentes a carbapenémicos de cuatro hospitales Colombianos estudiados no intervienen en la diseminación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub>
- Cada hospital posee una población de aislamientos del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* con perfiles plasmídicos propios; estas estructuras pueden acarrear otros determinantes genéticos de resistencia que no participan en la resistencia a carbapenémicos.
- La alta prevalencia del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> en aislamientos policlonales, como las encontradas en nuestro estudio sugiere la participación de otras estructuras que están involucradas en la diseminación de este gen, o la selección de cepas multirresistentes en los diferentes hospitales estudiados por uso masivo de antibióticos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bergogne-Berenzin, E, K. J Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. As nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and Epidemiologica features. *Clinical microbiology Reviews*.(9).2: 148-165.
2. Johanes G.M. Koeleman, Stoof. J. 2001 Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by integrasa gene PCR. *J.Clin Microbiol.* 39:8-13.
3. Perez F. Hujer A. Hujer. K. 2007. Global challenge of multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother.*3471-3484.
4. Hujer.K, Hujer. A, Hulten E. 2006 Analysis of antibiotic Resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter sp.* Isolates from Military and civilian patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.*50(12): 4114-4123.
5. Suarez C, Katan J, Guzman A, Villegas M.G. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *p. aeruginosa*, *Acinetobacter* y enterobacteriacea y estrategias para su prevención y control.. *Infectio* . 10 (2): 85-93.
6. Orquidea J, Mantilla J, Valenzuela E, Fernandez F, Alvarez C, Osorio E. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio.* 10 (2): 71-78.
7. Saavedra S.Y, Nuñez J, Pulido I, Gonzalez E, Valenzuela E, Reguero M, Mantilla J.2007. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex isolates in a third level hospital in Bogotá, Colombia. *International Journal of Antimicrobial Agents.* Letters of the Editor. 389-390.
8. Valenzuela J, Thomas L, Partridge S. 2007. Horizontal Gene Transfer in a Polyclonal Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin Microbiol* 45(2): 453-460.
9. Zarilli R., Crispino M., Bagattini M., Barretta E., Popolo A., Triassi M., Villari P. 2004. Molecular Epidemiology of sequential outbreaks of

- Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the Emergence of carbapenem resistance. *Journal of clinical microbiology*. 42(3): 9046-955.
10. Celis Bustos, Yamile Adriana. Descripción del ambiente genético del gen *bla*<sub>CTX-M-12</sub> detectado en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en hospitales de tercer nivel de Bogotá, 2008, 45, 46 p. (Tesis Maestría en Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias..
  11. Falagas E. M., Koletsi K, P., Bliziotis A. L. 2006 The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 55: 1619-1629
  12. Barlow M, Hall B. 2004. Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases“past, present and future. *Drug resistance updates*. 7: 111-123
  13. Brown S., Amyes B. 2005 The sequences of seven class D  $\beta$ -lactamases isolated from carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect*. 11: 326-329.
  14. Woodford N, Matthew J, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S, Amyes S, Livermore D. 2006 . Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicro Agents* 27: 351-353.
  15. Longo B, Pantosti A, Luzzi I, Tarasi A, Di sora F, Gallo E. 2007. Molecular findings and antibiotic-resistance in an outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *Ann ISt Super Sanita*. 43(1): 83-88.
  16. Koeleman J, Stoof J, Dennis J. 1998. Comparison of Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Identification of *Acinetobacter* Genomic Species and Typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 36(9):2522-2529.
  17. Queenan, A. M., K. Bush. 2007. Carbapenemases the versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rew*. 20(3):440-458.
  18. Pauline D.M, Poirel L, Nordmann P. 2009. Funtional Analysis of Insertion Sequence ISAbal, Responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriology*. 191(7): 2414-2418

