

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**



**CARACTERIZACIÓN DE *ACINETOBACTER* SPP EN EL  
AMBIENTE HOSPITALARIO : PAPEL DE LAS DISTINTAS  
ESPECIES Y ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESISTENCIA  
A CARBAPENEMAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Adela Álvarez-Buylla Álvarez

Bajo la dirección de la doctora

Esther Culebras López

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

**Caracterización de *Acinetobacter* spp en el ambiente  
hospitalario: papel de las distintas especies y  
estudio molecular de la resistencia a carbapenemes.**

Tesis doctoral

Adela Álvarez-Buylla Álvarez

Madrid, 2013



*A mis padres, a mi hermano y a Guille*



## Agradecimientos

*Ahora que este trabajo llega a su fin me gustaría agradecer a todas las personas que, de una forma u otra, han hecho que esto sea posible. Mi más sincero agradecimiento a todos ellos por su entrega y por el apoyo que me han brindado a lo largo de todo el proceso.*

*Quiero agradecer en primer lugar al Dr Juan J. Picazo por haberme acogido en su Servicio y haberme dado la oportunidad de desarrollar en él mi proyecto de investigación.*

*A mi directora de tesis, la Dra Esther Culebras, por haber compartido conmigo su experiencia y por la dedicación y el cariño con el que ha dirigido este trabajo.*

*Al Dr Miguel Fernández-Arquero por ayudarme con el trabajo de secuenciación, por su cercanía y sus palabras siempre de ánimo.*

*A Álvaro Gómez por introducirme en la espectrometría de masas, por su apoyo técnico y su disponibilidad. Asimismo, a Faustino Huertas por sus consejos y su ayuda en la interpretación química.*

*A los Drs Livermore y Woodford de la Health Protection Agency de Londres por haberme recibido en su laboratorio y haber puesto a mi disposición todos sus recursos y conocimientos. A todo su equipo por haberme hecho sentir como en casa desde el primer momento, por su calidad científica y humana.*

*A la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica por haberme otorgado una beca de formación con la que poder llevar a cabo esta estancia predoctoral en la HPA.*

*A todos los compañeros del Servicio de Microbiología Clínica del HCSC por haberme acompañado a lo largo de estos cuatro años de aprendizaje, por su apoyo y su colaboración. Especialmente a Esther por escucharme y estar siempre ahí, por confiar en mí y hacer que todo sea más fácil.*

*A mis padres y mi hermano por su cariño, por creer en mí y por animarme a perseguir mis sueños.*

*A Guille por ser mi mayor admirador, por conocerme y por apoyarme incondicionalmente.*

*Muchas gracias a todos.*

# ÍNDICE

---

---



# Índice

I. Abreviaturas.....	1
II. Summary.....	3
III. Introducción.....	7
➤ <i>Acinetobacter</i> spp.....	7
➤ Importancia nosocomial de los aislados de <i>Acinetobacter</i> spp. ....	9
➤ Opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por <i>Acinetobacter</i> spp. ....	10
➤ Determinantes de patogenicidad .....	13
• Mecanismos de resistencia enzimáticos .....	15
• Mecanismos de resistencia no enzimáticos .....	21
➤ Papel de las secuencias de inserción en la expresión de la resistencia a carbapenemes en <i>Acinetobacter</i> . ....	24
➤ Técnicas de tipado.....	27
➤ MALDI-TOF MS .....	28
• Identificación de microorganismos.....	29
• Determinación de resistencias a los betalactámicos .....	30
• Estudios de clonalidad .....	31
IV. Objetivos.....	33
V. Materiales y métodos.....	35
➤ Aislados clínicos .....	35
➤ Extracción de ácidos nucleicos y cálculo de la concentración de ADN.....	35

➤ Técnicas de identificación.....	36
• Técnicas c onvencionales: b atería d e p ruebas b ioquímicas d e identificación.....	36
• Técnicas de identificación moleculares basadas en el ADN .....	37
• Técnicas de identificación moleculares basadas en el perfil protéico: Espectrometría d e m asas M ALDI-TOF ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight</i> ).....	39
➤ Estudios de sensibilidad a antimicrobianos .....	41
• Método de dilución en agar .....	41
• Método de Epsilon-test .....	43
• Método de microdilución en caldo .....	43
➤ Pruebas fenotípicas para determinación de carbapenemasas.....	44
• Test de Hodge .....	44
• Test de sinergia de doble disco .....	45
• Test de PBA .....	45
• Detección de l a a ctividad c arbapenemasa m ediante M ALDI-TOF MS.....	46
➤ Estudios moleculares d e e nzimas i mplicadas e n l a r e sistencia a carbapenémicos .....	50
• Secuenciación de la enzima <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> .....	50
• Amplificación y s ecuenciación de c arbapenemasas d e l a c lase B: OXA-23-like, OXA-24-like y OXA-58.....	50

• Amplificación de carbapenemasas de la clase A: <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	51
• Amplificación y secuenciación de metalobetalactamasas: <i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> y <i>bla</i> <sub>SIM</sub> .....	51
• Presencia y localización de la secuencia de inserción IS <i>AbaI</i> ligada al gen <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> .....	52
➤ Estudios clonales .....	53
• Electroforesis en campo pulsado .....	53
➤ Análisis estadístico de los datos .....	54
<b>VI. Resultados</b> .....	55
➤ Aislados clínicos .....	55
• Características de crecimiento .....	55
• Epidemiología .....	56
➤ Identificación de los aislados clínicos .....	64
• Identificación de los aislados mediante galería de pruebas bioquímicas .....	64
• Determinación de la presencia de la enzima OXA-51-like .....	64
• Espectrometría de masas MALDI-TOF MS ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight</i> ).....	65
• Amplificación y secuenciación del gen <i>rpoB</i> .....	67
• Comparación de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de identificación.....	67
• Aislados distintos de <i>A. baumannii</i> .....	69

➤ Pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos .....	70
• Método de dilución en agar .....	70
• Método de Epsilon-test .....	75
• Método de dilución en caldo.....	76
• Comparación de las técnicas de determinación de sensibilidad a los carbapenemes: dilución en agar, Epsilon-test y dilución en caldo. ....	76
➤ Pruebas fenotípicas para determinación de carbapenemasas.....	79
• Test de Hodge modificado .....	79
• Test de sinergia de doble disco .....	80
➤ Clasificación de los aislados .....	81
• Antibiotipia .....	81
• Detección molecular de carbapenemasas .....	87
• Secuenciación de la enzima <i>bla</i> <sub>OXA 51-like</sub> .....	90
• Secuenciación de otras enzimas identificadas en el estudio .....	94
• Caracterización de perfiles clonales mediante electroforesis en campo pulsado .....	96
➤ Detección de actividad carbapenemasa por MALDI-TOF MS.....	108
• Selección de las condiciones óptimas del ensayo e identificación de los picos más representativos.....	108
• Detección de la actividad carbapenemasas en aislados de <i>Acinetobacter</i> spp mediante MALDI-TOF MS .....	119

• Detección de metalobetalactamasas mediante MALDI-TOF MS .....	121
VII. Discusión .....	125
VIII. Conclusiones .....	149
IX. Bibliografía .....	151



## ABREVIATURAS

---

---



## Abreviaturas

ATB: antibiotipia	COT: cirugía ortopédica y traumatológica
IPM: imipenem	UCI: unidad de cuidados intensivos
MEM: meropenem	MIN: medicina interna
CTX: cefotaxima	NFR: nefrología
CAZ: ceftazidima	GRT: geriatría
FEP: cefepime	HMT: hematología
SUB: sulbactám	ONCO: oncología
SAM: ampicilina-sulbactám	AP: atención primaria
TZP: piperacilina-tazobactám	CG: cirugía general
AMK: amikacina	NRL: neurología
GEN: gentamicina	END: endocrinología
MIN: minociclina	ACV: angiología y cirugía vascular
DOX: doxiciclina	URO: urología
TIG: tigeciclina	MCR: microbiología
LVX: levofloxacino	LCOR: líquido corporal
RIF: rifampicina	CVC: catéter venoso central
COL: colistina	HM: hemocultivo
DPA: ácido dipicolínico	BAS: aspirado bronquial
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	ESP: esputo
PBA: ácido fenilborónico	EXU: exudado
pb: pares de bases	HQX: herida quirúrgica
MBL: metalobetalactamasa	ORI: orina
CHDL: carbapenem-hydrolyzing Class D $\beta$ -Lactamase	CJN: exudado conjuntival
HCSC: Hospital Clínico San Carlos	LAR: líquido articular
CA-SFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	FIS: fistula
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute	H: hombre
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	M: mujer
BSAC: British Society for Antimicrobial Chemotherapy	



## SUMMARY

---

---



## I. Summary

Spread of *Acinetobacter* spp. strains in healthcare facilities is one of the biggest threats in nosocomial infection control. Some *Acinetobacter* strains can cause nosocomial outbreaks and, many times, it is difficult to eradicate it from the hospital environment becoming endemic.

The genus *Acinetobacter* has undergone significant taxonomic modification over the last few years. It currently comprises more than 30 genomic species and its most important representative, *Acinetobacter baumannii*, has emerged as one of the most problematic pathogens for health care institutions throughout the world, mostly because of its ability to develop resistance to several antibiotics. Although species other than *A. baumannii* are also thought to be involved in nosocomial disease, their role is not yet clear. Unfortunately, the simple phenotypic tests used in diagnostic laboratories for identification of other bacterial genera to species level fail to properly distinguish them thus leading to the misidentification of other *Acinetobacter* species with similar phenotypes. Consequently, more relevant species have been grouped together as *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. genospecies 3* and *A. genospecies 13TU*).

*Acinetobacter* species are defined based on several phenotypic and genotypic characteristics. Among the latter group, the presence of OXA 51-like genes (naturally occurring in *A. baumannii* but not in other species in the genus) Due to the increasing relevance of *Acinetobacter baumannii* and other genomic species as pathogens, recent researches have focused on the development of reliable identification methods. RNA polymerase  $\beta$ -subunit (*rpoB*) gene sequences seem to be one of the most useful tools for the identification and taxonomic classification of various bacterial species, including *Acinetobacter* spp. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is increasingly used in the field of bacterial taxonomy. The method is being introduced as a rapid tool for routine bacterial identification in clinical laboratories with promising results in most bacterial species

Nevertheless, some nonfermentative Gram-negative bacilli have been misidentified.

Increased use of carbapenems and other broad-spectrum antibiotics has promoted the selection of resistant strains, and infections by multidrug-resistant *A. baumannii* strains are commonly reported worldwide. The carbapenemases found in *Acinetobacter* species mainly include class B metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) (VIM, IMP, SIM and NDM type) and class D OXA-type enzymes (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58</sub> families), which confer different levels of resistance to imipenem, meropenem and other  $\beta$ -lactams. Most of these enzymes are found as part of mobile structures such as plasmids, although some are chromosomally encoded, such as the *bla*<sub>OXA-51</sub>. This enzyme is thought to be intrinsic to *A. baumannii* and has been widely used to easily identify this species. OXA-51-like enzymes usually show weak carbapenemase activity. However, its expression can be modified when the insertion sequence IS *AbaI* is located upstream of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene, which generates a strong promoter, resulting in a carbapenem-resistant phenotype.

As carbapenems are often the last resort treatment for *Acinetobacter* spp. clinical isolates, rapid detection and identification of enzymes responsible for carbapenem resistance is mandatory and a clinical challenge. MALDI-TOF MS has shown promise in the identification of antimicrobial resistance but it is still necessary a standard protocol that can be used systematically and facilitates routine use in all Microbiology Departments.

The objectives of this study were to characterize the *A. baumannii* population in our institution and to investigate the diversity of the OXA-51-like class D and other carbapenemases. We establish the usefulness of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of *Acinetobacter* species by comparison with two molecular techniques, as well as determine the role of species other than *A. baumannii* play in nosocomial infections. In addition, we studied the distribution and diversity of the intrinsic OXA-51-like class D carbapenemases in *A. baumannii* strains and

the presence of the IS*AbaI* insertion sequence upstream of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene. We also analyzed the time distribution of circulating clones.

In this study we check the utility of MALDI-TOF MS for carbapenemase detection in *Acinetobacter* spp. We compare the previous published conditions in order to develop an effective way to detect and differentiate carbapenemases that may appear in this bacterial genus. We determined the optimal antibiotic concentration and analyzed the peaks of interest with imipenem to finally report a rapid and reliable technique for screening all clinically relevant *Acinetobacter* spp carbapenemases

In this study, *bla*<sub>OXA51-like</sub> occurred naturally in *A. baumannii* but not in isolates from other species, as previously reported, thus making its detection a useful tool for the identification of *A. baumannii*. MALDI-TOF MS is a promising clinical laboratory technique that can rapidly identify most pathogens. All tested isolates were properly identified to genus level but a significant percentage were misidentified at the species level resulting in an unreliable technique when an accurate identification of the species of *Acinetobacter* is needed. We concluded that the limited nature of the database is MALDI-TOF's greatest drawback and should be extended to other currently underestimated *Acinetobacter* species that play an important role in nosocomial infections being more significant as human pathogens than originally thought. *rpoB* sequencing identified all the strains, even genetically close strains, and no other molecular techniques were necessary to conclude the analysis.

Some *bla*<sub>OXA-51</sub> alleles (OXA-65, OXA-64, OXA-71, and OXA-201) have more prevalence in our environment than others. Most of these predominant OXA-51-like variants were associated with a particular PFGE profile and different acquired carbapenemases defining successful clones that persist over time instead of others that appear sporadically. Analysis of IS*AbaI* insertion sequence showed 3 different susceptibility profiles among the IS*AbaI*-positive isolates, including some susceptible ones. Based on these results, the role of the IS*AbaI* element in the development of resistance to carbapenems is not clear here,

## Summary

Our findings allowed us to increase the understanding of the dynamics of this organism in the hospital.

# INTRODUCCIÓN

---

---



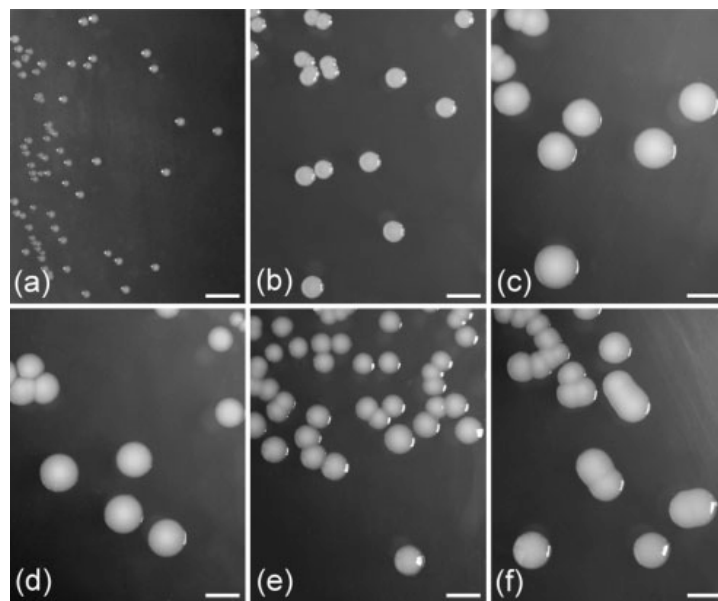
## II. Introducción

### ➤ *Acinetobacter* spp.

Las bacterias incluidas en el género *Acinetobacter* han sufrido muchos cambios taxonómicos a lo largo de la historia. Actualmente este género está formado por más de 30 especies, muchas de las cuales no tienen designado aún un nombre formal y se denominan como diferentes especies genómicas. Los principales representantes, especie genómica 1 (*A. calcoaceticus*), especie genómica 2 (*A. baumannii*), especie genómica 3 (*A. pittii*) y especie genómica 13TU (*A. nosocomialis*), se han agrupado bajo el nombre de complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* debido a su proximidad genética. Todas las bacterias del género comparten ciertas características bioquímicas, morfológicas y de crecimiento. Entre las primeras destaca el hecho de ser bacterias Gram negativas, no móviles, no fermentadoras de la glucosa, oxidasa negativa, catalasa positiva y aerobias estrictas, con un contenido G+C del 39 al 47 mol%. En cuanto a las propiedades morfológicas, todas ellas presentan forma cocobacilar, y atendiendo a sus características de crecimiento, las condiciones óptimas se dan entre los 20 y los 30 °C en medio de cultivo complejo sin requerimientos especiales de nutrientes. Sin embargo, otras propiedades como la hemólisis varían de unas especies a otras [1, 2]. En la figura 1 se muestran las características macroscópicas de las colonias de distintas especies del género *Acinetobacter*.

Aunque *Acinetobacter* spp. se considera un microorganismo con poco potencial patógeno, presenta ciertas características que pueden contribuir a su virulencia. Éstas son, entre otras, la presencia de un polisacárido capsular de L-ramnosa-D-glucosa-acido-D-glucurónico-D-manosa, que dota de mayor hidrofilia a su superficie, la propiedad de adhesión a las células del epitelio humano o la presencia del lipopolisacárido y del lípido A. También se ha observado que algunas cepas poseen sideróforos que les permiten obtener el hierro necesario para su crecimiento de las reservas del cuerpo humano [3-5].

A pesar de agruparse en un mismo complejo, sólo *A. baumannii* se ha considerado históricamente un microorganismo capaz de causar infecciones en el ser humano, mientras que *A. calcoaceticus* se aísla habitualmente del medio ambiente y *A. pittii* y *A. nosocomialis* forman parte de la flora normal de la epidermis, como la mayoría de las especies del género. No obstante, esta circunstancia ha ido cambiando con el tiempo y muchas de las especies que se creían comensales empiezan a encontrarse de forma repetida en aislados clínicos haciendo que se replantee su papel como microorganismos causales de infecciones en humanos. En la actualidad se están llevando a cabo muchos estudios centrados en dilucidar el papel que otras especies distintas de *A. baumannii* desempeñan en la clínica [6-10].



**Figura 1.** Aspecto macroscópico de las colonias de distintas especies de *Acinetobacter*. Crecimiento en TSA a 30°C durante 24 h. (a) *A. parvus* LMG 21765 (b) *A. ursingii* LUH 3792 (c) *A. lwoffii* ATCC 15309 (d) *A. johnsonii* (e) *A. junii* ATCC 17908 (f) *A. schindleri* LUH 5832. Las barras equivalen a 2 mm. Fuente: Nemeč *et al* Int J Syst Evol Microbiol (2003), 53, 1563–1567

A esta nueva perspectiva hay que añadirle el hecho de que la gran proximidad genética entre especies ha dificultado enormemente la correcta identificación de las mismas a lo largo de los años. Los diferentes métodos de identificación fenotípica mediante pruebas bioquímicas de los que se disponen en la mayoría de los laboratorios clínicos no son capaces de identificar especies

distintas de *A. baumannii* por lo que generalmente se agrupan como complejo o, simplemente, se nombran como *Acinetobacter* spp. Esto hace que el número de aislados clínicos distintos de *A. baumannii* esté a menudo subestimado. Sólo las técnicas moleculares permiten diferenciar a nivel de especie los distintos miembros de este género pero resultan demasiado laboriosas y caras para su empleo en la clínica. Las técnicas moleculares disponibles actualmente para la correcta identificación de las especies de *Acinetobacter* son la hibridación del ADN-ADN [1], el ribotipado [11], el análisis de restricción del gen 16S del ARN ribosomal [12, 13], la secuenciación de regiones espaciadoras de los genes 16S-23S [14], el MLST [15] o la secuenciación de la subunidad  $\beta$  del gen *rpo* [16]. Por otro lado se están desarrollando técnicas espectrométricas con resultados similares a los moleculares que ya se están aplicando en los laboratorios de asistencia clínica [17-19].

### ➤ Importancia nosocomial de los aislados de *Acinetobacter* spp.

El control de las infecciones nosocomiales causadas por bacilos Gram negativos multirresistentes se ha convertido en un problema de importancia mundial en los últimos años. El aumento de la incidencia de infecciones hospitalarias originadas por microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* en los años 70 tuvo como consecuencia el desarrollo e introducción en la clínica de nuevos antibióticos de amplio espectro capaces de hacerles frente, lo que originó un importante aumento en el número de infecciones producidas por bacilos Gram negativos aerobios estrictos como *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* o *Acinetobacter* spp. [20, 21]. De estos nuevos patógenos, *Acinetobacter* spp. juega desde entonces un importante papel en la colonización e infección de pacientes hospitalizados, causando infecciones que incluyen la bacteriemia, infecciones del tracto urinario, meningitis secundaria, infecciones de piel y tejidos blandos o neumonía asociada a ventilación mecánica [22, 23]. Las nuevas técnicas diagnósticas invasivas han favorecido también que microorganismos considerados tradicionalmente ambientales como *Acinetobacter* tengan acceso a

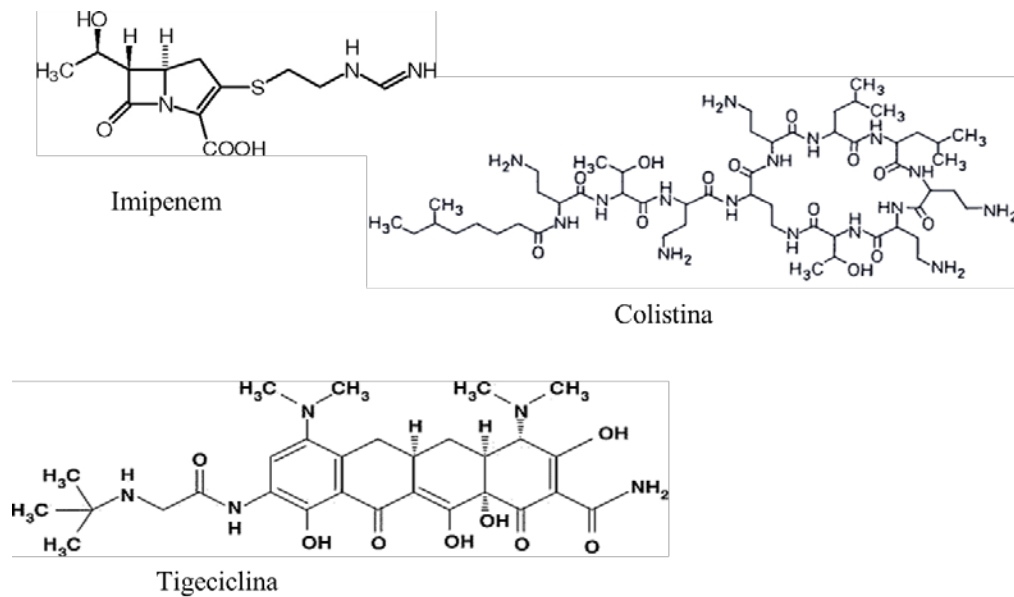
estructuras profundas del organismo afectando a pacientes críticos ingresados a menudo en unidades de cuidados intensivos. Se ha descrito que tanto el ingreso en UCI, a consecuencia de los procedimientos invasivos que se realizan, como la administración previa de antimicrobianos de amplio espectro, la cirugía mayor o los distintos tipos de inmunosupresión, suponen un factor de riesgo para la colonización y posterior desarrollo de una infección por *Acinetobacter* [2, 24].

Durante los últimos 30 años los clones predominantes de *Acinetobacter* spp. han ido acumulando resistencias a distintos antimicrobianos como las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas o aminoglucósidos. El abordaje terapéutico de las infecciones que producen estas cepas multirresistentes supone en muchas ocasiones un reto para los clínicos debido a la amplia distribución de estos clones multirresistentes, lo que hace necesario con frecuencia el uso de terapias combinadas [25-27]. A estas dificultades a la hora de plantear un tratamiento antibiótico efectivo hay que sumarle el hecho de que esta bacteria presenta una importante capacidad para sobrevivir largo tiempo en el ambiente hospitalario, lo que incrementa las posibilidades de transmisión entre pacientes, tanto vía reservorio humano como inanimado, apareciendo a menudo en forma de brotes. *Acinetobacter* es un microorganismo que forma parte de la flora normal de la población general, encontrándose principalmente en ingles y axilas, sin embargo, su presencia en pacientes hospitalizados es mayor y puede aislarse además en la cavidad orofaríngea y el tracto respiratorio. Este hecho se ve incrementado en los brotes, en particular en aquellos que implican a pacientes de las UCI con ventilación mecánica. En estos casos resulta con frecuencia necesario el cierre completo de unidades de hospitalización para su erradicación mediante limpieza de suelos, equipos, camas, etc [28-30].

### ➤ Opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter* spp.

La resistencia intrínseca de *Acinetobacter* a la mayoría de los betalactámicos así como la capacidad de este microorganismo para acumular

diversos mecanismos de resistencia ha derivado en el uso de los carbapenemes como primera opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. Sin embargo, desde principios de los años 90 se han notificado aislados resistentes a estos antibióticos y su número ha ido en aumento desde entonces, haciendo de éste un problema real en nuestros días [25, 31, 32]. Ante esta perspectiva ha sido necesario plantearse otras opciones terapéuticas como alternativa (figura 2).



**Figura 2.** Estructura molecular de los principales principios activos empleados frente a *Acinetobacter* spp. (imipenem, colistina y tigeciclina).

Una de ellas ha sido la reintroducción en la clínica de la colistina para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos. La colistina fue descubierta en 1949 y utilizada hasta los años 80, cuando se abandonó debido a la alta incidencia de nefrotoxicidad [33]. En los últimos años se han realizado muchos estudios para evaluar la eficacia de la colistina en el tratamiento de las infecciones por cepas de *A. baumannii* multirresistente y, aunque los datos son limitados, este antibiótico parece mostrar buenos resultados, especialmente en el tratamiento de pacientes con infecciones respiratorias donde la colistina se administraba en forma de aerosol [34-37]. Sin embargo, desde el primer aislamiento en 1999 de una cepa de *Acinetobacter* resistente a colistina e l

número de éstas ha ido en aumento en todo el mundo. Además, como sucede con otros antimicrobianos, se ha descrito el fenómeno de heterorresistencia, en el que se detectan subpoblaciones de *A. baumannii* resistentes entre otra mayoritaria de cepas sensibles [38-40]. El mecanismo de resistencia no está claro todavía pero algunos estudios indican que podría estar relacionado con la pérdida de lipopolisacárido y/o el sistema de dos componentes PmrAB. La administración de colistina en monoterapia origina con frecuencia aislados resistentes por lo que la terapia combinada resulta la mejor opción para prevenir estas resistencias [41].

Con objeto de hacer frente al creciente problema de la multirresistencia se están llevando a cabo muchos estudios que intentan analizar la actividad combinada de distintos antibióticos para el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter*. En este sentido, las combinaciones de colistina y rifampicina o colistina y carbapenemes han sido las más ensayadas y han mostrado resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo* [26, 27, 42]. Además, se están estudiando muchos otros compuestos con el fin proporcionar un número suficiente de opciones terapéuticas contra este microorganismo. Entre ellos cabe destacar los trabajos realizados con inhibidores de betalactamasas (sulbactam) y con la tigeciclina. El sulbactam es un inhibidor de las betalactamasas de la clase A de Ambler con estructura betalactámica que presenta actividad frente a *Acinetobacter* al unirse a la PBP 2 (*penicilin binding protein 2*) [43]. Mientras que la tigeciclina es una glicilglicina aprobada para el tratamiento de la infección intraabdominal complicada y las infecciones de piel y tejidos blandos. Esta molécula actúa mediante la unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma lo que impide la incorporación del ARN de transferencia al sitio A del ribosoma y, por tanto, inhibe la síntesis proteica. La tigeciclina se une a su sitio específico en el ribosoma con mayor afinidad que las tetraciclinas y no se ve afectada por las mutaciones en el sitio activo que confieren resistencia a las mismas. Además, sus propiedades estructurales hacen que evada con frecuencia las bombas de expulsión de las tetraciclinas. Todas estas características hacen de ella un antibiótico de gran utilidad para el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter* spp. [44, 45]. Sin embargo, en la bibliografía se recogen casos de

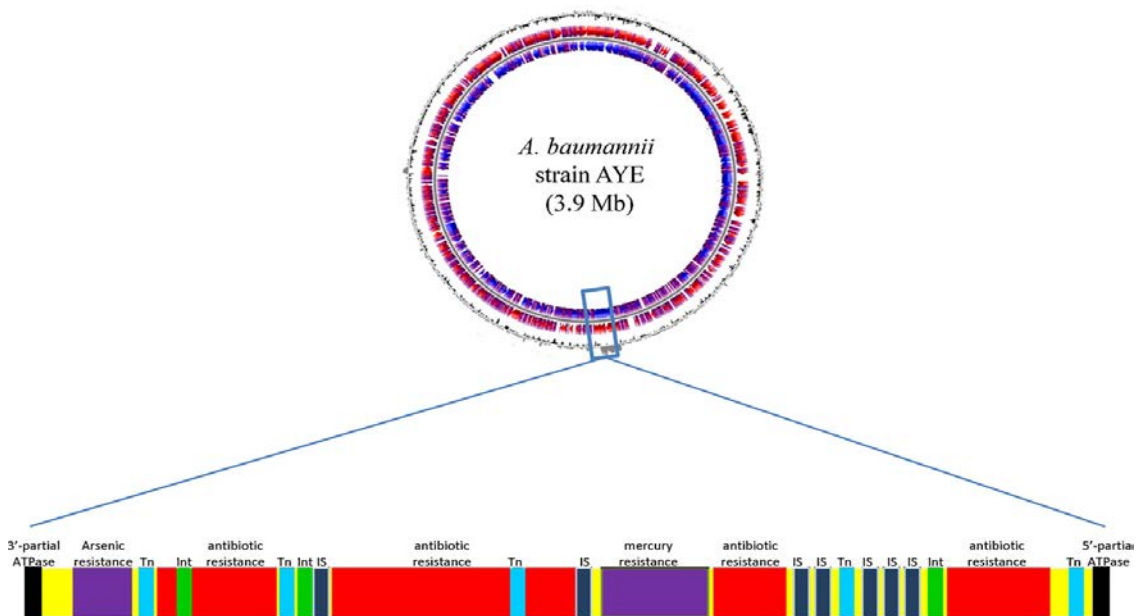
*A. baumannii* resistentes a este antibiótico [46]. El principal mecanismo implicado en la resistencia a la tigeciclina es la sobreexpresión de la bomba de expulsión AdeABC, aunque también se han descrito otros como la alteración de las porotéínas de membrana por la inserción de elementos IS en la región codificante. Esta pérdida de porotéínas de membrana genera resistencia a inhabilitar el acceso del antibiótico al interior celular [47, 48].

También se están estudiando nuevos péptidos con actividad biológica que comprenden entre 10 y 48 residuos aminoacídicos con dominios no conservados. La mayoría de ellos son moléculas catiónicas con un contenido de aminoácidos hidrofóbicos mayor o igual al 50% y son aislados de diferentes especies bacterianas, plantas y animales. Estos compuestos actúan mediante la unión electrostática a las cargas negativas de la membrana bacteriana y causan su efecto inhibitorio al aumentar la permeabilidad de esta membrana. Esto origina la pérdida del contenido bacteriano a la vez que facilita la penetración de otros compuestos. Algunas de estas moléculas son el aliteserin-1c y su análogo E4K, el buforin II o la  $\beta$ -defensina-2 humana [49-51].

### ➤ Determinantes de patogenicidad

Varios factores han contribuido al hecho de que las especies de *Acinetobacter*, más concretamente *A. baumannii*, hayan pasado de considerarse microorganismos comensales a convertirse en verdaderos patógenos implicados en infecciones, principalmente hospitalarias, de difícil manejo. Por un lado, su presencia en la flora normal de individuos sanos favorece la colonización y posterior desarrollo de infección. Por otro, la resistencia intrínseca a ciertos antibióticos debida bien a la baja permeabilidad de su membrana externa o a la expresión constitutiva de bombas de expulsión multisustrato dificulta su manejo clínico. Y, por último, la plasticidad de su genoma, que le permite incorporar con gran facilidad nuevos genes de resistencia ligados a estructuras como plásmidos, transposones o integrones, contribuye también a la expresión de un fenotipo de multirresistencia.

La secuenciación en 2006 del genoma de dos cepas de *A. baumannii* multirresistente (cepa AYE, figura 3) responsables de un brote en 2003 en Francia permitió identificar una región conocida como “isla de resistencia”. Ésta comprende una región de 86 Kb que incluye 52 genes de resistencia a antimicrobianos, metales pesados y antisépticos. Esta región está flanqueada en ambos extremos por una secuencia repetida de cinco nucleótidos (ACCGC) [43, 52, 53]. Desde entonces se han secuenciado y analizado muchas otras cepas de *A. baumannii* demostrando que estas islas presentan un gran número de genes de resistencia. Estos genes se han transmitido horizontalmente entremezclados con diversos tipos de transposones, integrones y secuencias relacionadas lo que puede haber facilitado la transferencia de esta región desde muestras ambientales hasta el genoma de *A. baumannii* [54-56].



**Figura 3.** Contexto genético de la isla de resistencia de la cepa AYE de *A. baumannii* (86kb). Tn, transposasa; Int, integrasa; IS, secuencia de inserción. Fuente: Kempf *et al* Antimicrob Agents Chemother 39 (2012) 105-114.

Aparezcan o no codificados en alguna de estas islas, los mecanismos de resistencia más frecuentes en este grupo de microorganismos pueden agruparse en dos categorías:

- Mecanismos de resistencia enzimáticos

La presencia de diferentes enzimas capaces de degradar los antibióticos betalactámicos (incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes) supone el principal mecanismo de resistencia dentro del género *Acinetobacter*. Este grupo de enzimas reciben de forma genérica el nombre de betalactamasas. Éstas, actúan inhibiendo la transpeptidación del peptidoglicano mediante la inactivación de las transpeptidasas, impidiendo de este modo la síntesis de la pared bacteriana, lo que conduce a la muerte de la bacteria. Las betalactamasas son enzimas de la familia de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) de las que se cree que han evolucionado [57].

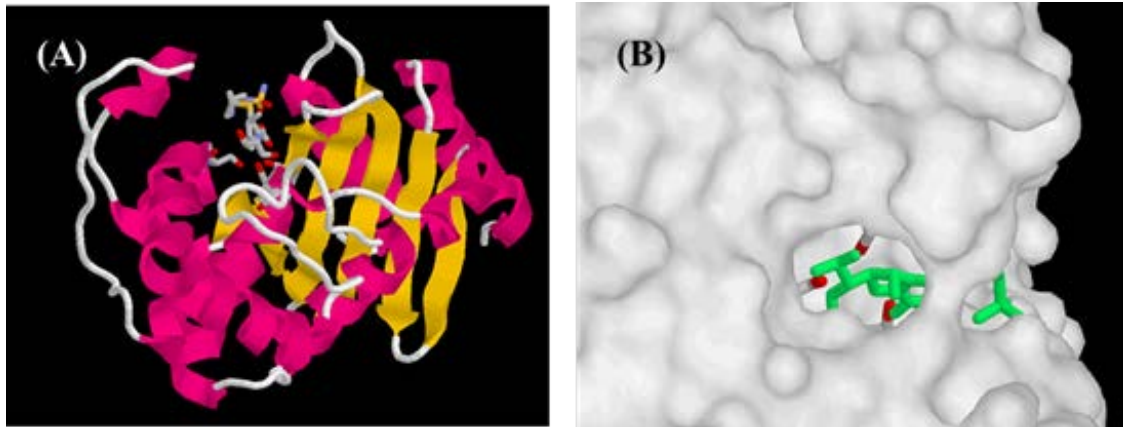
Las betalactamasas se clasifican según Ambler en cuatro grupos moleculares a tendiendo a la similitud en la secuencia de aminoácidos que componen su centro activo [58]. De este modo, las betalactamasas de los grupos A, C y D presentan un residuo de serina en su centro activo, responsable de la inactivación del antibiótico. Por otro lado, las betalactamasas del grupo B son metaloenzimas que precisan de al menos un residuo de Zinc para llevar a cabo su actividad catalítica. Estas enzimas también son conocidas como metalobetalactamasas.

Según su relevancia en el género *Acinetobacter*:

- **Betalactamasas clase D**

Estas enzimas han recibido históricamente el nombre de oxacilinasas debido a su capacidad para hidrolizar la oxacilina de forma más efectiva que la benzilpenicilina. Además, son capaces de hidrolizar la amoxicilina, meticilina, cefaloridina y la cefalotina. Algunas de estas enzimas, derivadas de otras con mayor actividad, son también capaces de hidrolizar las cefalosporinas de espectro extendido. La actividad carbapenemasa sin embargo, parece ser una propiedad intrínseca a algunas oxacilinasas, aunque su eficiencia hidrolizando estos antibióticos es mucho menor que la de las metalobetalactamasas [57, 59]. Las betalactamasas de la clase D son inactivadas por inhibidores de las

betalactamasas como el ácido clavulánico o el sulbactam. La figura 4 muestra el centro activo de una betalactamasa de la clase D.



**Figura 4.** Enzima OXA-24-like PDB 3 PAE de *A. baumannii* acomplejada con doripenem. (A) Estructuras en forma de  $\alpha$ -hélice y de lámina  $\beta$  y (B) detalle del centro activo donde se aprecian en rojo las serinas (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3pae>).

La primera oxacilinasas con actividad carbapenemasas fue aislada en 1985 de una cepa multirresistente de *A. baumannii* en un paciente de Edimburgo y descrita posteriormente en 1993. En la actualidad se han identificado más de 120 variantes de oxacilinasas. Todas ellas comparten tres dominios peptídicos altamente conservados: Ser-X-X-Lys, Ser-X-Val/Ile y Lys-Thr/Ser-Gly. Estas enzimas se agrupan en distintos *clusters* según su similitud en la secuencia aminoacídica, variando del 40 a 170%. Cuatro de estos *clusters* se han identificado en el género *Acinetobacter*: subgrupo 1/familia de la OXA-23, subgrupo 2/familia de la OXA-24, subgrupo 3/familia de la OXA-51 y subgrupo 4, que incluye a una única enzima, la OXA-58 [60]. La mayoría de estas enzimas están codificadas en plásmidos (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> y *bla*<sub>OXA-58</sub>), sin embargo algunas de ellas son de ubicación cromosómica, apareciendo siempre en todos los aislados de la misma especie, como es el caso de la OXA-51-like y *A. baumannii* [61]. Algunos autores han reseñado la presencia de esta enzima OXA-51-like ligada a otras especies de *Acinetobacter* distinta de *A. baumannii*, sin embargo, el número de estos a día de hoy es anecdótico [62]. Esta enzima no se

encuentra asociada a ningún integración ni transposición y su implicación en la resistencia de *A. baumannii* a los betalactámicos parece reducida. No obstante, esta situación se ve modificada cuando la enzima OXA-51-like se encuentra precedida por la secuencia de inserción IS*Aba1* separada del codón de inicio 7 pares de bases corriente arriba [63]. Esto se traduce en una sobreexpresión de la misma y, en consecuencia, un mayor nivel de resistencia a los betalactámicos [64].

La OXA-24-like se describió en España en el año 2000. Esta enzima de 274 aminoácidos no presenta actividad hidrolítica frente a la oxacilina, cloxacilina y meticilina a diferencia de otras betalactamasas de la clase D, pero sí moderada actividad frente a los carbapenemes [65]. Los altos niveles de resistencia a los betalactámicos observados en el caso de la OXA-24-like parecen estar ligados en gran medida a la presencia de otros mecanismos, como la disminución de la expresión de las proteínas de membrana (OMPs) [66]. La enzima OXA-58 fue descrita por primera vez en 2005 por Poirel *et al* formando parte de un transposón compuesto. Éste se encontraba en un plásmido e incluía dos copias de la secuencia de inserción IS*Aba3* flanqueando el gen *bla*<sub>OXA-58</sub>. Las secuencias de inserción IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS18 parecen regular la expresión del gen *bla*<sub>OXA-58</sub> mientras que la IS*Aba3* además participa en la adquisición de este gen. Esta enzima de 280 aminoácidos presenta una similitud del 48 y 47% con las enzimas OXA-23-like y OXA-24-like respectivamente y confiere resistencia a ticarcilina y sensibilidad disminuida a imipenem y meropenem [67].

La asociación de la secuencia de inserción IS*Aba1* con la OXA-23-like genera promotores fuertes que conducen a una hiperproducción de la enzima, lo que se traduce en un aumento significativo de los niveles de resistencia [68, 69]. Estas enzimas han sido identificadas en diferentes brotes de *Acinetobacter* spp. multirresistente a lo largo de todo el mundo: OXA-23-like en Brasil, Reino Unido, Korea y Tahiti, OXA-24-like en España y Portugal y OXA-58 en Francia, Grecia, Italia, Rumania, Turquía, Argentina y Kuwait [60].

### ○ Betalactamasas clase C

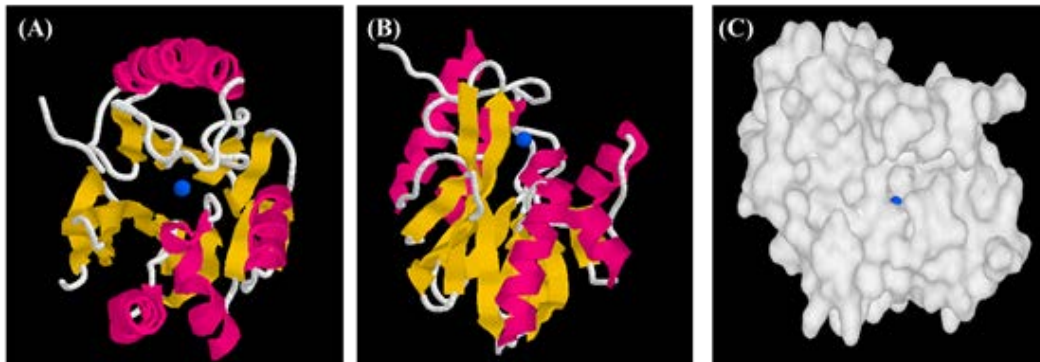
Las betalactamasas de la clase C pertenecen al subgrupo de las serin enzimas, por presentar este residuo aminoacídico en su centro activo.

La mayoría de las betalactamasas AmpC producidas por las bacterias Gram negativas hidrolizan las amino y ureidopenicilinas, las cefamicinas (cefotaxima y cefotetán) y en menor nivel las oximinocefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima) y las monobactamas como el aztreonam. Otras cefalosporinas, como el cefepime o la cefpirona no forman parte normalmente del espectro de acción de las AmpC. No obstante, se han descrito cefalosporinasas AmpC de amplio espectro en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* [70, 71].

*A. baumannii* presenta una AmpC cromosómica responsable de la resistencia intrínseca de este microorganismo a las amino y ureidopenicilinas. Esta enzima se expresa normalmente en bajos niveles y no es inducible, como sucede en otras especies. A diferencia de *E. coli*, donde la hiperproducción de AmpC es debida a mutaciones puntuales, en *A. baumannii* se relaciona con la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* corriente arriba, lo que origina un promotor fuerte. Las variables de AmpC presentes en *Acinetobacter* se han renombrado como ADC (*Acinetobacter-derived cephalosporinases*) [72, 73].

### ○ Betalactamasas clase B

Las metalobetalactamasas son enzimas que se caracterizan por su capacidad para hidrolizar los carbapenemes, así como por su resistencia a los inhibidores de las betalactamasas. Sin embargo, estas enzimas son inactivadas por quelantes divalentes como el EDTA, el DPA o el ácido-2-mercaptopropionico que atrapan los iones de Zinc presentes en el centro activo de la misma (figura 5). Además de los carbapenemes, las metalobetalactamasas son capaces de hidrolizar las penicilinas y las cefalosporinas, pero no el aztreonam [74].



**Figura 5.** Metalobetalactamasa IMP-1 de *P. aeruginosa* (A y B) Estructuras en forma de  $\alpha$ -hélice (rosa), láminas  $\beta$  (amarillo) y átomo de  $Zn^{2+}$  en el centro activo (azul) y (C) estructura tridimensional de la proteína (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F6z>).

Al igual que las oxacilinasas, este grupo de enzimas pueden formar parte del cromosoma de las bacterias o bien ubicarse en diferentes elementos móviles. Sin embargo, en el caso de *Acinetobacter*, todas las metalobetalactamasas aisladas se encuentran formando parte de una amplia variedad de integrones, a los que han sido incorporadas como *gen cassettes*. Cuando estos integrones se asocian a plásmidos o transposones, la transferencia entre bacterias se ve altamente facilitada incrementando su transferencia horizontal y dificultando el control de su expansión.

Las principales metalobetalactamasas conocidas son la IMP (“activa frente al imipenem”), VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*), SPM (*Sao Paulo metallo-beta-lactamase*), GIM (*German imipenemase*), SIM (*Seoul imipenemase*), y NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*), aunque se han descrito hasta un total de 9 metalobetalactamasas distintas. Desde su descubrimiento, las enzimas SPM, GIM y SIM, no se han diseminado más allá de sus países de origen, sin embargo, VIM e IMP son de distribución universal. Sólo se han identificado en el género *Acinetobacter* enzimas de la familia IMP, VIM, SIM o NDM, aunque con presencia dispersa; así, enzimas de la clase VIM se ha encontrado en contadas ocasiones en *A. baumannii*, tratándose siempre de VIM-2 y en zonas de Korea del Sur, región en la que las enzimas de la clase VIM se encuentran altamente presentes en *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* [59, 75]. Esto mismo sucede con las enzimas de la clase SIM, apareciendo en aislados de

*A. baumannii* portadores de SIM-1 en Korea del Sur. La más reciente de todas las metalobetalactamasas descritas en *A. baumannii* es la NDM, aislada originariamente en *E. coli* y *K. pneumoniae* [76, 77]. Tanto la NDM-1 como la NDM-2, que se diferencian en un solo aminoácido, se han encontrado en *A. baumannii*. Aunque la India, país en el que se aisló por primera vez la NDM, es considerada el reservorio de esta enzima, su gran capacidad para diseminarse hace posible su aislamiento en cualquier parte del mundo en la actualidad, haciendo de éste un tema de gran preocupación para la comunidad internacional.

Las cepas portadoras de metalobetalactamasas a menudo presentan patrones de multirresistencia complejos debido, en gran medida, al entorno genético en el que se hallan estas enzimas. Los genes de las metalobetalactamasas forman parte de integrones de la clase 1, insertados como *gen cassettes* entre los extremos conservados 5'-CS y 3'-CS y acompañados de otros genes de resistencia a antibióticos. Estos otros genes codifican con frecuencia para enzimas modificadoras de aminoglucósidos o enzimas de resistencia al cloranfenicol. Todos los genes de resistencia incluidos en un integrón se expresan de forma simultánea dotando a la bacteria portadora del mismo de un perfil de multirresistencia [59].

Aunque el aztreonam no se hidroliza por las metalobetalactamasas, no es útil para el tratamiento de estas cepas pues suelen presentar otros mecanismos de resistencia que lo inactivan [75].

#### o Betalactamasas clase A

Al igual que las betalactamasas de las clases C y D, las de la clase A comparten la similitud estructural de presentar un residuo de serina en su centro activo formando parte de los motivos conservados S-X-X-K, S-D-N y K-T-G.

Estas enzimas tienen la propiedad de hidrolizar antibióticos como los carbapenemes, las penicilinas, las cefalosporinas y el aztreonam y de ser inhibidas por inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico o el tazobactam. Dentro de las betalactamasas de la clase A se encuadran enzimas

como la IMI, la GES, la TEM, la SHV o la KPC [74]. Este grupo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la familia *Enterobacteriaceae* pero su presencia en el género *Acinetobacter* es muy limitada. Sin embargo, se ha descrito el hallazgo de alguna de estas enzimas en *A. baumannii*: KPC [78, 79] VEB-1 [80, 81], PER-1 [82, 83], PER-2 [84], TEM-92 [85], CTX-M-2 [86], TEM-1 y TEM-2 [87].

- Mecanismos de resistencia no enzimáticos

Aunque los mecanismos enzimáticos tienen una mayor implicación en el origen de resistencias a los betalactámicos en el género *Acinetobacter*, existen otros mecanismos que contribuyen, de forma decisiva en muchas ocasiones, a estas resistencias.

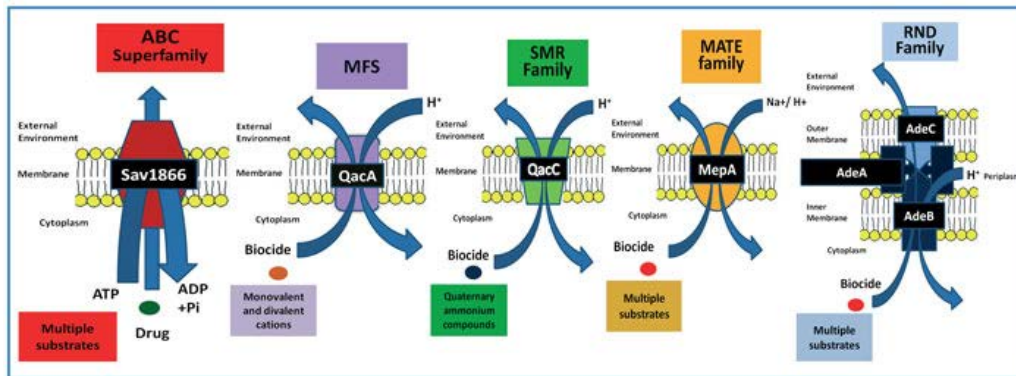
- Bombas de expulsión

Formando parte de la membrana externa de *Acinetobacter* spp. se encuentran una serie de proteínas transportadoras que se expresan de forma constitutiva. Fisiológicamente, estas proteínas están implicadas en la captación de nutrientes esenciales e iones, en la excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas y en los distintos procesos de comunicación intercelular y con el medio. Una característica fundamental de estas proteínas transportadoras es la relativa inespecificidad de sustrato que presentan, siendo capaces de transportar un amplio número de compuestos no relacionados estructuralmente, entre ellos, diversas clases de antimicrobianos [88].

Las bombas de expulsión se clasifican en cinco superfamilias que se diferencian tanto en su estructura como en la fuente de energía que utilizan para expulsar los distintos sustratos, como se muestra en la figura 6. Estas familias son: la ABC (*ATP-binding cassette*) y la MFS (*major facilitator superfamily*) la RND (*resistance-nodulation-cell division*), la MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) y la SMR (*small multidrug resistance*). Los transportadores de la superfamilia ABC son dependientes de la hidrólisis de ATP para expulsar

los distintos compuestos; en cambio, los transportadores de la familia MATE utilizan un gradiente electroquímico generado por  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$ . Por otro lado, las bombas pertenecientes a la superfamilia MFS y a las familias RND y SMR utilizan la fuerza protón-motriz para ejercer su función. De todas estas proteínas, las de mayor implicación en la multiresistencia de *A. baumannii* son aquellas que utilizan la fuerza protón motriz como fuente de energía [89, 90].

Se han identificado en *A. baumannii* tres bombas pertenecientes a la familia MFS; los sistemas Tet(A) y Tet(B), que otorgan resistencia a la tetraciclina y a la minociclina respectivamente, y el sistema CmlA, implicado en la resistencia al cloranfenicol. Un aspecto importante a considerar es el ambiente genético en el que se encuentran codificadas estas proteínas, bien formando parte de transposones, como es el caso del gen *tet(A)*, o dentro de islas genómicas, como sucede con el gen *cmlA*, lo cual se relaciona con una alta probabilidad de diseminación horizontal. Las bombas de esta familia consisten en sistemas compuestos por una sola proteína de membrana que actúan a través de mecanismos de simporte, antiporte o uniporte [89].



**Figura 6.** Mecanismo de acción de las principales familias de bombas de expulsión encontradas en el género *Acinetobacter*. Fuente: Microbiology Australia. No v.2010 Pumping out biocides cause for concern?

La mayoría de las bombas de expulsión de antimicrobianos presentes en los bacilos Gram negativos sin embargo, pertenecen a la familia RND. Estas bombas están formadas por tres componentes: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína accesoria periplasmática o proteína de fusión de

membrana y una proteína de membrana externa o porina. Los genes que codifican a los distintos componentes de estas bombas de expulsión se encuentran en el cromosoma bacteriano, generalmente en forma de operones. La importancia de estas bombas de expulsión radica en que poseen un amplio rango de sustratos, por lo que son capaces de contribuir a la resistencia de una gran cantidad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente, y por ello, se clasifican como sistemas multidrogas inespecíficos.

En el año 2001 se identificó en una cepa multirresistente de *A. baumannii* una bomba de expulsión perteneciente a esta familia denominada AdeABC [91]. En los últimos años se ha asociado esta bomba a la resistencia frente a varias clases de antimicrobianos, entre los que se encuentran la tetraciclina, la eritromicina, el cloranfenicol, la cefotaxima, la gentamicina, la kanamicina y la tigeciclina. También se ha descrito la implicación de esta bomba en la disminución de la susceptibilidad a los carbapenemes. Esto sucede como resultado de mutaciones puntuales que se traducen en la sobreexpresión de la misma. Del mismo modo, se ha demostrado la implicación directa de esta bomba con la resistencia al meropenem [92-94]. Dentro de la misma superfamilia RND está la bomba AdeIJK que, a diferencia de la AdeABC, que se encuentra solo en cepas multirresistentes de *A. baumannii*, aparece también en cepas sensibles, por lo que contribuye a la resistencia intrínseca de esta bacteria frente a diversos antimicrobianos como los betalactámicos, el cloranfenicol, la tetraciclina, la eritromicina y, en menor medida, a las fluoroquinolonas [95].

#### o Alteración de las proteínas de membrana

Las porinas son proteínas con forma de canal ubicadas en las membranas lipídicas que permiten el transporte de moléculas a través de las mismas. Estas pueden actuar como dianas potenciales para la adhesión de otras células o la unión de compuestos antibacterianos a la superficie de las bacterias Gram negativas. Tanto la variación en su estructura como la regulación de la expresión de las mismas en respuesta a la presencia de antibióticos son mecanismos de supervivencia que han desarrollado las bacterias para hacer frente a distintos

compuestos como los antibióticos, jugando un papel importante en los mecanismos de resistencia.

Las bacterias del género *Acinetobacter* presentan un número reducido de porinas en comparación con otros bacilos Gram negativos. Estas son, además, de pequeño tamaño, lo que explica la reducida permeabilidad de su membrana externa y su contribución a los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. La principal porina descrita en *A. baumannii* es la HMP-AB que pertenece a la familia de la OmpA, implicada en la inducción de la apoptosis y la formación de biopelículas [96]. Además, se han caracterizado otras tres porinas relacionadas con la resistencia a imipenem, disminuyendo su expresión o llegando en ocasiones a no expresarse en las cepas de *A. baumannii* resistentes al imipenem. Estas son una proteína Omp de 33-36 kDa, una de 29 kDa, denominada CarO y una última de 43 kDa, similar a la OprD de *P. aeruginosa*. [97, 98].

### ➤ Papel de las secuencias de inserción en la expresión de la resistencia a carbapenemes en *Acinetobacter*.

Una vez conocidos los principales determinantes de resistencia a los carbapenemes en *Acinetobacter* es preciso analizar también los mecanismos genéticos que regulan su expresión. El fenotipo final que manifieste cada cepa va a depender, en gran medida, de estos moduladores de la expresión. Así, los distintos genes de resistencia actuarán de un modo u otro dependiendo de factores tales como la adquisición de elementos móviles (plásmidos, transposones o integrones), la activación o inactivación de genes por secuencias de inserción (IS) o las posibles mutaciones que alteren la expresión normal de porinas y/o bombas de eflujo.

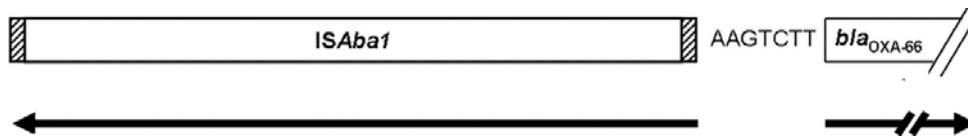
Los integrones median con frecuencia la adquisición y diseminación de genes de resistencia antibiótica en las bacterias Gram negativas. Estos integrones contienen determinantes genéticos para la recombinación específica de sitio y promotores que conducen a la expresión de *gene cassettes*. La integrasa (*intI*)

presente en ellos facilita la adquisición sitio-específica y la escisión de genes del integrón. Estos genes a menudo están implicados en la resistencia a antibiótica, aunque también pueden dotar a la bacteria de otras funciones metabólicas. Se han descrito cinco clases de integrones basándose en la secuencia de los genes de la integrasa *intI1* siendo el de la clase 1 es el más prevalente en *A. baumannii* [99]. Esta clase de integrones se caracterizan por presentar dos regiones conservadas la 5'-CS, que incluye el gen de la integrasa (*intI1*), el sitio de recombinación adyacente (*attI1*) y el promotor (Pc), y la región 3'-CS, con el gen *qacEΔ1* implicado en la resistencia a los compuestos de amonio cuaternario, el gen *sulI* de resistencia a las sulfonamidas y el *orf5*. La gran capacidad de los integrones para diseminarse se debe a que tan sólo portan genes codificantes de funciones para la integración y escisión. Además, los integrones de la clase 1 se encuentran con frecuencia formando parte de plásmidos, transposones y secuencias de inserción lo que facilita aún más su diseminación [100].

Las secuencias de inserción son elementos capaces de transponerse independientemente del genoma y han evolucionado como mecanismos de regulación de la expresión de genes. La trasposición de una secuencia de inserción puede conducir a la interrupción de un gen causando su inactivación o, por el contrario, originar una señal de activación que conduce a la sobreexpresión del gen adyacente al dotar a la secuencia de un promotor fuerte cuando se encuentra orientado a riba del gen. La activación o inactivación de estos elementos de inserción depende de mecanismos complejos de represión-inhibición bajo condiciones de estrés y juegan un importante papel en la regulación de la expresión de los genes [101].

Se conocen numerosas secuencias de inserción asociadas a mecanismos de resistencia en *Acinetobacter*. Dentro de ellos, el elemento IS*Aba1* es uno de los más diseminados y se ha encontrado asociado a diferentes genes de resistencia a los carbapenemes como el *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, y la cefalosporinasa AmpC. En todos estos casos el fragmento IS*Aba1* parece originar un promotor fuerte que conduce a la sobreexpresión de los genes de resistencia [102]. En el caso concreto del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> la localización del fragmento de inserción IS*Aba1* a

tan solo 7 pares de bases del promotor corriente arriba es suficiente para convertir una cepa sensible a los carbapenemes, no portadora de otro mecanismo enzimático de resistencia, en resistente (figura 7). En aislados portadores tanto del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> como del *bla*<sub>OXA-51-like</sub> el fragmento de inserción IS*Aba1* se encuentra asociado al primero y no al *bla*<sub>OXA-51-like</sub> lo que sugiere que la coexpresión de estos dos genes no tiene lugar. Sin embargo, con frecuencia se encuentran aislados portadores de más de una copia de la secuencia IS*Aba1* [63]. El fragmento de inserción IS*Aba1* también participa en la modulación de la movilidad de los genes tipo OXA.



**Figura 7.** Secuencia de inserción IS*Aba1* precediendo el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. La imagen muestra la distancia de 7 pb existente entre IS*Aba1* y el inicio del gen.

En el caso del gen *bla*<sub>OXA-58</sub> la asociación tiene lugar con el fragmento de inserción IS*Aba3*, lo que media la resistencia a algunas penicilinas como la amoxicilina y la ticarcilina, pero no a los carbapenemes. Esto último sucede cuando el gen *bla*<sub>OXA-58</sub> está precedido por un promotor fuerte formado por otras secuencias de inserción además del elemento IS*Aba3* como parte de un transposón compuesto [103] [67]. En algunos casos se ha observado la interrupción del fragmento IS*Aba3* por una secuencia de inserción IS1006. Esto genera un promotor híbrido con la secuencia IS1006 localizada en -35 y el IS*Aba3* en -10. En otros, el fragmento de inserción IS*Aba3* está interrumpido por una secuencia IS1008 originando dos promotores independientes para la transcripción y el control de la expresión del gen *bla*<sub>OXA-58</sub> [104]. El elemento IS*Aba3* también se ha encontrado corriente abajo del *bla*<sub>OXA-58-like</sub>.

Otros elementos como el IS*Aba825* ligado a los genes *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y *carO* [101, 105], el IS*Aba16* junto con el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> [106] o el IS*Aba125* asociado *bla*<sub>OXA-58</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> [107, 108] se han encontrado también en *A. baumannii* participando en la regulación de su expresión.

Se ha visto que varios de estos factores pueden darse simultáneamente y alterar la expresión de proteínas de membrana externa (CarO y OmpK 36 y 37) en *A. baumannii*. Así pues, la movilización de genes por medio de los elementos IS sirve como mecanismo regulador bacteriano en condiciones de estrés. Además, esta capacidad para modular la expresión de los genes de resistencia contribuye en gran medida a la patogenicidad bacteriana.

### ➤ Técnicas de tipado

La mayoría de los aislados clínicos responsables de brotes hospitalarios en todo el mundo se han agrupado en un reducido número de linajes epidémicos. Dos de estos, conocidos como linaje clonal internacional I y II, se identificaron por primera vez en el noroeste de Europa a principios de los años 80 y, posteriormente, en todo el mundo. Por su parte, el tercer grupo clonal (clon internacional III) apareció posteriormente en Francia, Holanda, Italia y España [109].

Con el objetivo de determinar la epidemiología de *A. baumannii*, tanto local como a escala global, se han ido desarrollando a lo largo de los años diferentes métodos de tipado como el ribotipado, el RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA analysis*) o el AFLP (*amplified fragment length polymorphism analysis*), entre otros [110]. De todos ellos, el análisis de fragmentos de macrorrestricción mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) y el *multilocus sequence typing* (MLST), son considerados actualmente los métodos de elección para tipado epidemiológico y estudios de poblaciones genéticas de *A. baumannii* [15].

La técnica de PFGE se basa en la comparación entre sí de los patrones discretos de bandas generados para cada aislado tras la digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción [110].

El MLST consiste en la secuenciación y análisis de diferentes genes *housekeeping* de modo que a cada uno de estos genes se le asigna un alelo. De

este modo cada aislado se define por los alelos de cada uno de los genes que son analizados. Estos genes *housekeeping* se seleccionan por codificar proteínas que desempeñan una función vital y, por lo tanto, por estar presentes en todos los aislados de la misma especie [15].

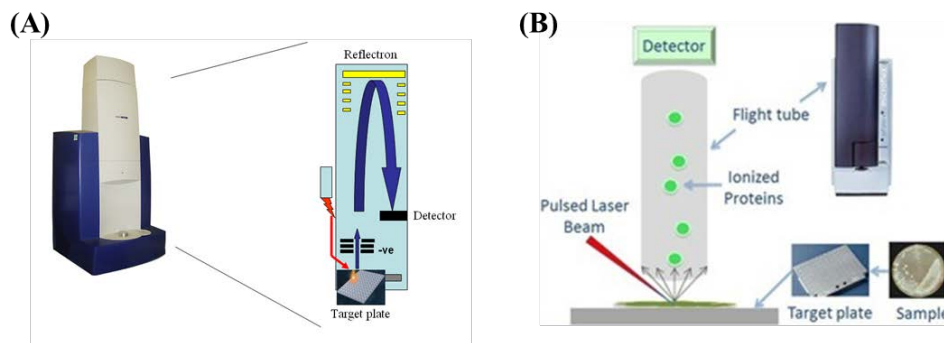
Aunque estas técnicas han sido ampliamente utilizadas, presentan ciertas limitaciones como su laboriosidad, la dificultad para extrapolar y comparar resultados entre diferentes laboratorios en el caso de PFGE, o las discrepancias con respecto a los genes que utilizan distintos autores en el caso del MLST. Actualmente se están empezando a utilizar nuevas técnicas como el análisis MLVA (*multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis*) que consiste en analizar diferencias en el polimorfismo de los motivos de ADN que aparecen en el genoma de cada microorganismo de forma repetitiva (VNTRs; *variable-number tandem repeats*) [109, 111]. En cada ensayo de MLVA se analizan un número determinado de VNTRs al que se le asigna un código en función del número de repeticiones de cada locus para cada cepa. Esta nueva técnica es a su vez coste-efectiva y permite incluir los resultados en una base de datos y compararlos entre distintos laboratorios.

## ➤ MALDI-TOF MS

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight*) se ha utilizado durante años en el campo de la química pero no ha sido hasta mediados de los años 70 cuando se empezaron a estudiar sus posibles aplicaciones en la microbiología. Los primeros estudios surgieron al observar el diferente espectro proteico que se originaba para cada género, y también especie, partiendo de un extracto bacteriano [112].

Esta técnica se basa en la determinación de los analitos cocrystalizados con una matriz apropiada que, tras la acción de un láser UV, son convertidos en iones de distintos tamaños. Estos iones atraviesan un acelerador y vuelan a través de un tubo separándose en función de su relación masa-carga. Cuando los iones alcanzan el final del tubo llegan a un detector de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-*

*Flight*) que se utiliza para calcular la masa de los iones. Con estos datos se crea un espectro que incluye no sólo la masa ( $m$ ) y carga ( $z$ ) de cada ion, sino también el número de iones de cada tamaño [113]. La figura 8 muestra los distintos componentes de un espectrómetro de masas MALDI-TOF y el funcionamiento de la técnica.



**Figura 8.** (A) Diferentes partes de las que consta un espectrómetro de masas Microflex (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) ([whri.qmul.ac.uk](http://whri.qmul.ac.uk)). (B). Flujo de trabajo en espectrometría de masas MALDI-TOF. Detalle de los pasos seguidos desde el crecimiento de los microorganismos en medio de cultivo hasta la preparación de la muestra en la placa de lectura y el posterior proceso de ionización que tiene lugar en el tubo de vuelo hasta su llegada al detector ([www.accugenix.com](http://www.accugenix.com)).

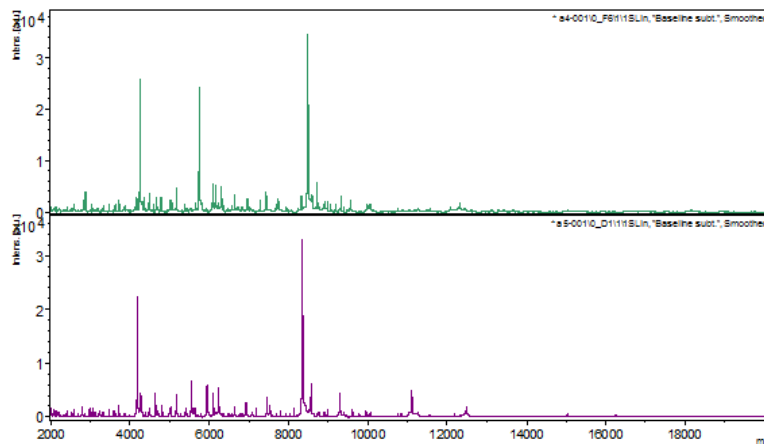
Entre las aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el campo de la microbiología destacan tres:

- Identificación de microorganismos

La espectrometría de masas MALDI-TOF permite la identificación de microorganismos a nivel de género y especie mediante la determinación de las proteínas ribosomales presentes en cada uno de ellos. Este espectro proteico contiene diferentes picos que oscilan entre los 0 y los 20 KDa y es único para cada microorganismo. La comparación de cada espectro con todos los incluidos en la base de datos permite la identificación a nivel de género y especie (figura 9). Cada identificación se acompaña de un valor de *score* que varía de 0 a 3 según la fiabilidad del resultado obtenido.

Esta técnica es la que se encuentra más ampliamente desarrollada en la actualidad utilizándose de forma rutinaria en un número creciente de centros

diagnósticos por permitir la identificación tanto de microorganismos Gram positivos, como de *Enterobacteriaceae*, bacterias no fermentadoras, micobacterias, anaerobios y levaduras [114-117]. Sin embargo, los resultados obtenidos con cada grupo varían bastante, dependiendo en gran medida del número de perfiles incluidos en la base de datos para cada especie. Las mayores limitaciones se encuentran en el grupo de los bacilos Gram negativos no fermentadores, entre ellos *Acinetobacter* [118], y *Streptococcus* grupo viridans [119], de los que no existen aún un número elevado de estudios.



**Figura 9.** El espectro proteico del aislado A4 de *Acinetobacter baumannii* (superior) y otro de *A. genomospecies 14BJ* (A5, inferior) obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

- Determinación de resistencias a los betalactámicos

La necesidad de una rápida determinación de los microorganismos resistentes a los antibióticos y la falta de técnicas sencillas para este fin han hecho que los últimos estudios en el campo de la espectrometría de masas en microbiología se enfoquen en esta dirección.

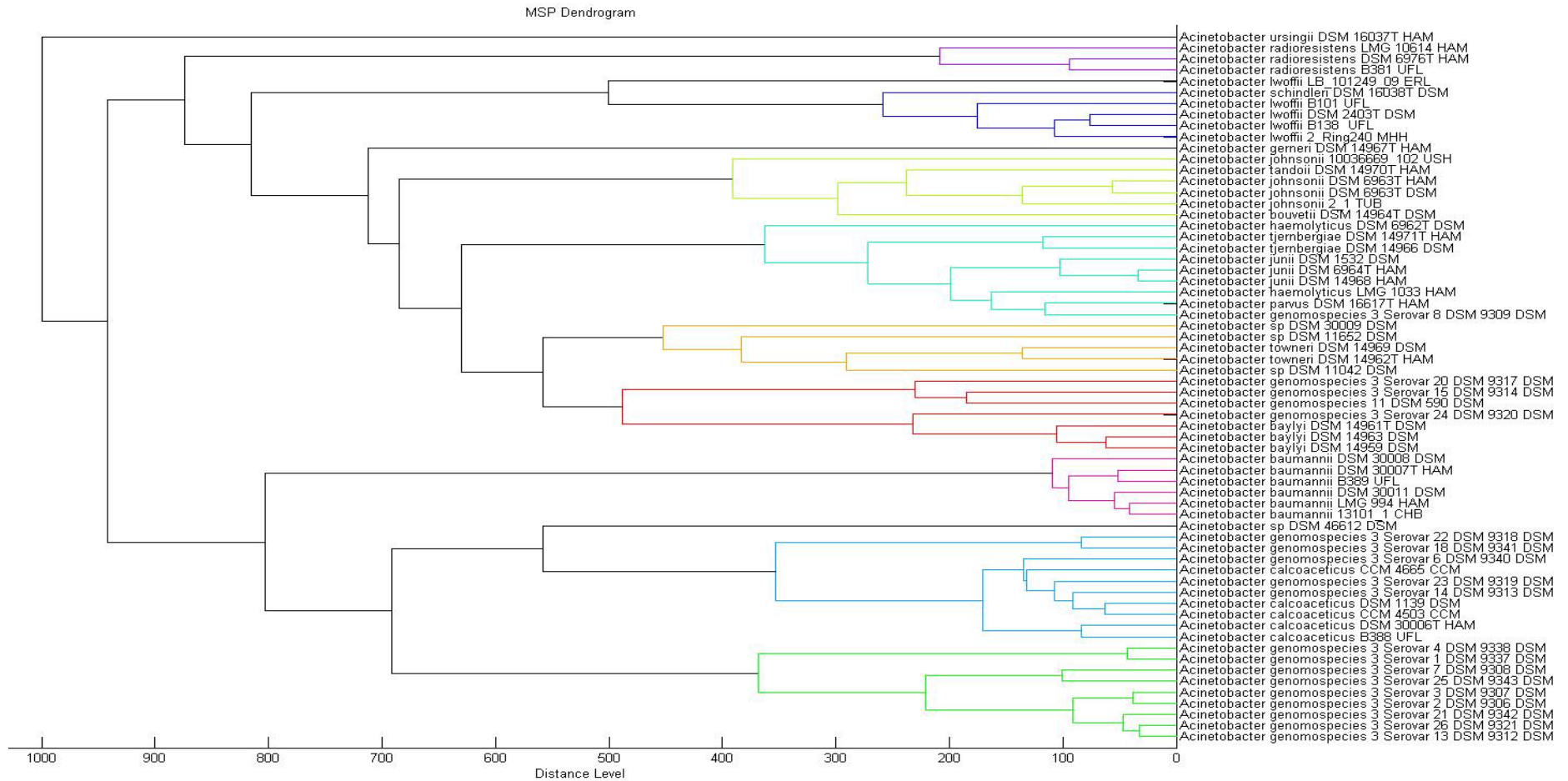
La identificación de microorganismos resistentes a los betalactámicos se basa en la monitorización de la actividad betalactamasas mediante la detección del compuesto estudiado y la posterior aparición de sus productos de degradación [120]. Los primeros compuestos ensayados en este contexto fueron los betalactámicos más sencillos, como la ampicilina y la penicilina, en las enterobacterias con los que se obtuvieron buenos resultados, aunque con una

aplicación algo limitada [121]. Tras estos estudios previos, los últimos se centran en el análisis de mayor número de antibióticos, entre ellos los carbapenemes [122] y tratan además de ampliar el espectro de microorganismos analizados a los bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* [123, 124].

Aunque los resultados son prometedores esta aplicación todavía se encuentra en fase de desarrollo. El número de variables que influyen en el resultado, como la estabilidad de las moléculas y los distintos solventes utilizados, la aparición de aductos y distintos productos de degradación tras la hidrólisis del anillo betalactámico, los distintos tiempos de incubación requeridos para la degradación de cada antibiótico, el calibrador y los picos debidos a la matriz, dificultan su reproducibilidad y estandarización [123].

- Estudios de clonalidad

El correcto manejo de los brotes originados por distintos microorganismos requiere del tipado de las cepas implicadas en el mismo con objeto de determinar su relación epidemiológica. Las técnicas de las que se disponen hoy en día, aunque útiles, resultan excesivamente laboriosas. En este sentido, la rapidez con la que la espectrometría de masas es capaz de analizar los aislados bacterianos se presenta como una herramienta interesante en este campo. La aplicación de la espectrometría de masas a los estudios de tipado se basa en el uso de un algoritmo que determina la relación existente entre determinaciones individuales del espectro de cada aislado. Los distintos espectros obtenidos se representan en forma de dendrograma o árbol donde la distancia existente entre los distintos brazos está directamente relacionada con la similitud entre los espectros y, por tanto, con la similitud entre los aislados (figura 10) [116]. Sin embargo, esta aplicación se encuentra aún en fase de desarrollo y existen pocos estudios hasta la fecha. Algunos de ellos incluyen el tipado de distintas especies de *Listeria* [125], la diferenciación de aislados de *S. pneumoniae* implicados en un brote de conjuntivitis [126], identificación de *E. faecium vanB* [127] o la caracterización y discriminación de cepas ambientales de *E. coli* altamente relacionadas [128].



**Figura 10.** Dendrograma que muestra la distancia genética existente entre todas las especies de *Acinetobacter* incluidas en la base de datos del espectrómetro de masas Microflex (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) FlexControl 3.0 con el que se desarrolló este trabajo.

## OBJETIVOS

---

---



### III. Objetivos

El estudio detallado de *Acinetobacter* spp resulta de gran importancia en el ambiente hospitalario tanto por el importante potencial patógeno de este microorganismo como por sus implicaciones epidemiológicas. *Acinetobacter* es capaz de persistir en el ambiente largos periodos de tiempo suponiendo una amenaza constante para los pacientes más susceptibles y está con frecuencia implicado en brotes difíciles de manejar que obligan a tomar medidas estrictas para su erradicación, incluyendo el cierre completo de unidades de hospitalización. Además, el elevado número de mecanismos de resistencia que presenta, tanto intrínsecos como adquiridos, complica en gran medida el manejo de las infecciones causadas por este microorganismo.

Por todo ello al inicio del estudio nos planteamos una serie de objetivos que se detallan a continuación:

1. Determinar la importancia nosocomial de *Acinetobacter* spp en el HCSC e identificar las patologías infecciosas más frecuentes causadas por este agente definiendo las principales características epidemiológicas que presentan los pacientes con aislados de *Acinetobacter* spp.
2. Caracterizar las especies predominantes de *Acinetobacter* en el HCSC y determinar la relevancia clínica de aquellas especies distintas de *A. baumannii*.
3. Evaluar las distintas técnicas existentes para la identificación de las especies de *Acinetobacter* y valorar la utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF para este fin.
4. Establecer el perfil de sensibilidad de los aislados de *Acinetobacter* spp del HCSC a los antimicrobianos más útiles para su tratamiento atendiendo principalmente a los carbapenemes

## Objetivos

5. Identificar y caracterizar molecularmente las enzimas responsables de la resistencia a los carbapenemes.
6. Conocer los clones de *Acinetobacter* spp predominantes en nuestro entorno y estudiar su evolución en un periodo de tres años.
7. Estudiar la aplicabilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección de enzimas de resistencia a los carbapenemes desarrollando un protocolo estandarizado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## IV. Materiales y métodos

### ➤ Aislados clínicos

En el estudio se incluyeron un total de 130 aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. Todos ellos se recogieron a lo largo de los años 2008-2010 en el servicio de microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Allí se identificaron como microorganismos pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* mediante pruebas bioquímicas Vitek-2 (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia) o Wider (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España) y se determinó también su sensibilidad a diferentes antimicrobianos por medio de los sistemas citados anteriormente.

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes con objeto de obtener cualquier información clínica relevante; patología de base, motivo del ingreso hospitalario en el cual se produce la infección por *Acinetobacter* spp., tiempo de ingreso hospitalario y servicio en el que ingresa, muestra clínica en la que se aísla el microorganismo en estudio, tratamiento antimicrobiano recibido y duración del mismo.

Se recogieron así mismo datos demográficos de los pacientes de los que procedían las muestras.

### ➤ Extracción de ácidos nucleicos y cálculo de la concentración de ADN.

Como punto de partida para todos los estudios moleculares que se realizaron con posterioridad se extrajo el material genético de los 130 aislados analizados. Este procedimiento se realizó en un extractor automático NucliSENSeasyMAG (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia) que emplea un

sistema basado en la tecnología de extracción con sílice magnética (también denominada tecnología BOOM).

La extracción de los ácidos nucleicos de los aislados se llevó a cabo a partir de 500 µl de una suspensión bacteriana en suero salino, ajustada a turbidez 3 en la escala de McFarland, que se preparó partiendo de un pase fresco de cada microorganismo en placas de agar sangre. En todas las muestras el volumen de elución fue 25µl.

Tras la extracción de los ácidos nucleicos se determinó la concentración y pureza del ADN en un Nanodrop a 260 nm (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). En todos los casos los valores de ADN fueron superiores a 25 ng. Los cálculos de la concentración de ADN se realizaron teniendo en cuenta que 1.0 unidad de  $A_{260nm}$  de ADN de doble cadena equivale a una concentración de 50 µg/ml.

### ➤ Técnicas de identificación

Todos los aislados de *Acinetobacter* seleccionados para el estudio se identificaron utilizando diferentes sistemas de los que dispone el servicio de microbiología del HCSC. Inicialmente, y para su inclusión en este trabajo, se utilizaron las técnicas de identificación convencionales para, posteriormente, determinar la especie concreta mediante pruebas moleculares.

- Técnicas convencionales: batería de pruebas bioquímicas de identificación

La identificación inicial de los microorganismos se realizó de forma rutinaria mediante técnicas de identificación semiautomatizadas. Según el origen de las muestras se utilizó un sistema u otro de los dos que se detallan a continuación.

- Sistema de identificación WIDER

La identificación de microorganismos mediante esta técnica se realiza por medio de paneles comerciales de pruebas bioquímicas. En el caso de *Acinetobacter* spp. se utilizan los paneles “MIC/ID Gram negativos Rev2”.

El procedimiento se realiza según las instrucciones del fabricante (Francisco Soria Melguizo, España). Para ello se inocula una suspensión de cada microorganismo equivalente a 0.5 McFarland en cada uno de los pocillos del panel. Posteriormente se incubaba a 37°C durante al menos 16 horas. En este tiempo, diferentes reacciones bioquímicas tienen lugar en cada ensayo lo que produce alteraciones en el pH. Esto genera un perfil específico para cada microorganismo que se identifica a continuación mediante lectura automática.

- Sistema de identificación Vitek 2

La identificación de microorganismos por el sistema Vitek 2 (BioMerieux, Marcy L’Etoile, Francia) se basa en la realización de diferentes pruebas bioquímicas.

El procedimiento se lleva a cabo a partir de una suspensión bacteriana equivalente a 0.5 McFarland en solución salina, como indica el fabricante (BioMerieux, Marcy L’Etoile, Francia). Para la identificación de microorganismos del género *Acinetobacter* spp. se emplearon tarjetas de identificación de Gram negativos (GN).

- Técnicas de identificación moleculares basadas en el ADN

- Determinación de la presencia de *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

La determinación de la presencia del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> (intrínseco a la especie *A. baumannii*) se llevó a cabo mediante PCR convencional empleando las parejas de cebadores OXA-51U y OXA-51L y OXA-51A y OXA-51B descritos por Ruíz *et al* y Coelho *et al* respectivamente (tabla 1) empleando las condiciones recogidas por Culebras *et al* [129]. Como ADN molde se utilizó una cantidad

variable de los extraídos dependiendo de las características del microorganismo analizado. Ésta no fue en ningún caso inferior a 200 ng ni superior a 400 ng.

La posterior visualización de los productos resultantes de la PCR se realizó mediante gels de agarosa al 1 % incluyendo marcadores de peso molecular Dominon mbl ladder 100pb como referencia.

#### ○ Amplificación y secuenciación del gen *rpoB*

La amplificación de la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa se realizó mediante PCR ensayando diferentes concentraciones de ADN (100ng, 200ng y 400ng) para cada uno de los aislados incluidos en el estudio. Se utilizaron los cebadores Ac969F y Ac1598R descritos por La Scola *et al* (tabla 1) [130], así como sus mismas condiciones de amplificación, pero introduciendo una modificación en la temperatura de anillamiento que se cambió de 48°C a 58°C.

Los amplificados se cargaron en gels de agarosa al 1% junto con marcadores de peso molecular conocidos (Dominon mbl ladder 100pb) y se visualizaron bajo luz UV.

Los productos de PCR se purificaron a continuación utilizando el *kit* de Qiagen PCR product purification (QIAGEN, Hilden, Germany). Para la secuenciación del gen *rpoB* se utilizó la mezcla BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems, California) y los mismos cebadores Ac969F y Ac1598R empleados en la amplificación a una concentración de 3.2 mM. Como ADN molde se añadieron 250 ng del producto purificado de la PCR. La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM BIG DYE system automático (Perkin-Elmer). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa informático Sequence Scanner y se identificaron mediante comparación con las secuencias incluidas en la base de datos de PubMed empleando la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Técnicas de identificación moleculares basadas en el perfil proteico: Espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight*)

La espectrometría de masas MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization*, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) es una técnica que permite identificar distintos analitos en función de sus propiedades de masa-carga. Para ello, los analitos co-cristalizados con una matriz apropiada se convierten en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico. Su aplicación en la microbiología clínica radica en la capacidad de esta técnica para identificar microorganismos según su espectro de proteínas ribosomales mediante comparación con los espectros incluidos en su base de datos.

En nuestro estudio todas las muestras se prepararon por el método de extracción en etanol y agua (2:1) recomendado por el fabricante, previamente a la determinación del espectro. Para ello se trabajó siempre a partir de colonia aislada y crecida en medio de cultivo agar sangre tras 24 horas de incubación a 37°C. Sin embargo, se introdujo una pequeña modificación en este protocolo que consistió en preparar una suspensión inicial de bacterias en agua, equivalente a 3 unidades en la escala de McFarland, a la que posteriormente se añadió el doble de volumen de etanol al 100%. A continuación, se centrifugó a velocidad máxima (14000rpm) durante 2 minutos y se utilizó el *pellet* originado para continuar con el protocolo de extracción con ácido fórmico al 70% y acetonitrilo en proporción 1:1.

Para la determinación final del espectro se utilizó 1 µl del sobrenadante obtenido en el último paso de la extracción que se cubrió con 1 µl de matriz (solución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinnámico en 50% acetonitrilo/2,5% ácido trifluoroacético).

**Tabla 1.** Relación de cebadores y condiciones empleadas para la amplificación de los genes del estudio.

Gen	Cebador	Tamaño del amplicón	T <sup>a</sup> anillamiento	Referencia
<i>bla<sub>OXA-51-like</sub></i>	U 5'-AACAAAGCGCTATTTTTATTTCAG-3'	641 pb	58°C	Ruíz <i>et al</i> , 2007 [131]
	L 5'-CCCATCCCCAACCACTTTT-3'			
	A 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	353 pb	58°C	Coelho <i>et al</i> , 2006 [132]
	B 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'			
<i>rpoB</i>	Ac969F 5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAA-3'	~800 pb	58°C	La Scola <i>et al</i> , 2006 [130]
	Ac1598R 5'-GGBGCRTGCATYTTGTCRT-3'			
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	A 5'-ATGAAATTATTAATAAATATTGAGTTTAGTTTGC-3'	843 pb	58°C	Coelho <i>et al</i> , 2006 [132]
	B 5'-TTATAAATAATGAAAAACACCCAACCTTATC-3'			
<i>bla<sub>OXA-23-like</sub></i>	A 5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3'	1062 pb	52°C	Afzal-Shah <i>et al</i> , 2001 [133]
	B 5'-TCACAACAATAAAAGCACTG-3'			
<i>bla<sub>OXA-24-like</sub></i>	A 5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3'	1023 pb	52°C	Afzal-Shah <i>et al</i> , 2001 [133]
	B 5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT-3'			
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	F 5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3'	1012 pb	58°C	Yigit <i>et al</i> 2005 [134]
	R 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'			
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	A 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	587 pb	52°C	Lee <i>et al</i> , 2008 [135]
	B 5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'			
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	A 5'-ATGGTGTTTCCTCGCATATC-3'	510 pb	52°C	Lee <i>et al</i> , 2008 [135]
	B 5'-TGGGCCATTCAGCCAGATC-3'			
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM1 5'-CTCTGTCACATCGAAATCGC-3'	884 pb	63°C	Kumarasamy <i>et al</i> , 2010 [136]
	NDM2 5'-CACCTCATGTTTGAATTCGCC-3'			
<i>bla<sub>SIM</sub></i>	F 5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	570 pb	56°C	Lee <i>et al</i> , 2005 [137]
	R 5'-ATATGGCCTGTTCCCATGTG-3'			

Las medidas se realizaron en un espectrómetro de masas Microflex instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) operando en modo lineal positivo y utilizando el software FlexControl 3.0 para el análisis de los resultados. Todos los espectros se analizaron en el rango 1000-20000 m/z y para cada muestra se realizaron 240 disparos. Los criterios de interpretación de los resultados se especifican en la tabla 2.

**Tabla 2.** Interpretación de los valores de *score* obtenidos en la identificación de cada microorganismo mediante MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, Bremen, Germany).

Valor de Score	Significado
0.000-1.699	Identificación no fiable
1.700-1.999	Identificación probable en el género
2.000-2.299	Identificación de género segura, probable de especie
2.300-3.000	Identificación con alta probabilidad en el género y especie

## ➤ Estudios de sensibilidad a antimicrobianos

### • Método de dilución en agar

Para determinar la sensibilidad de cada aislado a diferentes antimicrobianos se realizaron ensayos de dilución en agar según el protocolo descrito por el CLSI [138].

Se incluyeron en el estudio un total de 13 antimicrobianos pertenecientes a los diferentes grupos terapéuticos con interés clínico en el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter* spp. (antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, glicilglicinas, quinolonas, inhibidores de la ARN polimerasa y polimixinas), así como un inhibidor de betalactamasas y dos combinaciones de antibiótico betalactámico más inhibidor de betalactamasas. Los antibióticos estudiados se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Lista de antibióticos incluidos en el estudio

<b>Antibióticos</b>	
Imipenem	Amikacina
Meropenem	Gentamicina
Cefotaxima	Minociclina
Ceftazidima	Doxiciclina
Cefepime	Tigeciclina
Sulbactam	Levofloxacino
Ampicilina/Sulbactam	Rifampicina
Piperazilina/Tazobactam	Colistina

Para llevar a cabo esta determinación se prepararon placas de medio de cultivo Mueller-Hinton agar con concentraciones crecientes de cada uno de los antibióticos a ensayar (0,12 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml y 512 µg/ml). El inóculo bacteriano se preparó a partir de una dilución 1:10 de una suspensión de microorganismo de 0,5 de turbidez en la escala de McFarland en suero salino. Las placas se inocularon con ayuda de un replicador de Steers que posibilita la siembra simultánea de hasta 36 microorganismos por placa. Este sistema deposita 1 µl de cada uno de los microorganismos analizados lo que permite conseguir un inóculo final de aproximadamente  $10^4$  UFC. En todos los ensayos se incluyeron placas sin antibiótico al principio y al final de cada serie. Se incluyeron también como controles internos del ensayo tres cepas ATCC con CMI conocidas para cada antibiótico analizado (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* 27853).

Pasadas 24 horas de incubación a 37°C se realizó la lectura de la CMI. El valor de la CMI corresponde a la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano.

Para la clasificación de los aislados como sensibles o resistentes a los distintos antibióticos se utilizaron los criterios del CLSI del año 2010 y los del EUCAST 2013.

- Método de Epsilon-test

El Epsilon-test (AB Biodisk, Suecia) se empleó para determinar la CMI de los 130 aislados analizados a los cuatro carbapenemes disponibles en el mercado (imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem).

Se realizó una suspensión bacteriana de 0,5 unidades en la escala de turbidez de McFarland en suero salino que se sembró formando un césped uniforme en placas de Mueller-Hinton agar. Posteriormente se colocó una tira de celulosa que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones (0.002-32 µg/ml) y se incubó cada placa 18-24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la CMI considerando la CMI el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test.

- Método de microdilución en caldo

La determinación de la CMI al doripenem, imipenem y meropenem se realizó por el método de dilución en caldo descrito por el CLSI [138].

Para ello se prepararon 11 concentraciones crecientes de cada uno de los antibióticos a ensayar y se dispensaron en placas microtiter de fondo en U (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml y 512 µg/ml). Las suspensiones bacterianas (0.5 McFarland) preparadas en medio Mueller-Hinton caldo se añadieron en proporción 1:1 en las filas correspondientes de la placa microtiter para conseguir una concentración de  $0.5 \times 10^8$  UFC/ml en cada pocillo. En cada determinación se incluyó además un control de crecimiento de cada aislado.

La lectura de la CMI se realizó tras 18-24 horas de incubación de las placas a 37°C.

El valor de la CMI se consideró el correspondiente a la concentración de antibiótico del primer pocillo en el que el crecimiento bacteriano era claramente menor que el del pocillo control.

## ➤ Pruebas fenotípicas para determinación de carbapenemasas

### • Test de Hodge

La determinación fenotípica de carbapenemasas se realizó mediante el test de Hodge modificado [139]. Para ello se inoculó una placa de Mueller-Hinton agar con una suspensión en suero salino de la cepa *E. coli* ATCC 25922 con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland diluida al 1:10. A continuación se colocó un disco de imipenem (10 µg) en el centro de la placa y se sembraron 4 aislados problema diferentes formando con cada una de ellos una estría radial desde 2-3 mm del disco con imipenem hacia el borde de la placa. Estas placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Entre los 130 aislados estudiados se incluyó una *K. pneumoniae* de la colección de HCSC portadora de una metalobetalactamasa VIM como control positivo del ensayo.

Todos los ensayos del test de Hodge se realizaron además incluyendo discos de imipenem suplementados con 10 µl de ZnSO<sub>4</sub> a una concentración de 50 mM y discos de imipenem suplementados con 10 µl de EDTA 0,5 M [140]. El procedimiento que se llevó a cabo en ambos casos fue el descrito con anterioridad.

Posteriormente se repitió este estudio utilizando una suspensión de *M. luteus* en suero salino con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland que se sembró directamente en placas de Mueller-Hinton. El resto del protocolo fue similar al descrito anteriormente salvo los tiempos de incubación que, en este caso, fueron de 48 horas.

- Test de sinergia de doble disco

El test de sinergia de doble disco tiene por objeto la detección de cepas portadoras de metalobetalactamasas.

Este estudio se realizó en todos los aislados con resultado positivo para el test de Hodge. Para ello se preparó una suspensión bacteriana de 0.5 McFarland en suero salino y, a continuación, se sembró en placas de agar McConkey formando un césped homogéneo. En cada placa se realizaron tres ensayos diferentes que incluían discos de imipenem 10 µg y de meropenem 10 µg separados una distancia de 10 mm de discos de celulosa cargados con ZnSO<sub>4</sub> 2 mM, EDTA 0.5 M y DPA 2 mM. Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37°C y una vez transcurrido el tiempo se realizó la lectura de las mismas considerándose el test como positivo en todos los casos en los que se observó una deformación del halo [141]. Además, se estudió el efecto aislado de cada compuesto repitiendo el mismo ensayo con los discos separados a una distancia mayor para evitar la superposición de los halos.

- Test de PBA

La presencia de enzimas de la clase A se determinó analizando el comportamiento de los distintos aislados frente al ácido fenilborónico [142].

Inicialmente se preparó una suspensión 0.5 McFarland de cada microorganismo en suero salino y se sembró en una placa de Mueller-Hinton. A continuación se prepararon discos de imipenem y meropenem 10 µg suplementados con ácido fenilborónico 40 µg/µl y se colocaron en las placas frente a discos de estos mismos antibióticos sin suplementar. La lectura se realizó tras 18-24 horas incubación a 37°C y se consideraron positivos todos los ensayos que presentaron un halo de inhibición con ácido fenilborónico 5 mm mayor que su respectivo control sin suplementar.

- Detección de la actividad carbapenemasa mediante MALDI-TOF MS

La detección de la actividad carbapenemasa por MALDI-TOF se llevó a cabo en un espectrómetro Microflex (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) determinando todos los picos presentes en el rango de 100-1000 Da. Se seleccionó esta escala de m/z por incluir todos los valores esperados tanto para el antibiótico como para los posibles aductos y productos de degradación. Todos los ensayos fueron repetidos un mínimo de tres veces. La lectura se llevó a cabo en modo automático lo que aumentó la aleatoriedad del muestreo. Además, se ejecutaron 480 disparos para cada muestra, en vez de los 240 establecidos de modo estándar. Todos estos ajustes se realizaron con objeto de minimizar los errores de lectura y aumentar la repetitividad de la prueba.

Todos los ensayos se calibraron de acuerdo a lo descrito por Sparbier *et al* [122]. La calibración se realizó previa a la determinación de los espectros. Para ello se ajustaron los valores de cuatro compuestos bien identificados a su respectivo valor m/z conocido. Dos de estos picos corresponden a la matriz (alto 379.09 m/z y bajo 190.44 m/z) y otros dos a la bradiquinina 1-5 (572.76 m/z) y a la bradiquinina 1-7 (756.85 m/z).

La matriz fue suministrada por Francisco Soria Melguizo y ambas bradiquininas se adquirieron en Sigma España como liofilizados y se reconstituyeron en agua conservándose las alícuotas a -20°C hasta su uso. El calibrador se preparó mezclando las bradiquininas y ajustando cada una de ellas a una concentración de 35  $\mu$ M. El compuesto así preparado se conservó a 4°C durante un mes. Transcurrido este tiempo el preparado pierde estabilidad lo que se traduce en la aparición de una inflexión próxima a los picos de interés y un ensanchamiento de los mismos. Esto se debe a la oxidación de las argininas presentes en el compuesto por acción del agua. El empleo de una base débil como solvente minimizaría este efecto.

Antes de llevar a cabo los experimentos que realizaban la actividad carbapenemasa de los distintos aislados fue necesario determinar las condiciones óptimas del ensayo y diseñar un protocolo de trabajo fácil y reproducible.

#### o Selección de las condiciones óptimas del ensayo

La puesta a punto del ensayo de actividad carbapenemasa necesitó de un proceso previo de estandarización de las condiciones del estudio. El fin último fue seleccionar el solvente más adecuado en el que se realizarían las mezclas, el inóculo bacteriano con el que se desarrollarían los experimentos y el tiempo de incubación de los mismos. Además, fue preciso identificar los picos de interés en los que se centraría el análisis posterior. Estos picos deberían de ser fáciles de identificar, presentando una buena señal sobre ruido, y buenos indicadores para monitorizar la actividad carbapenemasa. Los picos seleccionados tendrían que guardar relación directa con el antibiótico utilizado, bien como antibiótico puro o como alguno de sus aductos.

La selección del solvente pasó por analizar el comportamiento de los 3 compuestos utilizados por otros autores (Tris-HCl 20mM pH6.8, citrato amónico dibásico 10 mM pH 7.0 y NaCl 0.46%) solos y tras la adición de SDS 0.01% [122-124]. Otros trabajos han señalado que el SDS puede aumentar la estabilidad de los productos de degradación facilitando su detección [143]. Posteriormente se analizó in formáticamente el perfil de picos originado por cada uno de ellos utilizando el software Flexanalysis proporcionado por la casa comercial.

Con objeto de establecer los picos correspondientes al antibiótico se ensayaron los tres solventes con y sin SDS 0.01% en presencia de imipenem a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1 y 5 mg/ml). Para ello se utilizó un preparado comercial de imipenem con cilastatina en proporción 1:1 (Tienam, 500mg MSD). Una vez identificado, el pico correspondiente a la cilastatina se utilizó para normalizar los espectros pues aparecía de forma constante en todos ellos. La estabilidad de la molécula de imipenem se analizó tras 4 horas de incubación a 35°C.

Los mismos experimentos se repitieron en presencia de distintos inóculos de los aislados A93 (cepa productora de la metalobetalactamasa IMP-8), A26 (portador de una OXA-24-like) y A1 (aislado sensible no portador de betalactamasas). Para esto se prepararon suspensiones de  $1 \times 10^9$  UFC/ml,  $2.5 \times 10^9$  UFC/ml y  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml en los distintos solventes con y sin antibiótico. Éstas se centrifugaron durante 2 minutos a 14000 rpm y se resuspendieron posteriormente en 1/20 del volumen inicial, utilizando las mezclas de solvente-antibiótico citadas. De este modo se determinó el inóculo más adecuado para los ensayos posteriores. El análisis de la disminución de la intensidad de los picos se monitorizó durante 4 horas, obteniéndose espectros a los 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas. La incubación se realizó a 35°C con agitación constante.

Los picos del espectro de masas correspondientes al ensayo de cada solvente aislado, al del mismo solvente más antibiótico y éste último en presencia de los aislados control se analizaron paralelamente. Esto permitió determinar los picos que aparecían y desaparecían en cada situación y asignarlos a sí a cada compuesto de la mezcla.

El espectro de masas de todas las situaciones descritas anteriormente se determinó mediante MALDI-TOF MS con las especificaciones mencionadas.

El procesamiento de todos los datos obtenidos en los diferentes ensayos permitió establecer las siguientes condiciones de ensayo:

Solvente: NaCl 0.46% y/o Tris-HCl 20 mM pH 6,8

Inóculo bacteriano:  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml

Incubación: 1h a 35°C con agitación constante (500rpm)

#### o Detección de la actividad hidrolítica mediante espectrometría de masas

La determinación de la actividad carbapenemasa mediante MALDI-TOF se llevó a cabo en los 130 aislados del estudio.

Para el ensayo se preparó una suspensión bacteriana de 3 McFarland en 1 ml de NaCl 0.46% a partir de un pase fresco en medio de cultivo Mueller-Hinton agar de cada una de los aislados. A continuación se centrifugaron 250  $\mu$ l de cada suspensión durante 2 minutos a 14000 rpm y se resuspendió el precipitado en 25  $\mu$ l del mismo solvente con imipenem 1 mg/ml. Los tiempos establecidos para el análisis fueron tiempo cero y transcurrida 1 hora de incubación a 35°C. Se incluyeron además muestras sin microorganismo y sin imipenem como controles del ensayo.

Para la determinación del espectro de masas se centrifugaron 15  $\mu$ l de cada preparado durante 2 minutos a 14000rpm y se depositó 1  $\mu$ l del sobrenadante en la placa de lectura. Una vez la muestra se hubo secado se cubrió con 1  $\mu$ l de matriz orgánica (solución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinnámico en 50% acetónitrilo/2,5% ácido trifluoroacético) y se realizó la lectura.

#### o Detección de metalobetalactamasas mediante MALDI-TOF MS

La actividad carbapenemasa se determinó en todos los aislados suplementando la solución de incubación con ZnSO<sub>4</sub> (2 mM concentración final) y/o un quelante divalente (DPA, 2 mM concentración final) para confirmar la presencia de metalobetalactamasas. Las muestras se incubaron durante una hora con agitación (500rpm) en NaCl 0.46% con imipenem 1 mg/ml con o sin el ion divalente y el compuesto quelante. El protocolo de preparación de las muestras fue el descrito en el apartado anterior.

La incubación con DPA inhibiría la actividad metalobetalactamasa, sin embargo, la adición de ZnSO<sub>4</sub> revertiría este efecto. En el caso de suplementar el medio con DPA más ZnSO<sub>4</sub> la actividad de la enzima permanecería intacta pues el DPA quelaría los cationes Zn<sup>2+</sup> liberados por el ZnSO<sub>4</sub> y el centro activo de la enzima no se vería afectado.

➤ Estudios moleculares de enzimas implicadas en la resistencia a carbapenémicos

• Secuenciación de la enzima *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

Para la secuenciación de la enzima *bla*<sub>OXA-51-like</sub> se utilizaron como ADN molde 250 ng del producto de PCR purificado (Qiagen PCR product purification -QIAGEN, Hilden, Germany) obtenido en el proceso de amplificación descrito en el apartado “Técnicas de identificación; Determinación de la presencia de *bla*<sub>OXA-51-like</sub>”. La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando la mezcla BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems, California) y los cebadores OXA-51U y OXA-51L (tabla 1) a una concentración de 3.2 mM. La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM BIG DYE system automático (Perkin-Elmer). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa informático Sequence Scanner y se identificaron mediante comparación con las secuencias incluidas en la base de datos de PubMed, empleando la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Todas las secuencias se identificaron con una similitud igual o superior al 98% a la incluida en la base de datos.

• Amplificación y secuenciación de carbapenemasas de la clase B: *OXA-23-like*, *OXA-24-like* y *OXA-58*

La presencia de las enzimas *OXA-23-like*, *OXA-24-like* y *OXA-58* se determinó mediante PCR convencional en todos los aislados incluidos en el estudio. Los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 1. Como ADN molde se utilizaron 200-400 ng de ADN de cada una de los aislados.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante geles de agarosa al 1% incluyendo marcadores de peso molecular (Dominon mbl ladder 100-2000pb) para estimar el tamaño de los amplificadores.

Por último, se secuenciaron los productos de PCR de un número representativo de aislados positivos para cada una de las enzimas ensayadas con el fin de confirmar los resultados obtenidos. La secuenciación se llevó a cabo utilizando los mismos cebadores empleados para la amplificación a una concentración de 3.2 mM y utilizando la mezcla BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems, California). Como ADN molde se utilizó una dilución 1:50 del producto de PCR en agua. La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM BIO system automático (Perkin-Elmer). La lectura de las secuencias se llevó a cabo con el programa informático Sequence Scanner. Éstas se identificaron posteriormente empleando la herramienta de alineamiento de secuencias *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de Pubmed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Amplificación de carbapenemasas de la clase A: *bla<sub>KPC</sub>*

El estudio de enzimas de la clase A tan solo se realizó en los aislados que presentaron un perfil de resistencia a los carbapenemes pero no amplificaron ninguna de las otras carbapenemasas estudiadas.

Para la PCR se emplearon los cebadores y las condiciones que se detallan en la tabla 1. Como ADN molde se utilizaron 200-400 ng de ADN de cada uno de los aislados. Se incluyó además un control positivo de la colección HCSC (*K. pneumoniae* HCSC493). La posterior visualización de los productos amplificados se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% incluyendo un marcador de peso molecular conocido (Dominon mbl ladder 100-2000pb).