19. Pauline D. M, Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Worldwide Dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*. 16(1): 35-40
20. Hawkey PM. 2008. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British J of Pharmacology* 153: S406-S413.
21. Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann.2009. Overexpression of the Naturally occurring *bla*<sub>OXA-51</sub> gene in *Acinetobacter baumannii* Mediated by Novel insertion sequence IS<sub>Aba9</sub>. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 53(9):4045-4047.
22. Bennett PM. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British J Pharmacology* 153: S347-S357.
23. Kado C.I., Liu S. T, .1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*.145(3): 1365-1373
24. Quale J, Bratu S, Landman D.2003. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Endemic in New York City. *Clin Infectious Diseases*.37:214-220.
25. Marti S, Sanchez J, Blasco M, Ruiz M, Espinal P, Alba V, Cuenca F, Pascual A, Vila J. 2008. Characterization of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Oxa-58 in an *Acinetobacter* Genomespecies 3 clinical isolate . *Antimicrob Agents Chemotherapy* . 52(8): 2955-2958
26. Turton J, Kaufmann M, Glover J, Coelho J, Warner M, Pike R. 2005. Detection and Typing of Integrons in Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* Found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 43(7):3074-3082.
27. Hall R, Brown H, Brookes D, Stokes H. 1994. Integrons Found in Different Locations Have Identical 5' Ends but Variable 3' Ends. *J. Bacteriology*. 176(20):6286-6294.
28. Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. 1994. Plasmid DNA Fingerprinting of *Acinetobacter* Species Other than *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 32(1):82-86.
29. Collins C, Hall R. 1995. Expression of Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 39(1): 155-162.

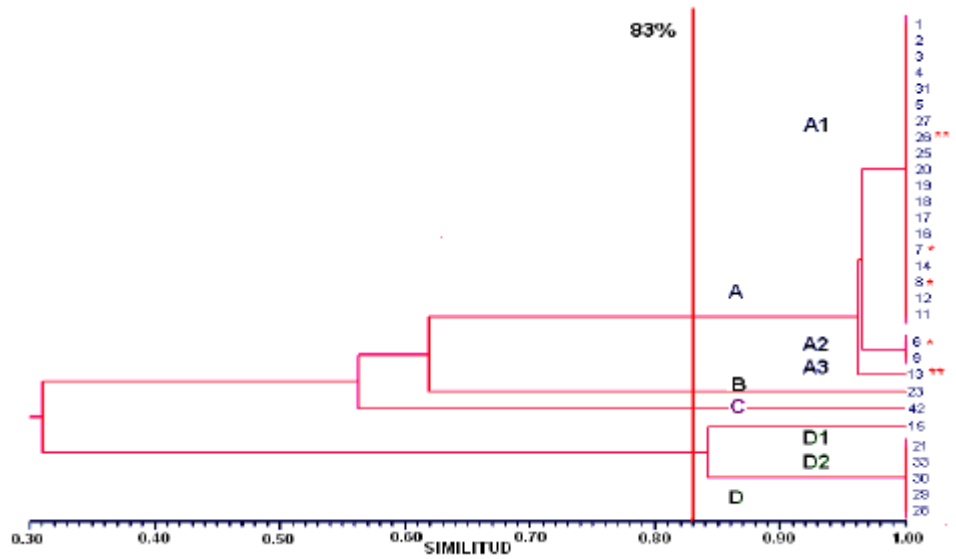
30. Rivera A, Vila J. 2004. Type 1 Integrons in Epidemiologically Unrelated *Acinetobacter baumannii* Isolates Collected at Spanish Hospitals. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 48(1):364-365.
31. Waltero, S., Santofimio, D., Ramirez, M., Lozano, A., Reguero M.T., Mantilla J. R., Valenzuela, M., Pulido, Y., Nuñez, J. 2008. Brote *Acinetobacter baumannii* resistente a Carbapenem en la UCI de un Hospital de Neiva. *Infectio*.12:62-63.
32. Saavedra S, Hernandez J, Murcia M, Gualteros S. 2008. Caracterización Molecular de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemicos aislados de pacientes adultos en unidades de cuidados intensivos de instituciones hospitalarias de Bogotá. *Infectio*. 12:63.
33. Martinez P, Mattar S. 2008. Carbapenemasa OXA-23 en *Acinetobacter baumannii* de Monteria. *Infectio*. 12:69
34. Nuñez J, Valenzuela E, Mantilla J, Pulido I, Reguero M, Gonzalez E. 2008. Identificación de mecanismos implicados en la resistencia a carbapenémicos en aislamientos nosocomiales de *Acinetobacter baumannii*. *Infectio*. 12:120.
35. Looveren M, Goossens H. 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* spp. In Europe. *Clin Microbiol Infect* 10: 684-704.
36. Chen T, Chen-Chih Wu, Men-Fang-Shaio, Chang-Phone Fung, Wen-Long Cho. 2008. Acquisition of a Plasmid-Borne *bla*OXA-58 Gene With an Upstream *IS1008* Insertion Conferring a High Level of Carbapenem Resistance to *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 52(7):2573-2580.
37. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gilbert I, Vila J. 2003. Partial characterization of a transposon containing the *tet(A)* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 52:477-480.
38. Villegas M, Kattan J, Correa A, Lolans K, Guzman A. 2007. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombia Hospitals. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 51(6):2001-2004.
39. Barlow M., Hall B. 2002. Phylogenetic analysis shows that the OXA  $\beta$ -lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *Journal of Molecular Evolution*. 55: 314-321.

40. Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 12(9):826-836.
41. Bogaerts P, Cuzon G, Nass T, Bauraing C, Deplano A, Lissoir B, Nordmann P, Glupezynski, Y. 2008. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Expressing the *bla*<sub>OXA-23</sub> Gene Associated with ISAb4 in Belgium. *Antimicrob Agents Chemotherapy.*52(11): 4205-4206.
42. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. 2008. *Acinetobacter baumannii* : a universal threat to public health? *Int. J.Antimicrob. Agents.* 32:106-119.
43. Alekshun M, Levy S. 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* . 1010-1016.
44. Peleg A, Seifert H, Paterson D. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful Pathogen. *Clin. Microbiol Rev.* 21(3): 538-582.
45. Marin, M., Gudial F. 2003. Antibióticos B-Lactámicos. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21(1): 42 – 55.
46. Paláu J. 2005. *Uso Racional de Antibióticos en Pediatría*. Cuarta edición. ISBN 958-9327-26-5. Ed CELSUS. Bogotá Colombia.
47. Oliver A. 2004. Resistencia a Carbapenemas y *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(5):259-61.
48. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature. Rev. Microbiol.* 5:939-951.
49. Rasmussen J, Hoiby N. 2006. OXA-type Carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:373-383.
50. Tafur J, Torres J, Villegas M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio.* 12(3)