- Amplificación y secuenciación de metalobetalactamasas: *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>SIM</sub>*

El estudio molecular de metalobetalactamasas se llevó a cabo mediante PCR convencional empleando los cebadores y condiciones de ensayo que se recogen en la tabla 1. El ADN utilizado como molde fue el obtenido tras la extracción automática de los ácidos nucleicos en el sistema EasyMag.

Como en los casos anteriores, la visualización de los amplificadores se realizó en geles de agarosa al 1% incluyendo un marcador de peso molecular conocido (Dominon mbl ladder 100pb).

Todas las muestras con PCR positiva se secuenciaron utilizando la mezcla BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems, California) y los cebadores descritos con anterioridad a una concentración de 3.2mM. El secuenciador que se utilizó para este estudio fue el ABI PRISM B I O s ystem automático (Perkin-Elmer). El procesamiento de las secuencias obtenidas se realizó con el programa informático Sequence Scanner y su identificación posterior se llevó a cabo empleando la herramienta BLAST de PubMed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Presencia y localización de la secuencia de inserción IS*Aba1* ligada al gen *bla<sub>OXA-51-like</sub>*

La determinación de la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* ligada al gen *bla<sub>OXA51-like</sub>* se llevó a cabo mediante PCR con las condiciones y los cebadores 23A y 51L reseñados en la tabla 1.

Los productos obtenidos en la PCR se analizaron bajo luz UV en geles de agarosa al 1%. En todos los geles se incluyeron marcadores de peso molecular conocido para estimar el tamaño de los fragmentos (Dominon mbl ladder 100pb).

Al igual que en los casos anteriores la secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM B I O s ystem automático (Perkin-Elmer) con los mismos cebadores utilizados para la amplificación a una concentración de 3.2 mM. Los productos de PCR se purificaron previamente con el kit de Qiagen PCR product purification siguiendo las instrucciones de fabricante. La secuenciación y el análisis de las secuencias se realizó con el programa informático Sequence Scanner. El alineamiento posterior se llevó a cabo utilizando mediante BLAST de PubMed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## ➤ Estudios clonales

- Electroforesis en campo pulsado

La determinación de perfiles clonales se realizó mediante electroforesis en campo pulsado. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de elevado peso molecular incluidos en un gel de agarosa mediante la alternancia de un campo eléctrico entre diferentes pares de electrodos. Este campo eléctrico provoca una reorientación continua de los fragmentos de ADN que migran a través de la agarosa.

Inicialmente se prepararon bloques de agarosa que incluyan el ADN bacteriano sin fragmentar. Para ello se partió de una suspensión bacteriana de  $10^9$  UFC/ml en tampón de resuspensión (Tris 100 mM, EDTA 100 mM pH 8.0) que se mezcló con un volumen de agarosa *low melting* al 2% (Low Melt Agarose. BioRad. Catalog 161-3112) en 1% SDS en TE (Tris 10 mM EDTA, 1 mM pH 7.5) en proporción 1:1. Posteriormente se incubó a 55°C en tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM pH 8, 1% sarcosil) con proteinasa K (0,1 mg/ml) durante 16 horas con agitación. A continuación se realizaron 5 lavados de 30 minutos con TE y finalmente se incubó 30 minutos a 25°C en tampón con BSA (100 µg/ml). Transcurrido este tiempo se incorporó la enzima ApaI 15-(20 U de enz/ 100 µl de buffer) durante 16 horas a 25°C. Finalmente, se cargaron los bloques en un gel de agarosa megabase al 1% (BioRad catalog) 161-3110 en TBE 0,5X y se realizó la electroforesis en un CHEF-DR III (BioRad) bajo las siguientes condiciones [144, 145]:

- 21 horas
- Pulsos de 5 a 35 segundos en rampa lineal
- Voltaje 6V/cm o 200V

La visualización de los geles se realizó bajo luz UV.

El análisis informático de los perfiles clonales se realizó con el programa FPQuest y los resultados se interpretaron según los criterios descritos por Seifert *et al* [145].

### ➤ Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico se utilizó para describir las principales variables demográficas incluidas en el estudio. El cálculo de las medidas de tendencia central, como la media, la moda o la mediana, sirvió para mostrar la distribución de los datos de edad y sexo de los pacientes, así como el tipo de muestra recibida y su procedencia.

Los valores predictivos, tanto positivo como negativo, se calcularon para evaluar la eficacia real de la espectrometría de masas MALDI-TOF como técnica de identificación para *Acinetobacter* spp. Asimismo, se calcularon los valores de sensibilidad y especificidad de esta prueba diagnóstica.

## RESULTADOS

---

---

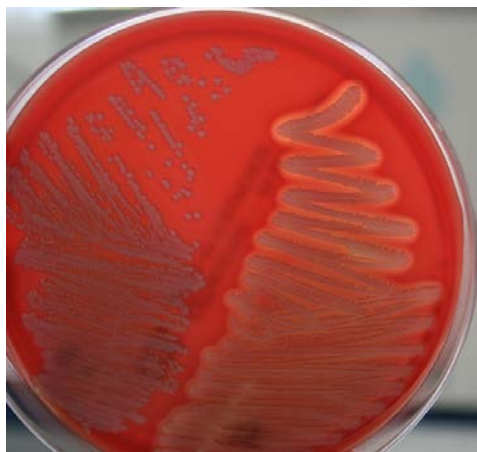


## V. Resultados

### ➤ Aislados clínicos

#### • Características de crecimiento

Todos los aislados incluidos en el estudio presentaron unas características similares de crecimiento tras 18 horas de incubación a 37°C. No obstante, el aspecto macroscópico de las distintas colonias varió sustancialmente de unos aislados a otros. Así, la mayoría de las colonias presentaron un tamaño de unos 2 mm de color blanquecino y consistencia mucosa. Esta gran homogeneidad se observó principalmente en los aislados de la especie *A. baumannii*. Sin embargo, en otros casos las colonias mostraron un tamaño menor transcurrido el mismo tiempo de incubación y su consistencia era seca. Otra característica destacable de algunos aislados fue la presentación de hemólisis al cultivarse en medio agar sangre, como se refleja en la figura 11. Estas variaciones de comportamiento se presentaron en su mayoría en aislados distintos de *A. baumannii* aunque no se pudo asociar claramente un patrón de crecimiento a ninguna especie concreta.



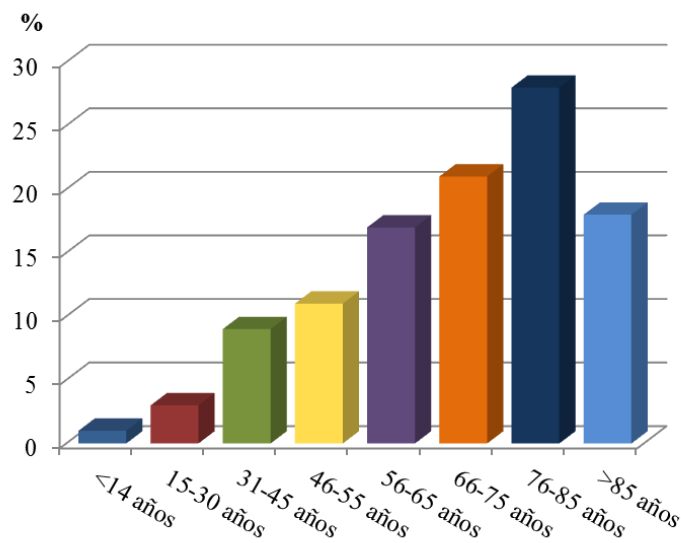
**Figura 11.** Aspecto macroscópico de las colonias de *A. baumannii* (izquierda) y *A. genomospecies 14BJ* (derecha) donde se aprecian las propiedades hemolíticas de esta última.

- Epidemiología

- Distribución de pacientes según edad y sexo.

Las 130 muestras incluidas en el estudio se aislaron de 110 pacientes. El rango de edad fue de los 1 a los 96 años aunque el mayor número de aislados correspondió a pacientes con una edad comprendida entre los 76 y los 85 años. El número de muestras recibidas aumentó con la edad de los pacientes hasta los 85 años, descendiendo a continuación en los pacientes mayores. La media de edad fue de 59 años y la mediana de 68. Tan sólo una muestra de las analizadas correspondió a un paciente pediátrico. Éste se trataba de un varón de 1 año que presentaba una infección de piel y partes blandas en tratamiento por el servicio de dermatología.

La distribución de edades de los pacientes se muestra en la figura 12.

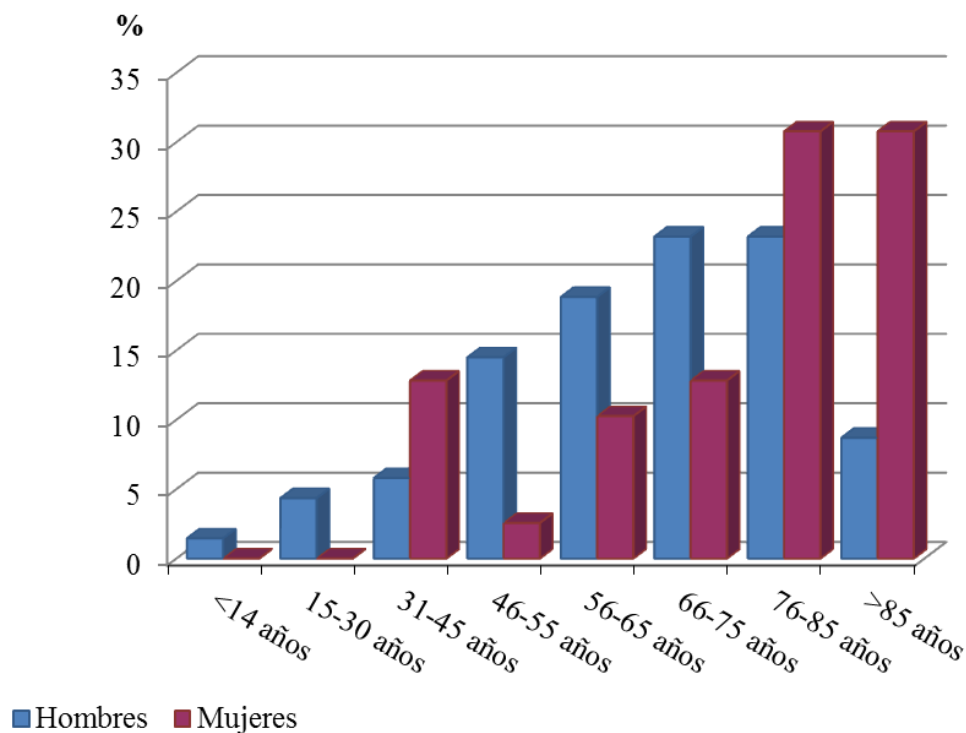


**Figura 12.** Distribución de edades de los pacientes incluidos en el estudio.

En cuanto al sexo de los pacientes, el mayor porcentaje de aislados de *Acinetobacter* spp. procedieron de varones (64.1%). El 35.9% restantes se aislaron de mujeres. La edad de los hombres varió de 1 a 88 años encontrándose la mayoría de ellos entre los 56 y los 85. El número de muestras procedentes de

hombres aumentó con la edad hasta los 85 años y tan sólo se recogieron 6 aislados de varones mayores de esta edad. Las muestras procedentes de mujeres correspondieron a pacientes de mayor edad presentando el 60% de ellas más de 76 años. Del 40% restante la mayoría de las muestras se obtuvieron de los rangos de edad comprendidos entre los 31 y los 45 años (12.8%) y los 66 y los 75 (12.8%) seguido del de 56 a 65 años (10.3%). Las pacientes de entre 46 y 55 años tan sólo supusieron el 2.6% del total de las muestras recibidas. En el caso de las mujeres el rango de edad osciló entre los 38 y los 96 años.

La figura 13 recoge los datos relativos a la edad de los pacientes en función de su sexo.



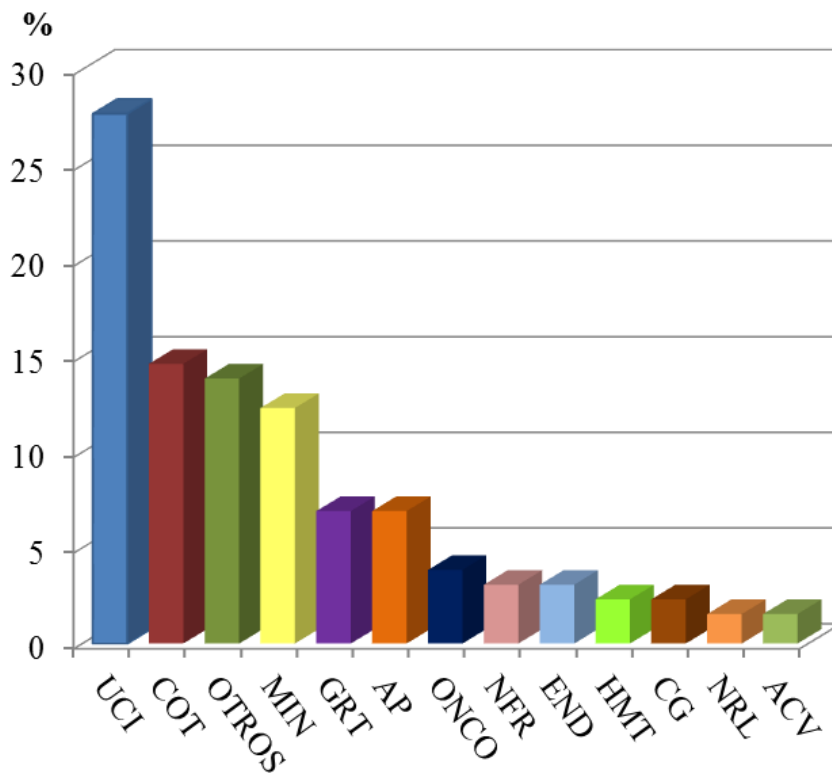
**Figura 13.** Distribución de los pacientes del estudio según su edad y sexo (porcentaje de hombres y mujeres en cada grupo de edad).

### o Distribución de aislados por servicios

Los aislados estudiados se obtuvieron de pacientes ingresados en distintos servicios del hospital, así como en aquellos que asistieron a la consulta de su médico de atención primaria. La mayor parte provinieron de pacientes ingresados

en la unidad de cuidados intensivos (27.7%) y en traumatología (14.6%). También se obtuvieron muestras de pacientes pertenecientes al servicio de medicina interna (12.3%), geriatría (6.9%), oncología (3.8%), nefrología (3.1%), endocrinología (3.1%), hematología (2.3%), cirugía general (2.3%), neurología (1.5%), y cirugía vascular (1.5%).

La distribución de aislados por servicio se muestra en la figura 14.



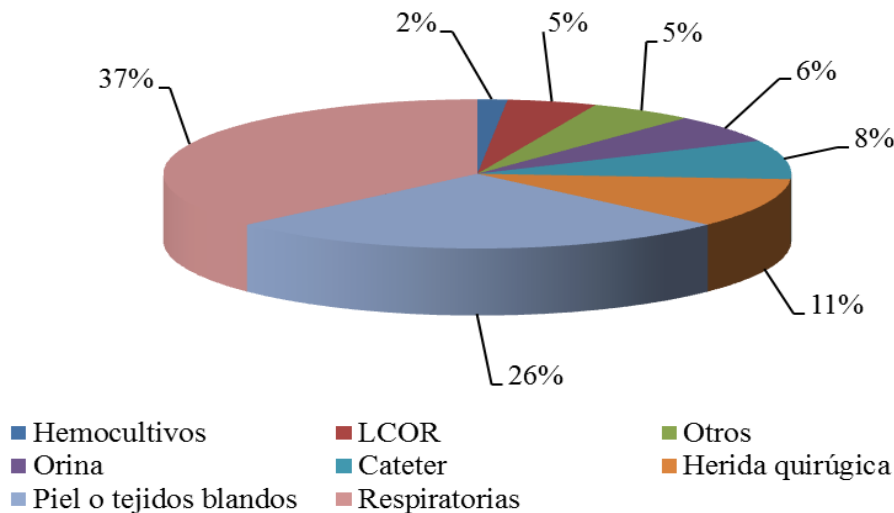
**Figura 14.** Distribución de los aislados de *Acinetobacter* según el servicio de procedencia, incluyendo el porcentaje de muestras recibidas de cada uno de ellos.

#### o Distribución de muestras

Los aislados de *Acinetobacter* spp. estudiados se obtuvieron a partir de diferentes muestras clínicas. La mayoría de éstas fueron muestras respiratorias (n=48, 37%) que incluían tanto broncoaspirados, en el caso de pacientes con ventilación mecánica, como esputos y lavados broncoalveolares. El 26 % de los aislados procedieron de muestras de piel o tejidos blandos, el 11% a partir de heridas quirúrgicas y el 8 % en catéteres vasculares. Tan sólo el 6 % de los

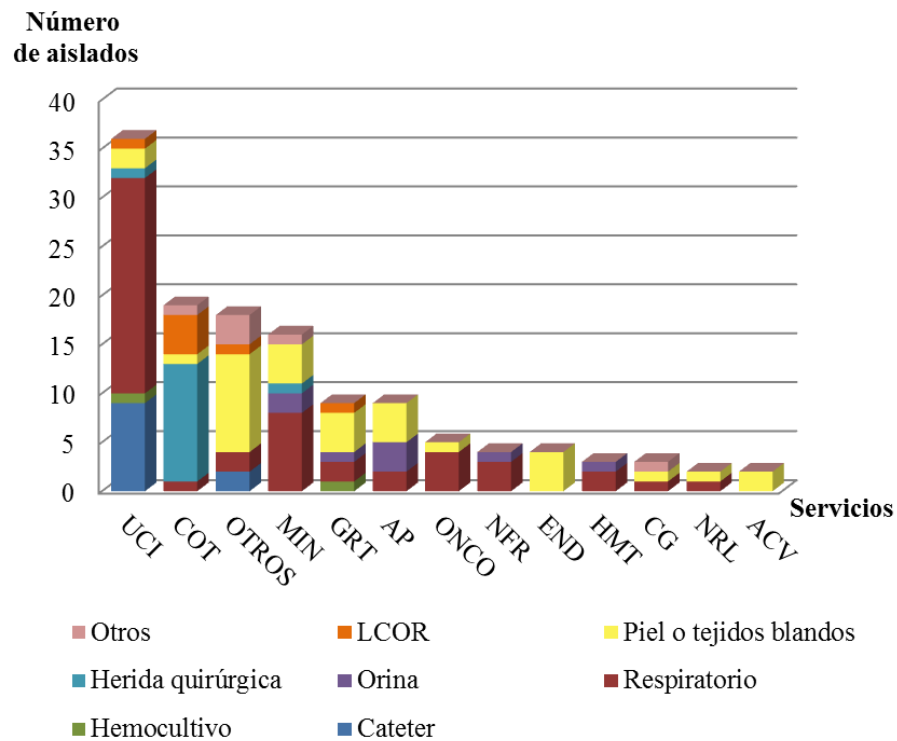
aislados se encontraron en orinas y el 5% en líquidos corporales estériles. El 2 y 5% restantes pertenecieron a hemocultivos y otro tipo de muestras, como exudado conjuntival, uña o prótesis.

La distribución de las muestras recogidas se detalla en la figura 15.

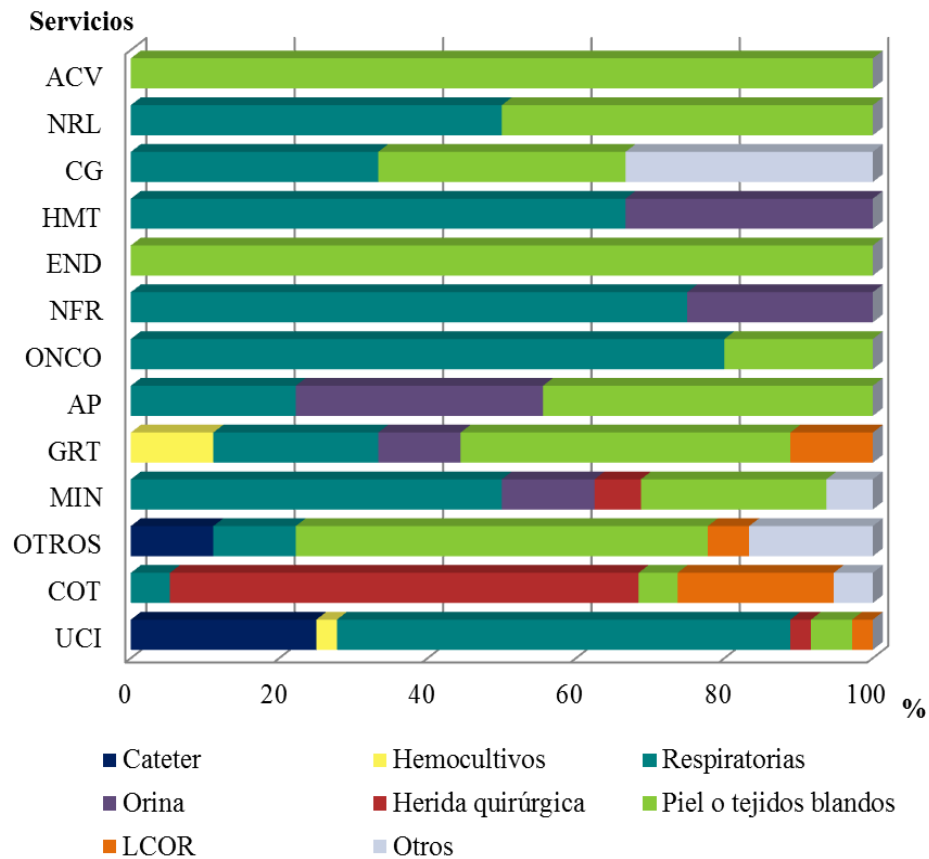


**Figura 15.** Porcentaje de muestras con aislados de *Acinetobacter* spp.

Posteriormente se analizó el tipo de muestra recibida según el servicio de procedencia. Así, de las 36 muestras aisladas en la UCI el 61.1% correspondieron a muestras respiratorias y el 25% a catéteres. Otras muestras de este servicio fueron hemocultivos, heridas quirúrgicas y líquidos corporales estériles. El segundo servicio que aportó mayor número de muestras al estudio fue COT (n=19) siendo en su mayoría muestras de heridas relacionadas con la intervención (63.2%) y distintos líquidos corporales (21.1%) tales como líquido articular. De las 16 muestras recibidas del servicio de medicina interna el 50% fueron esputos y otras muestras del tracto respiratorio y el 25% muestras de piel y tejidos blandos. Del mismo modo que sucedió con las muestras de medicina interna, las 9 muestras aisladas de pacientes a cargo del servicio de geriatría fueron en su mayoría muestras de piel y tejidos blandos (44.4%) y muestras respiratorias (22.2%). En el caso de atención primaria estos aislados (n=9) fueron igualmente recogidos de piel y tejidos blandos (44.4%) y de orina (33.3%).

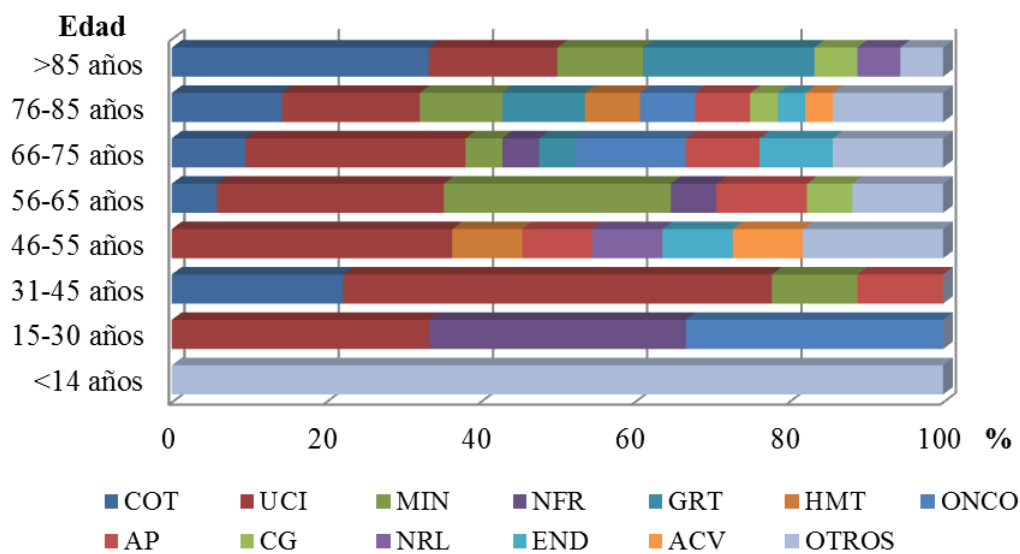


**Figura 16.** Relación de servicios de los que se obtuvieron aislados de *Acinetobacter* spp de sglosando e n c cada uno de ellos e l t ipo de m uestra de l q ue procedían l os mismos, expresado en valor absoluto.



**Figura 17.** Distintos tipos de muestras recibidas por servicios. Los valores están expresados como porcentaje del total de las muestras de cada servicio.

El 80% de las muestras de oncología fueron muestras respiratorias y el 20% restante se aislaron de piel y tejidos blandos. Otros servicios de los que se recibieron muestras respiratorias fueron hematología, cirugía general y neurología (66.7%, 33.3% y 50% respectivamente) (figuras 16 y 17). La relación de los servicios en los que se atendió a los distintos pacientes según su edad se recoge en la figura 18.



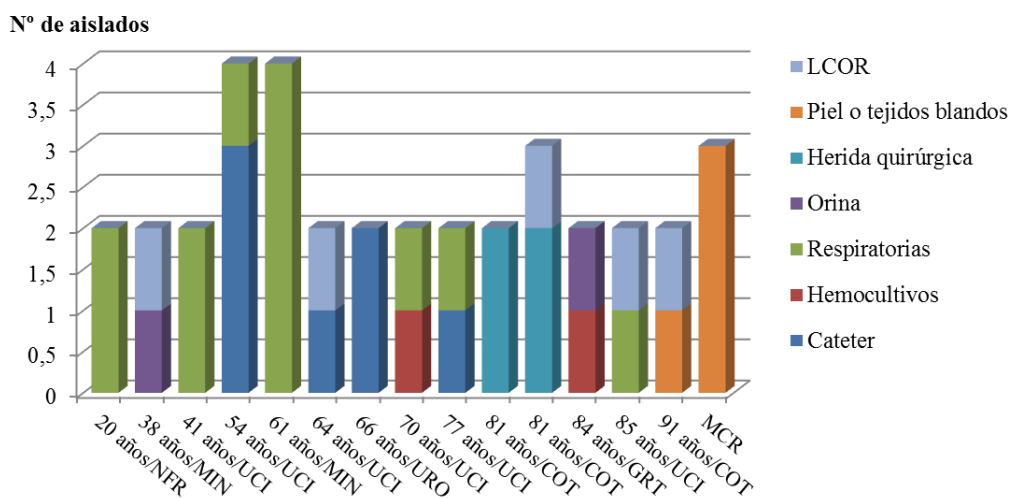
**Figura 18.** Distribución de los pacientes según su grupo de edad incluyendo los distintos servicios en los que fueron atendidos. Los valores aparecen expresados como porcentaje del total de los pacientes de su grupo de edad.

Como puede observarse, los pacientes mayores de 85 años fueron en su mayoría atendidos por el servicio de COT (33.3%), el de geriatría (22.2%) o la UCI (16.7%). Un porcentaje menor ingresó a cargo de medicina interna (11.1%) y otros servicios como cirugía general (5.6%) o neurología (5.6%). Los pacientes de los 76 a los 85 años se distribuyeron en un mayor número de servicios entre los que cabe destacar la UCI (17.9%), COT (14.3%), geriatría (10.7%) o medicina interna (10.7%) entre otros. El 28.6% de los pacientes de 66 a 75 años ingresaron en la UCI y el 14.3% en oncología. Este grupo de pacientes también fue atendido por los servicios de traumatología (9.5%), endocrinología (9.5%), nefrología, geriatría y medicina interna (4.8% cada uno de ellos), mientras que el 9.5% acudió a su médico de atención primaria. Los pacientes de entre 56 y 65

años e stuvieron ingresados en la UCI o en medicina interna principalmente (29.4% de los pacientes en ambos servicios). Por su parte, los de 46 a 55 años fueron en su mayoría atendidos en la UCI (36.4%). El resto de los pacientes de este rango de edad ingresaron a cargo de los servicios de hematología, neurología, endocrinología, angiología y cirugía vascular, o fueron vistos en las consultas de atención primaria (9.1% para cada uno de los servicios citados anteriormente). Al igual que sucedió con el grupo de edad anterior, la mayoría de los pacientes de 31 a 45 años e stuvieron ingresados en la UCI (55.6%). Los pacientes de 15 a 30 años se repartieron por igual entre los servicios de nefrología, oncología y la UCI (33.3% cada uno de ellos). El único paciente menor de 15 años e stuvo a cargo de dermatología, como se comentó con anterioridad.

o Pacientes con más de un aislado

La mayoría de los pacientes aportaron una única muestra al estudio, sin embargo, en 15 casos se recibió más de un aislado por paciente, lo que supuso un total de 36 muestras. Once de estos pacientes aportaron 2 muestras mientras que de los cuatro restantes se recibieron 3 muestras en dos casos y 4 en los otros dos.



**Figura 19.** Distribución de los 15 pacientes con más de un aislado de *Acinetobacter* spp. La figura recoge la edad de cada paciente así como el servicio en el que fueron atendidos y el número de aislados que se recogió de cada uno de ellos

**Tabla 4.** Relación de pacientes con más de un aislado de *Acinetobacter* spp.

Paciente	Edad	Sexo	Muestra/ID	Servicio	Fecha aislamiento	Especie
1	66	H	CVC (A14)	URO	30/11/09	<i>A. baumannii</i>
			CVC (A15)	URO	19/11/09	<i>A. berezinae</i>
2	54	H	CVC (A24)	UCI	17/11/08	<i>A. baumannii</i>
			CVC (A26)	UCI	13/11/08	<i>A. baumannii</i>
			BAS (A30)	UCI	30/10/08	<i>A. baumannii</i>
			CVC (A34)	UCI	27/10/08	<i>A. baumannii</i>
			EXU (A39)	UCI	03/10/08	<i>A. baumannii</i>
3	85	H	BAS (A42)	UCI	01/10/08	<i>A. baumannii</i>
			FIS (A40)	COT	03/10/08	<i>A. baumannii</i>
4	91	M	LAR (A46)	COT	17/09/10	<i>A. baumannii</i>
			HQX (A54)	COT	04/06/08	<i>A. baumannii</i>
5	81	M	HQX (A56)	COT	22/05/08	<i>A. baumannii</i>
			BAS (A58)	MIN	30/05/08	<i>A. baumannii</i>
6	61	H	BAS (A60)	MIN	22/05/08	<i>A. baumannii</i>
			BAS (A62)	MIN	14/05/08	<i>A. baumannii</i>
			BAS (A65)	NRL	08/04/08	<i>A. baumannii</i>
			EXU (A64)	MIN	21/11/07	<i>A. baumannii</i>
7	38	H	ORI (A66)	MIN	02/04/08	<i>A. baumannii</i>
			HQX (A68)	COT	10/03/08	<i>A. baumannii</i>
8	81	M	HQX (A73)	COT	28/12/07	<i>A. baumannii</i>
			LAR (A75)	COT	11/12/07	<i>A. baumannii</i>
			EXU (A84)	MCR	12/03/10	<i>A. calcoaceticus</i>
9		H	EXU (A85)	MCR	17/03/10	<i>A. calcoaceticus</i>
			EXU (A87)	MCR	12/03/10	<i>A. baumannii</i>
			ESP (A86)	NFR	22/07/10	<i>A. beijerinckii</i>
10	20	H	ESP (A102)	NFR	22/07/10	<i>A. baumannii</i>
			BAS (A97)	UCI	23/06/10	<i>A. baumannii</i>
11	70	M	HM (A98)	UCI	21/06/10	<i>A. baumannii</i>
			CVC (A103)	UCI	26/07/10	<i>A. baumannii</i>
12	77	M	BAS (A104)	UCI	05/08/10	<i>A. baumannii</i>
			CVC (A114)	UCI	10/09/10	<i>A. baumannii</i>
13	64	H	CJN (A117)	MIN	03/09/10	<i>A. baumannii</i>
			BAS (A118)	UCI	20/09/10	<i>A. baumannii</i>
14	41	H	BAS (A121)	UCI	30/09/10	<i>A. baumannii</i>
			HM (A126)	GRT	28/10/10	<i>A. baumannii</i>
15	84	H	ORI (A129)	GRT	29/10/10	<i>A. baumannii</i>

Estos pacientes presentaron edades comprendidas entre los 20 y los 91 años y estuvieron en su mayoría ingresados en la UCI (40%) o en traumatología (20%). El 33.3% fueron muestras respiratorias recibidas principalmente de la UCI. También se recogieron muestras de catéteres (19.4%) en la UCI, líquidos corporales estériles (13.9%) en la UCI, en traumatología y en medicina interna, heridas quirúrgicas (11.1%) en traumatología y muestras de piel y partes blandas (11.1%) también en traumatología y en la consulta de toma de muestras del servicio de microbiología. Además, se obtuvieron dos muestras de orina (5.6%) en pacientes de medicina interna y geriatría y otras dos de hemocultivos (5.6%) en la UCI y geriatría. Figura 19 y tabla 4

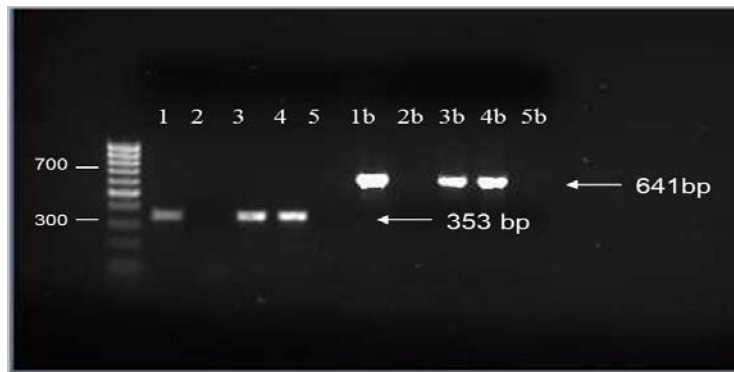
## Identificación de los aislados clínicos

- Identificación de los aislados mediante galería de pruebas bioquímicas

Todos los aislados seleccionados para este estudio se identificaron como miembros del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* mediante los test rutinarios disponibles en el servicio de microbiología del HCSC. Estos sistemas no permiten diferenciar entre unas especies del género y otras debido a su gran proximidad genética por lo que, tras su inclusión en el estudio, fue necesaria su identificación mediante técnicas moleculares.

- Determinación de la presencia de la enzima OXA-51-like

La PCR para detectar la presencia de la enzima OXA-51-like se llevó a cabo en los 130 aislados del estudio. En 105 de ellos se obtuvo un producto de 353 pb cuando la reacción se llevó a cabo con los cebadores OXA-51A y OXA-51B. Cuando se utilizaron OXA-51U y OXA-51L el producto de PCR mostraba una banda de 641 pb. Los 25 aislados restantes no presentaron ningún amplificado tras la realización de ambas PCR (figura 20).



**Figura 20.** Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de PCR del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. En el primer caso (muestras 1 a 5) se utilizó el par de cebadores OXA-51A/B mientras que en el segundo (muestras 1b a 5b) se emplearon los OXA-51U/L. Las muestras 1, 3 y 4 mostraron resultado positivo en ambas PCRs al presentar una banda del tamaño adecuado (353pb y 641pb respectivamente) mientras que en las muestras 2 y 5 no se observó producto de amplificación en ninguno de los dos casos.

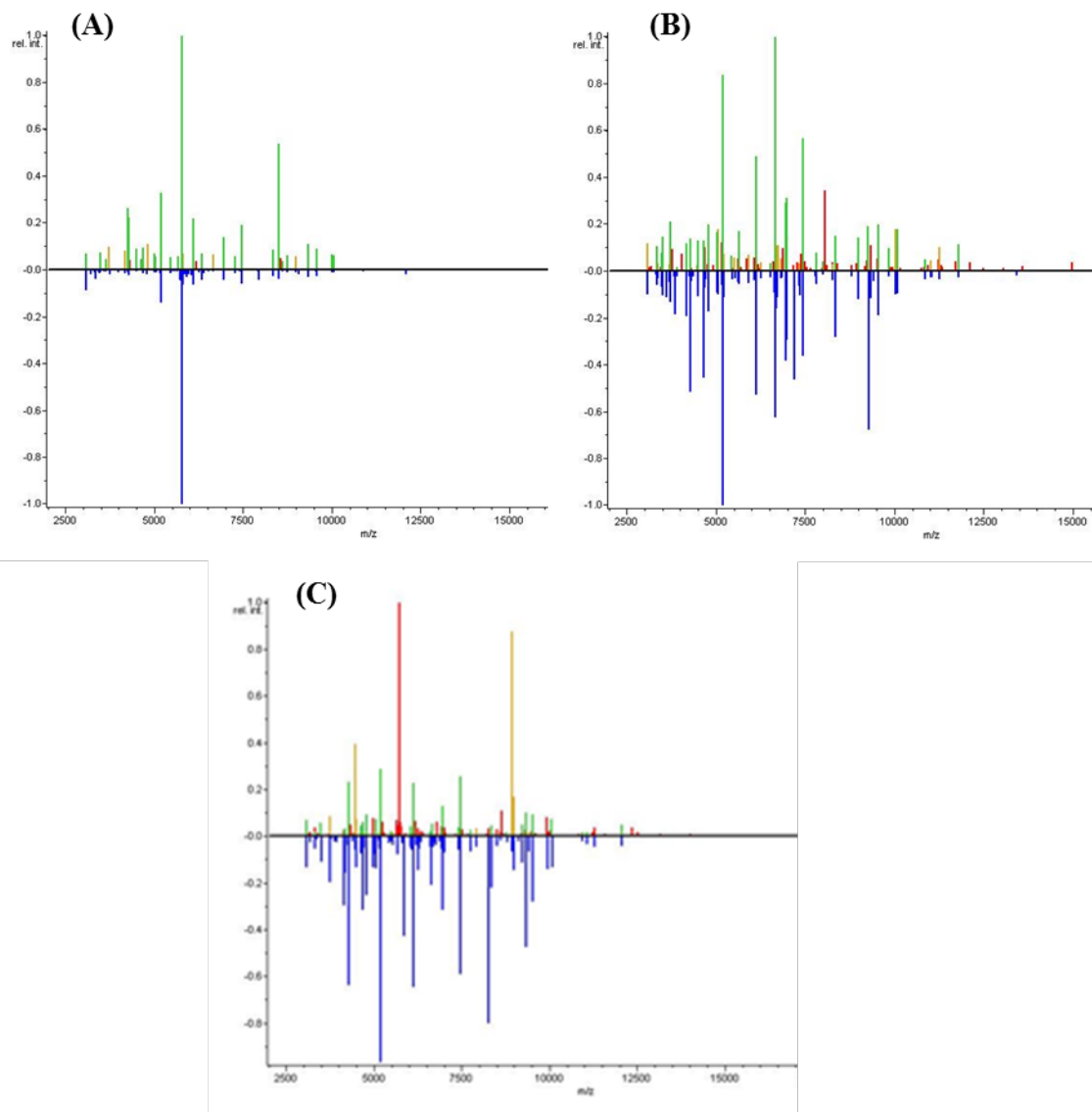
- Espectrometría de masas MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight*).

Los 130 aislados de *Acinetobacter* spp. se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, previa extracción según el protocolo. Los resultados de la comparación de los patrones de picos del espectro obtenido para cada microorganismo con el de referencia incluido en la base de datos (figura 21) se expresaron como  $\log(score)$  en una escala de valores que oscilan entre 0 y 3, según la fiabilidad de los resultados (tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de la identificación por MALDI-TOF MS y de la amplificación de la enzima OXA-51-like de los 130 aislados incluidos en el estudio. Aparecen también los valores de *score* obtenidos para cada determinación por MALDI-TOF MS.

Identificación MALDI-TOF MS	Número de aislados (n=130)	Valor de <i>score</i>	OXA-51-like
<i>A. baumannii</i>	102	$\geq 2$	Sí
<i>A. baumannii</i>	2	$\geq 2$	No
<i>A. baumannii</i>	3	1.8-1.99	Sí
<i>A. pitii</i>	19	$\geq 2$	No
<i>A. pitii</i>	1	1.95	No
<i>A. baylyi</i>	1	1.936	No
<i>A. junii</i>	1	2.432	No
<i>A. tjernbergiae</i>	1	2.024	No

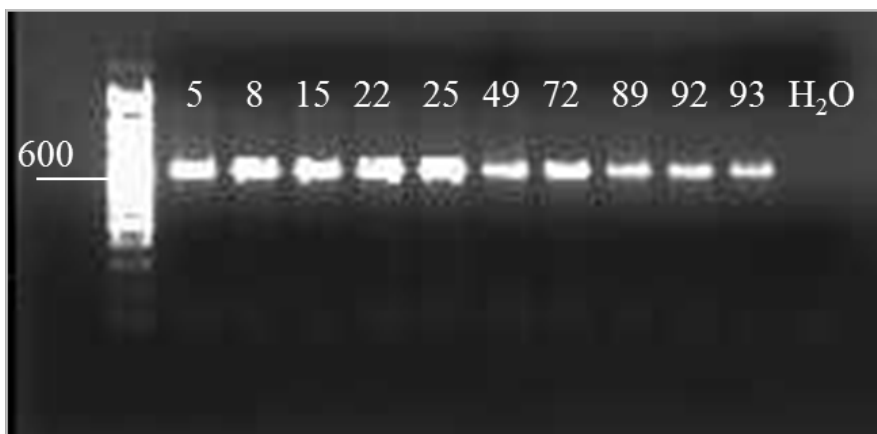
Los resultados del análisis de cada espectro mostraron un total de 107 *A. baumannii*, 20 *A. pitii*, 1 *A. junii*, 1 *A. baylyi* y 1 *A. tjernbergiae*. De las 130 muestras ensayadas, 125 tuvieron un valor de *score* mayor o igual a 2.0, lo que confirma su identificación de género y probable identificación también de especie. Sólo 5 aislados presentaron un valor menor de 2.0 indicando una probable identificación de género pero no de especie. Éstos correspondieron a 3 *A. baumannii*, 1 *A. pitii* y 1 *A. baylyi*.



**Figura 21.** Comparación de los espectros de masas de los aislados problema (azul) con los más similares de los incluidos en la base de datos. Se muestran en verde los picos coincidentes, en amarillo los similares y en rojo los no coincidentes. (A) espectro del aislado A1 (*A. baumannii*) frente a otro de *A. baumannii*, (B) espectro de A15 (*A. bereziniae*) frente a uno de *A. pitii* y (C) espectro de A84 (*A. calcoaceticus*) en comparación con uno de *A. pitii*.

- Amplificación y secuenciación del gen *rpoB*

La amplificación del gen *rpoB* se realizó en todos los aislados en los que la identificación por espectrometría de masas resultó diferente de *A. baumannii* (n=23), así como en los aislados de *A. baumannii* (n=2) que no amplificaron el gen de la OXA-51-like. Se incluyeron también como controles 7 aislados de *A. baumannii* con resultado positivo para la OXA-51-like e identificados como tales con *score* >2 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados de la PCR se muestran en la figura 22.



**Figura 22.** Visualización de los productos de la PCR del gen *rpoB* en gel de agarosa al 1%. En la imagen se muestran 10 aislados con resultado positivo.

La comparación de las secuencias de los 32 aislados analizados con las de la base de datos (BLAST-PubMed) permitió identificar todos con una homología mayor o igual al 98%. Éstos fueron: 7 *A. baumannii*, 3 *A. nosocomialis*, 8 *A. pittii*, 7 *A. berezinae/A. genomospecies 10*, 3 *A. calcoaceticus*, 1 *A. genomospecies 14BJ*, 1 *A. beijerinckii*, 1 *A. soli*, y 1 *A. junii*.

- Comparación de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de identificación

El empleo de pruebas de identificación bioquímicas permitió caracterizar los 130 aislados tan solo a nivel de género por lo que se realizaron distintas pruebas moleculares para establecer las especies concretas que se habían

obtenido de las distintas muestras. Las 3 técnicas moleculares que se utilizaron mostraron algunos resultados discrepantes, tal y como se recoge en la tabla 6.

De los 32 aislados con secuencia del gen *rpoB* (técnica de referencia), 25 se identificaron como no-*A. baumannii*. Ninguno de estos 25 aislados fue positivo para la amplificación del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> (gen que se considera intrínseco en esta especie bacteriana) por lo que los resultados de ambas técnicas pueden considerarse coincidentes. Sin embargo, y tal y como aparece en la tabla, dos de estos aislados se identificaron como *A. baumannii* por MALDI-TOF MS (scores 2.017 y 2.273). Estos 2 aislados erróneamente identificados correspondieron a 2 *A. nosocomialis* por secuenciación. Teniendo en cuenta el conjunto de estos resultados, la espectrometría de masas permitió identificar correctamente el 98.2% de los *A. baumannii*.

**Tabla 6.** Comparación de los tres métodos de identificación empleados en el estudio. Resultado de la identificación por espectrometría de masas, indicando el score obtenido, de la amplificación de la enzima OXA-51-like y de la secuenciación del gen *rpoB*.

MALDI-TOF MS	score	OXA-51	Secuenciación <i>rpoB</i> (n=32)
<i>A. baumannii</i> (n=7)	≥2	Sí	<i>A. baumannii</i> (n=7)
<i>A. baumannii</i> (n=2)	≥2	No	<i>A. nosocomialis</i> (n=2)
<i>A. pitii</i> (n=19)	≥2	No	<i>A. pitii</i> (n=8) <i>A. berezinae</i> / <i>A. genomospecies 10</i> (n=7) <i>A. calcoaceticus</i> (n=3) <i>A. genomospecies 14BJ</i> (n=1)
<i>A. pitii</i> (n=1)	1.95	No	<i>A. nosocomialis</i> (n=1)
<i>A. tjernbergiae</i> (n=1)	2.024	No	<i>A. beijerinkii</i> (n=1)
<i>A. baylyi</i> (n=1)	1.936	No	<i>A. soli</i> (n=1)
<i>A. junii</i> (n=1)	2.432	No	<i>A. junii</i> (n=1)

Los otros 23 aislados que no amplificaron la OXA-51-like fueron identificados como especies distintas de *A. baumannii* por espectrometría de masas (20 *A. pitii*, 1 *A. baylyi*, 1 *A. junii*, 1 *A. tjernbergiae*) aunque en la mayoría de los casos estas especies no coincidieron con las obtenidas por secuenciación.

La especie de no-*A. baumannii* que se identificó mayor número de veces por MALDI-TOF fue *A. pitii* (19 veces) pero esto sólo se confirmó mediante secuenciación en el 42.1% de los casos. Además de los anteriores, el aislado A109 se identificó como *A. junii* por ambas técnicas. En este último caso, el valor de *score* obtenido en la lectura por MALDI-TOF MS fue superior a 2.4.

De los 32 aislados que se estudiaron tanto por espectrometría de masas como por secuenciación del gen *rpoB* el 51.6% fue identificado correctamente por MALDI-TOF, considerando la secuenciación como la técnica de referencia. Si atendemos sólo a los identificados como *A. baumannii*, este valor asciende hasta el 77.8%. Comparando con la secuenciación, la espectrometría de masas presentaría una sensibilidad del 100% y una especificidad del 91.7% para la identificación de *A. baumannii*. En cuanto a los valores predictivos positivos y negativos serían el 77.8% y el 100% respectivamente. No obstante, hay que tener en cuenta el escaso número de aislados de *A. baumannii* (n=7) analizados por los dos métodos. Si comparamos entonces los resultados de la amplificación de la enzima OXA-51-like con los de MALDI-TOF los valores predictivos positivo y negativo anteriores se modifican siendo del 97.7% y del 100% respectivamente. El valor estadístico de estos datos es mayor que el de la comparación de la espectrometría de masas con la secuenciación al incluir un mayor número de aislados (n=109).

- Aislados distintos de *A. baumannii*

Las distintas pruebas de identificación revelaron la presencia de 25 aislados pertenecientes a una especie de *Acinetobacter* distinta de *A. baumannii*. Éstos se aislaron principalmente de muestras de piel y tejidos blandos (n=11) así como de muestras del tracto respiratorio superior (n=6) y orinas (n=4). Además, estos microorganismos estuvieron presentes también en muestras de catéter (n=1), herida quirúrgica (n=1), prótesis (n=1) y uña (n=1). No se observó ninguna asociación entre la especie identificada y el tipo de muestra del que se aisló el microorganismo. De este modo, *A. pitii* (n=8) y *A. berezinae*/*A. genomospecies 10* (n=7), que fueron las especies aisladas con mayor frecuencia, se obtuvieron de

muestras de piel y tejidos blandos (n=3), orina (n=3), esputo (n=1) y uña (n=1) la primera y de esputo (n=3), catéter (n=1), exudado (n=1), herida quirúrgica (n=1) y orina (n=1) la segunda.

Ocho de los pacientes con aislados distintos de *A. baumannii* estuvieron ingresados en el hospital en los servicios de cirugía general (n=2), oncología (n=2), angiología y cirugía vascular (n=1), urología (n=1), medicina interna (n=1) y nefrología (n=1) mientras que los 16 restantes acudieron a su centro de atención primaria (n=7) o a las consultas externas del hospital (n=9).

### ➤ Pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos

- Método de dilución en agar

Los resultados de las pruebas de sensibilidad frente a los distintos antimicrobianos realizadas mediante el método de dilución en agar se detallan en la tabla 7.

Los puntos de corte utilizados para el estudio corresponden a los aconsejados por el CLSI en el año 2010 para todos los antimicrobianos, a excepción de rifampicina, sulbactam y tigeciclina. Al no especificarse en el CLSI los valores para estos tres antimicrobianos se adoptaron los aconsejados por la CA-SFM en el caso de los dos primeros [146]. Sin embargo, ninguna de las guías (CLSI, EUCAST, CA-SFM) define el punto de corte para la tigeciclina por lo se utilizó el valor de  $\leq 2$  para los aislados sensibles y  $\geq 8$  para los resistentes, como recogen los estudios más recientes [147].

Las tetraciclinas y la tigeciclina, junto con la colistina fueron los antimicrobianos que menores CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> mostraron de entre todos los grupos testados. Las primeras presentaron el mayor número de aislados sensibles oscilando entre el 93.9% para la minociclina y el 99.2% para la tigeciclina, mientras que el porcentaje de sensibles a la colistina fue ligeramente menor (90.8%).

**Tabla 7.** Valores de CMI obtenidos, incluyendo CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>, para los 130 aislados incluidos en el estudio. Porcentaje de aislados sensibles, con sensibilidad intermedia y resistentes a todos los antibióticos ensayados.

<b>Antibiótico</b>	<b>CMI<sub>50</sub></b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>	<b>Rango CMI</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>% S</b>	<b>% I</b>	<b>% R</b>
IPM	32	512	0.25->512	39.7	0.8	59.5
MEM	4	256	<0.12-512	59.5	2.3	38.2
CTX	256	512	<0.12->512	24.0	3.9	72.1
CAZ	64	>512	0.5->512	32.6	3.9	63.6
FEP	32	256	0.5->512	35.7	12.4	51.9
SUB	4	32	0.25-128	51.2	27.1	21.7
SAM	16	64	1-512	41.1	11.6	47.3
TZP	64	512	4->512	37.4	22.9	39.7
AMK	8	256	0.12-512	66.7	1.6	31.8
GEN	512	>512	0.12->512	31.8	10.1	58.1
MIN	0.25	4	<0.12-32	93.9	3.1	3.1
DOX	1	4	<0.12-64	97.7	2.3	0
TIG	1	2	<0.12-8	99.2	0	0.8
LVX	8	32	<0.12-64	31.8	9.3	58.9
RIF	4	16	1-512	79.8	14.0	6.2
COL	1	2	0.5-32	90.8	0	9.2

De todos los betalactámicos ensayados los que mostraron menor actividad fueron las cefalosporinas de 2<sup>a</sup> generación, seguidas de las de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup>. Las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas obtuvieron valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> similares a los de las cefalosporinas mientras que el sulbactam solo resultó ser más activo que su combinación con ampicilina. De los dos carbapenemes, el que mostró mayor número de aislados sensibles fue el meropenem, sin embargo, ambos antibióticos obtuvieron valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> elevados. Los aminoglucósidos mostraron una actividad reducida, especialmente la gentamicina. La rifampicina presentó un valor de CMI<sub>50</sub> igual al punto de corte, sin embargo la CMI<sub>90</sub> fue superior a éste. A pesar de este dato, el 79.8% de los aislados resultaron sensibles a este antibiótico.

Las tablas 8 y 9 incluyen los resultados de las pruebas de sensibilidad antibiótica realizadas por el método de dilución en agar diferenciando entre aislados de *A. baumannii* (tabla 8) y otras especies del género (tabla 9).

En el caso de las especies distintas de *A. baumannii* el porcentaje de aislados sensibles fue mayor que el de *A. baumannii*, oscilando entre el 60 y el 100% para todos los antibióticos ensayados. Sólo la resistencia a colistina resultó mayor en este grupo. El resto de los antibióticos siguieron la misma distribución que el conjunto de los 130 aislados ensayados.

**Tabla 8.** Valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> obtenidos para los 105 aislados de *A. baumannii* incluidos en el estudio y porcentajes de sensibilidad y resistencia a los distintos antimicrobianos.

Antibiótico	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)	Rango CMI (µg/ml)	% S	% I	% R
IPM	64	512	0.12-512	28	0.9	70.8
MEM	8	256	<0.12-512	51.9	1.9	46.2
CTX	256	>512	1->512	15.4	0	84.6
CAZ	128	>512	0.5->512	19.2	4.8	76.0
FEP	64	256	1->512	23.1	13.5	63.5
SUB	8	32	0.25-128	59.6	0	40.4
SAM	32	128	2-512	28.8	14.4	56.7
TZP	64	512	4-512	26.4	24.5	49.1
AMK	16	256	0.5-512	59.6	1.0	39.4
GEN	512	>512	0.5->512	17.3	11.5	71.2
MIN	0.25	4	>0.12-32	92.5	3.8	3.8
DOX	2	4	>0.12-64	97.2	0	2.8
TIG	2	2	>0.12-8	99.0	0	0.1
LVX	8	32	>0.12-64	18.3	10.6	71.2
RIF	4	16	1-512	75.0	17.3	7.7
COL	1	2	0.5-32	95.2	0.0	4.8

**Tabla 9.** Resultados de CMI obtenidos para los aislados distintos de *A. baumannii*. La tabla muestra los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> así como los porcentajes de aislados sensibles, con sensibilidad intermedia y resistentes.

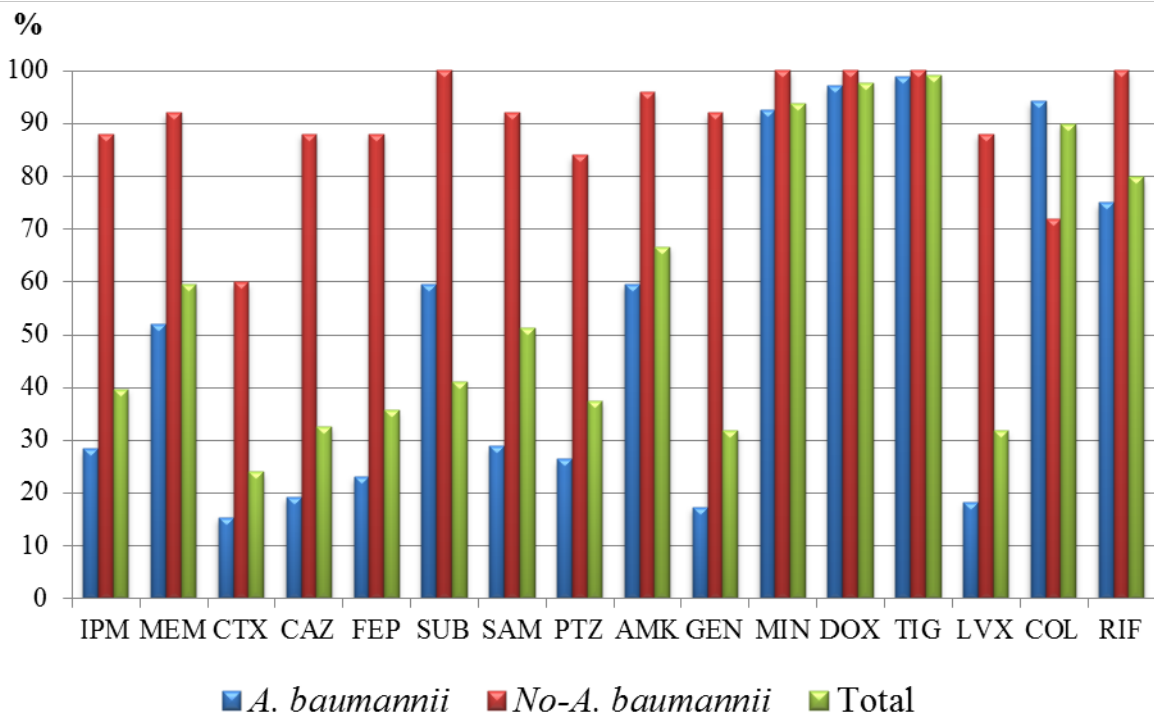
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI<sub>50</sub> (µg/ml)</b>	<b>CMI<sub>90</sub> (µg/ml)</b>	<b>Rango CMI (µg/ml)</b>	<b>% S</b>	<b>% I</b>	<b>% R</b>
IPM	1	32	0.25-256	88	0	12
MEM	0.5	4	<0.12-256	92	4	4
CTX	8	32	4-256	60	20	20
CAZ	4	128	2-512	88	0	12
FEP	4	16	0.5-256	88	8	4
SUB	1	2	0.25-8	100	0	0
SAM	4	32	1-32	92	0	2
TZP	16	32	4-64	84	16	0
AMK	1	4	0.12-32	96	4	0
GEN	0.5	4	0.12->512	92	4	4
MIN	0.1	0.5	<0.12-1	100	0	0
DOX	0.1	0.25	<0.12-0.5	100	0	0
TIG	0.12	0.25	<0.12-1	100	0	0
LVX	0.12	4	<0.12-16	88	4	8
RIF	4	4	1-4	100	0	0
COL	2	8	1-8	72	0	28

Atendiendo a los carbapenemes el meropenem presentó mayor número de aislados susceptibles que el imipenem en ambos conjuntos aunque la CMI<sub>90</sub> sólo estuvo por debajo del punto de corte en los aislados distintos de *A. baumannii*. En el grupo de las cefalosporinas se observó una resistencia reciente según fueran de 4<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> generación. No obstante, el porcentaje de aislados de *A. baumannii* sensibles a estos antimicrobianos no alcanzó el 25% ni siquiera en el caso del cefepime que fue la cefalosporina más activa. El grupo de los no-*A. baumannii* presentó un 88% de aislados sensibles frente a este antibiótico. En ambos conjuntos la sensibilidad a la piperacilina-tazobactam fue menor que a la ampicilina-sulbactam. Asimismo, este antibiótico, resultó menos activo que el sulbactam sólo. La principal diferencia de sensibilidad entre las especies de *A. baumannii* y no *A. baumannii* apareció en el grupo de los aminoglucósidos y el

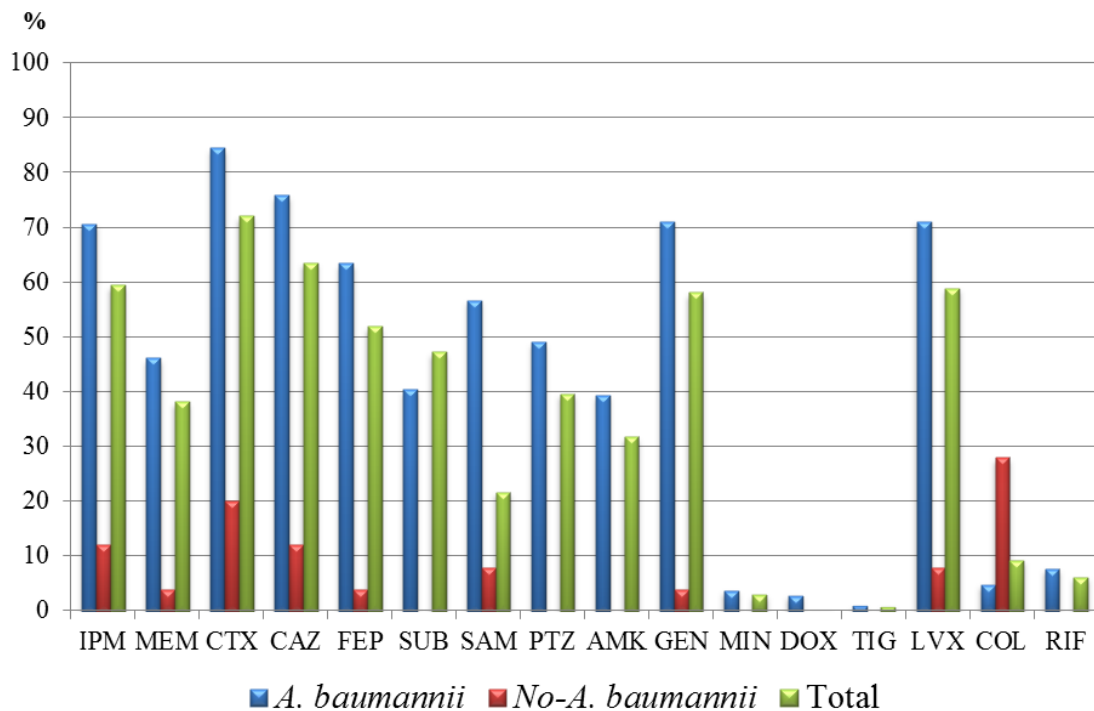
de las quinolonas donde un porcentaje muy reducido de aislados de *A. baumannii* (31.8%) resultó sensible a estos antibióticos.

Todas las especies presentaron una gran sensibilidad a las tetraciclinas y a la tigeciclina siendo el 100% de los no-*A. baumannii* sensibles a las mismas. En cuanto a los *A. baumannii* la tigeciclina se mostró más activa que la minociclina y la doxiciclina. La rifampicina mostró también buen perfil de actividad frente a ambos grupos. El 100% de los aislados de no-*A. baumannii* resultaron sensibles. En el caso de *A. baumannii* este porcentaje fue algo menor (75%) pero la CMI<sub>50</sub> se mantuvo por debajo del punto de corte.

En las figuras 23 y 24 se muestra la relación de aislados sensibles y resistentes de *A. baumannii* y otras especies del género a los distintos antimicrobianos.



**Figura 23.** Porcentaje de aislados sensibles a los antimicrobianos ensayados por la técnica de dilución en caldo. En la figura se incluyen los valores para *A. baumannii* y las especies distintas de *A. baumannii*, así como el porcentaje total de aislados sensibles.



**Figura 24.** Porcentaje de aislados de *A. baumannii* y no-*A. baumannii* resistentes a los antibióticos ensayados según la técnica de dilución en caldo. El gráfico muestra también el porcentaje total de aislados resistentes independientemente del género.

- Método de Epsilon-test

Los resultados de sensibilidad obtenidos mediante el método del Epsilon-test se muestran en la tabla 10.

Los puntos de corte para el imipenem y el meropenem utilizados en el estudio corresponden a los aconsejados por el CLSI en el año 2010 [148]. En cuanto al doripenem se siguieron los criterios del EUCAST 2013 al no aparecer recogidos en el CLSI. Para el ertapenem se establecieron únicamente los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> al no recogerse puntos de corte para *Acinetobacter* spp. en ninguna de las guías.

La CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> resultó mayor de 32 µg/ml para los cuatro carbapenemes ensayados, siendo el porcentaje de aislados sensibles de orden similar en todos los casos (42.0% para el imipenem y 41.2% doripenem y meropenem).

**Tabla 10.** Estudio de sensibilidad a los carbapenemes (imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem) mediante E-test.

<b>Antibiótico</b>	<b>CMI<sub>50</sub>(µg/ml)</b>	<b>CMI<sub>90</sub>(µg/ml)</b>	<b>Rango(µg/ml)</b>	<b>% S</b>	<b>% I</b>	<b>% R</b>
Imipenem	>32	>32	0.094->32	42	0	58
Meropenem	>32	>32	0.094->32	41.2	0.8	58
Doripenem	>32	>32	0.064->32	41.2	3.9	54.9
Ertapenem	>32	>32	0.5->32	-	-	-

- Método de dilución en caldo

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para el estudio de sensibilidad a los carbapenemes (imipenem, meropenem y doripenem) por el método de dilución en caldo.

Los puntos de corte utilizados para el estudio corresponden a los aconsejados por el CLSI en el año 2010 [148] para el imipenem y el meropenem y para el doripenem los recogidos en el EUCAST 2013.

**Tabla 11.** Estudio de la CMI a los carbapenemes (imipenem, meropenem y doripenem) por la técnica de dilución en caldo.

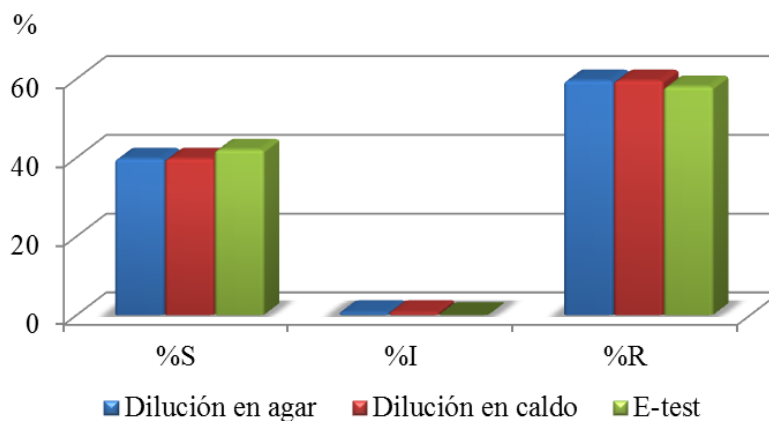
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI<sub>50</sub>(µg/ml)</b>	<b>CMI<sub>90</sub>(µg/ml)</b>	<b>Rango(µg/ml)</b>	<b>% S</b>	<b>% I</b>	<b>% R</b>
Imipenem	64	512	<0.5-512	39.7	0.8	59.5
Meropenem	8	256	<0.5-256	42.0	19.8	38.2
Doripenem	16	512	<0.5-512	34.4	6.1	59.5

El imipenem fue el antibiótico que mayor CMI<sub>50</sub> mostró seguido del doripenem. Este valor sólo fue inferior al punto de corte en el caso del meropenem. Sin embargo, la CMI<sub>90</sub> superó los 256 µg/ml en los tres casos. El mayor porcentaje de aislados sensibles se obtuvo con el meropenem (42%) y el menor con el imipenem (34.4%).

- Comparación de las técnicas de determinación de sensibilidad a los carbapenemes: dilución en agar, Epsilon-test y dilución en caldo.

La sensibilidad a los carbapenemes se determinó mediante las técnicas de dilución en agar, dilución en caldo y E-test y posteriormente se compararon los resultados obtenidos por los tres métodos.

Los porcentajes de sensibilidad obtenidos para el imipenem fueron similares en todos los casos. Las técnicas de dilución, tanto en caldo como en agar, clasificaron un 40% de los aislados como sensibles. Este valor se incrementó un 2% al utilizar la técnica de E-test (figura 25).

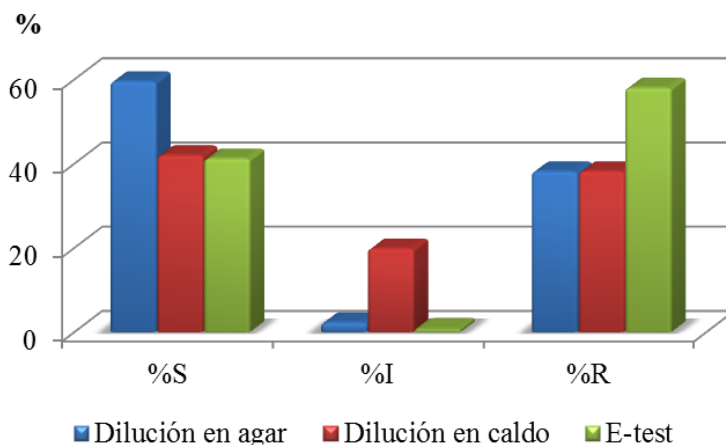


**Figura 25.** Comparación de los valores de sensibilidad obtenidos para el imipenem según la técnica empleada, dilución en agar, dilución en caldo y E-test.

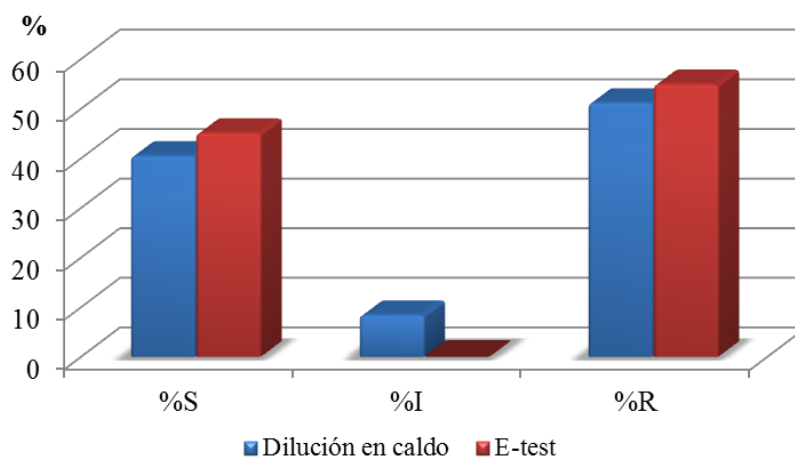
Las mayores discrepancias entre los distintos métodos aparecieron al analizar el meropenem, encontrándose las diferencias más importantes entre la técnica de dilución en agar y las tiras de E-test. Así, frente al 38.2% de aislados resistentes por la técnica de dilución se obtuvo un 58% cuando se emplearon las tiras de E-test.

El estudio comparativo de las dos técnicas de dilución (microdilución y dilución en agar) reveló idéntico porcentaje de microorganismos resistentes (38.2%). Sin embargo, la distribución de *Acinetobacter* no-resistentes varió entre una técnica y otra, encontrándose un 60% de aislados sensibles cuando el método

empleado fue el de dilución en agar frente a un 42% cuando el análisis se realizó mediante dilución en caldo. En este último caso, el 20% restante correspondió a aislados con sensibilidad intermedia (figura 26).



**Figura 26.** Estudio de sensibilidad al meropenem mediante las técnicas de dilución en agar, dilución en caldo y E-test.



**Figura 27.** Comparación de los valores de sensibilidad obtenidos para el doripenem por las técnicas de dilución en caldo y E-test.

El doripenem no se estudió por la técnica de dilución en agar al ser tan solo la técnica de dilución en caldo la recomendada por las guías. Los resultados obtenidos para el doripenem por las técnicas de dilución en caldo y E-test fueron de orden similar. Sólo el 8.4% de los aislados se clasificaron de forma diferente

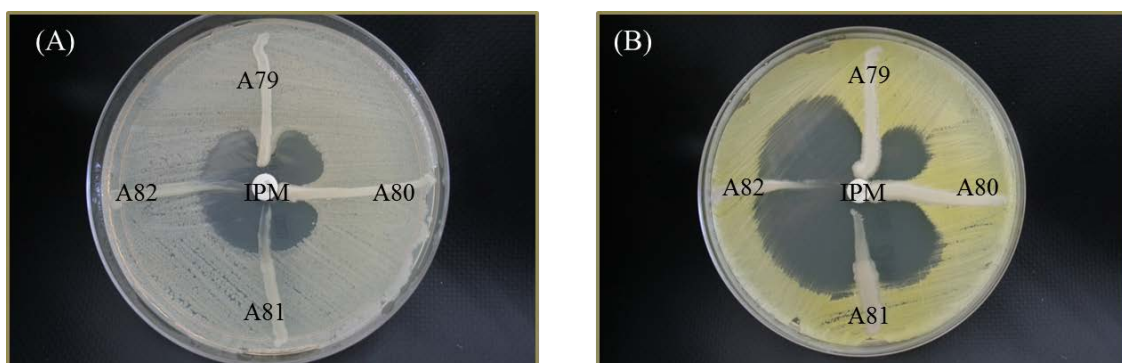
según la técnica. Así, la técnica de dilución en caldo los identificó con sensibilidad intermedia mientras que la de E-test dividió este porcentaje en sensibles (4.6%) y resistentes (3.8%) (figura 27).

Por último, el ertapenem se estudió mediante tiras de E-test. Sin embargo, no se realizaron estudios comparativos al tratarse de un antibiótico no eficaz para el tratamiento de *Acinetobacter* spp. Tan sólo un 6.1% de los aislados presentaron una CMI  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , que es el punto de corte para el doripenem sugerido por el EU CAST 2013. Tanto la CMI<sub>50</sub> como la CMI<sub>90</sub> resultaron mayores de 32  $\mu\text{g/ml}$ .

### ➤ Pruebas fenotípicas para determinación de carbapenemasas

- Test de Hodge modificado

El test de Hodge modificado permitió identificar de forma preliminar los aislados portadores de carbapenemasas. Ochenta y nueve aislados de los 130 analizados resultaron positivos para esta prueba al presentar crecimiento de la cepa sensible (*E. coli* o *M. luteus*) próximo al disco de antibiótico. Este fenómeno se produce gracias a la inactivación del imipenem por las carbapenemasas presentes en determinadas cepas.



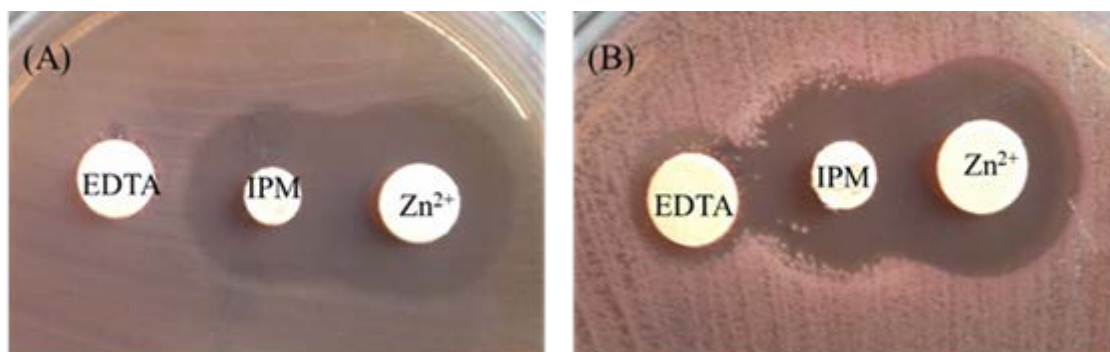
**Figura 28.** Test de Hodge para 4 aislados de *Acinetobacter* spp. En la figura se aprecia con claridad la distinta intensidad de la respuesta enzimática según se realice el ensayo con *E. coli* (A) o con *M. luteus* (B) como cepa sensible. Los aislados A79 y A80 presentan un resultado positivo en los dos ensayos mientras que A81 y A82 son negativos en ambos casos.

El resultado del test con *E. coli* fue más o menos claro según la actividad hidrolítica de la enzima presente en cada aislado. Sin embargo, este efecto fue más marcado cuando se realizó el test con *M. luteus* al presentar una invaginación más pronunciada (figura 28). La realización de este ensayo en paralelo con el del *E. coli* permitió establecer los resultados de la prueba de forma inequívoca.

- Test de sinergia de doble disco

De los 89 aislados analizados, tan sólo 2 (A93 y A107) resultaron positivos para esta prueba lo que sugiere la presencia de alguna enzima de la familia de las metalobetalactamasas.

El ensayo se consideró positivo en aquellos casos en los que se observó una deformación del halo de inhibición originado por el antibiótico (imipenem y meropenem) tanto en presencia de  $ZnSO_4$  (achatación del halo) como de EDTA y DPA (aumento del tamaño del halo) (figura 29).



**Figura 29.** Test de sinergia de doble disco en medio agar McConkey. (A) El aislado A93 presenta un test positivo al originarse un ensanchamiento del halo del imipenem por acción del  $Zn^{2+}$ . (B) Los halos de inhibición observados en el caso del aislado A102 no presentan ningún tipo de deformación en presencia del  $Zn^{2+}$  o del EDTA por lo que el resultado se considera negativo.

Además, se realizó este mismo ensayo analizando el efecto de cada compuesto por separado. Así, se observó que en los dos casos positivos la suplementación de los discos de antibiótico con  $ZnSO_4$  potenciaba la actividad enzimática. Esto originaba un halo de menor tamaño mientras que la acción quelante del EDTA y el DPA inhibía la enzima generando un halo mayor que el

del antibiótico solo. Este último ensayo reveló la presencia de colonias aisladas dentro de los halos de inhibición lo que sugiere la presencia de un fenómeno de heterorresistencia.

### ➤ Clasificación de los aislados

Los distintos aislados incluidos en el estudio se clasificaron según distintos criterios: perfil de resistencia a los antimicrobianos (antibiotipia), secuencia de la enzima OXA-51-like, presencia de carbapenemasas de la clase B y D o perfil de bandas en la electroforesis de campo pulsado.

- Antibiotipia

Los 130 aislados de *Acinetobacter* se agruparon inicialmente atendiendo a los valores de CMI obtenidos para los diferentes antimicrobianos testados, prestando especial atención a los carbapenemes. Así, pudieron establecerse los 8 grupos diferentes que se detallan a continuación (tabla 12).

- Grupo I (A)

Comprende 10 aislados de *A. baumannii* resistentes a imipenem y con sensibilidad intermedia a meropenem. Todos fueron resistentes a cefalosporinas, aunque los valores de CMI variaron según la generación de las mismas, siendo próximos al punto de corte en las cefalosporinas de 3ª generación. Del mismo modo, todos los aislados presentaron una sensibilidad intermedia a la combinación de piperacilina con tazobactam. Sin embargo, resultaron sensibles tanto frente a la asociación de ampicilina con sulbactam como al sulbactam solo. Las quinolonas mostraron una CMI superior al punto de corte, pero no las tetraciclinas, la tigeciclina ni la colistina, que resultaron activos frente a todos los aislados. En cuanto a la rifampicina, tan sólo dos aislados presentaron una CMI por debajo del punto de corte (A113 y A119). La mayoría de los aislados fueron sensibles a la amikacina y presentaron una sensibilidad intermedia a la gentamicina. Dentro de este grupo I hay que destacar el aislado A119 por

presentar una CMI a normalmente elevada a los aminoglucósidos (AMK=256 µg/ml y GEN >512 µg/ml) muy por encima de lo obtenido para el resto de los aislados del grupo.

#### o Grupo II (B.1)

Este grupo está formado por 10 aislados de *A. baumannii* con alto nivel de resistencia tanto al imipenem como al meropenem. Los valores de CMI para las cefalosporinas variaron según la generación del antibiótico. Así, todos los aislados resultaron resistentes a la cefotaxima, mientras que algunos fueron sensibles a la ceftazidima (A67, A71 y A79) y el cefepime (A59, A67, A71 y A79). Aparecieron además altos niveles de resistencia a la piperacilina-tazobactam en todos los aislados. Dentro de este grupo se observó gran variabilidad en cuanto a su sensibilidad frente a la ampicilina-sulbactam, detectándose tanto aislados sensibles, como con sensibilidad intermedia y resistentes. El sulbactam solo mostró mejores resultados que en asociación encontrándose tan sólo 3 aislados (A68, A73 y A75) resistentes a este antibiótico. Las quinolonas y los aminoglucósidos mostraron poca actividad y en la mayoría de los casos los aislados fueron resistentes a ambos grupos de antimicrobianos. La CMI para la amikacina resultó menor que la de gentamicina en todos los casos. Tan solo un aislado, A116, presentó valores inferiores al punto de corte para los aminoglucósidos. Cuatro aislados fueron resistentes a la rifampicina, tres de ellos con valores de CMI muy elevados (A68, A73 y A75). Éstos asociaban también resistencia de alto nivel a otros antibióticos. Todos los aislados fueron sensibles a la colistina (rango de CMIs 1-2 µg/ml), la tigeciclina y las tetraciclinas con valores iguales o inferiores a 4 µg/ml en el último caso.

#### o Grupo III (B.2)

Incluye 11 aislados de *A. baumannii* sensibles tanto al imipenem como al meropenem. A la igual que en otros casos, los valores de CMI para las cefalosporinas aumentaron según la generación de las mismas. Todos los aislados fueron resistentes a la cefotaxima y a la ceftazidima, a excepción de A74 que fue

sensible a este último. En cuanto a la cefepime, la mayoría de los aislados se mantuvieron sensibles o con valores intermedios y sólo tres casos fueron resistentes, A35, A37 y A44, el primero de ellos con resistencia de alto nivel.

El sulbactam resultó activo frente a todos los aislados y las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas también mostraron buena actividad. Todos los aislados fueron sensibles o mostraron sensibilidad intermedia a estos antibióticos. La rifampicina, la colistina, las tetraciclinas y la tigeciclina presentaron valores de CMI por debajo del punto de corte en todos los casos. Sólo un aislado, A19, fue sensible a levofloxacino. Atendiendo a los aminoglucósidos, la CMI para la gentamicina fue siempre superior a la de la amikacina. Sólo un aislado, A37, presentó sensibilidad intermedia al primero mientras que los demás resultaron resistentes, en su mayoría con resistencia de alto nivel. La amikacina fue activa frente a todo el grupo a excepción de un aislado, A23, que tuvo sensibilidad intermedia.

#### o Grupo IV (C)

Dentro de este grupo se engloban 16 aislados de *A. baumannii* resistentes a imipenem (CMI 32-64 µg/ml) pero sensibles a meropenem (CMI 4 µg/ml). La CMI para las cefalosporinas (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> generación) fue en todos los casos superior al punto de corte con valores más bajos para la cefepime. Sólo un aislado, A45, presentó sensibilidad intermedia a este último antibiótico. Su CMI para la ceftazidima fue también menor que la del resto del grupo. La piperacilina-tazobactam mostró mejores resultados que las cefalosporinas encontrándose la mayoría de los aislados próximos al punto de corte. Once aislados de este grupo tuvieron sensibilidad intermedia a este antibiótico. La ampicilina-sulbactam no resultó activa frente a ningún aislado, aunque las CMI variaron de unos a otros. Diez aislados fueron sensibles al sulbactam y 6 resistentes, lo que indica que este antibiótico obtuvo mejores resultados que su combinación con ampicilina. La mayoría de los aislados resultaron también resistentes a quinolonas aunque con valores de CMI diversos. En cuanto al grupo de los aminoglucósidos, todos los aislados presentaron alto nivel de resistencia a gentamicina mientras que fueron

en su mayoría sensibles a la amikacina salvo A 3, A 10, A 14 y A 43. Tanto las tetraciclinas como la tigeciclina, la rifampicina y la colistina presentaron valores de CMI por debajo del punto de corte, con excepción de A 13 y A 29 que fueron resistentes a doxiciclina y colistina y A 45 sólo con resistencia a doxiciclina.

#### o Grupo V (D)

Comprende 38 aislados de *A. baumannii* con alto nivel de resistencia para la mayoría de los antibióticos ensayados. La CMI para el imipenem fue del orden de una dilución mayor que para el meropenem, superando este último los 128 µg/ml en la mayoría de los casos. Sólo A 50, y A 78 presentaron una CMI a meropenem menor (CMI= 64 µg/ml) pero siempre por encima del punto de corte. Todos los aislados fueron resistentes a cefotaxima y en su mayoría también a ceftazidima y cefepime, aunque con este último se obtuvieron valores de CMI más bajos. Las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas tampoco resultaron activas y sólo A 26 fue sensible a piperacilina-tazobactam. Seis aislados (A 50, A 64, A 66, A 69, A 70 y A 78) fueron sensibles a sulbactam.

La mayor parte de los aislados presentó resistencia de alto nivel a los dos aminoglucósidos ensayados, con valores de CMI más elevados para la gentamicina. Sin embargo A 33, A 94, A 120, A 123, A 126 y A 129 mostraron valores próximos al punto de corte para ambos antibióticos y, en algunos casos, por debajo del mismo (A 33, A 94, A 120, A 126 y A 129 para la amikacina). La CMI para la rifampicina varió de unas muestras a otras detectándose tanto aislados sensibles como resistentes. Cabe destacar la resistencia de alto nivel presentada por A 94, A 120, A 123, A 126 y A 129. Atendiendo a las quinolonas sólo A 33 fue sensible a levofloxacino. Las tetraciclinas, tigeciclina y colistina fueron los antibióticos que mejores resultados mostraron al igual que había sucedido con otros grupos aunque también se encontraron aislados resistentes a estos compuestos. A 57 y A 64 fueron resistentes a colistina. A 33, A 125 y A 104 resultaron resistentes a doxiciclina y minociclina (A 104). Sin embargo, no se observaron resistencias a tigeciclina en ninguno de los aislados del grupo.

**Tabla 12.** Relación de aislados incluidos en cada grupo indicando los valores de CMI para el imipenem y el meropenem así como las carbapenemasas encontradas en cada uno de ellos.

Grupo (ATB)	Aislados	IMP (µg/ml)			MEM (µg/ml)			Carbapenemasa
		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango	
A (I)	A113, A114, A115, A117, A118, A119, A121, A122, A127, A130	32	32	16-32	8	8	4-8	OXA-51-like/ISAbal
B.1 (II)	A59, A61, A67, A68, A71, A73, A75, A79, A112, A116	>512	>512	256->512	128	256	64-256	OXA-51-like/ISAbal
B.2 (III)	A19, A23, A35, A37, A38, A40, A44, A46, A47, A48, A74	1	2	1-2	1	1	0.25-2	OXA-51-like/ISAbal
C (IV)	A2, A3, A6, A7, A10, A13, A14, A16, A18, A29, A31, A43, A45, A53, A80, A96	32	64	32-64	4	4	4	OXA-58
D (V)	A24, A26, A28, A30, A32, <b>A33*</b> , A34, A36, A39, A41, A42, A50, A57, A58, A60, A62, A64, A65, A66, A69, A70, A76, A78, A87, A90, A94, A97, A98, A99, A101, A103, A104, A105, A120, A123, A125, A126, A129	256	>512	256->512	256	256	64-512	OXA-24-like
E (VI)	A102, A124	64	64	64	8	8	8	-
F (VII)	A1, A4, A9, A11, A12, A20, A21, A22, A51 A52, A54, A55, A56, A63, A77, A81, A91, A110	1	2	0.25-2	0.25	1	<0.12-1	-
G (VIII)	A5, A8, A15, A17, A25, A27, A49, A72, A82, A83, A84, A85, A86, A88, A89, A92, A93, A95, A100, A106, A107, A108, A109, A111, A128	1	2	0.25-64	0.5	1	<0.12-8	-

\*Aislado portador de OXA-24-like y OXA-58

#### ○ Grupo VI (E)

Está formado por dos aislados de *A. baumannii* (A102 y A124) resistentes a imipenem y con sensibilidad intermedia al meropenem. Los dos fueron resistentes también a las cefalosporinas y a la piperacilina-tazobactam. A102 resultó sensible tanto a la sulbactam como a su combinación con ampicilina mientras que A124 no lo fue a ninguno de los dos. Ambos aislados fueron resistentes a la gentamicina pero sensibles a laamikacina, la tigeciclina y la colistina. La CMI de A102 para las dos tetraciclinas fue superior al punto de corte pero en el caso de A124 sucedió lo contrario. Por último, estos dos aislados fueron resistentes a levofloxacino pero sensibles a rifampicina.

#### ○ Grupo VII (F)

Dentro de este grupo se incluyeron 18 aislados de *A. baumannii* sensibles tanto al imipenem como al meropenem. Además, fueron en su mayoría sensibles también al resto de los antimicrobianos ensayados, con valores de CMI que oscilaban ligeramente de unos a otros.

A52, A63 y A77 fueron resistentes a levofloxacino y a las tres cefalosporinas testadas. En el caso de los dos últimos aislados la CMI para el cefepime fue mayor que para la ceftazidima. A52 presentó además resistencia a la ampicilina-sulbactam pero no a la piperacilina-tazobactam y también a la gentamicina, con un valor de CMI muy elevado. Por su parte, A77 asoció resistencia a la gentamicina, a la doxiciclina y a la tigeciclina pero no a la amikacina ni a la minociclina.

#### ○ Grupo VIII (G)

Está formado por 25 aislados de *Acinetobacter* no-*baumannii* sensibles en su mayoría a todos los antibióticos ensayados. Sólo A93 y A107 fueron resistentes a imipenem y el primero presentó además sensibilidad intermedia al meropenem. Estos dos aislados resultaron resistentes a las cefalosporinas de 1ª y

2ª generación con valores de CMI mayores para ésta última. Sin embargo, se mantuvieron sensibles al cefepime. A93 fue también resistente a la piperacilina-tazobactam y a la colistina mientras que A107 asoció resistencia a levofloxacin. Otros 8 aislados del grupo fueron resistentes a cefotaxima y de éstos tres presentaron sensibilidad intermedia al cefepime (A8, A17 y A88). A17 y A88 fueron además resistentes a la ampicilina-sulbactam. En cuanto a la piperacilina-tazobactam 5 aislados fueron resistentes a este antibiótico. Dentro de este grupo VIII se encontraron cinco aislados resistentes a colistina, cuatro de los cuales se identificaron como *A. berezinae* y el otro como *A. pitii*.

- Detección molecular de carbapenemasas

El análisis mediante PCR de las carbapenemasas de la clase D (CHDL) *bla<sub>OXA51-like</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-24-like</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, la *bla<sub>KPC</sub>* de la clase A y las de la clase B (MBL) *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>SIM</sub>* así como la presencia de la secuencia de inserción *ISAbal* corriente arriba del gen *bla<sub>OXA51-like</sub>* permitió realizar una primera caracterización molecular de los distintos aislados de l estudio. Estos resultados presentaron buena concordancia con lo obtenido anteriormente en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Los aislados del estudio se agruparon de la A a la G según la enzima que presentaron como se muestra en la tabla 12.

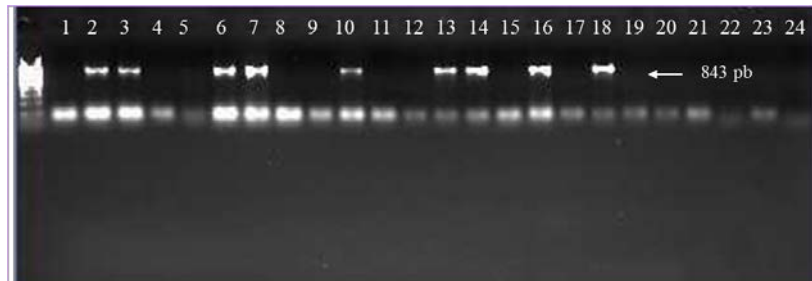
- Presencia de la enzima OXA-51-like ligada a la secuencia de inserción *ISAbal*

Todos los aislados identificados por técnicas moleculares como *A. baumannii* amplificaron la enzima OXA-51-like. Sin embargo, la secuencia de inserción *ISAbal* asociada corriente arriba al gen que codifica esta enzima se encontró solamente en los aislados con un perfil de antibiotipia I (A), II (B.1) y III (B.2). Aunque la secuencia de inserción *ISAbal* apareció a una distancia de 7 pb del inicio del gen *bla<sub>OXA-51-like</sub>* en todos los casos, los perfiles de resistencia a los carbapenemes variaron de unos aislados a otros. Así, los aislados de l

grupos I y II fueron resistentes tanto a la imipenem como a meropenem, el segundo de ellos con alto nivel de resistencia, mientras que los del grupo III fueron sensibles a ambos antibióticos.

### o Presencia de la enzima OXA-58

La enzima OXA-58 se identificó en los 16 aislados del grupo IV (C) (figura 30). Además, esta enzima apareció en otro aislado (A33) que no compartía el patrón de sensibilidad de los anteriores. El aislado A33 se había incluido en el grupo V al presentar alto nivel de resistencia a los carbapenemes.



**Figura 30.** Productos de amplificación de la enzima OXA-58 en un gel de agarosa al 1%. Las muestras 2, 3, 6, 7, 10, 13, 14, 16 y 18 presentan una banda del tamaño esperado.

### o Amplificación de la OXA-24-like

La OXA-24-like se encontró en 38 de los 130 aislados estudiados (figura 31). Todos han sido incluidos en el grupo V (D) según su patrón de sensibilidad a los antibióticos. En uno de los casos (A33) se identificó también la OXA-58.



**Figura 31.** Visualización de los productos de PCR de la OXA-24-like en un gel de agarosa al 1%. Las muestras 26, 28, 30, 32, 33 y 34 fueron positivas para este ensayo.

### ○ Amplificación de la OXA-23-like

Los resultados de la PCR para la OXA-23-like revelaron la presencia de una banda de aproximadamente 1062 pb en 24 aislados en los que, además, se había obtenido una amplificación positiva para la OXA-24-like. Todos presentaron altos niveles de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos, principalmente los carbapenemes, y se incluyeron en el grupo V.

### ○ Detección de metalobetalactamasas

El análisis de las metalobetalactamasas IMP, VIM NDM y SIM mediante PCR llevado a cabo en los 130 aislados incluidos en el estudio mostró un resultado positivo para la IMP en 2 casos, A93 y A107. Ambos aislados fueron identificados como *A. berezinae* y se incluyeron en el grupo G (VIII) de los *Acinetobacter no-baumannii*. Además habían tenido un resultado positivo en el test de Hodge modificado así como en el de sinergia de doble disco.

### ○ Ausencia de enzimas CHDL y MBL en el análisis molecular

Como corresponde a su perfil de sensibilidad, el grupo de *A. baumannii* sensibles a los carbapenemes y la mayoría de los otros antimicrobianos (VII/F) no presentó ninguna de las enzimas ensayadas. Del mismo modo, todos los aislados distintos de *A. baumannii* incluidos en el grupo VIII mostraron un resultado negativo en el estudio de MBL y CHDL. Tan sólo los dos aislados con CMI para los carbapenemes superior al punto de corte (A93 y A107) amplificaron una MBL tipo IMP, como se detalla en el punto anterior.

Los aislados del grupo VI (E) tampoco presentaron ninguna carbapenemasa de las analizadas, contrariamente a lo que sugiere su patrón de resistencia. Así, tras analizar las enzimas que comúnmente confieren resistencia a los carbapenemes en el género *Acinetobacter*, se estudió en este grupo la presencia de la enzima KPC. Otros autores han descrito anteriormente el hallazgo de aislados de *A. baumannii* portadores de esta enzima que presentaban un perfil de resistencia similar al observado en nuestro caso. El resultado fue negativo en

todos los casos cualesquiera fueran las concentraciones de ADN molde utilizado. El aislado *K. pneumoniae* HCSC493 que se utilizó como control positivo del ensayo amplificó una banda del tamaño esperado lo que sugiere que no es esta enzima la responsable del fenotipo de resistencia observado.

- Secuenciación de la enzima *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

La secuenciación del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> se llevó a cabo en 74 aislados y permitió determinar el alelo de este gen que portaba cada uno de ellos.

Las principales OXA-51-like encontradas entre estos aislados fueron la OXA-64, la OXA-65, las enzimas del grupo de la OXA-66 y la OXA-71 (tabla 13).

**Tabla 13.** Variantes de la enzima OXA-51 encontradas en el estudio y relación con los distintos grupos en los que se han clasificado los aislados. Se indica el número de aislados con cada variante enzimática así como las CMI a los dos carbapenemes

OXA-51-like	ISAbal	Grupo/ATB	n	CMI <sub>IPM</sub> (µg/ml)	CMI <sub>MEN</sub> (µg/ml)
201	+	A/I	10	32	8
65	+	B.1/II	10	512	128
65	+	B.2/III	11	1-2	0.25-1
71	-	C, E/IV, VI	17	64	4
64	-	D/V	27	256->512	128-256
66	-	D, E/V, VI,	7	64-512	8-512
70	-	D/V	1	256	256
64-132	-	D/V	4	64-512	8-512
64, 65, 66, 67, 68, 71, 89, 93, 180, 208, 216	-	F/VII	18	0.25-2	<0,12-1
-	-	G/VIII	25	0.25-64	<0.12-8

La enzima OXA-64 fue la más prevalente del estudio encontrándose en más del 25% de los aislados (26.4%), lo que incluye 27 aislados del grupo D, portadores además de la OXA-24-like y un aislado del grupo F. La OXA-65

apareció en 21 aislados, 10 de ellos con un perfil de alto nivel de resistencia a los carbapenemes (grupo II/B.1) y los otros 11 con valores de CMI inferiores al punto de corte para estos antibióticos (grupo III/B.2). En ninguno de los casos se identificó alguna carbapenemasa adquirida y la OXA-65 fue la única enzima encontrada independientemente del patrón de sensibilidad. Esta variante de la OXA-51 se encontró también en un aislado del grupo F. En total el porcentaje de aislados que amplificó la OXA-65 fue del 20.8%. El 16.0% de los mismos presentaron una de las enzimas incluidas en el grupo de la OXA-66. Así, la OXA-201 se identificó en los aislados del grupo A, mientras que la OXA-66 se encontró en 8 aislados incluidos en los grupos D (A33, A94, A120, A124, A125, A126 y A129) y F (A77). En el primer caso no se detectó la presencia de ninguna otra enzima. Por el contrario, la OXA-66 apareció tanto en solitario como acompañada de la OXA-24-like (grupo D). Los 16 aislados del grupo C y uno del E (A102) amplificaron la enzima OXA-71, lo que supuso un 15.1% del total de todo el estudio. Además de la OXA-71 el grupo C presentó la OXA-58. Dentro del grupo F de *A. baumannii* sensible a los antimicrobianos se encontraron las enzimas OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-67, OXA-68, OXA-71, OXA-89, OXA-93, OXA-180, OXA-208 y OXA-216 resultando éste el grupo más heterogéneo de todos los analizados. Por último, 4 aislados del grupo D (A62, A66, A76 y A87) iguales entre ellos presentaron una OXA-51-like cuya secuencia de nucleótidos varió en una base respecto a la OXA-64 y a la OXA-132 como se aprecia en la figura 32.

Estas mutaciones puntuales a nivel de ADN se tradujeron en un cambio en la secuencia aminoacídica. La transición (G→C) que se observó con respecto a la secuencia de la OXA-64 resultó en un cambio en el aminoácido de la posición 38 (G→A) mientras que la transversión originada con respecto a la secuencia de la OXA-132 (T→C) supuso una sustitución del aminoácido en 48 (V→A). El aislado restante (A123), perteneciente al grupo D, presentó una variante, la OXA-70, no encontrada en ninguna otra muestra.

Resultados

```

A66      TATATAGTGACTGCTAATCCAAATCACAGCGCTTCAAAATCTGATGAAAAAGCAGAGAAA 61
OXA-132 TATATAGTGACTGCTAATCCAAATCACAGCGCTTCAAAATCTGATGAAAAAGCAGAGAAA 120
OXA-64  TATATAGTGACTGCTAATCCAAATCACAGCGCTTCAAAATCTGATGAAAAAGCAGAGAAA 120
*****

A66      ATTA AAAATTTATTTAACGAAGCACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAA 121
OXA-132 ATTA AAAATTTATTTAACGAAGTACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAA 180
OXA-64  ATTA AAAATTTATTTAACGAAGCACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAA 180
*****

A66      ACTCAACAAAGCTATGGTAATGATCTTGCTCGTGCTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCG 181
OXA-132 ACTCAACAAAGCTATGGTAATGATCTTGCTCGTGCTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCG 240
OXA-64  ACTCAACAAAGCTATGGTAATGATCTTGCTCGTGCTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCG 240
*****

A66      ACCTTCAAAATGCTTAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAA 241
OXA-132 ACCTTCAAAATGCTTAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAA 300
OXA-64  ACCTTCAAAATGCTTAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAA 300
*****

A66      GTATTTAAGTGGGACGGGCAAAAAAGGCTATTTCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTA 301
OXA-132 GTATTTAAGTGGGACGGGCAAAAAAGGCTATTTCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTA 360
OXA-64  GTATTTAAGTGGGACGGGCAAAAAAGGCTATTTCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTA 360
*****

A66      GGCGATGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCTGATTGGA 361
OXA-132 GGCGATGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCTGATTGGA 420
OXA-64  GGCGATGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCTGATTGGA 420
*****

A66      CTTGAACTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACC 421
OXA-132 CTTGAACTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACC 480
OXA-64  CTTGAACTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACC 480
*****

A66      CAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAG 481
OXA-132 CAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAG 540
OXA-64  CAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAG 540
*****

A66      TTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTG 541
OXA-132 TTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTG 600
OXA-64  TTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTG 600
*****

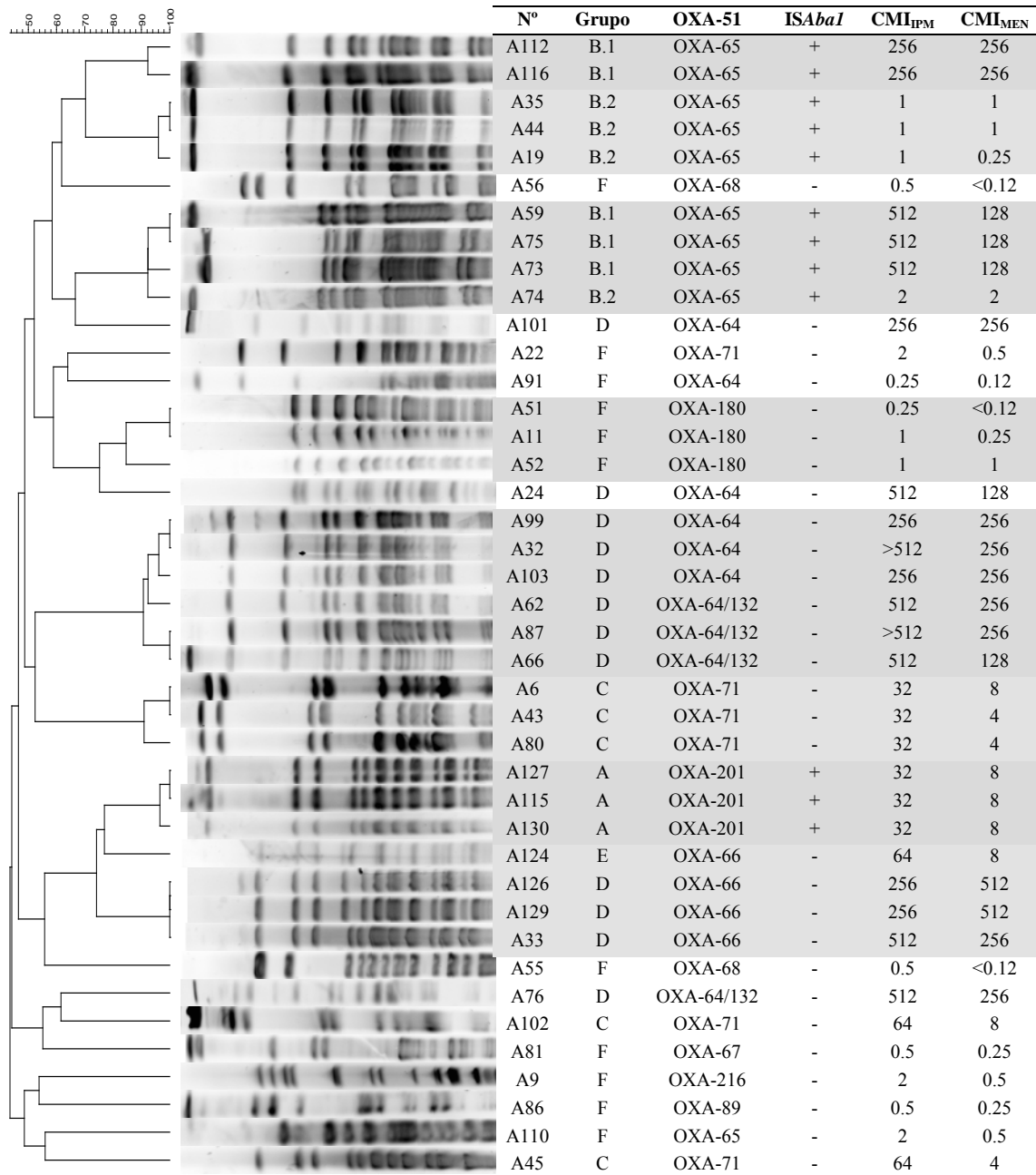
```

**Figura 32.** Alineamiento de la secuencia de la enzima OXA-51 del aislado A66 frente a las secuencias OXA-132 (EU547447.1) y OXA-64 (AY750907.1) incluidas en BLAST donde se aprecian los dos aminoácidos discordantes en A66 con respecto a las secuencias tipo (azul y amarillo).