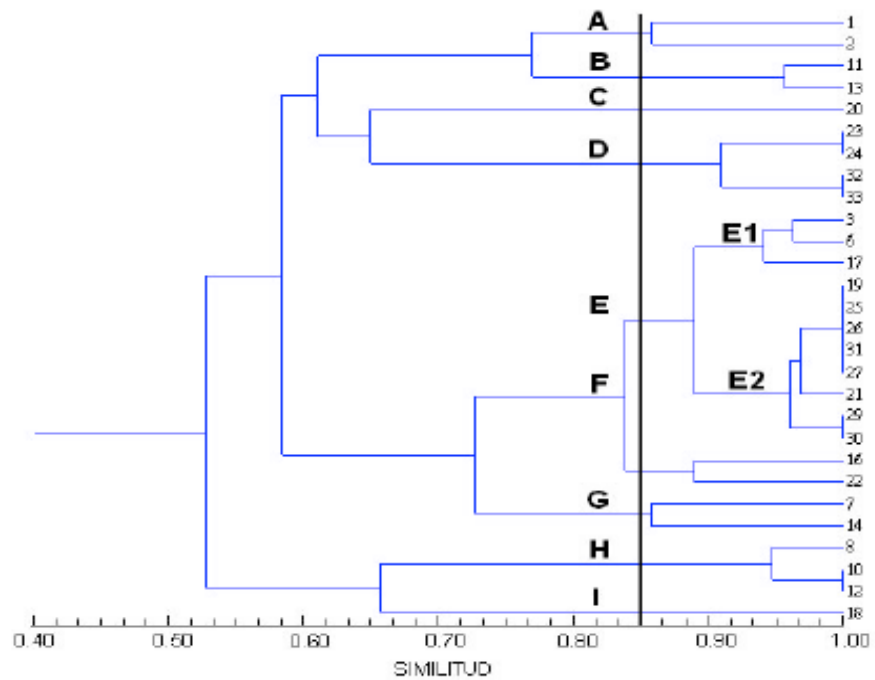
51. Corvec S, Poirel L, Nass T, Drugeon H, Nordmann P. 2007. Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolysing Oxacillinase Gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 51(4): 1530-1533.
52. Roche Applied Science. Dig High prime DNA Labeling and detection starter Kit I. 2005. Mannheim Germany .
53. Ausubel F, Brent R, Kinstong E, Moore D, et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc; ringbou edition. 2003
54. Sambrook J, Frrischt E, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manua. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, Nyl curso
55. Saavedra Rojas, Sandra Yamile. Caracterización de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenems relacionado con infección nosocomial en un hospital de tercer nivel de Bogotá D.C.. 2006 . 68 p. (Tesis Maestría en Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
56. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore D. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, Molecular class D  $\beta$ -lactamases Associated with Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* . *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 45: 583-588.
57. Pinzón Ávila, Janet Orquídea. Epidemiología molecular de infección nosocomial causada por *Acinetobacter baumannii* en la unidad de quemados del Hospital Simón Bolívar. Bogotá 2006, 55 p. (Tesis Maestría en Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
58. Vila J, Martí S, Sanchez J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* .
59. Charnock C. 1997. Characterization of the cryptic plasmids of the *Pseudomonas alcaligenes* type strain. *Plasmid*.37: 189-198.

60. Karagorgopoulos D, Falagas M.E 2008. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis.* 8: 751-62.
  
61. Adams M.D, Goglin K, Molyneaux N, Hujer K, Lavender H, Jaminson J. *et al.* 2008. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology.* 190 (24): 8053-8064.