El fragmento de inserción *ISAbal* sólo apareció ligado a la OXA-65 de los grupos B.1 y B.2 y a la OXA-201 del grupo A. Sin embargo, esta secuencia no se identificó asociada a estos alelos en los aislados del grupo D. La CMI observada a los carbapenemes en estos tres grupos varió de unos a otros. Entre ellos se encontraron tanto aislados sensibles (grupo B.2), como resistentes (grupo A) y con alto nivel de resistencia (grupo B.1), por lo que no queda clara la implicación de la secuencia *ISAbal* en la adquisición de resistencias a este grupo de antibióticos.

Dice (Opt:1.00%)(Tdd 1.0%-1.0%)(H&gt;0.0% S&gt;0.0%)[0.0%-100.0%]

ApaI



**Figura 33.** Aislados representativos de cada uno de los grupos de la OXA-51 obtenidos en el estudio. Se muestra además el patrón de bandas obtenido para cada uno de ellos en la electroforesis de campo pulsado. Los posibles grupos de aislados relacionados entre sí muestran una similitud  $\geq 87\%$  y aparecen sombreados en azul. CMI: CMI<sub>90</sub>  $\mu\text{g/ml}$ .

La presencia de los distintos tipos de la OXA-51-like detectados varió a lo largo del periodo de estudio. Los aislados que portaban la OXA-71 se consideraron un clon endémico puesto que se encontraron a lo largo de los tres años analizados, principalmente en servicios como la UCI o geriatría. Los clones de la OXA-64 y la OXA-65 fluctuaron entre 2008 y 2010. De este modo, los aislados portadores de la OXA-65 se encontraron con frecuencia en la UCI (16.6%) y en traumatología (33.3%) en 2008. Las medidas de control de la infección hicieron que en 2009 no se comunicase la presencia de aislados portadores de esta variante sin embargo, reaparecieron en 2010 aunque sólo el grupo de aislados resistentes (grupo B.1). Este mismo comportamiento se dio entre los aislados que presentaron la OXA-64, encontrándose la mayoría de ellos en la UCI (63.3%) en el año 2008 y volviendo a parecer en 2010 pero no en 2009. Los aislados que amplificaron la OXA-201 aparecieron únicamente en la UCI (50.0%) y en el servicio de medicina interna (40.0%) en forma de un pequeño brote de tres meses en el último año del estudio.

La figura 33 incluye los resultados del estudio de la OXA-51 indicando los valores de CMI obtenidos a los carbapenemes. Se recogen en ella también las distancias genéticas encontradas entre los aislados de un grupo y otro.

- Secuenciación de otras enzimas identificadas en el estudio

La secuenciación se llevó a cabo en un número representativo de aislados de cada grupo enzimático con el fin de corroborar los resultados obtenidos mediante PCR.

Dentro del grupo de la OXA-58 se seleccionaron 3 de los aislados con resultado positivo para la PCR. La comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos identificó los amplicones como OXA-58, confirmando la identidad de la enzima.

La secuenciación de la OXA-24-like se llevó a cabo en 16 aislados con PCR positiva. Dado que esta fue la enzima mayoritaria detectada por PCR se seleccionaron un mayor número de aislados para su secuenciación. La secuencia

parcial o obtenida permitió identificar la variante de la OXA-24 que presentaba cada aislado. La comparación de las secuencias con las incluidas en la base de datos (BLAST) reveló la presencia de la OXA-72 en la mayoría de los aislados analizados mientras que un pequeño porcentaje se asemejaba más a la OXA-207 (figura 34).

```

OXA-72  TTCTAGCGACTTATAAGTAATTTTCATTACGAATAGAACCAGACATTCCTTCTTTCATTTTC  80
A99     TTCTAGCGACTTATAAGTAATTTTCATTACGAATAGAACCAGACATTCCTTCTTTCATTTTC  120
OXA-207 TTCTAGCGACTTATAAGTAATTTTCATTACGAATAGAACCAGACATTCCTTCTTTCATTTTC  78
*****

OXA-72  TAAGTTGAGCGAAAAGGGGATTTTTTTTCCATTAGCTTGCTCCACCCAACCAGTCAACCA  140
A99     TAAGTTGAGCGAAAAGGGGATTTTTTTTCCATTAGCTTGCTCCACCCAACCAGTCAACCA  180
OXA-207 TAAGTTGAGCGAAAAGGGGATTTTTTTTCCATTAGCTTGCTCCACCCAACCAGTCAACCA  138
*****

OXA-72  ACCTACCTGTGGAGTAACATCCATTCCCCATCCACTTTTTGCATAAAATCTTACTACCATT  200
A99     ACCTACCTGTGGAGTAACATCCATTCCCCATCCACTTTTTGCATAAAATCTTACTACCATT  240
OXA-207 ACCTACCTGTGGAGTAACACCATTCCCCATCCACTTTTTGCATAAAATCTTACTACCATT  198
*****

OXA-72  TACTTCTTTAATTAGAAGCATTTTTTTAACTTCTTCTTGAGTTTCTAATTTAAAAGGTAA  260
A99     TACTTCTTTAATTAGAAGCATTTTTTTAACTTCTTCTTGAGTTTCTAATTTAAAAGGTAA  300
OXA-207 TACTTCTTTAATTAGAAGCATTTTTTTAACTTCTTCTTGAGTTTCTAATTTAAAAGGTAA  258
*****

OXA-72  TCGGTTATGTGCAAGGTCATCGGCAAAATTAACCTTCTTGTACTGGTGTAATTTTAAGGGG  320
A99     TCGGTTATGTGCAAGGTCATCGGCAAAATTAACCTTCTTGTACTGGTGTAATTTTAAGGGG  360
OXA-207 TCGGTTATGTGCAAGGTCATCGGCAAAATTAACCTTCTTGTACTGGTGTAATTTTAAGGGG  318
*****

OXA-72  GCCAACTAACCAAAAATTATCGACCTGTGTTCCAATATTTGTATTTCCAAAATTAACCCG  380
A99     GCCAACTAACCAAAAATTATCGACCTGTGTTCCAATATTTGTATTTCCAAAATTAACCCG  420
OXA-207 GCCAACTAACCAAAAATTATCGACCTGTGTTCCAATATTTGTATTTCCAAAATTAACCCG  378
*****

```

**Figura 34.** Fragmento de la secuencia de la OXA-24-like de un aislado representativo (A99) frente a la OXA-72 (JX968505.1) y la OXA-207 (JQ838185.1) incluidas en BLAST. El fragmento incluye los aminoácidos que varían de una secuencia tipo a la otra (sombreado).

Para confirmar la presencia de la OXA-23-like se secuenciaron 10 de las muestras que mostraron una banda de tamaño compatible tras la PCR. En todos los casos se obtuvo una secuencia de tamaño menor al esperado y tras su lectura se comprobó que no se trataba de una OXA-23-like como sugería el resultado de la PCR. Todas las secuencias fueron similares entre sí y su comparación con las base de datos reveló una homología del 90-95% con proteínas de membrana implicadas en el transporte de hierro, relacionadas con receptores dependientes de TonB (figura 35).

## Resultados

```

TonB  ACATGGCGGTCCATGGATTGACTTAAAGTCTGAGCGTTATGATTTTAAAACCGAGTTAAA 172
A50   ACATGGCGGTCCATGGATTGACTTAAAGTCTGAGCGTTATGATTTTAAAACCGAGTTAAA 179
*****

TonB  CGATCCATTTGCAGGCTTCCAAAAGTTACGTGCCAAGCGAGCTATACAGATTATCAGCA 232
A50   CGATCCATTTGCAGGCTTCCAAAAGTTACGTGCCAAGCGAGCTATACAGATTATCAGCA 239
*****

TonB  TGATGAGATTGAAGAAGGGGCAATCGCAACTCGATTCCAAAACAAAGGTTATGATGGGCG 292
A50   TGATGAGATTGAAGAAGGGGCAATCGCAACTCGATTCCAAAACAAAGGTTATGATGGGCG 299
*****

TonB  TATTGAGTTAGTCCATAACCCTATTGCTGATTGGGAAGGGGTAATTGGTACCCAGTTAGG 352
A50   TATTGAGTTAGTCCATAACCCTATTGCTGATTGGGAAGGGGTAATTGGTACCCAGTTAGG 359
*****

TonB  CCAACAAAACTAAATTTAACTGGTGAAGAGGCATTTATGGCACCGACCCTACCAAAA 412
A50   CCAACAAAA-CTAAATTTAACTGGTGAAGAAGCATTTATGGCACCAACTACTACCAAAAAG 418
*****

TonB  GTGGAGTGTTTTGTCTTTAGAACATAAACAATGGAAAGATGTTTCATTTTGAAC TTCTGC 472
A50   -TGGAGTG-TTTTGTCTTTAGAACAT-AACAATGG-AAGATGTTTCATTTTGAAC TTCTGC 473
*****

TonB  TCGTGCAGATCAGCAAGAAATCAATGTAGATGATAACTCTAAACAAGATTTTGACGGTTC 532
A50   TCGTGCAGATCAGCAG--AATCGATGTAGATGATAACTCTAACAGA--TTTGACGG-TC 527
*****

```

**Figura 35.** Alineamiento de la secuencia obtenida con los cebadores de la OXA-23-like para uno de los aislados del grupo (A50) frente a la de proteína receptora dependiente de TonB incluida en BLAST (CP000521.1). En todos los casos analizados se obtuvo una homología igual o superior al 90%.

En cuanto a los aislados que presentaron una MBL (A93 y A107) la secuenciación permitió determinar que se trataba de la variante IMP-8 en ambos casos.

- Caracterización de perfiles clonales mediante el electroforesis en campo pulsado

El análisis mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) permitió establecer los grupos clonales en los que se dividían nuestros aislados. Aplicando los criterios de Seifert *et al* todas los aislados cuya similitud en el patrón de bandas fue mayor o igual al 87% se consideraron el mismo clon [144]. Los datos del análisis del PFGE se relacionaron con los perfiles de sensibilidad y con los resultados obtenidos en el estudio enzimático lo que permitió una caracterización más completa los grupos antes descritos. En todos los casos se observó una gran homología entre los componentes de un mismo grupo (tabla 14). El resultado del análisis de PFGE se detalla a continuación:

### ○ Grupo A

La distribución del patrón de bandas del grupo A permitió identificar un clon predominante que incluía 7 aislados. De los tres restantes, A113 y A118 compartieron el mismo perfil, mientras que A119 resultó diferente. Este último presentó además valores de CMI para los aminoglucósidos muy superiores a los mostrados por el resto del grupo. Todos los aislados del grupo A amplificaron la OXA-201 como única enzima (tabla 15).

### ○ Grupo B.1

Ocho de los 10 aislados incluidos en este grupo tuvieron el mismo perfil de bandas. Los dos restantes (A112 y A116), aunque diferentes al resto del grupo, fueron iguales entre sí. Las CMIs de estos microorganismos fueron similares a las del resto del grupo a excepción de las tetraciclinas, que mostraron una CMI del orden de 5 diluciones mayor a los otros aislados (tabla 17).

### ○ Grupo B.2

Dentro del grupo B.2 se identificó un perfil clonal predominante que incluyó diez aislados. Tan sólo A74 presentó un patrón de bandas con una similitud menor del 80% a los del resto del grupo. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al perfil de sensibilidad entre este aislado y los del resto del grupo (tabla 18).

### ○ Grupo C

El patrón de bandas de los aislados del grupo C presentó una distribución homogénea para la mayoría de los casos. El clon predominante englobó a todos los aislados a excepción de uno (A45) cuya proximidad fue menor del 40%. Aunque el perfil de resistencia a los carbapenemes de este aislado fue igual al del resto del grupo, se apreciaron algunas diferencias en los valores de CMI para otros antimicrobianos. Este fue el caso de la gentamicina y las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación cuyas CMIs fueron cuatro diluciones menores a las del resto del grupo, y de la doxiciclina, antibiótico para la que este aislado fue el único resistente (tabla 19).

### ○ Grupo D

La digestión con la enzima ApaI mostró un modelo de bandas homogéneo en el análisis de 28 de los 38 aislados del grupo. Además, se identificaron otros 7 clones minoritarios. Todos los aislados de este grupo amplificaron la enzima OXA-24-like y 25 de ellos presentaron además la misma variante de la OXA-51-like (OXA-64). Tan sólo dos aislados (A24 y A101) portadores de la OXA-64 presentaron un perfil de bandas diferente (similitud <60%). Los otros 8 aislados amplificaron la OXA-66 (A33, A94, A120, A125, A126 y A129), la OXA64/132 (A76) o la OXA-70 (A123) y ninguno de ellos estuvo incluido en el perfil mayoritario. De éstos, cuatro fueron similares entre sí (A33, A120, A126 y A129), mientras que los 4 restantes (A76, A94, A123 y A125) aparecieron como clones únicos con una similitud menor del 50% de unos a otros (tabla 20).

### ○ Grupo E

Los dos aislados del grupo E (A102 y A124) mostraron perfiles únicos no relacionados con ninguno otro del estudio (tabla 16).

### ○ Grupo F

El patrón de bandas mostró gran variabilidad de unos aislados a otros dentro de este grupo. Tan sólo 4 de los clones estuvieron representados por dos aislados (A1 y A9, A11 y A52, A12 y A81, A54 y A56) (tabla 21).

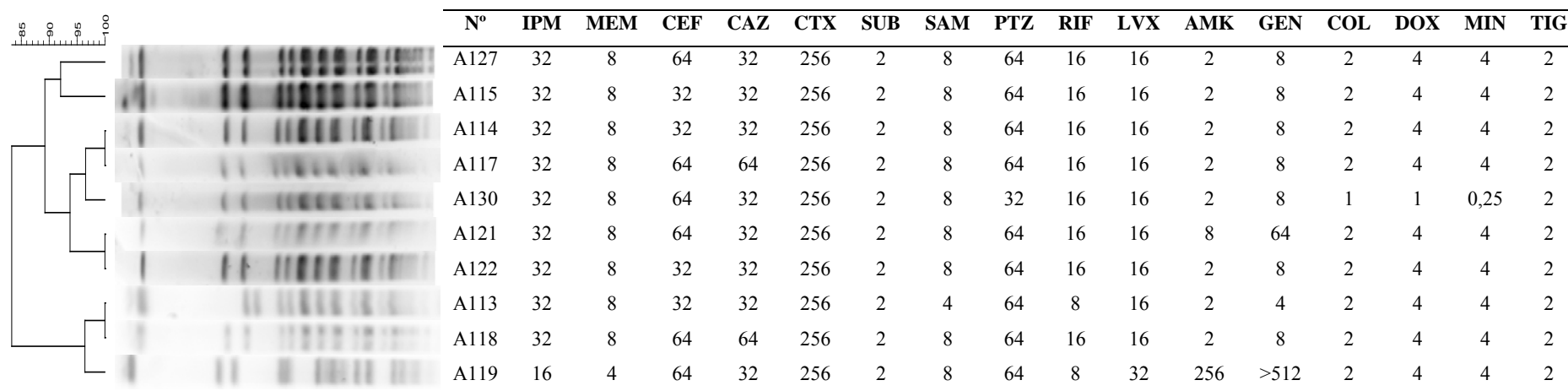
### ○ Grupo G

Los aislados del grupo H mostraron un gran número de perfiles de bandas diferentes en el estudio de clonalidad. Sólo los dos aislados portadores de IMP 8 (A93 y A107) y A84 y A85, aislados del mismo paciente, tuvieron el mismo patrón de bandas. Las muestras de A93 y A107 se recogieron con una diferencia de dos meses y procedieron de pacientes distintos ingresados en servicios independientes (tabla 22).

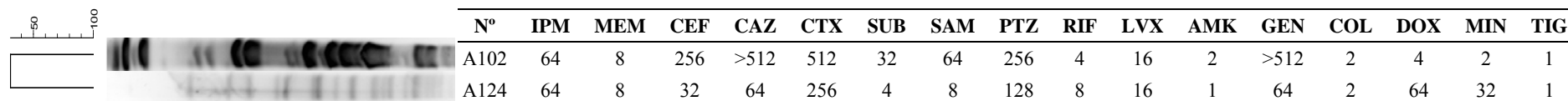
**Tabla 14.** Resumen de las características moleculares de los aislados incluidos en el estudio. En la tabla se incluye el grupo al que pertenece cada aislado, los valores de CMI<sub>90</sub> para IPM y MEN así como las enzimas presentes, el perfil de antibiotipia y el de la electroforesis en campo pulsado.

Grupo	N° aislados	CMI <sub>90</sub> IPM (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> MEN (µg/ml)	OXA-51 like	ISAbal	CHDL/MBL	Perfil ATB	PFGE perfil (aislados no incluidos)
A	10	32	8	201	+	–	I	A (A113, A118, A119)
B.1	10	512	128	65	+	–	II	B.1 (A112, A116)
B.2	11	1-2	0.25-1	65	+	–	III	B.2 (A74)
C	16	64	4	71	–	OXA-58	IV	C (A45)
D	38	256->512	128-256	64 (n=27) 66 (n=6) 70 (n=1) 64/132 (n=4)	–	OXA-24-like (n=33) OXA-58 (n=1)	V	D (A24, A33, A76, A94, A101, A120, A123, A125, A126, A129)
E	2	64	8	66 (n=1) 71 (n=1)	–	–	VI	Perfiles únicos
F	18	0.25-2	<0,12-1	64, 65, 66, 67, 68, 71, 89, 93, 180, 208, 216	–	–	VII	Perfiles únicos
G	25	0.25-2 32-64	<0,12-1 4-8	– –	– –	– IMP (n=2)	VIII	Perfiles únicos

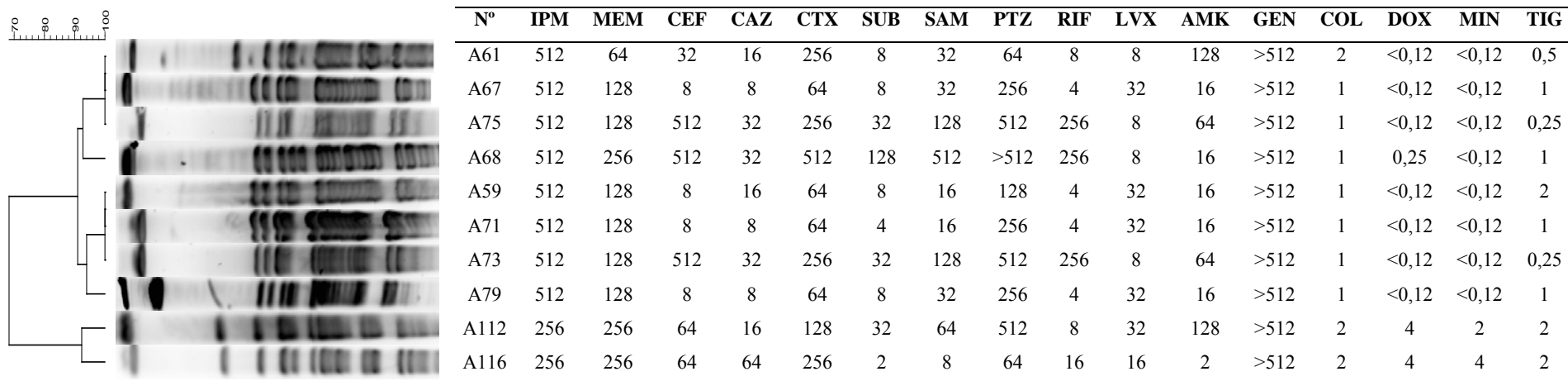
**Tabla 15.** Patrón de bandas obtenido para los aislados del grupo A incluyendo el perfil de sensibilidad de cada uno de ellos. Todos los aislados de este grupo amplificaron la enzima OXA-201 precedida de la secuencia de inserción IS*Abal*. Los resultados del estudio de sensibilidad corresponden a los valores de CMI<sub>90</sub> expresados en µg/ml.



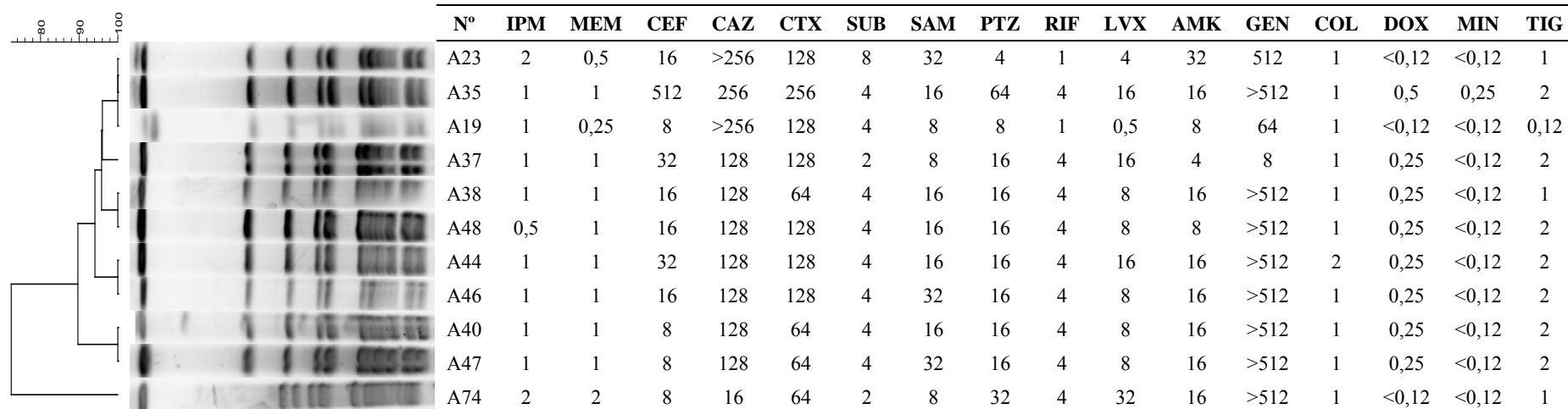
**Tabla 16.** Perfil de bandas de los aislados del grupo E y patrón de sensibilidad observado expresado como CMI<sub>90</sub> (µg/ml). Los aislados de este grupo no presentaron ninguna de las enzimas analizadas



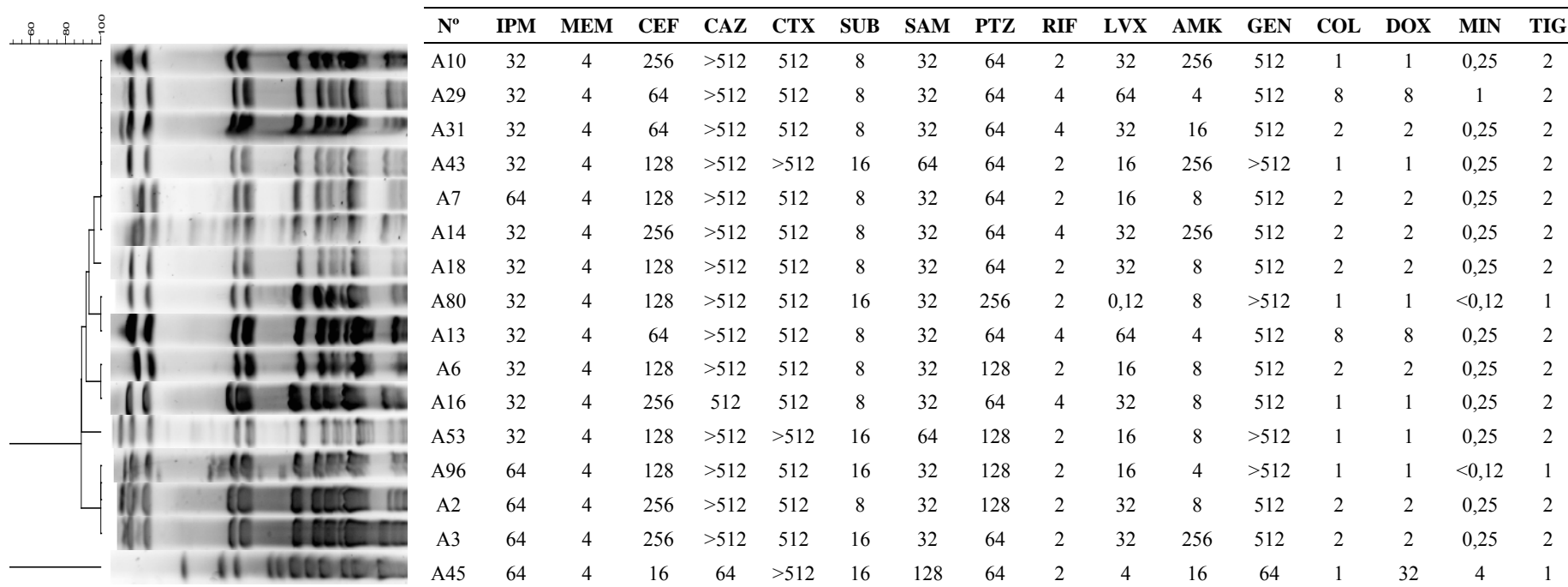
**Tabla 17.** Resultados de los estudios de PFGE y de sensibilidad para los aislados del grupo B.1. Los aislados incluidos en este grupo amplificaron la enzima OXA-65 así como la secuencia de inserción IS*AbaI*. Los resultados del estudio de sensibilidad corresponden a los valores de CMI<sub>90</sub> expresados en µg/ml.



**Tabla 18.** Perfil de bandas obtenido para los aislados del grupo B.2 en la electroforesis de campo pulsado y resultados del estudio de sensibilidad expresados como valor de CMI90 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Los aislados de este grupo amplificaron la enzima OXA-65 precedida de la secuencia de inserción IS*Aba1*.



**Tabla 19.** Patrón de bandas de los aislados del grupo C portadores de la enzima OXA-58. Se incluyen además los valores de CMI<sub>90</sub> (µg/ml) obtenidos para los distintos antimicrobianos en el estudio de sensibilidad.



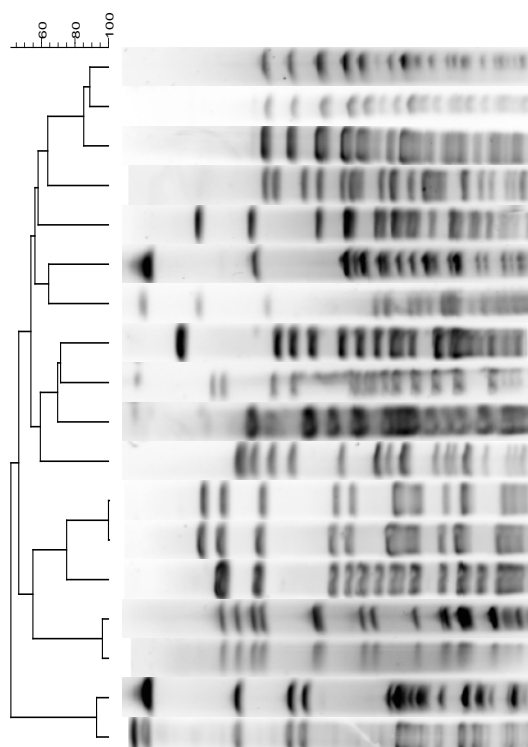
**Tabla 20.** Resultados de los estudios de PFGE y de sensibilidad, expresados como CMI<sub>90</sub> (µg/ml), para los aislados del grupo D portadores de la enzima OXA-24-like. Se incluye también la variante de la OXA-51 identificada en cada aislado.

N°	IPM	MEM	CEF	CAZ	CTX	SUB	SAM	PTZ	RIF	LVX	AMK	GEN	COL	DOX	MIN	TIG	OXA-51
A69	512	128	16	512	256	8	16	128	4	8	256	>512	4	2	0,25	2	OXA-64
A39	512	256	64	512	>512	32	64	512	4	4	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64
A97	256	256	256	512	512	32	64	512	4	8	128	>512	2	4	4	1	OXA-64
A98	256	256	256	512	512	32	64	512	4	8	128	>512	1	4	4	1	OXA-64
A99	256	256	256	512	512	32	64	512	4	8	128	>512	1	4	4	1	OXA-64
A78	256	64	16	512	256	4	16	256	2	16	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64
A34	512	256	32	512	256	32	64	512	8	8	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64
A103	256	256	256	512	512	32	64	512	4	8	128	>512	2	4	2	1	OXA-64
A70	256	128	16	512	256	4	16	128	2	4	256	>512	4	2	0,25	2	OXA-64
A30	>512	256	64	512	256	16	64	256	16	8	256	512	1	4	0,25	2	OXA-64
A104	256	256	256	512	512	32	64	512	4	8	128	>512	2	16	8	2	OXA-64
A105	256	256	256	512	256	32	64	>512	4	16	64	>512	2	4	4	1	OXA-64
A28	>512	256	64	512	512	16	64	256	16	8	256	512	1	4	0,5	2	OXA-64
A32	>512	256	256	512	512	16	64	256	16	8	256	512	1	4	0,5	2	OXA-64
A36	512	256	32	512	>512	16	64	512	2	8	256	>512	1	2	0,25	2	OXA-64
A41	512	256	64	512	>512	32	64	512	4	4	256	>512	2	2	0,5	2	OXA-64
A60	512	256	64	512	>512	32	64	256	4	4	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64
A42	512	256	64	>512	>512	32	64	512	4	4	256	>512	2	2	0,5	2	OXA-64
A50	512	64	16	512	256	8	16	128	4	8	256	>512	2	4	0,5	2	OXA-64
A66	512	256	16	512	256	4	16	128	2	8	512	>512	2	2	0,25	2	OXA-64/132
A62	512	256	64	512	>512	16	64	256	4	8	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64/132

Tabla 20. Continuación

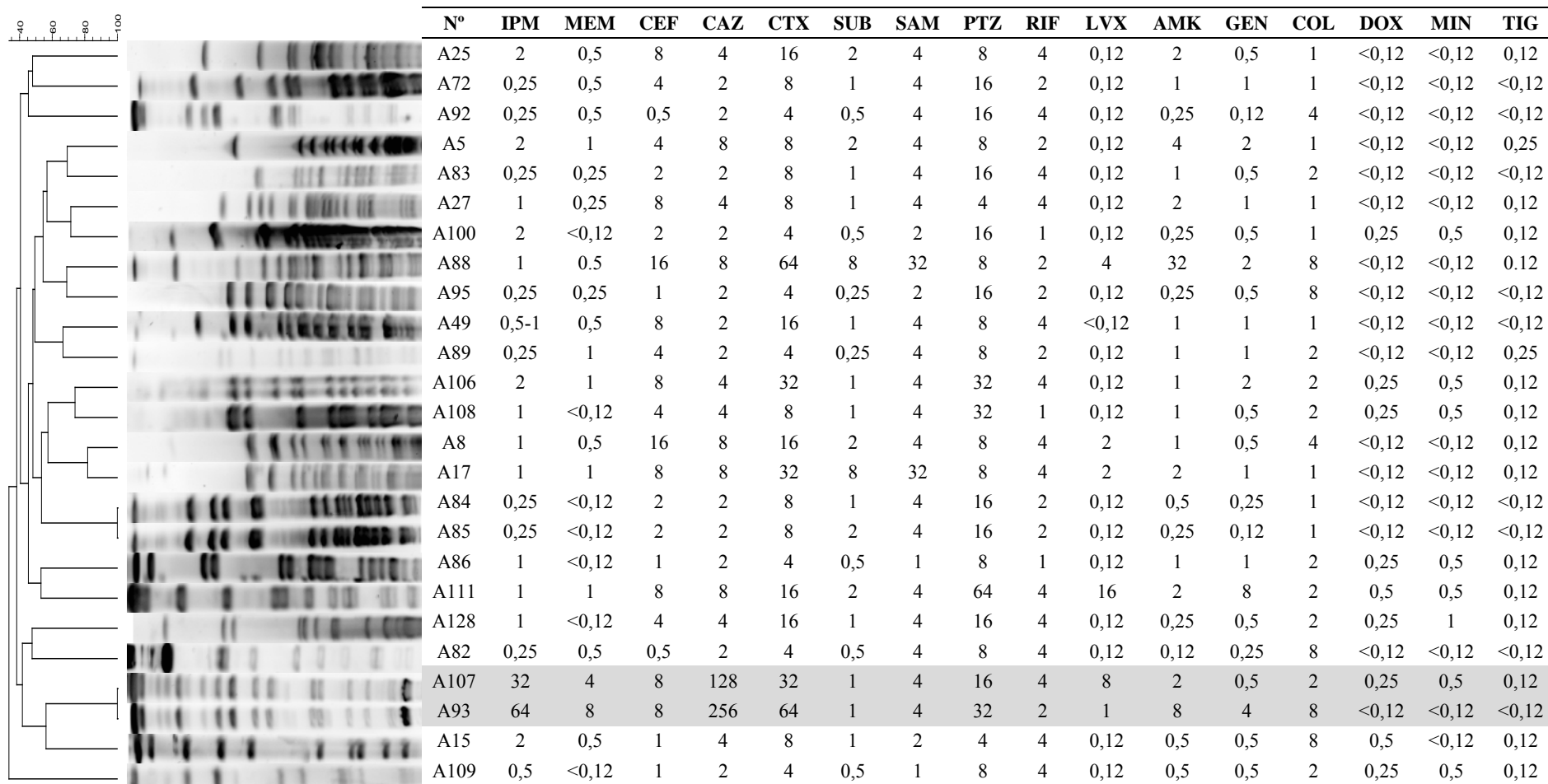
N°	IPM	MEM	CEF	CAZ	CTX	SUB	SAM	PTZ	RIF	LVX	AMK	GEN	COL	DOX	MIN	TIG	OXA-51
A64	512	128	16	512	256	8	16	128	4	8	512	>512	32	2	0,25	2	OXA-64
A57	512	256	64	512	>512	16	64	128	4	8	512	>512	16	2	0,5	2	OXA-64
A26	>512	256	64	>512	512	16	64	8	16	8	256	512	1	<0,12	<0,12	2	OXA-64
A90	256	256	64	512	512	32	64	256	4	4	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64
A65	512	256	64	512	>512	32	64	256	4	4	256	>512	2	4	0,25	2	OXA-64
A58	512	256	64	512	>512	32	64	256	4	8	256	>512	2	2	0,5	2	OXA-64
A87	512	256	64	512	512	32	64	256	4	4	256	>512	2	2	0,25	2	OXA-64/132
A24	>512	256	64	>512	256	16	64	256	16	8	256	512	1	2	0,25	2	OXA-64
A125	256	128	256	128	256	32	64	512	4	16	16	64	2	64	8	2	OXA-66
A101	256	256	256	512	256	32	64	>512	2	8	64	>512	2	4	4	1	OXA-64
A33	512	256	32	64	256	32	128	256	2	2	8	8	1	16	2	0,25	OXA-66
A120	256	512	256	32	256	32	256	>512	512	8	1	8	2	4	2	1	OXA-66
A126	256	512	128	32	256	32	256	>512	512	8	1	16	2	4	2	1	OXA-66
A129	256	512	128	32	256	32	256	>512	512	8	1	16	1	1	0,25	1	OXA-66
A94	>512	512	>512	32	256	128	256	>512	256	8	0,5	8	1	1	0,25	1	OXA-66
A76	512	256	512	>512	512	32	128	>512	4	8	256	>512	1	2	0,25	2	OXA-64/132
A123	256	256	256	>512	256	32	64	512	512	16	64	8	2	4	2	2	OXA-70

**Tabla 21.** Perfil de bandas de los aislados del grupo F acompañado del valor de CMI<sub>90</sub> (µg/ml) para los distintos antimicrobianos analizados en el estudio. Los aislados incluidos en este grupo no presentaron ninguna de las carbapenemasas adquiridas estudiadas.



	N°	IPM	MEM	CEF	CAZ	CTX	SUB	SAM	PTZ	RIF	LVX	AMK	GEN	COL	DOX	MIN	TIG
	A11	1	0,25	2	2	8	1	2	4	2	0,12	2	1	1	<0,12	<0,12	0,12
	A52	1	1	16	128	128	4	32	4	4	8	16	>512	1	<0,12	<0,12	2
	A51	0,25	<0,12	4	2	8	0,5	4	4	2	0,25	2	4	1	<0,12	<0,12	0,25
	A21	2	1	8	8	2	4	8	16	4	0,25	4	2	1	<0,12	<0,12	0,5
	A22	2	0,5	2	4	8	2	4	8	4	0,12	2	0,5	1	<0,12	<0,12	0,12
	A4	2	0,5	2	4	8	2	4	8	4	0,12	2	1	2	<0,12	<0,12	0,12
	A91	0,25	0,12	2	0,5	2	0,25	8	4	1	0,12	4	1	0,5	<0,12	<0,12	<0,12
	A63	0,5	1	16	8	32	2	8	16	4	8	1	0,5	1	0,5	<0,12	1
	A77	0,25	1	128	16	512	8	4	32	1	32	4	512	0,5	64	1	8
	A110	2	0,5	4	2	8	1	4	16	4	0,12	0,5	1	2	0,5	0,5	0,12
	A20	2	0,25	2	4	1	2	4	4	4	0,12	2	1	1	<0,12	<0,12	0,12
	A54	0,5	0,25	2	2	8	1	4	8	4	<0,12	1	0,5	1	<0,12	<0,12	0,12
	A56	0,5	<0,12	2	2	8	1	4	8	4	<0,12	1	0,5	1	<0,12	<0,12	0,12
	A55	0,5	<0,12	1	2	8	1	4	8	4	<0,12	1	0,5	1	<0,12	<0,12	0,12
	A9	2	0,25	2	4	8	2	4	8	2	0,12	2	1	1	<0,12	<0,12	0,12
	A1	1	0,25	2	2	8	2	4	8	1	0,12	2	0,5	1	<0,12	<0,12	0,12
	A12	2	0,5	2	4	8	1	2	4	1	0,12	2	1	1	<0,12	<0,12	0,12
	A81	0,5	0,25	2	4	8	1	4	8	4	0,12	1	0,5	2	<0,12	<0,12	<0,12

**Tabla 22.** Perfil clonal de los aislados distintos de *A. baumannii* incluidos en el grupo G. La tabla recoge los valores de CMI<sub>90</sub> (µg/ml) a los antimicrobianos analizados en el estudio de sensibilidad. Tan solo los aislados A93 y A107 amplificaron una de las enzimas ensayadas (IMP-8).

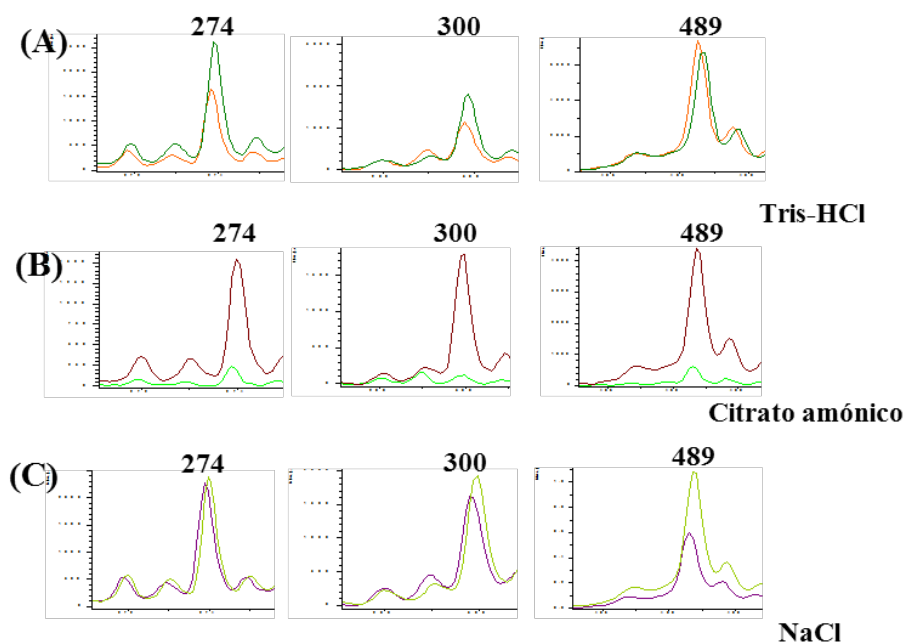


## ➤ Detección de actividad carbapenemasa por MALDI-TOF MS

### • Selección de las condiciones óptimas del ensayo e identificación de los picos más representativos

#### ○ Estabilidad del imipenem en los distintos solventes

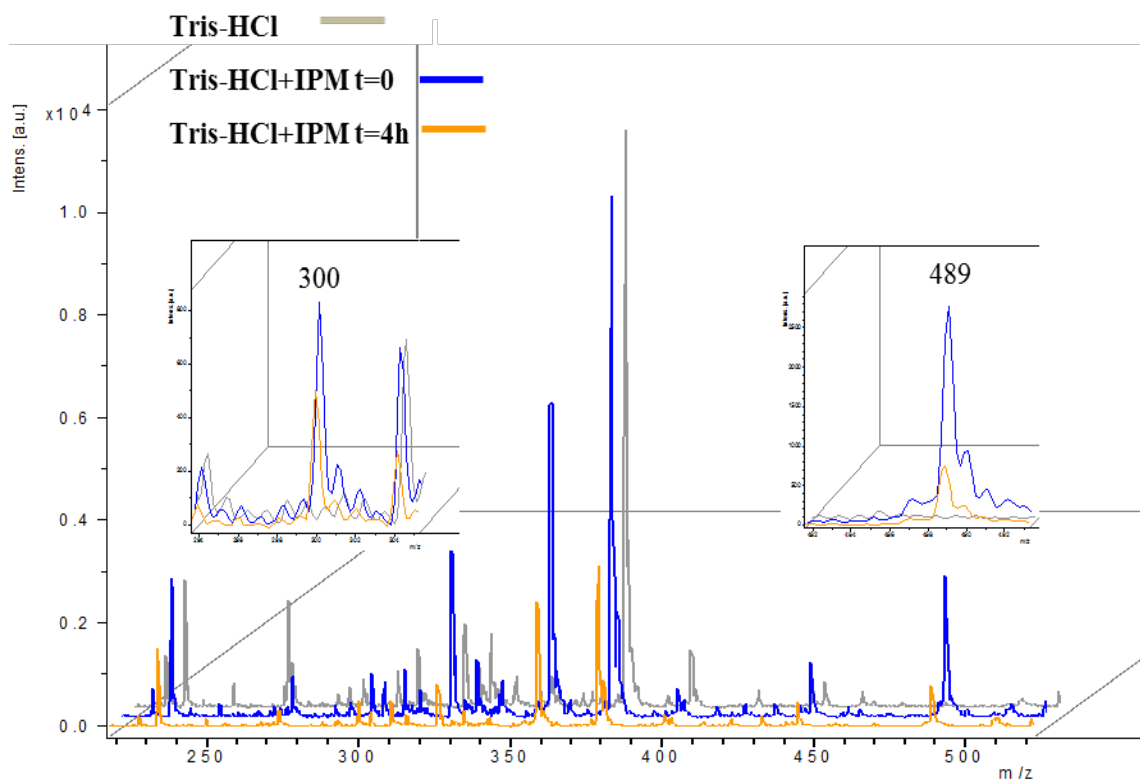
El primer paso para llevar a cabo los experimentos fue determinar la estabilidad del imipenem en los tres solventes previamente empleados por otros autores en ensayos similares (NaCl 0.46%, e l Tris-HCl 20 mM pH 6.8 e hidrógenocitrato de amonio 10 mM pH 7.0). Para esto se prepararon soluciones de imipenem (0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml y 1 mg/ml) en cada uno de ellos y se incubaron a 35°C durante 4 horas, realizándose determinaciones del espectro a los 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas.



**Figura 36.** Estabilidad del imipenem en los distintos solventes. Detalle de los picos de 274 m/z, 300 m/z y 489 m/z del imipenem tras su incubación en Tris-HCl 20mM (A), Citrato amónico 10mM (B) y NaCl 0.46% (C) a tiempo 0 horas (A-verde, B-granate, C-verde claro) y tiempo 4 horas (A-naranja, B-verde, C-malva).

Los resultados obtenidos fueron similares con los tres solventes a tiempos cortos pero, al prolongar el periodo de incubación hasta las 4 horas, los picos más significativos presentaban una intensidad menor cuando se empleaba el hidrogenocitrato de amonio como solvente (figura 36). En el caso del NaCl y el Tris-HCl los valores obtenidos fueron similares en todos los tiempos. Las pequeñas variaciones que se detectaron en los datos crudos al emplear estos dos solventes pasaban a ser imperceptibles al normalizar la señal de los picos del espectro con el valor del pico de cilastatina- $\text{Na}^+$ .

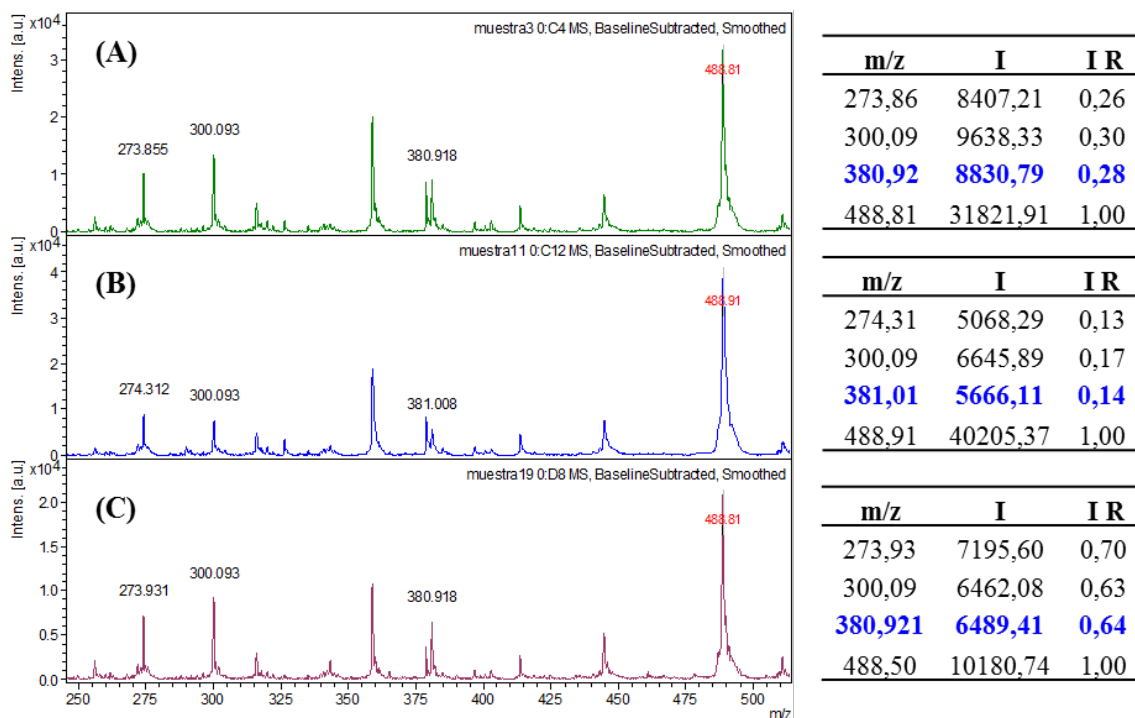
La figura 37 presenta un espectro significativo cuando se emplea el Tris-HCl como solvente. En ella se aprecia como al añadir el antibiótico aparecen diferentes picos y como éstos se mantienen estables a lo largo de las 4 horas de incubación.



**Figura 37.** Estudio de estabilidad del imipenem a distintos tiempos de incubación en Tris-HCl 20 mM. La figura muestra el espectro de masas MALDI-TOF del imipenem en Tris-HCl a tiempo 0 horas (azul) y 4 horas de incubación (amarillo) y del solvente sin antibiótico (gris). En el detalle se aprecian los picos más representativos del imipenem.

La figura 38 muestra el efecto de la incubación a 3 tiempos distintos en NaCl. Aquí puede apreciarse como el valor de los picos más importantes se mantiene constante a lo largo del tiempo.

La suplementación con SDS 0.01% no produjo ningún cambio en el espectro del antibiótico en ninguno de los casos estudiados.

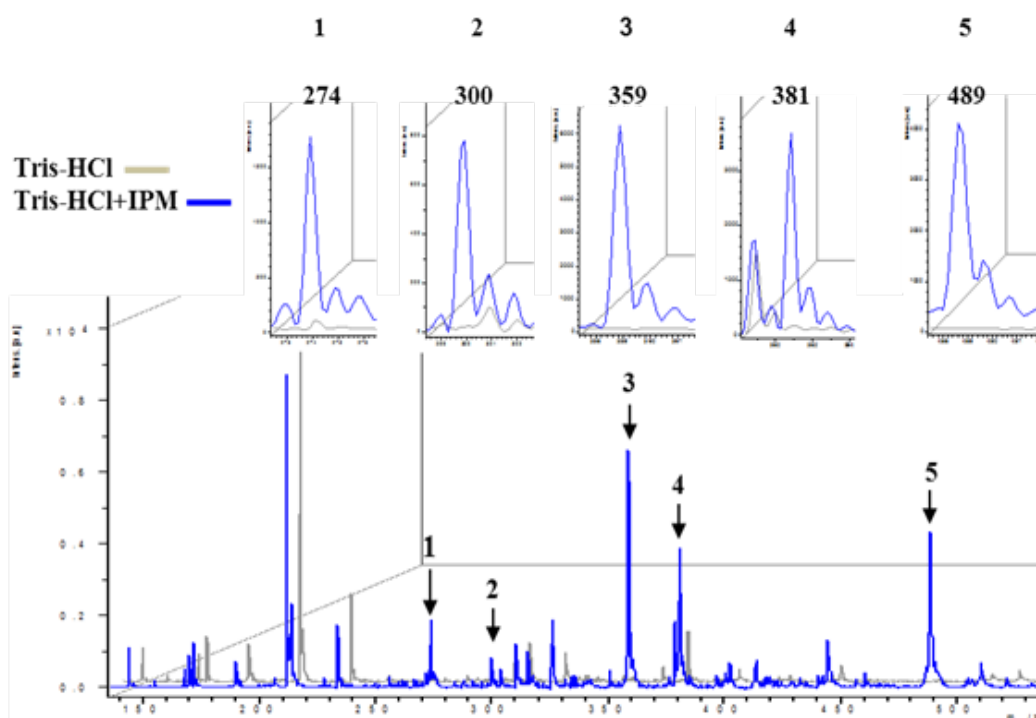


**Figura 38.** Estabilidad del imipenem 1mg/ml en NaCl (A) t=0 h, (B) t=15 min y (C) t=1 h. La tablas recogen el valor m/z de los picos más representativos así como la intensidad de cada uno de ellos y su intensidad relativa asignando el valor de 1 a l pico de mayor intensidad que , en todo s los c asos, corresponde al 498 m/z. I: intensidad absoluta, IR: intensidad relativa.