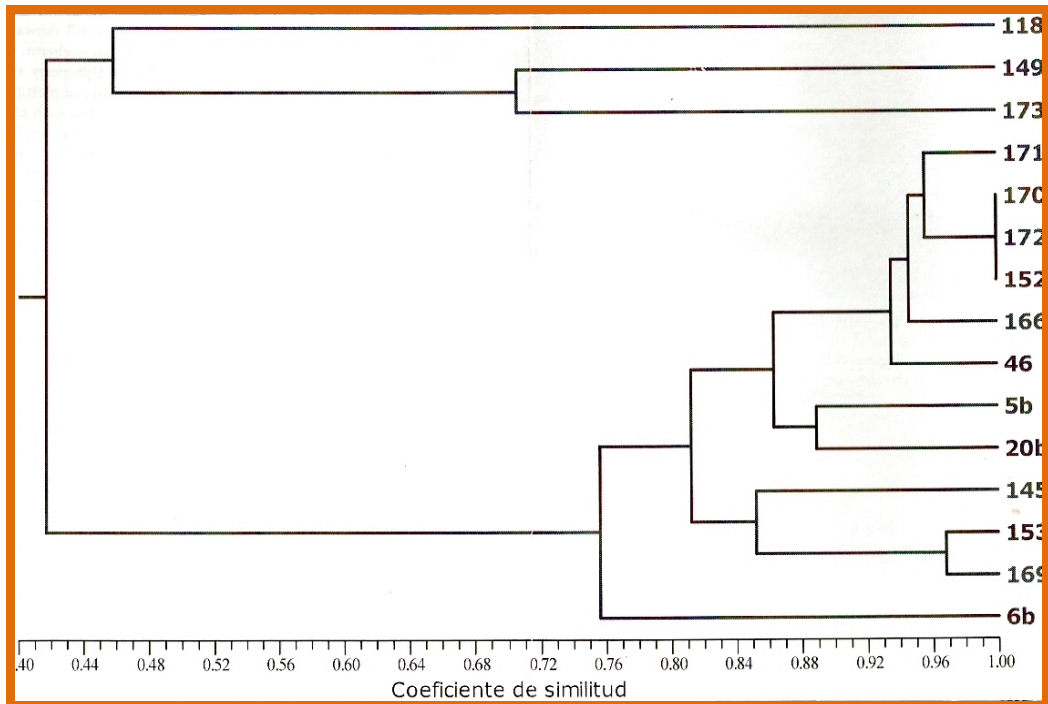
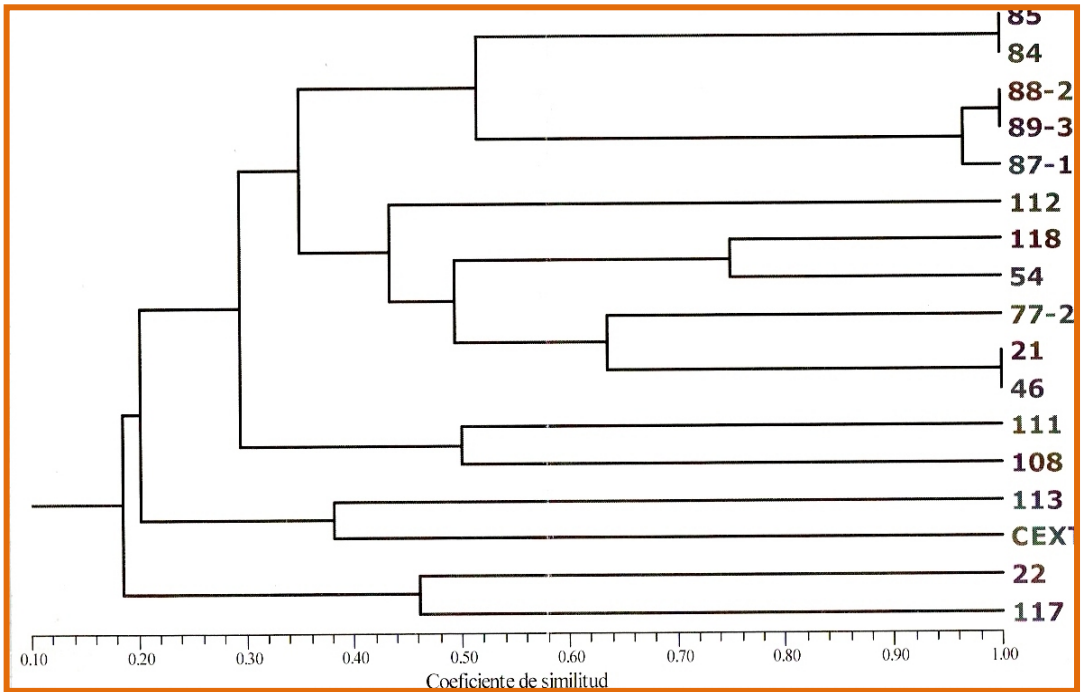
ANEXO 1



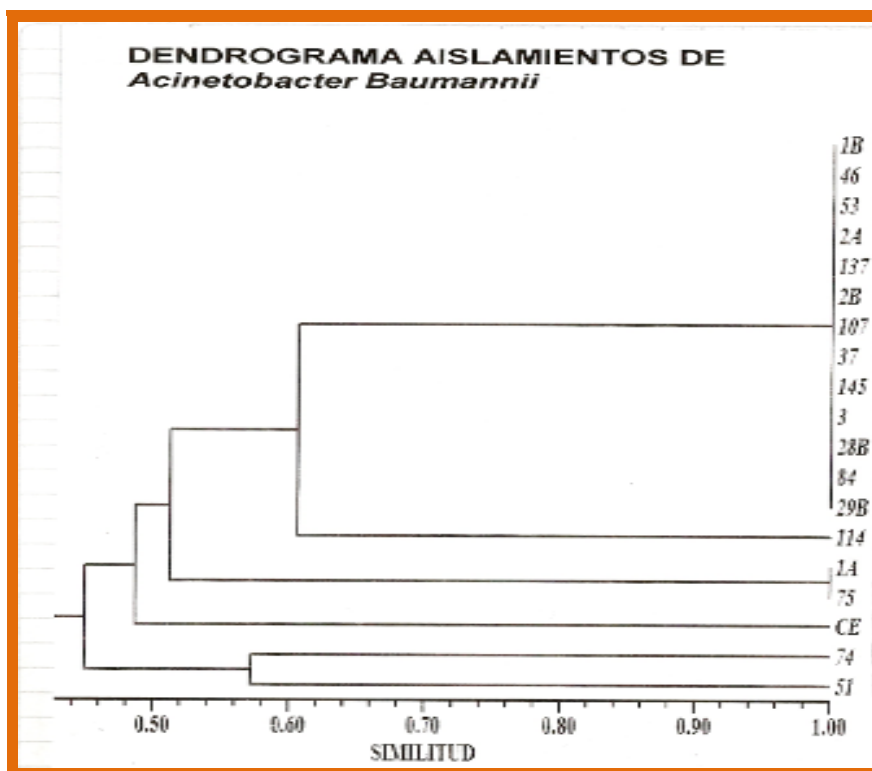
Dendrograma de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* obtenido por el programa NTSYSpc 2.0 Hospital 1. (55)



Dendrograma de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* obtenido por el programa NTSYSpc 2.0 Hospital 2. (55)



**Dendogramas de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* obtenido por el programa NTSYSpc 2.0 Hospital 3.**



Dendogramas de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* obtenido por el programa NTSYSpc 2.0 Hospital 4.

## ANEXO 2

### **TÉCNICA DE LISIS CELULAR POR EBULLICIÓN PARA OBTENCIÓN DE DNA**

- Los aislamientos se inocularon en agar nutritivo y se incubaron a 37°C por 18 – 24 horas.
- Se tomó con asa bacteriológica una colonia aislada del cultivo fresco y se suspendió en 100ul de agua destilada estéril, en un tubo de 1.5 mL con una pequeña perforación en la tapa.
- Para conseguir la lisis celular se colocaron los tubos en baño de agua a temperatura de ebullición por 10 minutos.
- Pasado el tiempo de lisis celular, se colocaron los tubos en agua hielo por 10 minutos.
- Se centrifugaron los tubos a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos, para remover los restos celulares.
- Finalmente, se realizó una dilución 1:10 tomando 50 *ul* del sobrenadante y 450 *ul* de agua destilada estéril.

Con esta dilución se realizaron las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) .

### ANEXO 3

#### **EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO (TERMOLISIS ALCALINA)**

Se parte de una colonia aislada en medio selectivo 25 ml (LB) con imipenem 2 ug/ml , se incubo 15 horas a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.7-0.8 a 550 nm.

Se recolecta un total de 20 ml de cultivo en tubo falcón y se centrifuga a 6000 rpm por 5 minutos.

El paquete celular se resuspende homogéneamente en 5ml de buffer TE 50/50 ( Tris HCl 1M, EDTA 0.5 M) estéril .

Se centrifuga nuevamente a 6000 rpm por 5 minutos, el pellet es resuspendido en 2 ml de buffer te 50/50 y es transferido a 2 tubos de 1.5 ml.