### o Identificación de los picos más representativos del espectro

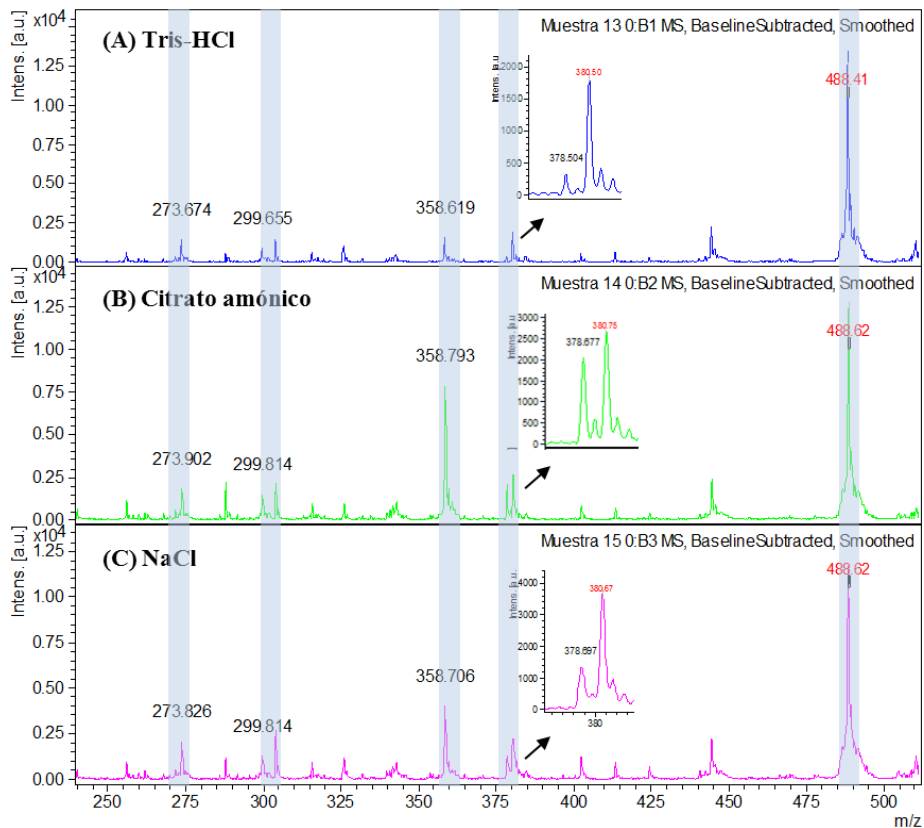
La complejidad de los espectros de masas hace que el análisis de los mismos sea difícil y laborioso. Por esto resulta necesario identificar los picos más característicos de cada compuesto para facilitar la interpretación de los resultados. Para ello se estudió el espectro de masas del imipenem en distintas condiciones experimentales tratando de identificar en ellos sus compuestos relacionados.

La comparación de los espectros obtenidos en los ensayos realizados con los distintos solventes con y sin imipenem-cilastatina permitió seleccionar 8 picos relacionados teóricamente con el uso del antibiótico (121 m/z; 274 m/z; 300 m/z; 359 m/z; 381 m/z; 445 m/z; 489 m/z y 658 m/z). Estos picos aparecieron de forma repetida con todos los solventes y en todas las condiciones ensayadas. Por el contrario, los picos que aparecían en un solo solvente o en un solo ensayo no se consideraron. En la figura 39 se muestran 5 de estos picos que aparecen tras la adición del antibiótico pero que no se detectan en el ensayo realizado con el solvente solo (Tris-HCl).



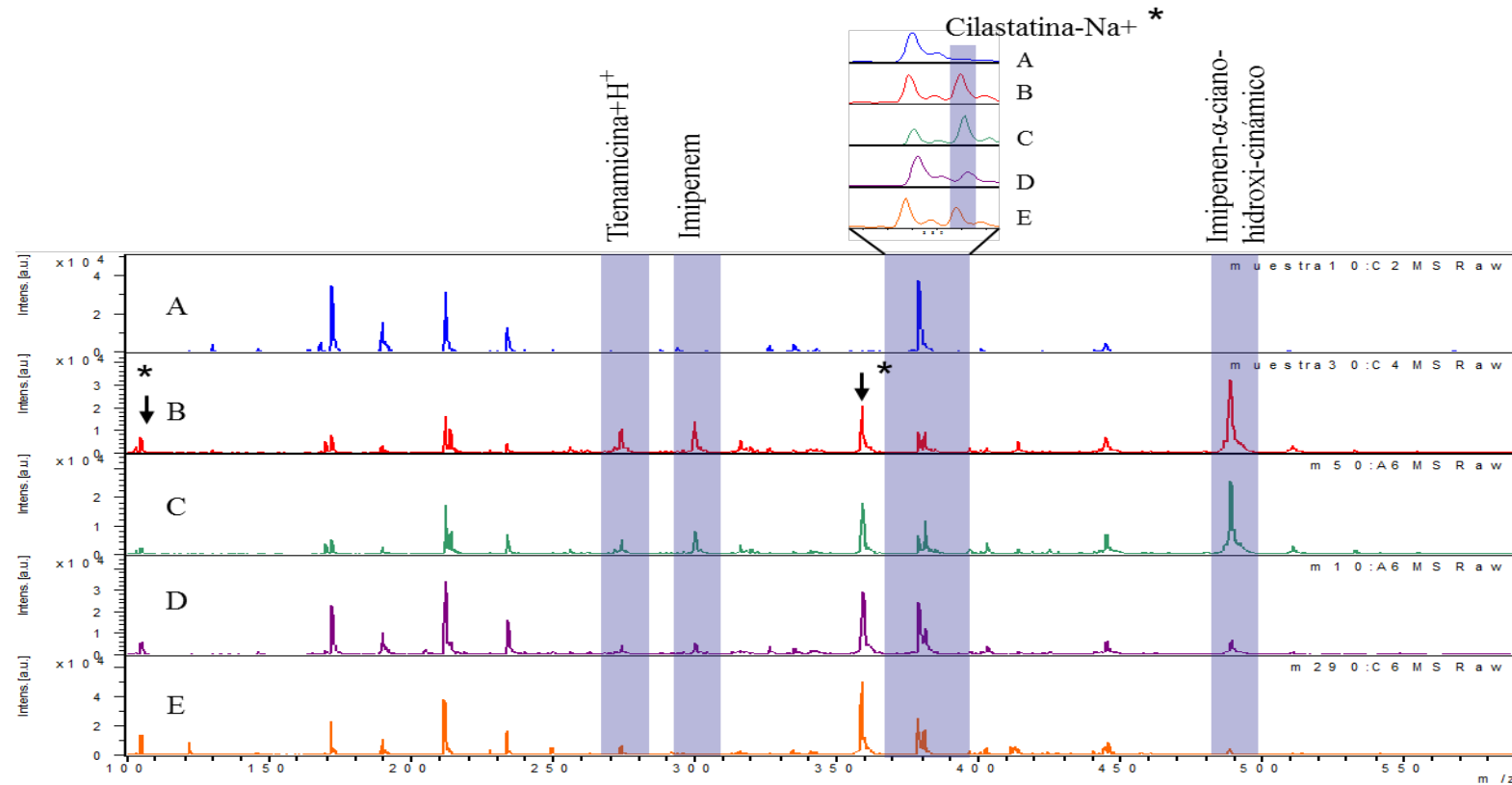
**Figura 39.** Comparación de los espectros de masas del solvente Tris-HCl (gris) y el solvente Tris-HCl con imipenem 1m g/ml ( azul) donde se aprecian con claridad los picos debidos a la adición del antibiótico. El detalle en la parte superior resalta los picos más representativos (1) tienamicina- $H^+$  (274 m/z), (2) imipenem ( 300 m/z), (3) (359 m/z), (4) cilastatina- $Na^+$  (381 m/z) y (5) imipenen-ác- $\alpha$  hidroxi-cinámico (489 m/z).

La figura 40 muestra el comportamiento de los mismos 5 picos en los 3 solventes ensayados.



**Figura 40.** E espectros de masas MALDI-TOF del imipenem 1 mg/ml en los distintos solventes (A) Tris-HCl 20 mM (B) citrato amónico 10mM y (C) NaCl 0.46%. El detalle muestra el pico de 381 m/z utilizado para la normalización de los espectros.

Una vez seleccionados los picos relacionados con la adición del antibiótico (imipenem-cilastatina) se estudió su evolución en presencia de tres aislados representativos de los grupos de microorganismos encontrados: A1, *Acinetobacter* sensible a los carbapenemes, OXA51-like positivo, A26, resistente a los carbapenemes, OXA-24-like positivo y A93, resistente a los carbapenemes portador de IMP-8. La respuesta a la incubación con los microorganismos resistentes debería indicar cuáles de los picos seleccionados inicialmente corresponden al antibiótico en realidad. La incubación con el aislado A93 originó una disminución en la intensidad de cuatro de estos picos (m/z: 274; 300; 489; 658), observándose el mayor efecto en los de 300 m/z y 489 m/z. Al incubar con A26 se obtuvo un resultado similar si bien la disminución de la intensidad fue menor en todos los casos. Por último, el ensayo con A1 no produjo ningún cambio en la intensidad de ninguno de los ocho picos inicialmente considerados (figura 41).



**Figura 41.** Espectro de masas MALDI-TOF en el que se muestran los picos más representativos del imipenem. Los espectros se obtuvieron con el solvente de incubación solo (NaCl 0.46%) (A), con la solución de imipenem-cilastatina 1 mg/ml (B), con el aislado sensible A1 (C), con el A26 productor de una OXA-24-like (D) y con el A93 portador de una IMP-8 (E). Los picos señalados corresponden a la tienamicina-H<sup>+</sup> (274 m/z), imipenem (300 m/z), cilastatina-Na<sup>+</sup> (381 m/z) e imipenem- $\alpha$ -ciano-hidroxi-cinámico (489 m/z). Las flechas y los asteriscos muestran los picos de imipenem-cilastatina que no se modificaron tras la incubación con los aislados de *Acinetobacter* productores de carbapenemasas

Aquellos picos que parecieron tras la adición del imipenem que no modificaron su intensidad al incubarse con los microorganismos resistentes se consideraron relacionados con la cilastatina presente en el Tienam y no se valoraron en ensayos posteriores, exceptuando el pico de 381 m/z que se identificó como el correspondiente a cilastatina sódica y se utilizó en ensayos sucesivos para normalizar los espectros.

En la tabla 23 se recogen los valores m/z de los picos relacionados con el imipenem y del probable compuesto químico asociado, así como su modificación en presencia de los *Acinetobacter* spp empleados como controles.

**Tabla 23.** Relación m/z de los picos de interés y sus compuestos asociados y respuesta a la incubación con los microorganismos control.

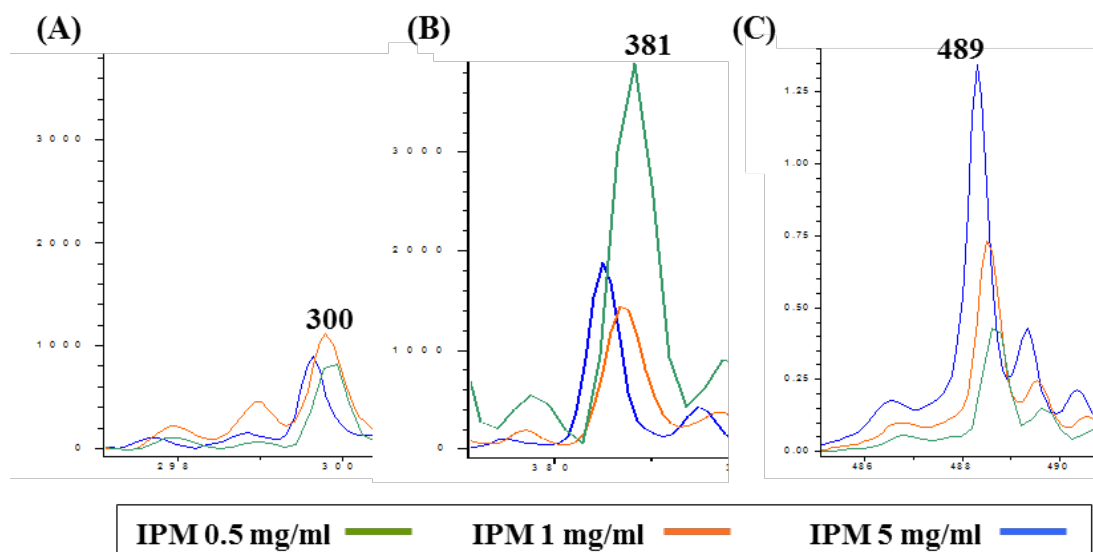
m/z	Compuestos	Respuesta		
		A93	A26	A1
274	[Tienamicina+H] <sup>+</sup>	+	+	-
300	Imipenem	+	+	-
381	Cilastatina sódica	-	-	-
489	Aducto Imipenem- Ác- $\alpha$ -hidroxi-cinámico	+	+	-
658	Imipenem+Cilastatina	+	+	-

Aunque la evolución en la intensidad de los 4 picos del imipenem recogidos en la tabla se valoró en todos los ensayos que se hicieron a continuación, se otorgó una mayor relevancia al correspondiente al aducto de imipenem-Ác- $\alpha$ -hidroxi-cinámico (489 m/z) puesto que presentaba la mayor intensidad relativa en las condiciones control (sin microorganismo) (figura 38).

#### o Selección de la concentración de antibiótico

Una vez identificados los picos de interés se procedió a determinar la concentración de antibiótico óptima con la que realizar los estudios posteriores.

Para ello se probaron 4 concentraciones distintas de imipenem (0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml y 5 mg/ml) en NCl<sub>4</sub> y Tris-HCl y se incubaron las soluciones durante 1 hora a 35°C en agitación. Estos ensayos se realizaron igualmente en presencia de 2 aislados de *Acinetobacter* resistentes (A26 portador de una OXA-24-like y A93 de una IMP-8). La intensidad de los picos aumentó de forma directamente proporcional a la concentración de imipenem empleada hasta 1 mg/ml, sin embargo, a concentraciones superiores (5 mg/ml) este efecto no fue tan evidente (figura 42). La incubación con ambos microorganismos resistentes permitió también observar de manera clara la desaparición del antibiótico con la concentración de 1 mg/ml. A concentraciones menores, las diferencias que aparecían entre el productor de metalobetalactamasa y el de oxacilinas se apreciaban peor mientras que el aumento de la concentración de antibiótico a 5 mg/ml no supuso ninguna ventaja.

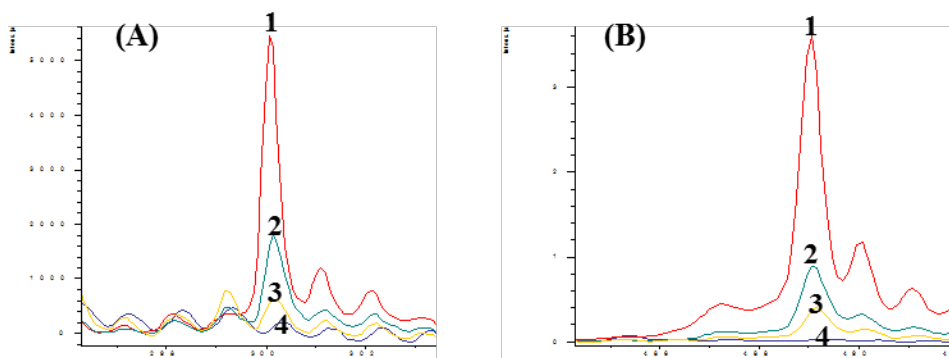


**Figura 42.** Detalle de los picos de interés del imipenem (A) imipenem (300 m/z), (B) cilastatina (381 m/z) y (C) aducto a mipenen-ácido- $\alpha$ -hidroxi-cinámico (489 m/z) empleando distintas concentraciones de antibiótico, 0.5 mg/ml (verde), 1 mg/ml (naranja) y 5 mg/ml (azul).

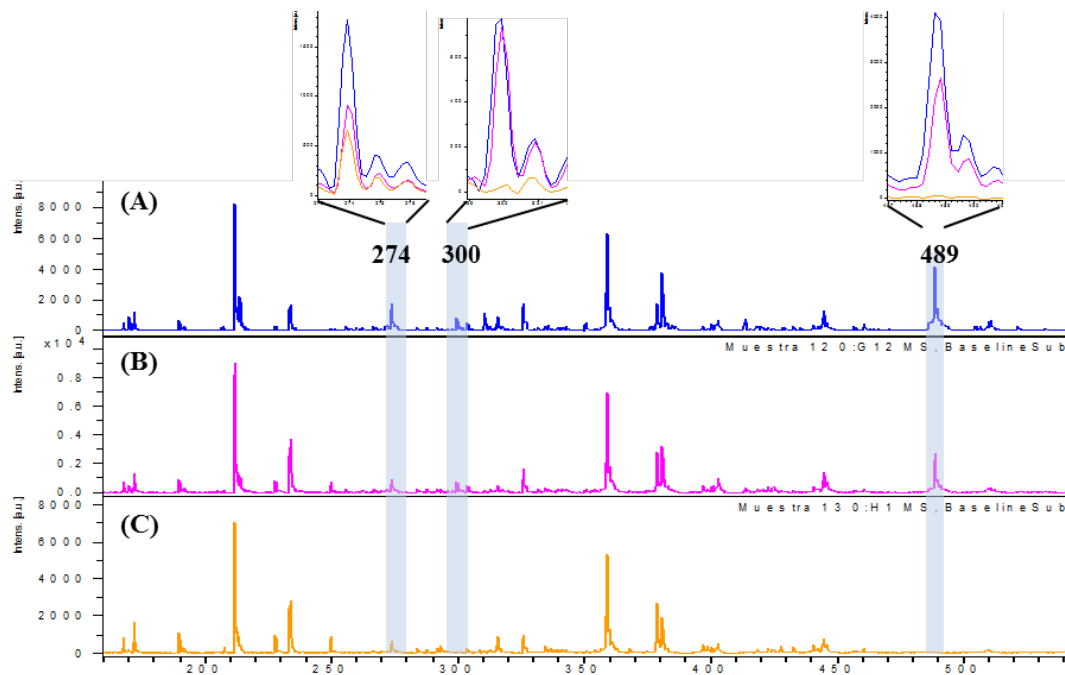
### o Estudio del efecto del inóculo

Como parte del proceso de optimización de los ensayos se procedió a determinar la concentración de microorganismo que permitiese seguir la degradación del antibiótico de manera fácil y clara. La disminución en la intensidad de los picos seleccionados se estudió con tres concentraciones diferentes de microorganismo ( $1 \times 10^9$  UFC/ml,  $2.5 \times 10^9$  UFC/ml,  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml) y, a la igual que en los ensayos anteriores, se utilizaron como microorganismos control los aislados A1, A26 y A93.

Los resultados variaron en función de la cepa de *Acinetobacter* empleada. De este modo, el efecto más marcado se observó al realizar la incubación en presencia del aislado productor de metalobetalactamasa (A93). Debido a la gran actividad hidrolítica de la enzima que posee, la degradación del antibiótico con este aislado fue rápida y, cuando se emplearon inóculos elevados, la desaparición de los picos de interés se produjo en menos de 30 minutos (figura 43). Al emplear  $1 \times 10^9$  UFC/ml la intensidad de los picos disminuyó de forma inversamente proporcional al tiempo de incubación lo que permitió estudiar la actividad enzimática en función del tiempo (figura 44).

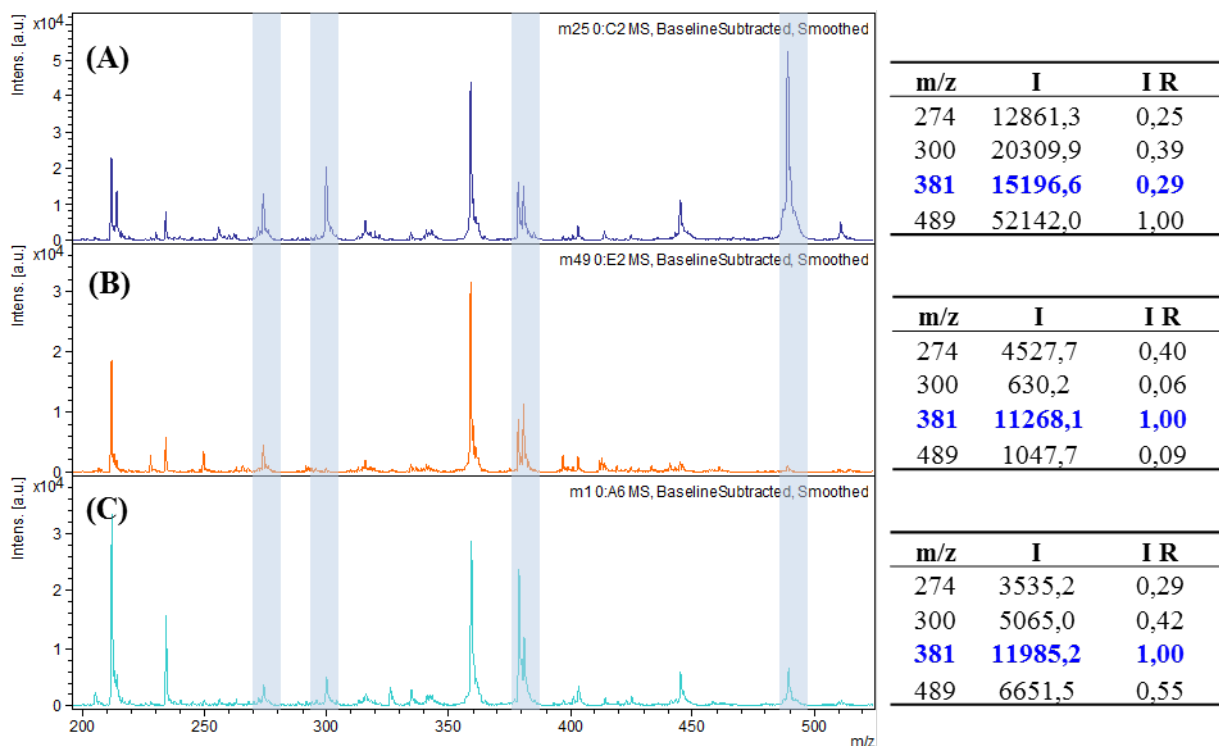


**Figura 43.** Reducción de la intensidad de los picos más representativos de la imipenem tras su incubación con el aislado A93 ( $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml). (A) Imipenem (300 m/z); (B) Aducto imipenem- $\alpha$  hidroxí-cinámico (489 m/z). Tiempos: 1: 0 minutos; 2: 15 minutos; 3: 30 minutos; 4: 1 hora.



**Figura 44.** Estudio del efecto inóculo. Espectros de masas MALDI-TOF del imipenem (A) y de éste tras incubación 30 minutos con distintas concentraciones del aislado A93 (B)  $1 \times 10^9$  UFC/ml y (C)  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml en Tris-HCl 20 mM. El detalle permite apreciar la disminución de la intensidad de los picos de interés según el inóculo bacteriano que se utilice.

La menor actividad presentada por las enzimas tipo OXA hizo necesarios emplear largos tiempos de incubación para detectar actividad carbapenemasa cuando los ensayos se llevaron a cabo en presencia de  $1 \times 10^9$  UFC/ml del aislado A26. Por el contrario, al emplear un inóculo de  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml la degradación del imipenem se detectó con claridad a tiempos menores. El ensayo de esta concentración, tanto con el aislado A93 portador de una metalobetalactamasa como con el aislado A26 productor de una OXA24, permitió detectar la degradación del antibiótico tras 1 hora de incubación de manera incuestionable. La combinación de esta concentración de microorganismo y este tiempo de incubación origina, además, diferencias suficientes en la disminución de los picos de 300 m/z y 489 m/z como para identificar los dos grupos de enzimas (figura 45).



**Figura 45** Modificación del espectro de imipenem 1 mg/ml (A) tras 1 hora de incubación con  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml de un productor de MBL (B) y un productor de OXA-24-like (C). En la figura se aprecia como la disminución de la intensidad de los picos del imipenem tras 1 hora de incubación es más intensa en el caso del aislado A93. Las tablas de la derecha recogen los datos de m/z de los picos de interés así como su intensidad absoluta y relativa asignando el valor 1 al pico de mayor intensidad. En ellas se observa que el pico que sufre una mayor disminución es en ambos casos el de 489 m/z. I: intensidad absoluta, IR: intensidad relativa.

#### o Selección de las condiciones finales del ensayo.

Tras el procesamiento de los datos los picos de 300 m/z y 489 m/z fueron asignados a li mipenem y a la ducto formado por e li mipenem y la matriz respectivamente y fueron los picos seleccionados como marcadores para detectar la actividad carbapenemasa en los estudios sucesivos. Ambos picos disminuían de manera notable su intensidad, o bien desaparecían completamente, tras su incubación durante 1 hora con *Acinetobacter* productores de carbapenemasas en todos los solventes ensayados, confirmando que son buenos indicadores para monitorizar esta actividad enzimática.

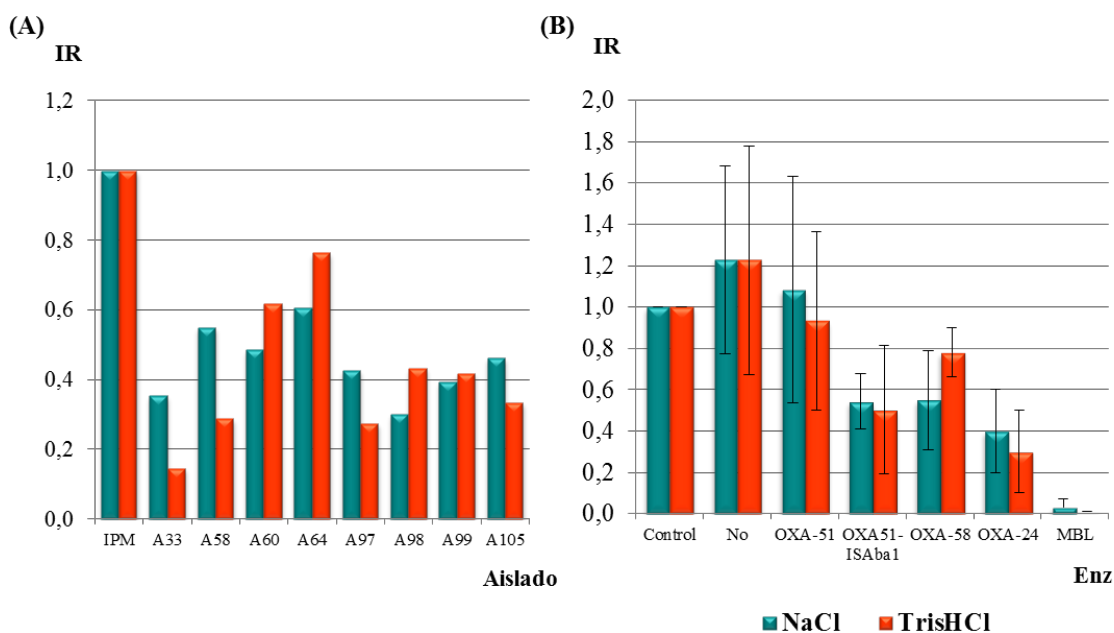
Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores se seleccionaron las condiciones definitivas del ensayo. La concentración final de imipenem en cada

mezcla se estableció en 1 mg/ml. El inóculo bacteriano se ajustó en todos los experimentos para conseguir una concentración final de  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml y el tiempo de incubación se redujo a 1 hora. Como solventes se emplearon tanto NaCl 0.46% como Tris-HCl 20 mM pH 6.8, dado que ambos mostraron buenos resultados y, acorde con la bibliografía previa, el NaCl 0.46% podría ejercer algún tipo de inhibición sobre la actividad de las OXAs.

- Detección de la actividad carbapenemasas en aislados de *Acinetobacter* spp mediante MALDI-TOF MS

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas para la detección de la actividad carbapenemasa se analizaron los 130 aislados del estudio bajo las condiciones descritas en el punto anterior. Los espectros de todos los aislados se obtuvieron tras la incubación de  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml de cada microorganismo con imipenem 1 mg/ml utilizando como solventes NaCl 0.46% y 20mM Tris-HCl pH 6.8. Todos los espectros se normalizaron con el valor del pico de la cilastatina y se compararon entre sí y con los correspondientes controles (antibiótico en ambos solventes en ausencia de microorganismo). Se incluyeron también como controles muestras de los dos solventes con cada microorganismo pero sin antibiótico para comprobar los picos que podrían parecerse al proceso de incubación y que eran debidos al microorganismo y no a la degradación del antimicrobiano.

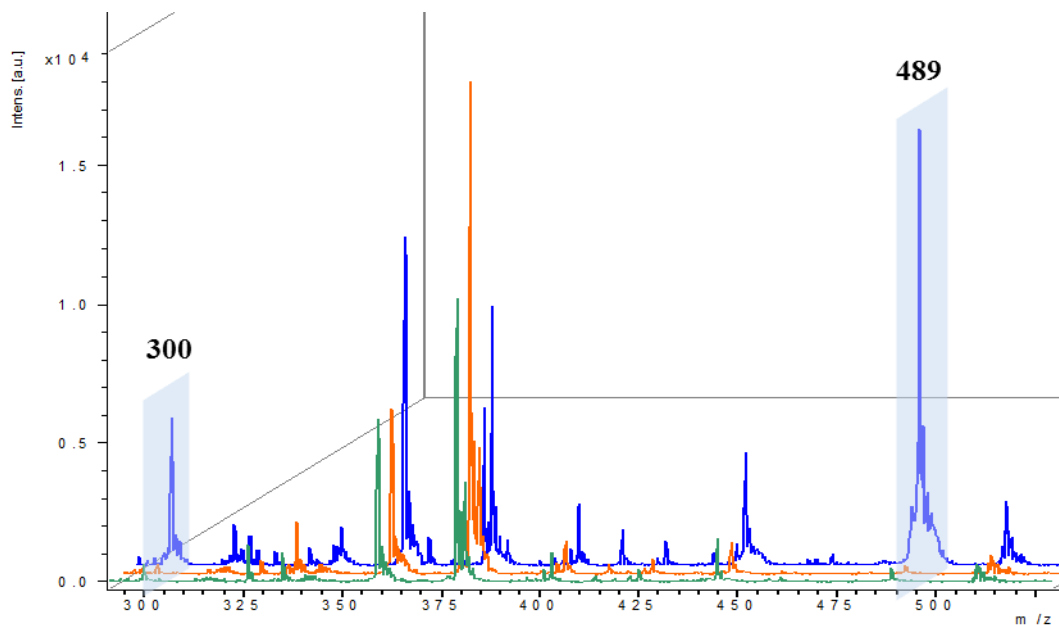
Todos los aislados resistentes a los carbapenemes presentaron actividad tras 1 hora de incubación al observarse la desaparición o reducción importante en la intensidad de los picos de 300 m/z y 489 m/z. Al comparar los resultados obtenidos para los dos solventes se observó una disminución mayor en varios aislados portadores de distintas oxacilinasas al utilizar Tris-HCl. Sin embargo, esto varió sustancialmente de unos aislados a otros llegando a ser en muchos casos inapreciable o incluso apreciándose el efecto contrario. En la figura 46 aparece una muestra de la respuesta obtenida en ambos solventes para un número representativo de portadores de OXA-24-like (46A) y para todos los aislados del estudio en función de la enzima que poseen.



**Figura 46.** Variación de la intensidad del pico de 489 m/z tras 1 hora de incubación en NaCl y Tris-HCl con (A) varios aislados portadores de OXA-24-like y (B) todos los aislados del estudio agrupados según la enzima que portan. En este último caso se representa la media y la desviación estándar de todos los aislados de cada grupo. El control corresponde al imipenem solo sin microorganismo. IR: intensidad relativa.

El efecto más drástico tuvo lugar con los aislados A93 y A107 productores de metalobetalactamasas en los que, tras 1 hora de incubación, se produjo la completa desaparición de ambos picos. Con el resto de los aislados, la mayor disminución correspondió a aquellos portadores de la OXA-24-like. Los aislados de *A. baumannii* que codificaban el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> precedido de la secuencia de inserción *ISAba1* mostraron una disminución menor que los anteriores. No obstante, ésta fue ligeramente superior a la observada para los aislados resistentes al imipenem que amplificaban la enzima OXA-58. Los experimentos realizados con los aislados distintos de *A. baumannii* sensibles al imipenem confirmaron que éstas no presentaban actividad carbapenemasa, puesto que los picos de 300 m/z y 489 m/z no sufrieron modificaciones significativas. En el caso de este grupo de microorganismos se realizaron experimentos complementarios a tiempos de incubación mayores confirmándose los resultados ya que ambos picos estaban todavía presentes y con la misma intensidad tras 4 horas de incubación.

El estudio de la actividad carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS se realizó también en los dos aislados de *A. baumannii* resistentes a los carbapenemes (A102 y A124) en los que no había sido posible amplificar ninguno de los genes analizados. La incubación de estos microorganismos con el imipenem reflejó que ambos eran capaces de hidrolizar dicho compuesto prácticamente en su totalidad al cabo de una hora lo que sugiere la presencia de una enzima con actividad carbapenemasa. La figura 47 destaca como la intensidad de los picos de 300 m/z y 489 m/z disminuye con respecto al control al incubar con los aislados A102 y A124



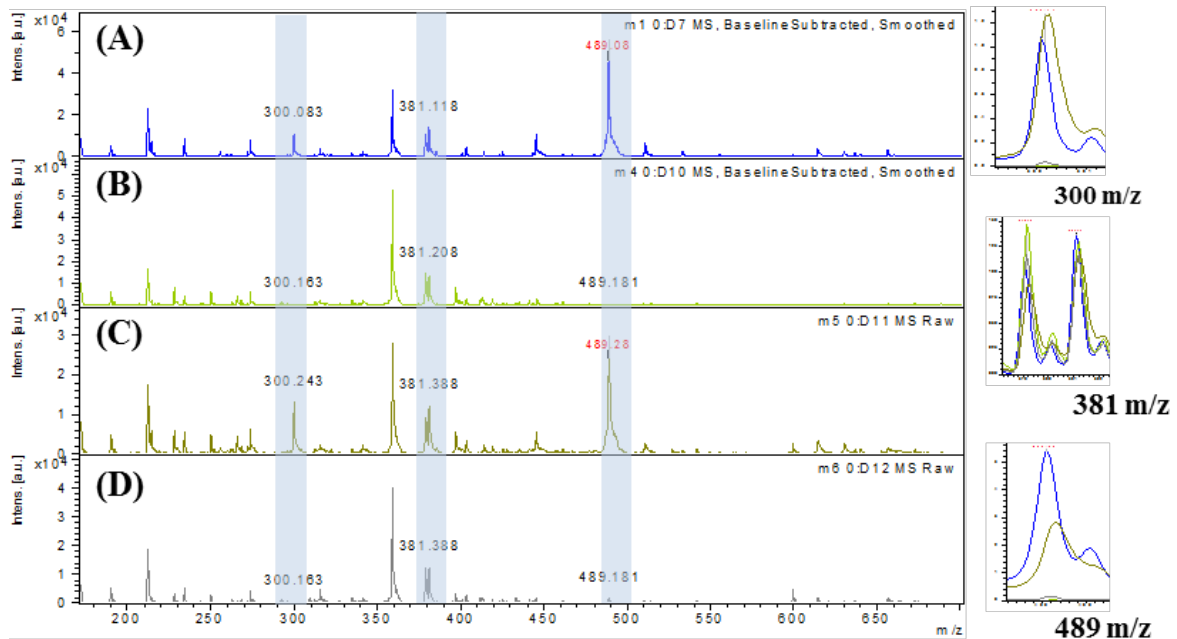
**Figura 47** Espectro del imipenem 1mg/ml (azul) y tras su incubación con los aislados A102 (naranja) y A124 (verde).

- Detección de metalobetalactamasas mediante MALDI-TOF MS

La completa desaparición de los picos de 300 m/z y 489 m/z tras una hora de incubación con los aislados A93 y A107 indicaba la presencia de una enzima tipo MBL en ambos aislados. No obstante, el estudio de esta actividad enzimática se completó mediante la adición de distintos compuestos, DPA y ZnSO<sub>4</sub>, a las mezclas de microorganismo y antibiótico. Este ensayo se llevó a cabo en

portadores de distintas oxacilinasas según el estudio molecular y en los dos caracterizados como productores de la metalobetalactamasa IMP (A93 y A107).

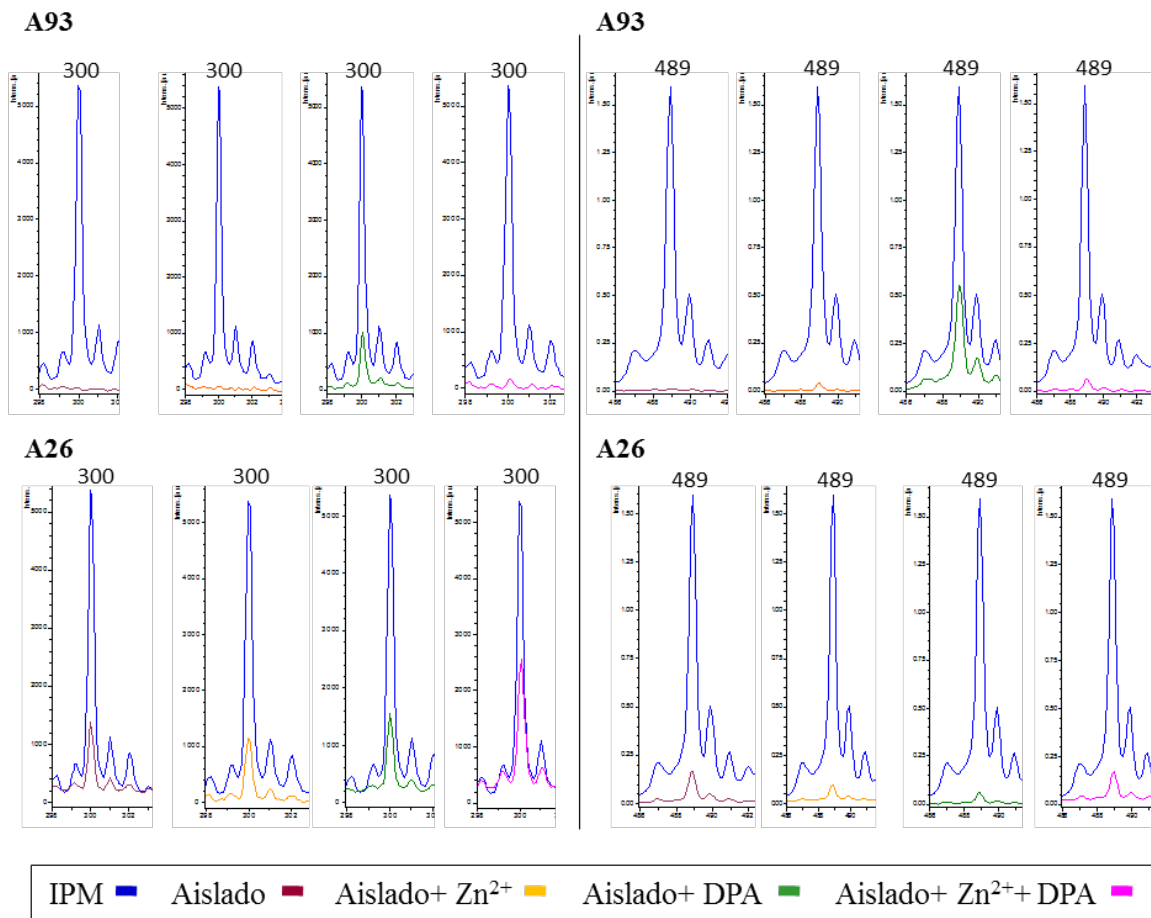
La incubación con DPA originó una inhibición de la actividad metalobetalactamasa en los aislados A93 y A107, sin embargo, la concentración de DPA empleada no fue suficiente para inhibir por completo la actividad. La actividad enzimática residual produjo una pequeña disminución en la intensidad de los picos relacionados con el imipenem. Al repetir los experimentos en presencia de  $ZnSO_4$  se apreció una reactivación parcial de la enzima (figura 48). La incubación con ambos compuestos a la vez (DPA y  $ZnSO_4$ ) no alteró el espectro con respecto al control.



**Figura 48.** Estudio de la actividad metalobetalactamasa. En la figura se muestran los espectros de masas del imipenem 1 mg/ml (A), el de este antibiótico tras su incubación con el aislado A93 (B), con A93 y DPA (C) y con A93, DPA y  $Zn^{2+}$  (D). La disminución de la intensidad de los picos sombreados de 300 m/z, 381 m/z y 489 m/z en (B) y su recuperación al añadir un quelante divalente en (C) demuestran que este aislado es portador de una metalobetalactamasa. La actividad quelante del DPA revierte en (D) al introducir iones  $Zn^{2+}$  y se aprecia de nuevo la actividad hidrolítica de A93. Los picos de 300 m/z, 381 m/z y 489 m/z de todos los ensayos aparecen en el detalle de la derecha.

Cuando se realizaron estos experimentos con aislados portadores de distintas oxacilinasas no se detectó efecto alguno en ninguna al añadir cualquiera de los compuestos mencionados. La figura 49 recoge en detalle la evolución de

los picos más representativos del ensayo realizado con A93-portador de una IMP-8 y A26-portador de una OXA-24-like. En ella se aprecia con claridad como la actividad hidrolítica de A93 se ve modificada al incluir en el medio de incubación los distintos compuestos ( $\text{ZnSO}_4$ , DPA y  $\text{ZnSO}_4$ +DPA), mientras que el espectro de A26 permanece inalterado con respecto al control en todas las situaciones ensayadas.



**Figura 49.** Estudio de la actividad metallobeta-lactamasa en los aislados control A93 y A26. En la figura se muestra el detalle de los picos de 300 m/z y 489 m/z en las distintas condiciones del ensayo.



## DISCUSIÓN

---



## VI. Discusión

*A. baumannii* presenta una gran capacidad para sobrevivir largos periodos de tiempo en el ambiente hospitalario lo que supone un importante reservorio para su diseminación. Incluso después de la erradicación de un brote, ciertas poblaciones de este microorganismo permanecen en el ambiente suponiendo un riesgo para los pacientes más críticos. Sin embargo, no todas las cepas de *A. baumannii* parecen presentar la misma capacidad para persistir y ciertos clones prevalecen sobre otros. La caracterización de los clones circulantes así como el conocimiento de la epidemiología local resultan de gran importancia tanto para el correcto manejo de los pacientes infectados como para la rápida actuación en el caso de brotes.

Los estudios de colonización e infección por *Acinetobacter* spp. destacan como causas principales para el desarrollo de una patología asociada a este microorganismo el ingreso en unidades de cuidados intensivos, la cirugía previa o los largos tiempos de estancia hospitalaria. Además, factores como el uso de catéteres centrales, urinarios y otros dispositivos invasivos como los respiradores y aparatos de ventilación mecánica pueden favorecer también la adquisición de una infección por *Acinetobacter* spp. El tratamiento previo con antibióticos de amplio espectro predispone además a la infección por variantes multirresistentes [22-24].

De acuerdo con esto, la mayoría de las muestras incluidas en este estudio procedieron de la UCI, tratándose principalmente de muestras respiratorias de pacientes intubados. Otro número importante de aislados se obtuvieron de heridas e infecciones de piel y partes blandas de pacientes a cargo del servicio de traumatología fundamentalmente. En la UCI se recogieron también muestras de otros dispositivos médicos como catéteres centrales.

Aunque la asociación entre la unidad de ingreso y el desarrollo de infección por *Acinetobacter* spp. sí parece clara, otras variables no muestran una relación tan directa y distintos trabajos arrojan resultados dispares.

Así, datos demográficos como la edad o el sexo no parecen guardar relación con la mayor probabilidad de padecer una infección por *Acinetobacter* spp. Sin embargo, con frecuencia, los pacientes de mayor edad presentan estancias hospitalarias más prolongadas y mayores comorbilidades, factores que sí se encuentran relacionados con la colonización y posterior desarrollo de una infección por *Acinetobacter* spp [149]. Por el contrario, otros estudios destacan que tener una edad mayor de 60 años por sí solo supone un factor de riesgo a tener en cuenta [150]. Los datos de nuestro estudio estarían más acorde a estos trabajos y a que este grupo de pacientes comprendió el 70.9% del total de las muestras.

Aunque parece que *A. baumannii* es el patógeno del género implicado con mayor frecuencia e indistintas infecciones la dificultad para identificar los microorganismos del grupo a nivel de especie hace necesario un estudio más detallado del papel que otras especies puedan desempeñar en este tipo de procesos.

La distinción de los microorganismos incluidos en el género *Acinetobacter* es complicada y, a menudo, se identifican como complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* en muchos laboratorios de microbiología clínica, sin prestar especial atención a la especie concreta. Este hecho se debe fundamentalmente a que los sistemas de identificación comerciales de los que disponen la mayoría de los laboratorios (API, VITEK, PHOENIX) no son capaces de distinguir unas especies de otras y, con frecuencia ofrecen tan sólo información del género. Para conseguir una identificación exacta son necesarias pruebas moleculares más complejas pero este tipo de análisis presentan un coste elevado y precisan además de personal especialmente entrenado para realizarlas. De este modo, estas técnicas no resultan una opción asequible en la mayoría de los laboratorios de rutina y sólo disponen de ellas los centros especializados. No obstante, los esfuerzos realizados en los últimos años para identificar estos aislados a nivel de especie están permitiendo conocer a fondo y caracterizar mejor la epidemiología de este género.

En este contexto, nuevas técnicas de identificación como la espectrometría de masas MALDI-TOF se están abriendo camino en el campo de la microbiología clínica tanto por la rapidez con la que se obtienen resultados como por la fiabilidad de los mismos. Esta técnica permite en la actualidad la correcta identificación de gran número de microorganismos como *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. o los bacilos del grupo de las enterobacterias [114]. Sin embargo, el número de estudios en bacilos Gram negativos no fermentadores como es el caso de *Acinetobacter* es todavía escaso [151].

Teniendo en cuenta estos precedentes, nos planteamos como uno de los objetivos de este trabajo evaluar la utilidad del sistema MALDI-TOF MS en la identificación de los microorganismos del género *Acinetobacter* y comparar su poder discriminatorio con el de dos métodos moleculares ampliamente validados para este fin: la secuenciación del gen *rpoB* (aplicable en todas las especies del género) [16] y la presencia de la enzima OXA-51-like (enzima intrínseca de la especie *A. baumannii*). Los resultados obtenidos indican que la presencia de la enzima OXA-51-like, tal y como han mencionado otros trabajos [61] permite distinguir *A. baumannii* del resto de las especies del género y, aunque algunos autores han determinado esporádicamente su presencia en otras especies [62], en este estudio sólo obtuvieron un resultado positivo en la PCR los 107 aislados de *A. baumannii*.

Al comparar los resultados de las técnicas moleculares con el análisis espectrométrico por MALDI-TOF, se observa que todos los aislados portadores de OXA-51-like se identifican correctamente. No obstante, dos aislados en los que no se había detectado esta enzima se identificaron también como *A. baumannii* mediante espectrometría. Estas discrepancias se resolvieron mediante la secuenciación del gen *rpoB*. Para poder valorar la fiabilidad del sistema en el resto de las especies del complejo se incluyeron en este estudio todos los aislados que habían sido identificados como especies distintas de *A. baumannii* mediante MALDI-TOF MS. Esta técnica consiguió la identificación correcta a nivel de especie de los 25 aislados distintos de *A. baumannii* con una similitud igual o superior al 99% con las incluidas en la base de datos BLAST.

El análisis comparativo de las tres técnicas permitió comprobar que la espectrometría de masas presentaba errores importantes en la asignación de especie (no de género). Se observó que, en conjunto, todos los microorganismos del estudio se identificaron correctamente a nivel de género, sin embargo, un porcentaje considerable (48.4%) de los 32 aislados analizados (25 no-*baumannii*, 7 *A. baumannii* –portadores de OXA-51-like-), tanto por técnicas moleculares (secuenciación del gen *rpoB*) como por técnicas espectrométricas (MALDI-TOF), se identificaron de forma errónea a nivel de especie, lo que supone un 16.4% del total de aislados ensayados. Estos problemas de identificación incorrecta pueden ser atribuidos en gran medida a la limitación en el número de perfiles de *Acinetobacter* incluidos en la base de datos [152]. Vila *et al*, han publicado recientemente resultados similares [153]. Estos autores encuentran identificaciones incorrectas con especies como *A. pittii* o *A. nosocomialis*. Sin embargo, tras realizar un análisis detallado de los picos obtenidos para cada microorganismo, observan que hay diferencias relevantes entre los espectros obtenidos para estos aislados y aquellos de las especies con los que el sistema los asemeja de forma incorrecta. Estas discrepancias resultan suficientes para realizar una identificación adecuada y así, después de aumentar las entradas de la base de datos de estos microorganismos consiguen una identificación inequívoca. En nuestro caso, el perfil proteico de 5 especies de los 15 aislados que habían sido identificadas erróneamente no estaban incluidos en la base de datos utilizada- *A. genospecies 13TU*, *A. beijerinckii*, *A. soli*, *A. genospecies 10*, y *A. genospecies 14BJ*. Aun así, cuando se trata de especies muy relacionadas entre sí no pueden descartarse totalmente errores de identificación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los de Vila *et al* e indican que el sistema MALDI-TOF MS puede ser una herramienta útil en la identificación de las especies del grupo siempre y cuando las entradas de la base de datos MALDI BioTyper software se amplié con un número de espectros suficientemente alto. Mientras tanto, las técnicas moleculares siguen siendo necesarias siempre que se requiera una identificación precisa a nivel de especie. Entre éstas, la amplificación de la enzima OXA-51-like, que aparece de forma

constitutiva en el genoma de *A. baumannii*, es una forma sencilla de distinguir esta especie del resto de las del género [61, 154].

Los resultados demuestran que las tres técnicas analizadas son de gran utilidad para la identificación de *Acinetobacter* spp. y que, por tanto, se debe emplear la que mejor se ajuste al objetivo que se persigue. Así, hoy en día, la espectrometría de masas es una técnica de utilidad en los laboratorios de microbiología clínica cuando se precisa de una respuesta rápida, por lo menos a nivel de género [155, 156]. Por su parte, la determinación del gen *bla*<sub>OXA51-like</sub> y la secuenciación del gen *rpoB* permiten obtener unos resultados más exhaustivos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la espectrometría de masas se encuentra aún en desarrollo y que la implementación de la base de datos, tanto en número de especies como de perfiles de cada una de ellas incluidos, permitirá obtener resultados más precisos, incluso a nivel de especie, con valores de sensibilidad y especificidad equiparables a los de las técnicas de biología molecular.

Como ya se ha mencionado, la identificación de los aislados de *Acinetobacter* spp. a nivel de especie resulta de gran importancia pues pone de manifiesto que otras especies distintas de *A. baumannii* se encuentran también implicadas en la infección. Así, en el año 1993 se comunicaron los primeros casos de bacteriemia relacionada con el catéter causada por *A. johnsonii* que afectó a 13 pacientes de 6 hospitales alemanes [9]. Desde entonces se han seguido documentando casos de infección, la mayoría de ellos bacteriemias, originados por especies distintas de *A. baumannii*. Entre estos patógenos destacan *A. ursingii* [157, 158], *A. baylyi* [159] o *A. septicus*, responsable de un brote de bacteriemia en una UCI neonatal de Turquía [160]. También se han descrito infecciones causadas por especies como *A. berezinae/A. genomospecies 10* [161] y *A. junii* [162].

El estudio más amplio llevado a cabo hasta la fecha tuvo lugar en Reino Unido. En él se identificaron a nivel de especie 690 aislados clínicos de *Acinetobacter* mediante la combinación de dos técnicas moleculares, la

amplificación del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y la secuenciación del gen *rpoB*. Sorprendentemente, más del 20% de los aislados fueron identificados como especies distintas de *A. baumannii* incluyendo hasta 18 especies diferentes. Entre éstas destacaban *A. lwoffii*, *A. ursingii*, *A. pitii*, *A. johnsonii* y *A. parvus*. Se encontraron además, aunque de forma más minoritaria *A. nosocomialis*, *A. radioresistens*, *A. baylyi* y *A. calcoaceticus* entre otros. La mayoría de los aislados procedieron de muestras de sangre y se identificaron como agente causal de bacteriemia pero también se recogieron de otras localizaciones anatómicas [10].

Aunque el porcentaje de aislados distintos de *A. baumannii* incluidos en nuestro estudio (19%) es similar al obtenido por Turton *et al* nosotros tan sólo encontramos 9 especies diferentes. Aquí es posible observar que ciertas especies como *A. pitii* o *A. berezinae/A. genomospecies 10* se pueden aislar de muestras clínicas de piel y tejidos blandos con cierta frecuencia, así como de ITU o del tracto respiratorio. No obstante, no se recogió ningún caso de bacteriemia. Estos resultados respaldan la idea de que, a diferencia de lo que se pensaba anteriormente, las especies distintas de *A. baumannii* desarrollan un papel fundamental en el origen de la infección [157, 159, 162].

Como se ha visto, identificar la especie concreta de *Acinetobacter* implicada en el proceso infeccioso resulta de gran interés. No obstante, el control de las infecciones producidas por este grupo de microorganismos requiere además de la caracterización del perfil de sensibilidad a distintos antimicrobianos. Esto resulta de gran importancia en el entorno clínico donde lo que se persigue es establecer un tratamiento apropiado y dirigido tanto al tipo de infección como al microorganismo causal, siempre ajustado al perfil de cada paciente. Por otro lado, conocer la epidemiología local y caracterizar las cepas circulantes en un ambiente determinado permite también establecer protocolos de tratamiento empírico bien fundamentados y altamente ajustados.

En el caso de *Acinetobacter* spp. esto resulta aún más importante debido al perfil de multirresistencia que a menudo presentan los aislados de este género,

limitando considerablemente el número de opciones terapéuticas disponibles. Antibióticos de gran utilidad en el ámbito hospitalario como las cefalosporinas resultan ineficaces para el tratamiento de las infecciones causadas por *Acinetobacter* spp. y, aunque los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> incrementan de forma inversamente proporcional según se trate de cefalosporinas de 3<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 1<sup>a</sup> generación, incluso las de últimas generaciones, como el cefepime, presentan unos niveles de resistencia superiores al 50% en nuestro estudio. Continuando con el grupo de los betalactámicos, los carbapenemes, que son con frecuencia el antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo, presentaron altos porcentajes de resistencia, rondando el 60 y el 40% para el imipenem y meropenem respectivamente. No obstante, los niveles de resistencia a los carbapenemes encontrados en nuestro hospital fueron menores que los citados en otros estudios realizados en centros españoles, donde el porcentaje de aislados no sensibles a ambos carbapenemes superaba el 80% [163]. Hay que resaltar también que la sensibilidad frente al meropenem fue mayor que la del imipenem, a diferencia de lo esperado en un principio [24]. Sin embargo, otros autores han señalado este hecho con anterioridad [164, 165]. El meropenem se ve afectado en mayor medida por la actividad de las bombas de eflujo mientras que el imipenem es hidrolizado por las betalactamasas de forma más eficiente. De este modo, la sensibilidad a meropenem no predice los valores para el imipenem y viceversa, por lo que resulta indispensable testar la actividad de ambos carbapenemes en cada caso [24]. Tampoco el doripenem, el último de los carbapenemes introducidos en la clínica, resulta una alternativa a estos dos antibióticos al presentar niveles de resistencia similares. Sin embargo, los aislados portadores de la OXA-58 presentaron CMI menores para este antibiótico que las de los otros grupos de aislados resistentes [166]. *Acinetobacter* spp. se considera intrínsecamente resistente a carbapenem y por este motivo no debe usarse para tratar las infecciones producidas por este microorganismo. No obstante, en este estudio lo empleamos para comprobar si podía ser de utilidad para distinguir unos grupos de otros y encontramos que tan sólo el 6.1% de los aislados estudiados tuvieron una CMI ≤ 1 µg/ml.

En cuanto a los sulbactam, que presenta actividad intrínseca frente a *Acinetobacter* spp., la CMI<sub>90</sub> no superó los 32 µg/ml. Su combinación con un betalactámico no parece contribuir al incremento de la actividad del mismo y los valores de CMI<sub>90</sub> en este caso son de una dilución mayor que para el inhibidor de betalactamasas solo. Sin embargo, dado que el uso de sulbactam en monoterapia no se recomienda en el caso de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. [167] este hecho no parece ser relevante en la búsqueda de una opción terapéutica útil.

El análisis de los resultados obtenidos con el grupo de los aminoglucósidos nos muestra una variabilidad mayor. La mayoría de los aislados (67%) resultaron sensibles a la amikacina, mientras que sólo un tercio de ellos lo fue a la gentamicina. Un estudio publicado recientemente en nuestro país presenta resultados similares para la amikacina [163]. Los aminoglucósidos son una de las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones de *Acinetobacter* spp siempre que las cepas sean sensibles. Estos antimicrobianos se usan a menudo en combinación, principalmente con betalactámicos pero se ha observado que la resistencia a este grupo de antibióticos está en aumento debido tanto a la presencia de enzimas modificadores de aminoglucósidos como a las bombas de eflujo [24, 168, 169].

La aparición y alta incidencia de cepas de *A. baumannii* resistentes a la mayoría de los antimicrobianos disponibles en el mercado, incluidos los carbapenemes, ha derivado en la búsqueda de otras alternativas terapéuticas. Entre ellas cabe destacar el uso de las polimixinas, especialmente colistina. Los altos niveles de resistencia para la colistina observados en este estudio son preocupantes (9.2% aislados resistentes), muy por encima de lo encontrado en otros centros de nuestro entorno, donde este valor oscila entre el 1.2%-3% [163, 170, 171]. Sin embargo, este dato se suaviza cuando se tienen en cuenta únicamente los aislados de *A. baumannii* (4.9%) y no otras especies, donde los niveles de resistencia son mayores (28%), especialmente *A. bereziniae*/ *A. genomospecies 10* (71.4%). Este dato confirma que las distintas especies presentan niveles de resistencia diferentes y refuerza la idea de lo importante de

conocer la especie concreta en cada proceso. En el caso de *A. baumannii*, el principal problema con la colistina son los niveles de heterorresistencia. Está descrita que la heterorresistencia a colistina en *A. baumannii* es mayor que la resistencia pero, dado que para el estudio de este fenómeno son necesarios ensayos de difusión (discos o E-test) nuestro trabajo no puede aportar información a este respecto por las limitaciones del método analítico empleado [38]. No obstante, ha de tenerse en cuenta esta posibilidad a la hora de escoger el tratamiento.

Otro antibiótico que ha de mostrado su utilidad en el manejo de *Acinetobacter* multirresistentes es la tigeciclina. En la actualidad, ninguno de los principales organismos reguladores (CLSI y EUCAST) establece puntos de corte para esta glicilglicina en el género *Acinetobacter* debido a falta de evidencia científica. Esto complica la estandarización y comparación de los resultados de unos estudios con otros. La mayoría de los casos publicados adoptan el valor del punto de corte establecido para enterobacterias (sensible  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ ; resistente  $< 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) y la BSAC ha incorporado los valores sugeridos por el EUCAST en sus protocolos de *Acinetobacter* spp. [172]. Ajustándonos a los criterios del EUCAST para enterobacterias, los niveles de resistencia a tigeciclina encontrados en este estudio superan el 45%, muy por encima de lo observado en otros estudios españoles que adoptan los mismos puntos de corte [163]. Sin embargo, existen otros estudios con este antibiótico que definen  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  como sensible y  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  como resistente [46, 147, 173]. En este segundo supuesto el porcentaje de aislados sensibles a la tigeciclina se incrementaría hasta el 99.2% siendo de orden similar al de la doxiciclina (97,7%) y la minociclina (93,9%), que resultaron los antibióticos más activos en este trabajo. Esta gran variación en los resultados según se tenga en cuenta un punto de corte u otro se debe a que el 46.5% de nuestros aislados presentaron una CMI de 2  $\mu\text{g/ml}$  que supone un valor crítico para definir una cepa como sensible según los distintos criterios. La minociclina, con unos porcentajes de resistencia bajos en nuestra serie, se considera en este momento de gran interés en el tratamiento de las infecciones

por *Acinetobacter* debido a los niveles que alcanza en sangre y tejido y por tener además una buena penetración en el sistema nervioso central [174].

El grupo de las quinolonas tampoco parece como una buena opción de tratamiento ya que tan solo un 3.1.8% de los aislados fue sensible al levofloxacin. Aun así, estos resultados fueron mejores que los presentados por otra quinolona, ciprofloxacino, analizada en un estudio reciente donde el porcentaje de aislados sensibles era tan solo del 6% [163].

La rifampicina está considerada como un antimicrobiano dirigido a las bacterias Gram positivas, sin embargo, estudios *in vitro* y modelos experimentales muestran que este antibiótico presenta efecto bactericida frente a *A. baumannii* multirresistente. En estos estudios la rifampicina en monoterapia ha demostrado una eficacia similar a la del imipenem y mayor a la de la colistina, sin embargo el uso de rifampicina en monoterapia no está recomendada por la rápida aparición de resistencias [175, 176] y es necesaria su combinación con otros antibióticos para que el tratamiento sea efectivo. La combinación que mejores resultados ha mostrado ha sido la de rifampicina con colistina [177, 178]. Los valores de sensibilidad *in vitro* obtenidos en nuestro estudio rondan el 80% confirmando su eficacia en *Acinetobacter* spp. Así, la rifampicina resultó uno de los compuestos con más actividad de todos los ensayados, sin embargo el valor de CMI<sub>90</sub> superó el punto de corte.

En conjunto, los niveles de resistencia de los aislados de nuestra serie fueron elevados y mostraron gran concordancia con lo reflejado en la literatura. El perfil de multirresistencia que presenta con frecuencia este género bacteriano hace que los carbapenemes sigan siendo el tratamiento de elección en las infecciones causadas por este grupo de microorganismos. Sin embargo, el número de cepas portadoras de carbapenemasas capaces de hidrolizar estos antibióticos está aumentando notablemente en los últimos años. Por ello resulta de gran interés disponer de técnicas rápidas que permitan su identificación. La detección mediante PCR de los genes implicados en la resistencia ofrece un resultado de gran fiabilidad, pero ha de tenerse en cuenta que la aplicación diaria

de este método en los laboratorios de microbiología clínica es limitada debido, principalmente, a su coste [179, 180]. Las pruebas fenotípicas como el test de Hodge modificado, el test de sinergia de doble disco o el E-test, suponen una herramienta rápida y sencilla para proporcionar un resultado preliminar, sin embargo, tan sólo ofrecen una aproximación al no permitir identificar la enzima concreta responsable de la resistencia.

Entre estas enzimas, las oxacilinasas son las que se identifican con mayor frecuencia en las cepas resistentes de *Acinetobacter*. Sin embargo, el número de portadoras de metalobetalactamasas es cada vez mayor y se ha visto que algunas de estas enzimas, con importante distribución entre las enterobacterias (como la NDM), pueden tener su origen en *Acinetobacter* [77].

Muchos estudios se han centrado recientemente en desarrollar un protocolo optimizado para la detección de metalobetalactamasas de una manera rápida lo que supone uno de los mayores retos en la actualidad [139, 181]. No obstante, en todos estos trabajos se han observado ciertas limitaciones sobre todo con los bacilos Gram negativos no fermentadores. Los E-test diseñados para detectar MBLs con frecuencia originan resultados falsos positivos que no se confirman posteriormente por PCR [182]. El alto nivel de resistencia a los antibióticos de muchas de las cepas portadoras de estas enzimas complica también la interpretación de los mismos. Los pequeños halos de inhibición que se originan con frecuencia hacen necesario ajustar de forma individualizada la distancia relativa a la que se colocan los discos [141, 183]. Por otro lado, algunos quelantes como el EDTA a menudo originan grandes halos de inhibición no relacionados con la producción de enzima [140]. Estos test fenotípicos sirven por lo tanto como técnicas de *screening* pero es necesaria una comprobación molecular cuando se persigue un resultado preciso.

En este sentido, las técnicas moleculares permiten caracterizar con detalle los aislados presentes en un entorno determinado. Esta caracterización facilita además información epidemiológica de interés y, dado que *Acinetobacter* se considera un microorganismo nosocomial capaz de producir brotes en

determinados servicios hospitalarios, ayuda a comprender la evolución de los distintos clones en el tiempo.

Así, en este estudio se emplearon técnicas moleculares (PCR y secuenciación) para confirmar los test fenotípicos, conocer las principales enzimas implicadas en la resistencia a carbapenemes y determinar los clones predominantes en nuestro entorno. La consecución de este último objetivo se alcanzó mediante la electroforesis en campo pulsado.

El primer paso para la caracterización molecular de los aislados y su relación genética se llevó a cabo mediante la amplificación y posterior secuenciación de gen *bla<sub>OXA-51-like</sub>*. Este gen, además de ser una herramienta útil para la identificación de *A. baumannii*, se emplea habitualmente en estudios epidemiológicos y de tipado y es uno de los tres *loci* analizados para la identificación de los distintos clones globales descritos (GC). Según los datos de los que se disponen los aislados portadores de la OXA-66 corresponden al GC1 mientras que los del GC2 presentan la OXA-69 y los del GC3 la OXA-71 [111].

La secuenciación del gen *bla<sub>OXA-51-like</sub>* reveló que algunas de sus variantes se aíslan en mayor medida en nuestro hospital (*bla<sub>OXA-65</sub>*, *bla<sub>OXA-64</sub>*, *bla<sub>OXA-71</sub>* y *bla<sub>OXA-201</sub>*). Algunas enzimas tipo OXA-51 se han agrupado debido a la gran similitud en su secuencia aminoacídica. Entre ellas, la OXA-201 se incluye dentro del grupo de la OXA-66 por diferenciarse tan solo en un aminoácido (137 L→V) con respecto a la OXA-109, otra enzima de este grupo. La OXA-65 también se ha considerado parte del grupo de la OXA-66. No obstante, estudios de tipado mediante DiversiLab llevados a cabo recientemente han asignado la OXA-65 al grupo WW5 fuera del de la OXA-66 (WW2). Otras enzimas como la OXA-71 y la OXA-64 altamente relacionadas a nivel de secuencia con las anteriores tampoco forman parte del mismo grupo [184, 185].

Como sucede en otros estudios españoles, dos de las variantes mayoritarias de nuestro estudio, la OXA-65 y OXA-201, pertenecen al grupo de la OXA-66 [182]. Dentro de estos grupos aparecieron tres patrones de sensibilidad bien diferenciados, incluyendo uno de aislados con alto nivel de resistencia tanto al

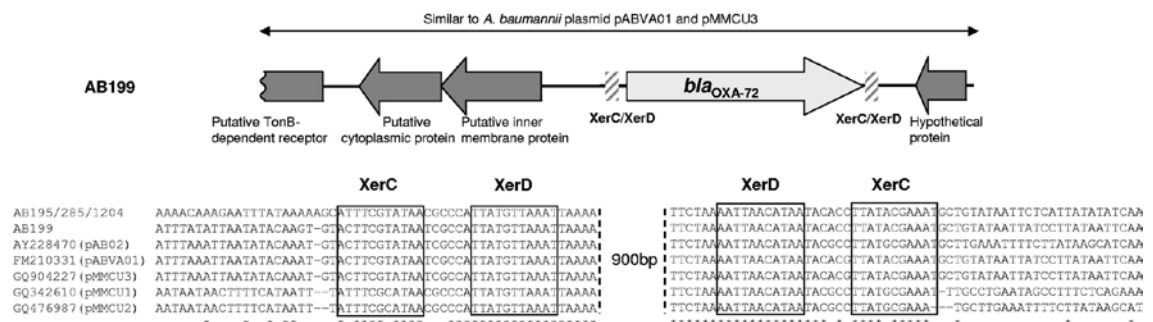
imipenem como al meropenem. La presencia de una carbapenemasa adquirida tipo OXA-24-like u OXA-23-like podría explicar estos altos niveles de resistencia, sin embargo, en este grupo no se encontró ninguna de las enzimas ensayadas. Los patrones de bandas de la electroforesis en campo pulsado también mostraron 3 clones mayoritarios que se correlacionaron con los perfiles de sensibilidad. Las secuencias de inserción tipo IS son otro de los elementos que modulan la resistencia a los carbapenemes. En el caso concreto del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> la secuencia implicada con mayor frecuencia es la ISAbal. Aunque ésta se encontró delante del promotor del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, tanto en *bla*<sub>OXA-65</sub> y *bla*<sub>OXA-201</sub> a la distancia descrita para originar un promotor fuerte, su presencia sólo explicaría un cierto incremento en la CMI a los carbapenemes. Además, la secuencia ISAbal apareció a igual distancia en los aislados sensibles y en los de bajo nivel de resistencia lo que refuerza la idea de que ésta no es la causa de los altos valores de CMI observados. Otros autores también han identificado la OXA-65 ligada a la ISAbal en aislados resistentes a los carbapenemes en ausencia de una carbapenemasa adquirida [186]. No obstante, debe considerarse la posibilidad de que existan otros mecanismos, enzimáticos o no (alteración de las porinas, presencia de bombas de eflujo, etc) que contribuyan de manera significativa al fenotipo final observado. La secuencia de inserción ISAbal se encontró precediendo a distintas enzimas del grupo de la OXA-66 (OXA-65 y OXA-201) pero en ningún caso asociada a la OXA-66, como ya comentaron otros autores previamente [111]. Otras secuencias de inserción como la ISAb9 pueden encontrarse también acompañando al gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> aumentando la actividad carbapenemasa en aquellos aislados resistentes [187].

La enzima OXA-64 fue otra de las variantes predominantes del estudio. Ésta apareció junto con la OXA-24-like, que fue la oxacilinasas adquirida más prevalente de todas las estudiadas, en todos los aislados resistentes. Esta enzima, y sus principales variantes (OXA-24, OXA-25, OXA-26 OXA-40, OXA-72, OXA-160), aparecen ampliamente distribuidas en la Península Ibérica, que está considerada una región endémica [133, 188, 189]. La secuenciación del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub> reveló que la variante encontrada en nuestros aislados correspondía a

la OXA-72. De acuerdo con lo descrito previamente, los aislados de este grupo mostraron un perfil de multirresistencia [190]. Aunque algunos grupos han identificado la enzima OXA-24-like en cepas portadoras del gen *bla<sub>OXA-51-like</sub>* precedido del ISAbal1 ninguno de nuestros aislados presentó esta secuencia de inserción delante de *bla<sub>OXA-51-like</sub>* [191]. La mayoría de los aislados portadores de la OXA-24-like se identificaron como el mismo clon atendiendo a los perfiles de bandas observados en la electroforesis de campo pulsado. Sin embargo, también se observaron perfiles minoritarios dentro del grupo. Otros autores han descrito este hecho previamente argumentando que diferentes mecanismos, tanto de transferencia horizontal como de diseminación clonal, deben desempeñar un papel en la propagación de la OXA-24-like en el ambiente hospitalario [191]. A la vista de nuestros resultados el mecanismo de dispersión clonal parece tener mayor relevancia en nuestro hospital. Sin embargo, es importante destacar que tan sólo dos aislados de los no incluidos en el perfil de bandas predominante presentaron la variante mayoritaria de la OXA-51 observada en el grupo (OXA-64), mientras que los otros 8 amplificaron la OXA-66, la OXA-64/132 y la OXA-70. Así, las variaciones en la OXA-51-like parecen tener mayor influencia en el perfil de bandas observado. Hay que tener en cuenta que la OXA-51-like tiene localización cromosómica por lo que variaciones en la misma pueden traducirse en distintos patrones de bandas en PFGE, independientemente de los elementos móviles que presente cada aislado.

La presencia de las secuencias tipo XerC/XerD flanqueando el gen *bla<sub>OXA-24-like</sub>* podría explicar en gran medida la alta diseminación de este gen. (figura 50) Estas secuencias repetidas invertidas conservadas (IRs) se encuentran separadas 6pb de la región variable y comparten una gran homología con los dominios de unión tipo *dif*. Éstos actúan como dianas para la recombinación específica de sitio mediada por las recombinasas XerC y XerD. Este mecanismo es responsable de la movilización de fragmentos discretos de ADN en el genoma de *Acinetobacter* spp, entre ellos el gen *bla<sub>OXA-24-like</sub>* [192-194]. Otro de los mecanismos posiblemente involucrados en la transmisión horizontal de la OXA-24-like son las vesículas. Como es bien sabido, los bacilos Gram negativos

secretan vesículas a l medio portadoras de distintas moléculas implicadas con frecuencia en procesos de virulencia. Se ha visto que las vesículas de *A. baumannii* pueden incluir en su interior el gen *bla<sub>OXA-24-like</sub>* actuando como un mecanismo de dispersión de genes de resistencia [195].



**Figura 50.** Esquema de l gen *bla<sub>OXA-24-like</sub>* y su ambiente genético. Los elementos XerC/XerD aparecen en las cajas. Fuente: Tian, G-B *et al* Antimicrob Agents Chemother, Jan. 2011, p. 429–432 Vol. 55, No. 1

Otra de las carbapenemasas adquiridas con mayor repercusión mundial es la OXA-23-like. Esta enzima se encuentra ampliamente extendida en Reino Unido y el sudeste asiático siendo responsable de brotes de *A. baumannii* resistente a los carbapenemes en ambos países. Su localización puede ser tanto cromosómica como plasmídica y, a menudo, se encuentra formando parte del transposón Tn2006 en la isla genómica AbaR4 [196-199]. A pesar de ser un gen con gran capacidad de dispersión, su presencia en España se describió por primera vez en el año 2013 [196, 200]. Al igual que sucede en nuestro estudio, ninguno de los realizados con anterioridad en nuestro país han descrito esta enzima en aislados de *A. baumannii*. La secuencia de los productos erróneamente identificados por PCR como OXA-23-like en nuestro estudio reveló que el amplificado detectado era en realidad de una proteína de la familia del receptor de membrana TonB. El TonB actúa como un transductor de energía en los procesos de transporte de la vitamina B12 y el sideróforo-Fe (III) a través de la membrana externa [201-203]. La ausencia de la OXA-23-like como principal enzima responsable de la resistencia a los carbapenemes en *Acinetobacter* spp. está reemplazada por la

OXA-24-like en nuestro entorno, donde esta oxacilinasasa tiene una incidencia mayor que en otras partes del mundo [182].

El hecho de no haber estudiado los otros dos genes *housekeeping* (*ompA* y *csuE*) empleados para la identificación de los clones globales descritos (GC) nos impide asignar definitivamente nuestros aislados a un grupo u otro. No obstante, los datos de la OXA-51-like parecen indicar la presencia de GC1 y GC3 en nuestro ambiente. Las variantes de la OXA-66, una de las enzimas mayoritarias en nuestro estudio, forman parte de uno de los GC más ampliamente distribuidos en el mundo. Sin embargo, aunque los aislados de GC3 portadores de la OXA-71 parecen aislarse en menor medida, éstos han sido descritos anteriormente en nuestro país [111, 184, 185]. En nuestro estudio todos los aislados resistentes a los carbapenemes portadores de esta variante de la OXA-51 presentaron además la OXA-58 mostrando valores de CMI similares a los descritos por otros autores [131, 132]. Aunque en este caso la secuenciación se centró en identificar el gen y no su entorno genético nuestros datos sugieren que la OXA-58 podría estar ligada a la secuencia de inserción *ISAb<sub>3</sub>*. Los aislados de este grupo se definieron como un mismo clon en nuestro estudio, a excepción de uno de ellos que no guardó relación con el resto. La OXA-58 se encuentra ampliamente distribuida entre los aislados de *Acinetobacter* no sensibles a los carbapenemes en el sur de Europa [204] causando brotes en Francia, Grecia, Bélgica, Italia y Turquía [205-209]. En nuestro caso, la cepa mayoritaria de *A. baumannii* portadora de OXA-58 se ha mantenido en el ambiente hospitalario a lo largo de los tres años de estudio.

Entre las variantes minoritarias de la OXA-51 encontradas en nuestro hospital destaca la OXA-64/OXA-132. El hecho de tratarse de una secuencia parcial no permite asignar definitivamente esta enzima a una variante u otra. Sin embargo, al analizar la secuencia de nucleótidos obtenida aparecen discrepancias con respecto a las dos enzimas propuestas. Por otro lado, el fragmento secuenciado comprende el 80% del gen e incluye el mayor número de posiciones en las que tienen lugar los cambios de nucleótidos que diferencian las enzimas

entre sí. Estos datos parecen indicar que se trata en realidad de una nueva OXA-51-like.

La distribución de las distintas oxacilinasas encontradas en este trabajo se ajusta a lo descrito en los distintos estudios para nuestro entorno. Sin embargo, dado la gran capacidad de diseminación de las enzimas implicadas en la resistencia a los carbapenemes y la descripción cada vez más frecuente de metalobetalactamasas se analizó también la posible presencia de estas enzimas. Nuestro estudio se centró en aquellas MBL que se detectan con más frecuencia en *Acinetobacter* y que presentan además una distribución geográfica más amplia (IMP, VIM y la NDM).

Desde que se identificará por primera vez en 2009 la metalobetalactamasa NDM en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* su distribución ha ido en aumento encontrándose principalmente en países como Bangladesh, India, Pakistán, y Reino Unido. [136, 210]. Además, esta nueva enzima se ha transferido horizontalmente a otras especies como *A. baumannii* suponiendo una verdadera amenaza en determinadas regiones. No obstante, en nuestro país tan solo se han descrito casos de enterobacterias portadoras de NDM, pero no de *A. baumannii* [211, 212].

La prevalencia de las distintas metalobetalactamasas en España es escasa, lo que puede explicar el reducido porcentaje de aislados portadores de estas enzimas encontrado en este trabajo [75]. Aunque estas enzimas parecen tener mayor actividad hidrolítica frente a los carbapenemes que las OXAs [213] los dos aislados portadores de IMP-8 identificados en este estudio presentaron menores valores de CMI para el imipenem y el meropenem que los que amplificaron la OXA-24-like. Las enzimas tipo IMP se han encontrado tanto en *A. baumannii* como en otras especies del género, en nuestro caso, los dos aislados portadores de este gen fueron identificados como *A. berezinae*/*A. genomospecies 10* [214, 215]. Al no haberse recogido posteriormente más aislados con este perfil resulta complicado saber si se trata de dos casos aislados

o si, por el contrario, al ser los dos el mismo clon, éste presenta poco potencial patógeno y permanece en el ambiente sin gran capacidad de dispersión.

Por último, dos de los aislados que hidrolizaron el imipenem no presentaron ninguna de las carbapenemasas ensayadas, como ha sucedido en otros estudios [204]. Aunque no se haya podido determinar el mecanismo de resistencia implicado en estos dos casos cabe la posibilidad de que estos aislados presenten alguna otra enzima no analizada en este trabajo o, también, que se trate de una carbapenemasa no descrita hasta el momento.

El análisis de los perfiles de sensibilidad y las enzimas presentes permite caracterizar las distintas cepas que predominan en nuestro medio. Sin embargo, para poder determinar con mayor exactitud los clones circulantes es necesario completar esta información con otro tipo de estudios. Como sucede con muchos otros microorganismos, la electroforesis en campo pulsado es una de las técnicas de tipaje con mayor poder discriminatorio para *Acinetobacter* spp y todavía hoy es considerada la técnica de referencia [66]. Gracias a ella se pudo determinar la relación genética entre nuestros aislados y la implicación de cada cepa en las distintas situaciones epidemiológicas. El estudio muestra que algunos de los clones se mantienen en el tiempo mientras que otros presentan oscilaciones reapareciendo tras un determinado periodo. Esto sugiere que ciertos clones se instauran como endémicos en un entorno, como ha sido descrito con anterioridad [216]. La dispersión de un clon predominante se considera el patrón de transmisión más común en los brotes. Sin embargo se sabe que diferentes clones coexisten a menudo en el mismo hospital [217-220].

La resistencia antibiótica es uno de los factores que contribuye a la dispersión y mantenimiento de una determinada cepa en el ambiente hospitalario. La rápida detección de estas resistencias ayuda al control y manejo de estos microorganismos y, por tanto, es fundamental en cualquier laboratorio de microbiología.

Como ya se comentó, las técnicas para la detección de carbapenemasas de las que se disponen en la actualidad presentan ciertas limitaciones. Estas resultan

o bien poco precisas aunque fáciles de realizar, como los test fenotípicos, o, por el contrario, son altamente específicas aunque muy laboriosas, como las técnicas moleculares. Es por esto que la puesta a punto de nuevos métodos que garanticen la rápida detección y caracterización de estas enzimas puede ser de gran utilidad en el entorno clínico a la hora de establecer el tratamiento más idóneo en cada caso.

En este sentido, la espectrometría de masas MALDI-TOF se presenta como una alternativa prometedora y son muchos los estudios que se publican actualmente sobre este tema [120, 122, 143]. La mayoría de ellos utilizan el meropenem o el ertapenem como sustrato enzimático y se centran principalmente en enterobacterias. Hasta la realización de este trabajo sólo había aparecido una publicación centrada en *A. baumannii* y su capacidad para hidrolizar el imipenem [124], pero no existían datos sobre otras especies del género ni sobre las características específicas de cada carbapenemasa. A falta de un protocolo estandarizado, todos estos estudios se llevaron a cabo con las condiciones descritas por los propios autores, tanto en relación al solvente utilizado como a los tiempos de incubación. Nuestro estudio compara todas las condiciones descritas anteriormente con objeto de establecer los parámetros más adecuados para la rápida identificación de las carbapenemasas de *Acinetobacter*.

El uso de una matriz comercial, 5 mg/ml de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinámico en 50% acetronitrilo/2.5% ácido trifluoroacético, recomendada por el fabricante (Bruker Daltonik GmbH, Germany) contribuye también a la estandarización del protocolo. Además de facilitar la ionización de los compuestos a los que acompaña, hay que tener en cuenta que el ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinámico se ioniza por sí solo y también sus aductos. En los últimos tiempos se han ensayado distintas matrices tratando de mejorar la ionización de los analitos [124]. Otros componentes de la mezcla como el solvente o los materiales plásticos que se emplean para la preparación y almacenamiento de las muestras liberan al medio iones sodio y potasio que inducen la formación de aductos. Muchos autores tienen en cuenta estos aductos al analizar los espectros pero no los formados con la matriz [120, 123]. Estos últimos aparecen a lo largo

de todo el espectro proteico y son particularmente evidentes a bajas concentraciones de muestra. Por ello se está estudiando también la manera de reducir la formación de aductos que disminuyen la sensibilidad de las medidas y dificultan la interpretación de los resultados en los espectros complejos. En este estudio se analizaron diferentes concentraciones de antibiótico e inclusiones bacterianas y se compararon los espectros entre sí para determinar las condiciones en las que aparecían menos picos que interfiriesen con los de interés. La principal diferencia observada correspondía al tiempo necesario para la completa desaparición de los picos del antibiótico pero no se detectaron diferencias significativas en cuanto al número de picos ni la complejidad de los espectros.

Una de las aportaciones más relevantes de los experimentos realizados es la identificación de los principales picos del espectro proteico asociados a la actividad enzimática que se mide. Esto simplifica de forma significativa el análisis de los resultados al seleccionar tan solo aquellos picos que sufren las mayores modificaciones durante el tiempo de incubación. Este estudio establece inequívocamente los picos de interés relacionados con el imipenem y su análisis permite identificar los distintos patrones de sensibilidad y resistencia que presenta cada aislado. Además, la normalización de cada ensayo con el valor de la intensidad del pico de cilastatina hace posible la comparación de diferentes experimentos entre sí. Puesto que existe una variabilidad intra e inter-ensayo, el uso de un control interno resulta fundamental para estandarizar y normalizar cada espectro. De este modo se pudieron comparar los resultados de diferentes experimentos y detectar pequeñas variaciones en la intensidad de los picos de interés. Entre todos los picos identificados el de mayor relevancia correspondieron a la molécula de imipenem y a varios aductos, sin embargo, sólo los de 300 (imipenem) y 489 m/z (aducto imipenem+ác. hidroxicinámico) presentaron una alta señal sobre ruido en todos los ensayos realizados. La mayor intensidad la presentó el pico de 489 m/z independientemente de las condiciones empleadas, por lo que éste resultó el pico de mayor utilidad en el procesamiento

de los resultados. Todos estos datos posibilitan el diseño de un protocolo fácilmente reproducible en todos los laboratorios de microbiología.

La hidrólisis de los antibióticos origina unos productos de degradación con valores masa/carga concretos que podrían ser detectados en los espectros. No obstante, estos productos suelen ser inestables lo que dificulta su detección por MALDI-TOF. Algunos autores han reseñado el aumento de la estabilidad de los productos de degradación de los carbapenemes tras la suplementación del solvente con SDS [123]. No obstante, la adición de este compuesto no produjo ningún cambio en el espectro de masas en nuestro estudio, independientemente del solvente utilizado.

Como ya se ha comentado, una posible explicación de este hecho podría ser que estos productos son muy lábiles y permanecen poco tiempo en el medio por lo que deberían de ser analizados inmediatamente después de su formación y no transcurrido un tiempo como sucede en nuestros ensayos. Por otro lado, la dificultad de estos compuestos para ser ionizados podría contribuir también a que no sean detectados de forma adecuada. Uno de los picos que presenta menor valor  $m/z$  (274  $m/z$ ) podría corresponder a uno de estos productos de degradación o, como sugiere su peso molecular, a la tienamicina. Sin embargo, al incubarse con un aislado resistente disminuye su intensidad por lo que la posibilidad de que este pico corresponda a la tienamicina parece la más factible. El pico de 254  $m/z$  descrito por Kempf *et al* aparece en alguno de nuestros ensayos pero, en nuestro caso, su presencia no se asocia con la degradación del imipenem y a que fue posible detectarlo en los espectros control de *Acinetobacter* en ausencia de antibiótico.

Los resultados observados con los microorganismos portadores de distintas enzimas permitieron comprobar que la degradación del antibiótico varía según el tipo de carbapenemasa presente en cada microorganismo y no en función de la CMI a los carbapenemes. Así, la hidrólisis del imipenem tras una hora de incubación es mayor en los aislados portadores de una MBL que en los que presentan una CHDL, como ya indicaban otros trabajos [120]. Más aún, es

posible apreciar diferencias en la hidrólisis originada por un tipo de oxacilinasas u otra, independientemente de la solución de incubación, al contrario de lo que sugieren otros estudios. Éstos mencionan que el NaCl tiene la capacidad de inhibir las oxacilinasas, no obstante, este efecto no se detectó en nuestro trabajo. Este solvente tampoco afectó a la actividad de las MBL. Por el contrario, es bien sabido que compuestos como los quelantes divalentes inhiben la actividad de este grupo de enzimas. Entre estos, el DPA se utiliza con frecuencia en la detección fenotípica de cepas productoras de MBL [141]. Este compuesto no inhibe el crecimiento bacteriano ni hidroliza los betalactámicos por lo que es adecuado para el estudio molecular mediante MALDI-TOF MS.

La utilización de este quelante permitió confirmar los datos obtenidos para las distintas carbapenemasas. De este modo, se comprobó que al incubarse una cepa portadora de una MBL con DPA ésta pierde su actividad hidrolítica y el espectro del imipenem permanece inalterado. Además, tal y como cabía esperar, la actividad del quelante revierte al incluir  $Zn^{2+}$  en la solución de incubación. El hecho de no observarse ningún efecto sobre las oxacilinasas al utilizar ambos compuestos demuestra su capacidad selectiva para la detección de las MBL y confirma su utilidad para analizar estas enzimas independientemente de la bacteria en la que se encuentren. Nuestro estudio es el primero en el que se establece mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) la capacidad del DPA para inhibir las MBL y, aunque sólo se ha ensayado en aislados de *Acinetobacter*, este análisis podría reproducirse en otras especies portadoras de MBL esperando el mismo efecto tras la incubación con DPA.

En definitiva, los resultados presentados en este trabajo confirman el papel de *Acinetobacter* como microorganismo causal de infecciones hospitalarias y recogen la importancia que otras especies distintas de *A. baumannii* pueden tener en estos procesos.

Los altos niveles de resistencia a carbapenemes detectados entre los clones mayoritarios que se mantienen en el ambiente hospitalario largos periodos de tiempo remarcan la necesidad de técnicas simples y rápidas que permitan tanto la

identificación de las diferentes especies del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* como la caracterización de las enzimas responsables de las resistencias observadas.



## CONCLUSIONES

---

---



## VII. Conclusiones

1. La infección respiratoria, asociada al uso de dispositivos de ventilación mecánica, así como la infección de piel y partes blandas son las principales patologías en las que se encuentra implicado *Acinetobacter* como agente causal siendo los pacientes de mayor edad y más críticos los más susceptibles de padecer una infección causada por *Acinetobacter* spp.
2. Las galerías de pruebas bioquímicas tradicionales resultan insuficientes para la correcta identificación de los aislados de *Acinetobacter* spp. a nivel de especie y, por tanto, hacen necesario el uso de pruebas moleculares. Entre éstas, la detección del gen *bla<sub>OXA-51-like</sub>* aparece como la manera más simple de identificar *A. baumannii* mientras que la secuenciación del gen *rpoB* permite la correcta identificación de todas las especies del complejo.
3. La espectrometría de masas MALDI-TOF puede ser una buena alternativa para la identificación de este género bacteriano siempre y cuando se disponga de un número suficiente de entradas en la base de datos.
4. Especies distintas de *A. baumannii*, principalmente *A. pittii* y *A. berezinae*, están también implicadas en la infección nosocomial.
5. Los aislados del estudio presentan un elevado porcentaje de resistencia a los carbapenemes. Además, éstos suelen llevar asociadas resistencias a otros grupos de antimicrobianos lo que dificulta en gran medida su tratamiento.
6. Las tetraciclinas, junto con la tigeciclina y la colistina son los antimicrobianos que presentan mejor perfil de actividad frente a *Acinetobacter* spp. Las especies distintas de *A. baumannii* resultan más

sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, a excepción de la colistina.

7. La OXA-24-like es la carbapenemasa adquirida e identificada con mayor frecuencia en este estudio. No se encontró ni ningún aislado portador de OXA-23-like.
8. Algunas variantes de la OXA-51 son más prevalentes que otras en nuestro entorno estableciéndose como endémicas. Asimismo, los clones con mayores niveles de resistencia son los que perduran en el ambiente hospitalario a lo largo del tiempo. Las medidas de preventivas permiten su control pero no su erradicación definitiva.
9. La detección de carbapenemasas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) ofrece resultados satisfactorios si se emplea 1 mg/ml de imipenem como sustrato y se ajusta el tiempo de incubación a 1 hora. Inóculos de  $2.5 \times 10^{10}$  UFC/ml ofrecen la posibilidad de diferenciar los distintos grupos de enzimas. La presencia de metalobetalactamasas puede fácilmente confirmarse mediante el empleo de DPA.
10. El pico correspondiente al ducto imipenen-ác- $\alpha$  hidroxí-cinámico (489 m/z) es el marcador más adecuado para el estudio de la degradación enzimática del imipenem.
11. La espectrometría de masas MALDI-TOF permite una rápida detección e identificación de las carbapenemasas más frecuentes en nuestro entorno, siempre que se utilice un calibrador externo y un normalizador interno (cilastatina) que disminuyan la variabilidad inter e intraensayo haciendo que los resultados de los distintos experimentos puedan ser comparados entre sí.

## BIBLIOGRAFÍA

---

---



## VIII. Bibliografía

- 1 **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 538-582.
- 2 **Bergogne-Berezin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9: 148-165.
- 3 **Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA.** Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4188-4193.
- 4 **Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT et al.** Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics.* 2011; 12: 126.
- 5 **Peleg AY, de Breij A, Adams MD, et al.** The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One.* 2012; 7: e46984.
- 6 **Dortet L, Legrand P, Soussy CJ et al.** Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4471-4478.
- 7 **Chuang YC, Sheng WH, Li SY, et al.** Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: 352-360.
- 8 **Molina J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, et al.** Clinical features of infections and colonization by *Acinetobacter genospecies 3*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 4623-4626.
- 9 **Seifert H, Strate A, Schulze A et al.** Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): Report of 13 cases. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 632-636.

- 10 **Turton JF, Shah J, Ozongwu C et al.** Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: Evidence for emerging species. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1445-1449.
- 11 **Gerner-Smidt P.** Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2680-2685.
- 12 **Boudewijns M, Bakkers JM, Sturm PD et al.** 16s RNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: A perfect marriage? *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3469-3470.
- 13 **Janda JM, Abbott SL.** 16s RNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2761-2764.
- 14 **Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L et al.** Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16s-23s RNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1632-1639.
- 15 **Bartual SG, Seifert H, Hippler C et al.** Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4382-4390.
- 16 **Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S et al.** Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology.* 2009; 155: 2333-2341.
- 17 **Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L et al.** Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 2011.
- 18 **Giebel R, Worden C, Rust SM et al.** Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010; 71: 149-184.
- 19 **Mellmann A, Bimet F, Bizet C, et al.** High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

- spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 3732-3734.
- 20 **Livermore DM.** Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39: 283-294.
- 21 **Livermore DM, Woodford N.** The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006; 14: 413-420.
- 22 **Playford EG, Craig JC, Iredell JR.** Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: Risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect.* 2007; 65: 204-211.
- 23 **Fournier PE, Richet H.** The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 692-699.
- 24 **Maragakis LL, Perl TM.** *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1254-1263.
- 25 **Coelho J, Woodford N, Turton J et al.** Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: How big a threat? *J Hosp Infect.* 2004; 58: 167-169.
- 26 **Miyasaki Y, Morgan MA, Chan RC, et al.** In vitro activity of antibiotic combinations against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of their antibiotic resistance determinants. *FEMS microbiology letters.* 2012; 328: 26-31.
- 27 **Mutlu Yilmaz E, Sunbul M, Aksoy A et al.** Efficacy of tigecycline/colistin combination in a pneumonia model caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40: 332-336.
- 28 **Baang JH, Axelrod P, Decker BK, et al.** Longitudinal epidemiology of multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control.* 2012; 40: 134-137.
- 29 **Apisarnthanarak A, Pinitchai U, Thongphubeth K et al.** A multifaceted intervention to reduce pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

- colonization and infection in 3 intensive care units in a Thai tertiary care center: A 3-year study. *Clin Infect Dis* : 2008; 47: 760-767.
- 30 **D'Agata EM, Thayer V, Schaffner W.** An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000; 21: 588-591.
- 31 **Afzal-Shah M, Livermore DM.** Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41: 576-577.
- 32 **Corbella X, Montero A, Pujol M, et al.** Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4086-4095.
- 33 **Peck KR, Kim MJ, Choi JY, et al.** In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *J Med Microb.* 2012; 61: 353-360.
- 34 **Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M et al.** Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: A matched cohort study. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2478-2482.
- 35 **Michalopoulos AS, Tsiodras S, Rellos K et al.** Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant gram-negative bacteria: The renaissance of an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 115-121.
- 36 **Enoch DA, Summers C, Brown NM, et al.** Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. *J Hosp Infect.* 2008; 70: 109-118.
- 37 **Livermore DM, Hill RL, Thomson H, et al.** Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenem- and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35: 19-24.

- 38 **Li J, Rayner CR, Nation RL, et al.** Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2946-2950.
- 39 **Herrera ME, Mobilia LN, Posse GR.** Comparative evaluation of the sensitivity of *Acinetobacter* to colistin, using the prediffusion and minimum inhibitory concentration methods: Detection of heteroresistant isolates. *Rev Argent Microbiol.* 2011; 43: 115-119.
- 40 **Yau W, Owen RJ, Poudyal A, et al.** Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the western pacific region in the sentry antimicrobial surveillance programme. *J Infect.* 2009; 58: 138-144.
- 41 **Cai Y, Chai D, Wang R et al.** Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 1607-1615.
- 42 **Chopra S, Matsuyama K, Tran T et al.** Systematic discovery of synergistic novel antibiotic combinations targeting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40: 377-379.
- 43 **Kempf M, Rolain JM.** Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: Clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39: 105-114.
- 44 **Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I et al.** Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: A review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 45-55.
- 45 **Principe L, D'Arezzo S, Capone A et al.** In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8: 18.
- 46 **Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y.** High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 772-774.

- 47 **Sun JR, Perng CL, Chan MC, et al.** A truncated adenyl kinase protein generated by insertion correlates with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2012; 7: e49534.
- 48 **Yahav D, Lador A, Paul M et al.** Efficacy and safety of tigecycline: A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 1963-1971.
- 49 **Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E.** Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: A review. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37: 102-109.
- 50 **Cirioni O, Silvestri C, Ghiselli R, et al.** Therapeutic efficacy of buforin II and rifampin in a rat model of *Acinetobacter baumannii* sepsis. *Crit Care Med*. 2009; 37: 1403-1407.
- 51 **Conlon JM, Demandt A, Nielsen PF et al.** The alyteserins: Two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad alytes obstetricans (alytidae). *Peptides*. 2009; 30: 1069-1073.
- 52 **Poirel L, Menuteau O, Agoli N et al.** Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase veb-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a french hospital. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 3542-3547.
- 53 **Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al.** Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*. 2006; 2: e7.
- 54 **Post V, White PA, Hall RM.** Evolution of a bar-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1162-1170.
- 55 **Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, et al.** Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 8053-8064.
- 56 **Krizova L, Dijkshoorn L, Nemec A.** Diversity and evolution of a bar genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of european clone I. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 3201-3206.
- 57 **Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57: 373-383.

- 58 **Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289: 321-331.
- 59 **Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 826-836.
- 60 **Brown S, Amyes S.** OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: The story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1-3.
- 61 **Turton JF, Woodford N, Glover et al.** Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla<sub>OXA-51-like</sub>* carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2974-2976.
- 62 **Lee YT, Turton JF, Chen TL, et al.** First identification of *bla<sub>OXA-51-like</sub>* in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. *J Chemother.* 2009; 21: 514-520.
- 63 **Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al.** The role of *ifisab* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 258: 72-77.
- 64 **Heritier C, Poirel L, Fournier PE et al.** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4174-4179.
- 65 **Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J.** OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in a n *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1556-1561.
- 66 **Bou G, Cervero G, Dominguez MA et al.** Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: High-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3299-3305.
- 67 **Poirel L, Marque S, Heritier C et al.** OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 202-208.
- 68 **Lee Y, Kim CK, Lee H et al.** A novel insertion sequence, *ISAbal0*, inserted into *ISAbal* adjacent to the *bla<sub>OXA-23</sub>* gene and disrupting the outer

- membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 361-363.
- 69 **Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P.** Coexistence of *bla*<sub>OXA-23</sub> with *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 2253-2254.
- 70 **Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Ronco E et al.** Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 3484-3488.
- 71 **Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P.** Genetic and functional variability of ampC-type beta-lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 4930-4933.
- 72 **Corvec S, Caroff N, Espaze E et al.** AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 629-635.
- 73 **Jacoby GA.** AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22: 161-182.
- 74 **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 440-458.
- 75 **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo-beta-lactamases: A last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 381-393.
- 76 **Poirel L, Dortet L, Bernabeu S et al.** Genetic features of bla<sub>NDM-1</sub>-positive enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 5403-5407.
- 77 **Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A et al.** Tn125-related acquisition of *bla*<sub>NDM-like</sub> genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1087-1089.
- 78 **Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, et al.** Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 1354-1357.
- 79 **Robledo IE, Aquino EE, Vazquez GJ.** Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and

- Acinetobacter baumannii* during a pcr-based nosocomial surveillance study in puerto rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2968-2970.
- 80 **Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, et al.** Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J Hosp Infect.* 2005; 60: 14-18.
- 81 **Naas T, Coignard B, Carbonne A, et al.** VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, france. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1214-1222.
- 82 **Naas T, Nordmann P, Heidt A.** Intercountry transfer of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from romania. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 226-228.
- 83 **Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al.** Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-2269.
- 84 **Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, et al.** Emergence of PER-2 and veb-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the americas. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3222-3224.
- 85 **Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, et al.** Spread in an italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2211-2214.
- 86 **Nagano N, Nagano Y, Cordevant C et al.** Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3978-3984.
- 87 **Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, et al.** 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.* 2006; 50: 4114-4123.

- 88 **Opazo AC, Mella SM, Dominguez MY et al.** Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Rev Chilena Infectol.* 2009; 26: 499-503.
- 89 **Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J.** Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 1210-1215.
- 90 **Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S et al.** Antibiotic efflux pumps in gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy. *T J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1223-1229.
- 91 **Magnet S, Courvalin P, Lambert T.** Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain bm4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3375-3380.
- 92 **Chau SL, Chu YW, Houang ET.** Novel resistance-nodulation-cell division efflux system encoded in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4054-4055.
- 93 **Huys G, Cnockaert M, Nemec A et al.** Sequence-based typing of Ade-B as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5327-5331.
- 94 **Huang L, Sun L, Xu G, Xia T.** Differential susceptibility to carbapenems due to the adeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62: 326-332.
- 95 **Coyne S, Courvalin P, Perichon B.** Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 947-953.
- 96 **Fernandez-Cuenca F, Smani Y, Gomez-Sanchez MC, et al.** Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins caro and oprd-like. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 38: 548-549.

- 97 **Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I et al.** Molecular and structural characterization of the *hmp-ab* gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol.* 2003; 47: 434-443.
- 98 **Limansky AS, Mussi MA, Viale AM.** Loss of a 29 -kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4776-4778.
- 99 **Fluit AC, Schmitz FJ.** Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 272-288.
- 100 **Domingues S, Harms K, Fricke WF et al.** Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002837.
- 101 **Lopes BS, Al-Hassan L, Amyes SG.** IS*Aba825* controls the expression of the chromosomal *blaOXA-51-like* and the plasmid borne *blaOXA-58* gene in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from the USA. *Clin Microbiol Infect* 2012.
- 102 **Pagano M, Martins AF, Machado AB et al.** Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1* upstream *blaOXA-51-like* gene in porto alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect.* 2012: 1-4.
- 103 **Chen TL, Chang WC, Kuo SC, et al.** Contribution of a plasmid-borne *blaOXA-58* gene with its hybrid promoter provided by IS1006 and an IS*Aba3-like* element to beta-lactam resistance in *Acinetobacter genomic species 13TU*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 3107-3112.
- 104 **Chen TL, Wu RC, Shaio MF et al.** Acquisition of a plasmid-borne *blaOXA-58* gene with an upstream IS1008 insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 2573-2580.
- 105 **Ravasi P, Limansky AS, Rodriguez RE et al.** IS*Aba825*, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and *blaOXA-58* expression in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 917-920.

- 106 **Lopes BS, Evans BA, Amyes SG.** Disruption of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene by isab16 and activation of the *bla*<sub>OXA-58</sub> gene leading to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* ab244. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 59-63.
- 107 **Evans BA, Hamouda A, Towner KJ et al.** Novel genetic context of multiple *bla*<sub>OXA-58</sub> genes in *Acinetobacter* *genospecies* 3. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1586-1588.
- 108 **Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, et al.** Molecular characterization of *bla*<sub>NDM-1</sub> in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 1998-2001.
- 109 **Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, et al.** Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 539-548.
- 110 **Seifert H, Dolzani L, Bressan R, et al.** Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4328-4335.
- 111 **Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C et al.** Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 807-815.
- 112 **Anhalt JP, and C. Fenselau.** Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry.* 1975; 47: 219-225.
- 113 **Giebel R, Worden C, Rust SM et al.** Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Advances in applied microbiology.* 2010; 71: 149-184.
- 114 **van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ.** High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 900-907.

- 115 **Nagy E, Maier T, Urban E et al.** Species identification of clinical isolates of bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 796-802.
- 116 **Murray PR.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1626-1630.
- 117 **Rajakaruna L, Hallas G, Molenaar L, et al.** High throughput identification of clinical isolates of staphylococcus aureus using MALDI-TOF MS intact cells. *Infect Genet Evol.* 2009; 9: 507-513.
- 118 **Alvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ.** Identification of *Acinetobacter* species: Is the biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 345-349.
- 119 **Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, et al.** Misidentification of alpha-hemolytic *Streptococci* by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 1709-1715.
- 120 **Burckhardt I, Zimmermann S.** Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 3321-3324.
- 121 **Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ et al.** Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using matrix-assisted mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2012; 11: 79-84.
- 122 **Sparbier K, Schubert S, Weller U, et al.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 927-937.
- 123 **Hrabak J, Walkova R, Studentova V et al.** Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 3222-3227.
- 124 **Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al.** Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser

- desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7: e31676.
- 125 **Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM et al.** Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2868-2873.
- 126 **Williamson YM, Moura H, Woolfitt AR, et al.** Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 5891-5897.
- 127 **Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, et al.** Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant *Enterococci* and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2918-2931.
- 128 **Siegrist TJ, Anderson PD, Huen WH et al.** Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J Microbiol Methods*. 2007; 68: 554-562.
- 129 **Culebras E, Gonzalez-Romo F, Head J et al.** Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-66 in a Spanish hospital: Epidemiology and study of patient movements. *Microb Drug Resist*. 2010; 16: 309-315.
- 130 **La Scola B, Gundi VA, Khamis A et al.** Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 827-832.
- 131 **Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F et al.** High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 1192-1198.
- 132 **Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M et al.** Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 756-758.