Se centrifuga nuevamente a 10000 rpm por 2 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 75 ul de solución de prelisis ( 50 mM de glucosa; 10mM EDTA; 25 mM tris pH 8.0) con lisozima 4 mg/ml, RNAsa 50 ug/ml y se incuba a 37°C por 5 minutos.

Se adiciona 200ul de buffer de lisis (Tris base 50mM; pH 12.5, SDS 3% pH 12.6) mezclar por inversión y calentar a 65°C por 20 minutos.

Adicionar al lisado un volumen de fenol-cloroformo-isoamilico, mezclar suavemente por inversión por 2 minutos y centrifugar durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C

Recolectar la fase acuosa de los dos tubos aproximadamente 400 ul y agregar un volumen de cloroformo isoamílico, centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm .

Retirar la fase acuosa con sumo cuidado colocarla en un tobo nuevo y agregar 100 ul de éter, mezclar suavemente e incubar por 10 minutos a 65 °C, enfriar en baño de agua hielo, centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm.

Este producto es precipitado con Acetato de Sodio 3mM y 2.5 volúmenes de etanol absoluto por 2 horas a 4°C, se centrifuga por 15 minutos a 14.000 rpm.

Se realiza un lavado con 200 ul de etanol al 75% se centrifuga por 15 minutos a 14.000 rpm, se deja secar el pellet y se disuelve en 100 ul de agua HPLC estéril.

## ANEXO 4

Se realizó la amplificación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> de un aislamiento positivo para dicho gen confirmado por secuenciación, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores y condiciones citadas en el numeral 3.6.1(14).

El producto amplificado fue purificado por el método de elución en columna Pure Link de Invitrogen®, posteriormente fue cuantificado por el método de fluorometría (Qubit) Invitrogen®, Los productos obtenidos por PCR purificados fueron evaluados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, utilizando como marcador de peso molecular (ADN ladder 100pb) de Invitrogen®, coloreados con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El registro fotográfico y digitalización del gel se realizó mediante el programa Quantity one® y el digitalizador Gel Doc® de (Biorad).

El producto obtenido fue marcado con digoxigenina por el sistema de Random primed durante 20 horas a 37° en un termociclador iCycler® de Bio-Rad laboratorios, bajo las condiciones establecidas por la casa comercial Roche Alemania. (52)

### **Construcción de sonda marcada con digoxigenina específica para búsqueda del gen 16S rRNA.**

Se utilizó la metodología descrita en el numeral 3.6.1, utilizando iniciadores universales descritos en la tabla 1 y bajo las condiciones citadas en la tabla 2 de anexos. (16)

**Tabla 1: iniciadores utilizados para amplificar el gen 16S rRNA**

<i>GEN</i>	<i>INICIADOR</i>	<i>ORIENTACION</i>	<i>SECUENCIA (5`-3`)</i>	<i>REFERENCIA</i>
16S rRNA	PC 20	DIRECTA	TACGGGAGGCAGCAG TGGG	Edwars et al 1989
	PD 18	INVERSA	GTATTACCGCGGCTGC TG	Edwars et al 1989

**Tabla 2: Condiciones de amplificación de los genes 16S rRNA,**

<i>CICLOS</i>	<i>OXA-23</i>
Desnaturalización inicial	94° 5 minutos
Desnaturalización	94° 25 segundos
Anillamiento	52° 40 segundos
Extensión	72° 50 segundos
Extensión final	72° 6 minutos
	30 ciclos

## ANEXO 5

### Clonación del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> .

Para obtener un control positivo se construyó un plásmido recombinado con el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, se utilizó para esto una estrategia de clonación usando como vector el plásmido TOPO® invitrogen, y como inserto, el producto obtenido por PCR para el gen *bla*<sub>OXA-23</sub> utilizando los iniciadores citados en la tabla 3 bajo las condiciones citadas en la tabla 4 anexos. (54)