- 133 **Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM.** 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 Chemother.* 2001; 45: 583-588.
- 134 **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1151-1161.
- 135 **Lee MF, Peng CF, Hsu HJ et al.** Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant gram-negative bacteria from a university hospital in southern taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 475-480.
- 136 **Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al.** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in india, Pakistan, and the U K: A molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 597-602.
- 137 **Lee K, Yum JH, Yong D, et al.** Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4485-4491
- 138 **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement document M100-S21. *CLSI, Wayne, PA* 2011; 31. *CLSI, Wayne, PA* 2011; 31.
- 139 **Lee K, Chong Y, Shin HB et al..** Modified hodge and edta-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7: 88-91.
- 140 **Lee K, Lim YS, Yong D et al.** Evaluation of the hodge test and the imipenem-edta double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4623-4629.

- 141 **Yong D, Lee Y, Jeong SH et al.** Evaluation of double-disk potentiation and disk potentiation tests using dipicolinic acid for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2012.
- 142 **Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F et al.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Pnt-mrn-03. *SEIM*. 2011; 2<sup>a</sup> edición.
- 143 **Hrabak J, Studentova V, Walkova R, et al.** Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA -48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2441-2443.
- 144 **Seifert H, Dolzani L, Bressan R, et al.** Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4328-4335.
- 145 **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2233-2239.
- 146 **Microbiologie. CASFM. Recomendations 2010.** Paris, France. [www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org). 2010.
- 147 **Hoban DJ, Bouchillon SK, Dowzicky MJ.** Antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase producers and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* throughout the United States and comparative in vitro activity of tigecycline, a new glycylcycline antimicrobial. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 57: 423-428.
- 148 **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement document M100-S20CLSI, Wayne, PA 2010; 30.
- 149 **Fernandez-Cuenca F, Gomez-Sanchez M, Rodriguez-Bano J, et al.** Epidemiological and clinical features associated with colonisation/infection

- by *Acinetobacter baumannii* with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40: 235-238.
- 150 **Cardoso T, Ribeiro O, Aragao IC et al.** Additional risk factors for infection by multidrug-resistant pathogens in healthcare-associated infection: A large cohort study. *BMC infectious diseases*. 2012; 12: 375.
- 151 **Jacquier H, Carbonnelle E, Corvec S, et al.** Revisited distribution of nonfermenting gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011.
- 152 **Spanu T, De Carolis E, Fiori B, et al.** Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to *rpoB* gene sequencing for species identification of bloodstream infection *Staphylococcal* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 44-49.
- 153 **Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L et al.** Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (ab) group by maldi-tof ms. *Clin Microbiol Infect.*: 2012; 18: 1097-1103.
- 154 **Heritier C, Poirel L, Fournier PE et al.** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4174-4179.
- 155 **Bizzini A, Jaton K, Romo D et al.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16s rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 693-696.
- 156 **Seng P, Rolain JM, Fournier PE et al.** MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*. 2010; 5: 1733-1754.
- 157 **Loubinoux J, Mihaila-Amrouche L, Le Fleche A, et al.** Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1337-1338.
- 158 **Endo S, Sasano M, Yano H, et al.** IMP-1-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter ursingii* from Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 2533-2534.

- 159 **Chen TL, Siu LK, Lee YT, et al.** *Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic infection. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2938-2944.
- 160 **Kilic A, Li H, Mellmann A, et al.** *Acinetobacter septicus* sp. no v. Association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 902-908.
- 161 **Kuo SC, Fung CP, Lee YT et al.** Bacteremia due to *Acinetobacter genomic species* 10. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 586-590.
- 162 **Cayo R, Yanez San Segundo L, Perez del Molino Bernal IC, et al.** Bloodstream infection caused by *Acinetobacter junii* in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogenic haematopoietic cell transplantation. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 375-377.
- 163 **Fernandez-Cuenca F, Tomas-Carmona M, Caballero-Moyano F, et al.** In vitro activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: Multicenter national study geih-reipi-ab 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012.
- 164 **Ikonomidis A, Pournaras S, Maniatis AN et al.** Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 28: 376-377.
- 165 **Jones RN, Sader HS, Fritsche TR et al.** Carbapenem susceptibility discords among *Acinetobacter* isolates. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 158.
- 166 **Marti S, Sanchez-Cespedes J, Alba V et al.** In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 181-182.
- 167 **Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D et al.** In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1586-1592.
- 168 **Nemec A, Dolzani L, Brisse S et al.** Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains

- of pan-european *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* 2004; 53: 1233-1240.
- 169 **Yamada Y, Suwabe A.** Diverse carbapenem-resistance mechanisms in 16s rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 618-622.
- 170 **Gomez-Garces JL, Aracil B, Gil Y et al.** Susceptibility of 228 non-fermenting gram-negative rods to tigecycline and six other antimicrobial drugs. *J Chemother.* 2009; 21: 267-271.
- 171 **Garcia-Penuela E, Aznar E, Alarcon T et al.** Susceptibility pattern of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Madrid vs. Hong Kong. *Rev Esp Quimioter* 2006; 19: 45-50.
- 172 **Chemotherapy BSAC.** Methods for antimicrobial susceptibility testing version 6.1. [http://www.bsac.org/\\_db/\\_documents/version\\_61pdf](http://www.bsac.org/_db/_documents/version_61pdf) 2007.
- 173 **Curcio D, Fernandez F.** *Acinetobacter* spp. Susceptibility to tigecycline: A worldwide perspective. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60: 449-450.
- 174 **Bishburg E, Bishburg K.** Minocycline--an old drug for a new century: Emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 395-401.
- 175 **Montero A, Ariza J, Corbella X, et al.** Efficacy of colistin versus beta-lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1946-1952.
- 176 **Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R et al.** Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 537-540.
- 177 **Petrosillo N, Chinello P, Proietti MF, et al.** Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: Clinical outcome and adverse events. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 682-683.

- 178 **Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, et al.** Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect.* 2006; 53: 274-278.
- 179 **Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN et al.** Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative gram-negative bacteria. *Indian J Med Res.* 2009; 129: 707-712.
- 180 **Kim SY, Hong SG, Moland ES et al.** Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2798-2801.
- 181 **Bonnin RA, Naas T, Poirel L et al.** Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-beta-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 1419-1421.
- 182 **Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ et al.** Epidemiology of the *Acinetobacter-Derived Cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 550-553.
- 183 **Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.** Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiols compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40-43.
- 184 **Evans BA, Hamouda A, Towner KJ et al.** OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 268-275.
- 185 **Zander E, Nemeč A, Seifert H et al.** Association between beta-lactamase-encoding *bla<sub>OXA-51</sub>* variants and diversilab re-p-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1900-1904.
- 186 **Zander E, Chmielarczyk A, Heczko P et al.** Conversion of OXA-66 into OXA-82 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and association with altered carbapenem susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 308-311.

- 187 **Figueiredo S, Poirel L, Croize J et al.** In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAbal-mediated overexpression of the natural *bla*OXA-66 oxacillinase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 2657-2659.
- 188 **Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ et al.** Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4741-4743.
- 189 **Da Silva GJ, Quinteira S, Bertolo E, et al.** Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 255-258.
- 190 **Grosso F, Quinteira S, Poirel L et al.** Role of common *bla*<sub>OXA-24/OXA-40</sub>-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 3969-3972.
- 191 **Lu PL, Doumith M, Livermore DM et al.** Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a taiwan hospital: Spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 641-647.
- 192 **Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, et al.** Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 429-432.
- 193 **D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, et al.** Characterization of PAbva01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3528-3533.
- 194 **Merino M, Acosta J, Poza M, et al.** OXA-24 carbapenemase gene flanked by Xerc/Xerd-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 2724-2727.

- 195 **Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, et al.** Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3084-3090.
- 196 **Lee HY, Chang RC, Su LH, et al.** Wide spread of Tn2006 in an AbaR4-type resistance island among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40: 163-167.
- 197 **Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, et al.** Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and southeast England. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3623-3627.
- 198 **Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, et al.** A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in southeast England. *J Hosp Infect*. 2004; 58: 170-179.
- 199 **Turton JF, Baddal B, Perry C.** Use of the accessory genome for characterization and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1260-1266.
- 200 **Espinal P, Macia MD, Roca I, et al.** First report of a novel OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to tn2006 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 589-591.
- 201 **Smani Y, McConnell MJ, Pachon J.** Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One*. 2012; 7: e33073.
- 202 **Postle K, Larsen RA.** TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals*. 2007; 20: 453-465.
- 203 **Larsen RA, Letain TE, Postle K.** In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2003; 49: 211-218.
- 204 **Marque S, Poirel L, Heritier C, et al.** Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4885-4888.

- 205 **Bogaerts P, Naas T, Wybo I, et al.** Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4189-4192.
- 206 **Kulah C, Mooij MJ, Comert F, et al.** Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 114-118.
- 207 **Poirel L, Lebessi E, Heritier C et al.** Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1138-1141.
- 208 **Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, et al.** Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 557-561.
- 209 **Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, et al.** Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 481-489.
- 210 **Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al.** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla<sub>NDM-1</sub>*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-5054.
- 211 **Sole M, Pitart C, Roca I, et al.** First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4402-4404.
- 212 **Gil-Romero Y, Sanz-Rodriguez N, Almagro-Molto M et al.** New description of a NDM-1 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* carrier in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012.
- 213 **Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, et al.** Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-beta-lactamase IM P-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 902-906.

- 214 **Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, et al.** IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 710-714.
- 215 **Yamamoto M, Nagao M, Matsumura Y, et al.** Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *bla<sub>IMP-19</sub>* among *Acinetobacter* species in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 2480-2483.
- 216 **Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ et al.** Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 875-882.
- 217 **Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, et al.** Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 827-832.
- 218 **Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, et al.** Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GeiH-ab project (2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22: 267-271.
- 219 **Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, et al.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 22-29.
- 220 **Monterrubio-Villar J, Gonzalez-Velasco C, Valdezate-Ramos S et al.** Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: Clinical, epidemiological analysis and p fge-printing evolution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1281-1284

ANEXOS

---

---





## Identification of *Acinetobacter* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques?

Adela Álvarez-Buylla\*, Esther Culebras, Juan J. Picazo

Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 September 2011  
Received in revised form 9 December 2011  
Accepted 4 January 2012  
Available online 12 January 2012

#### Keywords:

MALDI-TOF MS  
*Acinetobacter* spp.  
Identification  
*rpoB*  
*bla<sub>OXA51-like</sub>*

### ABSTRACT

*Acinetobacter* spp. has become a leading cause of nosocomial infection in recent years. Phenotypic similarities between the species in the genus have made it difficult to identify them clearly using routine diagnostic methods. Consequently, more relevant species have been grouped together as *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter genospecies 3* and *A. genospecies 13TU*). However, there are other species that may also have clinical significance.

The aims of this study were to establish the usefulness of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of *Acinetobacter* species by comparison with two molecular techniques, as well as determine the role of species other than *A. baumannii* play in nosocomial infections. The study sample comprised 109 clinical isolates of *Acinetobacter*. They were all identified using MALDI-TOF MS. Thirty-one isolates of these were also tested using comparator amplification of *bla<sub>OXA51-like</sub>* and sequencing of the *rpoB* gene. Different score values in MALDI-TOF MS revealed 87 *A. baumannii*, 19 *A. genospecies 3*, 1 *Acinetobacter junii*, 1 *Acinetobacter baylyi* and 1 *Acinetobacter tjernbergiae*. Amplification of *bla<sub>OXA-51-like</sub>* showed products in 85 isolates. Sequencing of the *rpoB* gene allowed us to identify all the 31 isolates analyzed: 16 were consistent with the results of spectrometry and 15 were not. This work showed that molecular techniques are still needed to identify the different species of clinical interest within the genus *Acinetobacter*. Although, MALDI-TOF MS could be useful to identify *A. baumannii* but not other species in the genus.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Acinetobacter* has undergone significant taxonomic modification over the last few years. It currently comprises more than 30 genomic species and its most important representative, *Acinetobacter baumannii*, has emerged as one of the most problematic pathogens for health care institutions throughout the world, mostly because of its ability to develop resistance to several antibiotics (Joly-Guillou, 2005; Peleg et al., 2008). Although species other than *A. baumannii* are also thought to be involved in nosocomial disease, their role is not yet clear (Kuo et al., 2010; Rodriguez-Bano et al., 2006; Turton et al., 2010). Even though these organisms are usually susceptible to a range of antimicrobials, they must be distinguished from *A. baumannii* in order to determine their incidence and role as pathogens in human disease.

Unfortunately, the simple phenotypic tests used in diagnostic laboratories for identification of other bacterial genera to species

level are only able to identify *Acinetobacter calcoaceticus*–*A. baumannii* complex members (Dortet et al., 2006), thus leading to the misidentification of other *Acinetobacter* species with similar phenotypes.

*Acinetobacter* species are defined based on several phenotypic and genotypic characteristics. Among the latter group, the presence of OXA 51-like genes (naturally occurring in *A. baumannii* but not in other species in the genus) (Heritier et al., 2005), the results of DNA–DNA homology (Peleg et al., 2008) and similarities or differences in 16S rRNA gene sequences are the most frequently used. However, the 16S rRNA gene is not sufficiently polymorphic to clearly distinguish all *Acinetobacter* species (Janda and Abbott, 2007; Kilic et al., 2008). Due to the increasing relevance of *A. baumannii* and other genomic species as pathogens, recent researches have focused on the development of reliable identification methods. RNA polymerase  $\beta$ -subunit (*rpoB*) gene sequences seem to be one of the most useful tools for the identification and taxonomic classification of various bacterial species, including *Acinetobacter* spp. (Gundi et al., 2009).

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is increasingly used in the field of bacterial taxonomy. The method is being introduced as a rapid tool for routine bacterial identification in clinical laboratories with

\* Corresponding author. Address: Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínico San Carlos, C/Professor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913303269; fax: +34 013303478.

E-mail addresses: [adelabuylla@gmail.com](mailto:adelabuylla@gmail.com) (A. Álvarez-Buylla), [eculebras.hcsc@salud.madrid.org](mailto:eculebras.hcsc@salud.madrid.org) (E. Culebras), [jpicazo@microb.net](mailto:jpicazo@microb.net) (J.J. Picazo).

promising results in most bacterial species (Jacquier et al., 2011; van Veen et al., 2010). Nevertheless, some nonfermentative Gram-negative bacilli have been misidentified.

Due to the small number of studies on the utility of MALDI-TOF MS to identify *Acinetobacter* spp. it is important to determine the real applicability of this system in order to correctly identify this group of microorganisms. We also assessed the clinical relevance of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* as human pathogens.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

The study sample comprised 109 *Acinetobacter* spp. clinical isolates collected during a two-year period (2008–2010) at the Microbiology Department of Hospital Clínico San Carlos, a tertiary hospital in Madrid, Spain. Only one isolate per patient was analyzed in order to avoid duplicates. Samples belonged to both men and women (men 70; 64.22%, women 39; 35.78%) aged between 16 and 93 years (mean = 69.21 years) The sources of the isolates were respiratory tract (34.86%, 38 samples), skin or soft tissues (30.28%, 33 samples), post-operative wound (11.01%, 12 samples), urine (8.26%, 9 samples), catheter (7.34%, 8 samples) and other sites (8.26%, 9 samples). Isolates were routinely identified as *Acinetobacter* species using phenotypic methods (Vitek-2 -BioMerieux, MarcyL'Etoile, France- and Wider-Francisco Soria Melguizo, Madrid, Spain).

### 2.2. MALDI-TOF MS

For MALDI-TOF MS analysis, samples were prepared using cells from a single colony of fresh overnight blood agar culture following the ethanol/formic acid extraction procedure recommended by the manufacturer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). The procedure was modified at the outset by using a three McFarland bacterial suspension in water ( $10^9$  CFU/ml) instead of a single colony in order to increase the reproducibility of the method. The suspension was then centrifuged (3 min; 13,000 rpm) and the pellet used to continue with the protocol. The bacterial extract was obtained after centrifugation at maximum speed (13,000 rpm) for 3 min. One microliter of each supernatant was overlaid with 1  $\mu$ l of a chemical matrix (saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/2.5% trifluoroacetic acid). MALDI-TOF MS measurements were made using an Microflex III instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) for the automatic acquisition of mass spectra in the linear positive mode within a range of 2–20 kDa, according to the manufacturer's instructions. The peaks from the generated mass spectra and their matching against the reference spectra of the integrated database was performed using MALDI Biotyper Software (Bruker Daltonics). Score values  $\geq 2.0$  can be considered as a probable classification.

All MALDI-TOF MS determinations were repeated at least twice and Bruker Bacterial Test Standard (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  extract) was used for spectral calibration showing a characteristic peptide and protein profile. Thus, the BTS (Bruker Bacterial Test Standard) covers an overall mass range from 4 to 17 kDa. Only score values greater than 2.0 were considered appropriate for identification to species level (Sedo et al., 2011).

The MALDI Biotyper identifies microorganisms by comparing their mass spectral protein expression pattern with reference patterns in a database. The closeness of the match to the reference is reflected in the score value calculated during the matching process. The score value is defined by three components, the matches of the unknown spectrum against the main spectrum, the matches of the

main spectrum peaks against the unknown spectrum, and the correlation of intensities of the matched peaks. This leads to a first score, from 0 (no match) to 1000 (perfect identity), which is converted into a log score from 0 to 3. In our study, comparison of spectra is entirely automated and was performed by the Maldi Biotyper automation software (version 2.0) (Bruker Daltonics) at the default settings.

MALDI Biotyper Version 2.0SR1 Build 223 was the database used in the study. It includes 63 *Acinetobacter* profiles of 17 different species (*A. baumannii*, 6 profile; *Acinetobacter baylyi*, 3 profiles; *Acinetobacter bouvetii*, 1 profile; *Acinetobacter calcoaceticus*, 5 profiles; *Acinetobacter genospecies 11*, 1 profile; *A. genospecies 3*, 18 profiles; *Acinetobacter gerneri*, 1 profile; *Acinetobacter haemolyticus*, 2 profiles; *Acinetobacter johnsonii*, 4 profiles; *Acinetobacter junii*, 3 profiles; *Acinetobacter lwoffii*, 5 profiles; *Acinetobacter parvus*, 1 profile; *Acinetobacter radioresistens*, 3 profiles; *Acinetobacter schindleri*, 1 profile; *Acinetobacter tjernbergiae*, 2 profiles; *Acinetobacter townneri*, 2 profiles; *Acinetobacter ursingii*, 1 profile).

### 2.3. PCR analysis

Nucleic acids of the 109 samples for both PCR were extracted using the NucliSens<sup>®</sup> easyMAGTM system (BioMerieux, MarcyL'Etoile, France) following manufacturer specifications. The amount of DNA in the eluate was determined by Nanodrop measures. Two hundred and fifty nanograms of extracted DNA were used in each PCR assay. PCR for detection of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene was carried out under conditions previously described by Culebras et al. (2010). Likewise, the partial ribosomal polymerase B subunit was amplified using PCR with the standard oligonucleotide primers Ac969F and Ac1598R and under the conditions applied by La Scola et al. (2006).

PCR products were visualized on 1% agarose gel under UV light.

### 2.4. Nucleotide sequence of the *rpoB* gene

The *rpoB* gene sequence was performed on PCR products, which were purified using the Qiagen PCR product purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The same PCR amplification primers (Ac969F and Ac1598R) were used for sequencing, which was carried out with BigDye and analyzed in an automated ABI PRISM BIO system (Perkin-Elmer). An isolate was correctly identified when its partial *rpoB* gene sequence yielded  $\geq 98\%$  similarity with the closest bacterial species sequence in GenBank.

Ten *bla*<sub>OXA-51-like</sub> PCR products were also sequenced as an internal control, following the purification method described above.

### 2.5. Statistical analysis

Genotypic identification was used as the reference method. Indeed, identification results of MALDI-TOF MS were compared with those obtained for *rpoB* gene sequencing and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> presence. Identification results were classified into two groups: (i) species level identification when MALDI-TOF MS identification matched with the reference methods and (ii) misidentification when a discrepancy was observed with reference methods.

## 3. Results

### 3.1. MALDI-TOF identification

All the 109 isolates were analyzed for MALDI-TOF MS. After measurement, software identified each protein profile obtained with the species it most resembled in its database. The results of the pattern matching process were expressed as log (score) values

in the range 0–3. The technique revealed the following species: 87 *A. baumannii*, 19 *A. genospecies 3*, 1 *A. junii*, 1 *A. baylyi* and 1 *A. tjernbergiae*. A score greater than 2.0 was observed in 104 isolates. This score value was lower than 2.0 in the other five strains. (Table 1)

In 15 samples, the correlation obtained between MALDI-TOF MS and *rpoB* sequencing (reference method) was not acceptable even when the score value was higher than 2.0. When we compared the spectrum with the database, we observed that although more significant protein spectra were consistent, several did not match (data not shown).

### 3.2. Presence of *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

*bla*<sub>OXA-51-like</sub> amplification was carried out in all the 109 strains included in the study. Amplification was positive in 85 samples with an amplicon size of 641 bp. The other 24 strains did not show any PCR product (Table 1).

PCR-based purified fragment sequencing confirmed all 10 strains tested as *bla*<sub>OXA-51-like</sub>.

### 3.3. *rpoB* sequence

*rpoB* was sequenced in the 22 MALDI-TOF non-*A. baumannii* samples and in the two cases identified as *A. baumannii* by MALDI-TOF analysis in which *bla*<sub>OXA-51-like</sub> amplification was negative. A further 7 MALDI-TOF *A. baumannii* isolates were also tested as an *A. baumannii* control, including those with a MALDI-TOF score value below 2.0.

The 2 *A. baumannii* isolates that did not contain *bla*<sub>OXA-51-like</sub> proved to be 2 *A. genospecies 13TU* by the *rpoB* sequencing method.

Eight of the 19 isolates identified as *A. genospecies 3* were also confirmed as *A. genospecies 3*. However, the remaining 11 were found to be *A. genospecies 13TU* (1 isolate), *Acinetobacter bereziniae* sp. nov./*A. genospecies 10* (7 isolates) (Nemec et al., 2010), *A. calcoaceticus* (2 isolates) and *A. genospecies 14BJ* (1 isolate). The isolate identified as *A. junii* by MALDI-TOF MS had the same result by *rpoB* sequencing. However, the isolate identified as *A. baylyi* by MALDI-TOF MS proved to be *A. solii* by *rpoB* sequencing. The remaining strain identified as *A. tjernbergiae* by MALDI-TOF MS proved to be *A. beijerinckii* by *rpoB* sequencing. (Table 1). Five of the 15 *Acinetobacter* strains poorly identified by MALDI-TOF MS—*A. genospecies 13TU*, *A. beijerinckii*, *A. soli*, *A. genospecies 10*, and *A. genospecies 14BJ*—were not included in the database used.

### 3.4. Statistical analysis

Of the 31 isolates tested by MALDI-TOF MS and *rpoB* sequencing, 16 (51.6%) were accurately identified by the spectrometric system to the species level. Misidentification was observed for 48.4% of the total isolates.

However, if we only consider *A. baumannii* isolates, concordance between both methods is 77.8%, achieving a sensitivity and

specificity of 100% and 91.7%, respectively. The positive and negative predictive values would be 77.8% and 100%. Nevertheless, these results are based due to the low number of *A. baumannii* included.

On the other hand and in agreement with the published literature (Turton et al., 2006), the presence of *bla*<sub>OXA-51</sub> has been considered a characteristic of *A. baumannii*. Therefore, we also used the presence of this gene as a reference method to calculate the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of MALDI-TOF MS. This comparison gave values of 100%, 91.7%, 97.7% and 100%, respectively, for the identification of *A. baumannii*. The statistical significance of these data is greater owing to the larger number of samples included ( $n = 109$ ).

### 3.5. Non-*A. baumannii* isolates distribution

The distribution of *Acinetobacter* spp. other than *A. baumannii* appears in Table 2. Species other than *A. baumannii* are frequently involved in skin or soft tissue infections (12 samples) as well as in respiratory infections (6 samples). The species most frequently found were *A. genospecies 3* followed by *A. bereziniae/genospecies 10*. The former was isolated mainly from skin and soft tissues and urine samples the latter mainly from respiratory specimens. The remaining isolates were obtained from urine samples (4 samples) prosthesis (1 sample) and catheter (1 sample) (Table 2).

## 4. Discussion

MALDI-TOF MS is a promising clinical laboratory technique that can rapidly identify most pathogens (Bizzini et al., 2011; Seng et al., 2010). In our study, all tested isolates were properly identified to genus level but a significant percentage of the 31 samples analyzed (48.4%) by both molecular (*rpoB* sequencing) and spectrometric (MALDI-TOF MS) were misidentified at the species level. These cases of misidentification accounted for 16.4% of the total number of strains included in the study, thus showing MALDI-TOF MS to be an unreliable technique when an accurate identification of the species of *Acinetobacter* is needed.

This error can be largely attributed to the database is not extensive enough. Other authors have previously considered an extensive database a critical requirement for accurate identification of isolates by MALDI-TOF MS (Spanu et al., 2011). Three commercial systems use mass spectrometry MALDI-TOF for microbial identification: MicrobeLynx™ Waters Corporation, MALDI Biotyper Bruker Daltonics™ and AXIMA @ SARAMIS™ of Shimadzu & Anagnostec. Each technique has its own software for acquisition of spectra and comparison with its own database. Although commercial databases contain several references, their number continues to be limited. In order to correctly identify an unknown microorganism, it is essential that the microorganism analyzed be included in the database used. Even so, identification errors may occur with MALDI-TOF when the microorganisms belong to highly

**Table 1**  
MALDI-TOF identification of the 109 clinical isolates with each score value, *bla*<sub>OXA51-like</sub> PCR amplification results and *rpoB* sequencing.

MALDI-TOF identification	Number of isolates ( $n = 109$ )	Score value	OXA 51	<i>rpoB</i> sequencing ( $n = 31$ )
<i>A. baumannii</i>	82	$\geq 2$	YES	<i>A. baumannii</i> ( $n = 7$ )
<i>A. baumannii</i>	2	$\geq 2$	NO	<i>A. genospecies 13TU</i> ( $n = 2$ )
<i>A. baumannii</i>	3	1.8–1.99	YES	
<i>A. genospecies 3</i>	18	$\geq 2$	NO	<i>A. genospecies 3</i> ( $n = 8$ ) <i>A. bereziniae/genospecies 10</i> ( $n = 7$ ) <i>A. calcoaceticus</i> ( $n = 2$ ) <i>A. genospecies 14BJ</i> ( $n = 1$ )
<i>A. genospecies 3</i>	1	1.95	NO	<i>A. genospecies 13TU</i> ( $n = 1$ )
<i>A. baylyi</i>	1	1.936	NO	<i>A. soli</i> ( $n = 1$ )
<i>A. junii</i>	1	2.432	NO	<i>A. junii</i> ( $n = 1$ )
<i>A. tjernbergiae</i>	1	2.024	NO	<i>A. beijerinckii</i> ( $n = 1$ )

**Table 2**  
*Acinetobacter* species distribution in several clinical samples.

<i>rpoB</i> sequencing (n = 31)	Resp tract <sup>a</sup>	S.S.T <sup>b</sup>	Catheter	Urine	Joint fluid	Prosthesis
<i>A. baumannii</i> (n = 7)	2 (6.45%)	2 (6.45%)	1 (3.23%)		2 (6.45%)	
<i>A. genospecies 3</i> (n = 8)	1 (3.23%)	4 (12.90%)		3 (9.68%)		
<i>A. bereziniae/genospecies 10</i> (n = 7)	3 (9.68%)	2 (6.45%)	1 (3.23%)	1 (3.23%)		
<i>A. genospecies 13TU</i> (n = 3)	1 (3.23%)	2 (6.45%)				
<i>A. calcoaceticus</i> (n = 2)		1 (3.23%)				1 (3.23%)
<i>A. genospecies 14BJ</i> (n = 1)		1 (3.23%)				
<i>A. soli</i> (n = 1)		1 (3.23%)				
<i>A. junii</i> (n = 1)		1 (3.23%)				
<i>A. beijerinckii</i> (n = 1)	1 (3.23%)					

<sup>a</sup> Respiratory tract.

<sup>b</sup> Skin or soft tissues.

similar species, such as viridans-group streptococci (Ikryannikova et al., 2011).

The main advantages of MALDI-TOF MS are that species can be routinely identified quicker than with DNA sequence analysis, consumables costs are not high and no external conditions such as culture medium or conditions can affect the result.

In this study, *bla*<sub>OXA51-like</sub> occurred naturally in *A. baumannii* but not in isolates from other species, as previously reported (Heritier et al., 2005; Turton et al., 2006), thus making its detection a useful tool for the identification of *A. baumannii*. Our results show MALDI-TOF MS to be a valid method for the identification of *A. baumannii*, but not suitable for more complex taxonomic studies requiring clearer identification of all species in this genus. In this regard, more sophisticated molecular tools are necessary. DNA polymorphism analysis based on selective amplification of restriction fragments (AFLP) (Koeleman et al., 1998), ribotyping (Germer-Smith, 1992), amplified 16S rRNA restriction analysis (ARDRA) (Dijkshoorn et al., 1998), rec A (Krawczyk et al., 2002), gene sequence analysis of the 16S–23S rRNA gene spacer region (ITS) (Chang et al., 2005) and *rpoB* sequencing (Gundi et al., 2009) has been developed and validated. *rpoB* sequencing was the technique finally chosen in the study because of the high polymorphism of this gene, which allows easier identification than other molecular tools (La Scola et al., 2006). In our study *rpoB* sequencing allowed us to easily identify all the isolates analyzed.

The usefulness of each of the techniques analyzed can be assessed according to the objective pursued. Thus, use of mass spectrometry in clinical diagnostic laboratories provides rapid identification (Seng et al., 2009) to the genus level and quite reliable to the species level in the case of *A. baumannii*, while detection of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene and *rpoB* amplification provide more exhaustive results.

At the beginning of the study we questioned the need to identify to species level all *Acinetobacter* family members because of their increasing involvement in clinical practice. Our results confirm that species other than *A. baumannii* are clearly involved in infectious diseases and are often underestimated after identification by conventional methods. Previous works have highlighted the clinical relevance of these organisms in several diseases (Cayo et al., 2011; Chuang et al., 2011; Dortet et al., 2006; Molina et al., 2010). Although the number of non-*A. baumannii* isolates included in this study is limited it is possible to observed that some species such as *A. genospecies 3* or *A. bereziniae/genospecies 10* can be isolated in clinical samples from skin or soft tissues infections as well as from UTI and respiratory tract infections.

## 5. Conclusions

We concluded that the MALDI-TOF database should be extended to other, currently underestimated *Acinetobacter* species, which play an important role in nosocomial infections,

for this tool to be considered useful. The limited nature of the database is MALDI-TOF's greatest drawback. In this study *rpoB* sequencing identified all the strains, even genetically close strains, such as *A. genospecies 11* and *A. bereziniae*, and no other molecular techniques were necessary to conclude the analysis.

Our results reinforce the idea that other species may be more significant as human pathogens than originally thought.

## 6. Transparency declaration

The authors did not receive any funding for this work and declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Bizzini, A., Jaton, K., Romo, D., Bille, J., Prod'homme, G., Greub, G., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J. Clin. Microbiol.* 49, 693–696.
- Cayo, R., Yanez San Segundo, L., Perez del Molino Bernal, I.C., Garcia de la Fuente, C., Bermudez Rodriguez, M.A., Calvo, J., Martinez-Martinez, L., 2011. Bloodstream infection caused by *Acinetobacter junii* in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic haematopoietic cell transplantation. *J. Med. Microbiol.* 60, 375–377.
- Culebras, E., Gonzalez-Romo, F., Head, J., Gomez, M., Morales, G., Picazo, J.J., 2010. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-66 in a Spanish hospital: epidemiology and study of patient movements. *Microb. Drug Resist.* 16, 309–315.
- Chang, H.C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vanechoutte, M., Tang, C.T., Chang, T.C., 2005. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S–23S rRNA gene spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1632–1639.
- Chuang, Y.C., Sheng, W.H., Li, S.Y., Lin, Y.C., Wang, J.T., Chen, Y.C., Chang, S.C., 2011. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 52, 352–360.
- Dijkshoorn, L., Van Harsselaar, B., Tjernberg, I., Bouvet, P.J., Vanechoutte, M., 1998. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 33–39.
- Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C.J., Cattoir, V., 2006. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4471–4478.
- Germer-Smith, P., 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2680–2685.
- Gundi, V.A., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., La Scola, B., 2009. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 155, 2333–2341.
- Heritier, C., Poirel, L., Fournier, P.E., Claverie, J.M., Raoult, D., Nordmann, P., 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4174–4179.
- Ikryannikova, L.N., Lapin, K.N., Malakhova, M.V., Filimonova, A.V., Ilina, E.N., Dubovickaya, V.A., Sidorenko, S.V., Govorun, V.M., 2011. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1709–1715.
- Jacquier, H., Carbonnelle, E., Corvec, S., Illiaquer, M., Le Monnier, A., Bille, E., Zahar, J.R., Beretti, J.L., Jauregui, F., Fihman, V., Tankovic, J., Cattoir, V., 2011. Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761–2764.

- Joly-Guillou, M.L., 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 868–873.
- Kilic, A., Li, H., Mellmann, A., Basustaoglu, A.C., Kul, M., Senses, Z., Aydogan, H., Stratton, C.W., Harmsen, D., Tang, Y.W., 2008. *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 46, 902–908.
- Koeleman, J.G., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 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, 2522–2529.
- Krawczyk, B., Lewandowski, K., Kur, J., 2002. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol. Cell Probes* 16, 1–11.
- Kuo, S.C., Fung, C.P., Lee, Y.T., Chen, C.P., Chen, T.L., 2010. Bacteremia due to *Acinetobacter* genomic species 10. *J. Clin. Microbiol.* 48, 586–590.
- La Scola, B., Gundi, V.A., Khamis, A., Raoult, D., 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 827–832.
- Molina, J., Cisneros, J.M., Fernandez-Cuenca, F., Rodriguez-Bano, J., Ribera, A., Beceiro, A., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Bou, G., Vila, J., Pachon, J., 2010. Clinical features of infections and colonization by *Acinetobacter genospecies* 3. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4623–4626.
- Nemec, A., Musilek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., Zdrahal, Z., Vanechoutte, M., Dijkshoorn, L., 2010. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 896–903.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 538–582.
- Rodriguez-Bano, J., Marti, S., Ribera, A., Fernandez-Cuenca, F., Dijkshoorn, L., Nemec, A., Pujol, M., Vila, J., 2006. Nosocomial bacteremia due to an as yet unclassified *acinetobacter* genomic species 17-like strain. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1587–1589.
- Sedo, O., Vorac, A., Zdrahal, Z., 2011. Optimization of mass spectral features in MALDI-TOF MS profiling of *Acinetobacter* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 30–34.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49, 543–551.
- Seng, P., Rolain, J.M., Fournier, P.E., La Scola, B., Drancourt, M., Raoult, D., 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 5, 1733–1754.
- Spanu, T., De Carolis, E., Fiori, B., Sanguinetti, M., D'Inzeo, T., Fadda, G., Posteraro, B., 2011. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to *rpoB* gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 44–49.
- Turton, J.F., Shah, J., Ozongwu, C., Pike, R., 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1445–1449.
- Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L., 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2974–2976.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C., Kuijper, E.J., 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 48, 900–907.

# Optimized Method for *Acinetobacter* Species Carbapenemase Detection and Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

Adela Álvarez-Buylla, Juan J. Picazo, Esther Culebras

Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

**The use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid detection and identification of the enzymes responsible for carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. appears as a promising option, but it will be necessary to have a standardized protocol that facilitates routine use. Based on the results reported herein and comparisons of several previously published reports, we identified the significant peaks for imipenem detection. Optimal bacterial inoculum and incubation time were established, and results obtained with and without dipicolinic acid (DPA) and Zn<sup>2+</sup> allowed us to distinguish between metallo-beta-lactamases and oxacillinases.**

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been routinely used for bacterial identification in many clinical laboratories, and recently several authors have validated this technology to detect antibiotic resistance (1–5). Most of these studies have been focused on the group of beta-lactam antibiotics, mainly carbapenems.

Carbapenems possess broad-spectrum activity and can be considered the last antibiotics reliably active against many multidrug-resistant Gram-negative bacteria, including *Acinetobacter* spp., with imipenem being the most active agent. However, carbapenem resistance has increasingly been reported (6, 7). Even so, only one previous work focuses on *Acinetobacter baumannii* (but not on other species in the genus) and imipenem (4).

These published studies were developed using nonuniform conditions both in regard to the solution and incubation times employed. The main peaks of the spectrum in which the analysis focused also varied from one study to another.

In order to develop a standardized method that can be routinely used in any clinical microbiology laboratory, the current study compares several of the previously described conditions and establishes the parameters for easily and quickly detecting and identifying *Acinetobacter* carbapenemases.

Seventy isolates of *Acinetobacter* spp. previously identified to species level by *rpoB* sequencing (8) were included in this study. MICs of imipenem and meropenem were determined according to CLSI guidelines by microdilution methods (9) and confirmed by Etest. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were tested as controls.

PCRs for metallo-beta-lactamase (MBL) genes (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, and *bla*<sub>NDM</sub>), oxacillinase genes (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, and *bla*<sub>OXA-58</sub>), and the insertion sequence (IS) *ISAbal* were performed for all isolates as previously described (10, 11).

The MICs of imipenem and meropenem and enzymes present in each isolate appear in Table 1.

MALDI-TOF MS analysis was performed by analyzing all peaks in the range of 100 to 1,000 *m/z* in a Microflex mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Data were processed with FlexControl, version 3.3, software. A total of 480 shots

were acquired in automatic mode by random measurements. All experiments were repeated at least three times. Calibration and measurements were performed as previously described (5).

Commercially available imipenem that contains cilastatin (500 mg) (Tienam; MSD) was used for the experiments. Four different imipenem concentrations (0.25, 0.5, 1, and 5 mg/ml) were diluted in three testing solutions (0.46% NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 6.8], and 10 mM ammonium hydrogen citrate [pH 7.0]), all of them with and without 0.01% SDS. This compound has been used by others to enhance the visualization of degradation products (2). Incubation was carried out at 35°C under constant shaking (500 rpm).

Initially, the characteristic mass spectrum of imipenem was established. Spectrum comparison of all solutions studied with and without imipenem-cilastatin allowed us to select eight peaks theoretically related to the antibiotic used. Only peaks common to all solutions and conditions were selected. Incubation with the IMP-8-producing *Acinetobacter* strain A93 caused a significant decrease in the intensity of four of those peaks: 274 *m/z* ([thienamycin-H<sup>+</sup>]), 300 *m/z* (imipenem), 489 *m/z* (imipenem- $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid), 658 *m/z* (imipenem-cilastatin) (Fig. 1). Peaks that were due to imipenem addition but were nonresponsive to carbapenem-resistant *Acinetobacter* incubation were assumed to be related to cilastatin present in the imipenem-cilastatin compound. The cilastatin peak at 381 Da (cilastatin-Na<sup>+</sup>) was identified and used for standardization. After data processing was performed, peaks at 300 and 489 *m/z* were selected to assess carbapenemase detection in further assays. The absolute signal intensity for 489 *m/z* was the strongest signal in all the assays regardless of the conditions used. The remaining peaks observed were detected with weak signals. Alpha-cyano-4-hydroxycin-

Received 22 January 2013 Returned for modification 12 February 2013

Accepted 17 February 2013

Published ahead of print 27 February 2013

Address correspondence to Adela Álvarez-Buylla, adelabuylla@gmail.com.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00181-13

TABLE 1 Characteristics of *Acinetobacter* species isolates included in the study

No. of isolates (control strain)	<i>Acinetobacter</i> species (no. of isolates) <sup>b</sup>	MIC (mg/ml) <sup>a</sup>		Carbapenemase gene(s) detected
		Imipenem	Meropenem	
2 (A93)	<i>A. bereziniae</i> /AG10	32	4	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
10	<i>A. baumannii</i>	256–512	256	<i>bla</i> <sub>OXA23-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub>
9 (A26)	<i>A. baumannii</i>	256–512	256	<i>bla</i> <sub>OXA24-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub>
15 (A31)	<i>A. baumannii</i>	32–64	4	<i>bla</i> <sub>OXA58</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub>
8	<i>A. baumannii</i>	512	128	<i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub> - <i>ISAbal</i>
8	<i>A. baumannii</i>	32	8	<i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub> - <i>ISAbal</i>
5	<i>A. baumannii</i>	1	1	<i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub> - <i>ISAbal</i>
5 (A1 and A4)	<i>A. baumannii</i>	2	0.5	<i>bla</i> <sub>OXA51-like</sub>
8	<i>A. bereziniae</i> /AG10 (2), <i>A. calcoaceticus</i> (1), <i>A. beijerinckii</i> (1), <i>A. soli</i> (1), <i>A. junii</i> (1), <i>A. pittii</i> (1), AG14BJ (1)	0.5–2	0.25–2	None

<sup>a</sup> The breakpoint for both imipenem and meropenem is 4 mg/ml (CLSI criteria).

<sup>b</sup> AG10, *Acinetobacter* genospecies 10; AG14BJ *Acinetobacter* genospecies 14BJ.

amic acid as a matrix facilitates the ionization of compounds in MALDI-TOF MS, but it is important to consider that the matrix itself also ionizes, and so do adducts. However, matrix adducts are not usually considered.

A decrease in the intensity of selected peaks could readily be detected at three different sample amounts ( $1 \times 10^9$ ,  $2.5 \times 10^9$ , and  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml). An inverse relationship between incubation time and peak intensity was observed.

The same spectra were obtained with all antibiotic concentrations and all bacterial inocula tested. The main difference observed was related to the time required for the complete disap-

pearance of antibiotic, but no significant differences were found in the number and complexity of the spectrum peaks.

To corroborate these results, the same experiments were conducted with two other carbapenem-resistant (strain A26, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>; strain A31, *bla*<sub>OXA-58</sub>) and two carbapenem-susceptible (strains A1 and A4, both *bla*<sub>OXA-51-like</sub>) well-characterized *Acinetobacter* species strains. Samples prepared without imipenem and without microorganisms were included in all the assays as controls.

Once the data were processed, it was clear that the two selected peaks had a significant reduction after 1 h of incubation time with

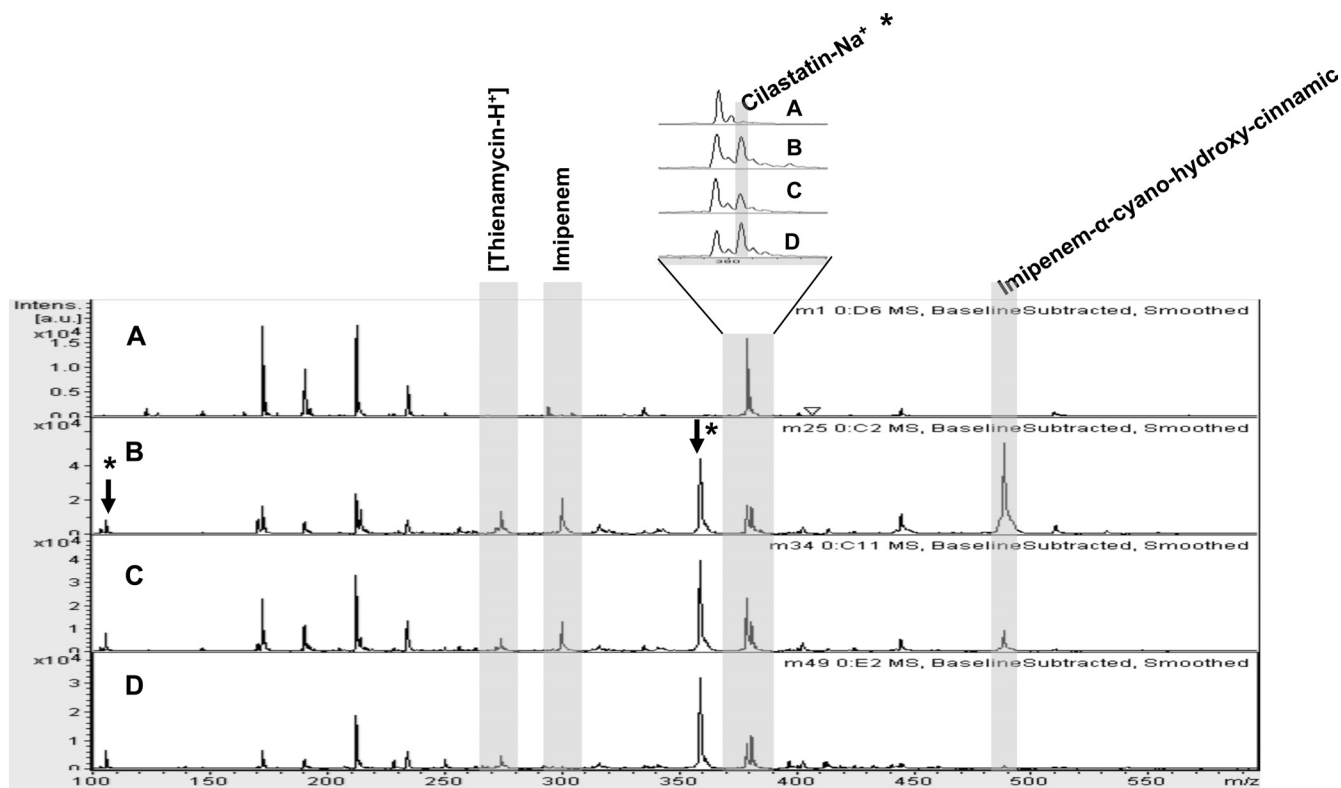


FIG 1 MALDI-TOF MS spectra showing the most representative imipenem peaks. Spectra were determined with the incubation solution alone (0.46% NaCl) (A), imipenem-cilastatin solution (B), an OXA-24-like-producing *Acinetobacter* strain (C), and an IMP-8-producing *Acinetobacter* strain (D). Peaks represent [thienamycin-H<sup>+</sup>] at *m/z* 274, imipenem at *m/z* 300, cilastatin-Na<sup>+</sup> at *m/z* 381, and imipenem- $\alpha$ -cyano-hydroxy-cinnamic acid at *m/z* 489. Arrows and asterisks show peaks due to imipenem-cilastatin addition that were nonresponsive to resistant *Acinetobacter* incubation. au, arbitrary units.

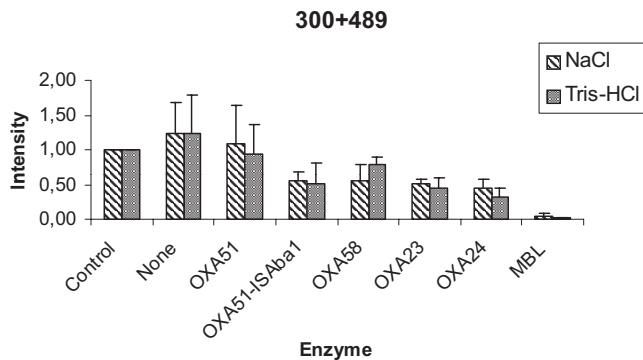


FIG 2 Representative comparison of the average intensities of the most representative peaks of imipenem ( $m/z$  300 and 489) obtained after a 1-h incubation with the different carbapenemases included in the study. As controls, 1 mg/ml imipenem was used in both solutions with no microorganism.

both resistant microorganisms under all the assay conditions tested. This demonstrates that the two selected peaks are good markers to detect carbapenemase activity.

When the effects of different assay solutions are compared, it can be seen that 0.46% NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 6.8, led to a higher stability of compounds throughout the incubation time than 10 mM ammonium hydrogen citrate, pH 7.0. For this reason the ammonium hydrogen citrate was not used in subsequent assays. SDS supplementation produced no change in the antibiotic spectrum in any instances (data not shown). A possible explanation suggested for this fact could be that the hydrolyzed products were very labile and therefore should be analyzed immediately after sample preparation (2). In addition, the difficulty of ionizing degradation products might result in their not being detected in the cellular supernatant (5).

On the basis of all results, a standard protocol was designed. The chosen imipenem concentration was 1 mg/ml, and the inocula were adjusted to achieve a final concentration of  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml in each tube. The incubation time was reduced to 1 h at 35°C under constant shaking (500 rpm). No SDS (0.01%) was added to the buffer solutions.

Once the procedure had been successfully assayed in control strains, MALDI-TOF MS was performed on 65 selected strains based on the type of enzyme produced (Table 1).

All strains were analyzed in 0.46% NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 6.8, buffers. The spectra obtained with the two solutions were compared between themselves and with those obtained for the corresponding controls.

Results showed that after 1 h of incubation time, carbapenemase activity was observed for all the carbapenem-resistant strains tested with a significant reduction in the 300 and 489  $m/z$  peaks. As other investigators have noted (1), imipenem hydrolysis was greater with the microorganisms that produced metallo-beta-lactamases than with those producing carbapenem-hydrolyzing class D (OXA-type) beta-lactamases. Moreover, regardless of the incubation solution used, significant differences were detected among different tested oxacillinases (Fig. 2).

The capacity of NaCl for oxacillinase inhibition has been mentioned previously, but no major effects were detected in our study.

*Acinetobacter* carbapenemase activity was then determined under Zn-rich and -chelated conditions to confirm the presence of

metallo-beta-lactamases by MALDI-TOF MS. Samples were incubated with agitation (500 rpm) for 1 h at 35°C in 0.46% NaCl-imipenem unsupplemented or supplemented with 2 mM ZnSO<sub>4</sub>, 2 mM dipicolinic acid (DPA), or 2 mM DPA plus 2 mM ZnSO<sub>4</sub>. The procedure was repeated five times using fresh samples each time.

The comparative analysis of MBL- and OXA-type-producing *Acinetobacter* strains under the described conditions resulted in the inhibition of metallo-beta-lactamases by DPA. No effect was observed in OXA-type producers. The concentration of DPA used was not enough to completely inhibit the enzymatic activity. The 1-h DPA incubation assay reduced the activity to 70% relative to the activity observed for nontreated samples. Zinc addition to the incubation solution completely reversed the chelating agent action. Although these results have been obtained with *Acinetobacter* spp., DPA should have the same effect with other MBL producers.

This study resulted in the identification of the most representative peaks associated with imipenem, particularly those involved in carbapenemase activity, and could be useful to establish a standardized protocol that can be used in routine assays.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Faustino Huertas for chemistry advice. We thank Alvaro Gómez for technical assistance during this project.

The study was developed with resources of the Hospital Clínico San Carlos.

We declare that we have no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Burckhardt I, Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J. Clin. Microbiol.* 49:3321–3324.
- Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerova T. 2012. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50:2441–2443.
- Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 49:3222–3227.
- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM. 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 7:e31676. doi: 10.1371/journal.pone.0031676.
- Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* 50:927–937.
- Liu YM, Chen YS, Toh HS, Huang CC, Lee YL, Ho CM, Lu PL, Ko WC, Chen YH, Wang JH, Tang HJ, Yu KW, Liu YC, Chuang YC, Xu Y, Ni Y, Liu CE, Hsueh PR. 2012. *In vitro* susceptibilities of non-*Enterobacteriaceae* isolates from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region from 2003 to 2010: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int. J. Antimicrob. Agents* 40(Suppl):S11–S17.
- Kempf M, Rolain JM. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:105–114.
- Alvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. 2012. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect. Genet. Evol.* 12:345–349.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement.

- ment. Document M100-MS120. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
10. Culebras E, Gonzalez-Romo F, Head J, Gomez M, Morales G, Picazo JJ. 2010. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-66 in a Spanish hospital: epidemiology and study of patient movements. *Microb. Drug Resist.* 16:309–315.
  11. Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. 9 November 2012, posting date. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dks448.