**Tabla 3: iniciadores utilizados para amplificar el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>**

<i>GEN</i>	<i>INICIADOR</i>	<i>ORIENTACION</i>	<i>SECUENCIA (5'-3')</i>	<i>REFERENCIA</i>
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	OXA-23 F	DIRECTA	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	Afzal-Shah 2001
	OXA-23 R	INVERSA	TCACAACAACATAAAAGCACTG	Afzal-Shah 2001

**Tabla 4: Condiciones de amplificación de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub>,**

<i>CICLOS</i>	<i>OXA-23</i>
Desnaturalización inicial	94° 5 minutos
Desnaturalización	94° 25 segundos
Anillamiento	52° 40 segundos
Extensión	72° 50 segundos
Extensión final	72° 6 minutos
	30 ciclos

### Ligación plásmido/inserto

La ligación del plasmido TOPO® y el inserto (amplificado del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> por PCR) obtenido en el numeral 3.6.3 se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones especificadas en la tabla 5 anexos..

**Tabla 5 Condiciones de ligación plásmido inserto**

<i>REACTIVO</i>	<i>INSERTO/VECTOR</i>
Solución salina	1 µl
DNA inserto producto fresco PCR	1 µl (25ng)
Agua HPLC	3 µl
TOPO® vector	1 µl 10 ng/ul

La reacción de ligación se llevo a cabo a temperatura ambiente por 30 minutos.

### **Transformación química**

Se obtuvieron células *Escherichia coli* TOP 10® químicamente competentes (54) a 50 µl de células TOP 10® químicamente competentes se adicionaron 5 µl del producto de ligación esta mezcla se deja en hielo por 10 minutos y posteriormente es incubado en baño maría a 42° C por 45 segundos, transcurrido este tiempo se enfrió en hielo por 2 minutos y se adicionó 250 µl de caldo LB precalentado a 42° se incubo a 37° C en movimiento de rotación 200 rpm por 1 hora y se procedió a sembrar en agar LB con ampicilina 100 µg/ml , Xgal 20 mg/ml y se incubaron a 37°C ON.

Las células transformadas obtenidas fueron repicadas en agar LB con ampicilina 50 µg/ml, se evaluó la presencia del gen *bla<sub>OXA-23</sub>* por PCR, posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico de los aislamientos portadores de dicho gen y este producto recombinado fue utilizado como control positivo para llevar a cabo la búsqueda del gen *bla<sub>OXA-23</sub>* en ADN plasmídico por el método de hibridización.

## ANEXO 6

### **SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL PROCESO DE HIBRIDIZACIÓN.**

**Buffer de lavado:** 0.1M ácido maleico; 0.15 M NaCl; pH 7.5 (20°C) ; 0.3% (V/V) tween 20.

**Buffer de Ácido Maleico:** 0.1 M ácido maleico; 0.15 M NaCl; ajustar con NaOH sólido a pH 7.5 (20°).

**Buffer de detección:** 0.1M Tris HCl , 0.1 M NaCl pH 9.5 (20°C)

**Buffer TE:** 10 mM Tris-HCl , 1mM EDTA, pH 8.0

**Solución de lavado 2x SSC;** 0.1% SDS . (lavado post hibridización)

**Solución de lavado 0.5x SSC,** 0.1% SDS (lavado astringente post hibridización)

### **SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL PROCESO DE TRANSFERENCIA DEL GEL A LA MEMBRANA DE NYLON**

**Solución 20X SSC:** NaCl 3M; 300 mM citrato de sodio pH 7.0 (para transferencia)

**Buffer desnaturalizante:** 0.5 N NaOH; 1.5 M NaCl.

**Buffer Neutralizante:** 0.5M Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 3M.

**Solución depuración:** 0.25 N HCl

### **SOLUCIÓN UTILIZADA PARA DESHIBRIDIZAR**

**Solución para retirar la sonda:** 0,2 N NaOH; 0,1% SDS (W/V).