

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**TÍTULO**

“IDENTIFICACIÓN DE LA BOMBA DE EFLUJO TIPO AdeABC COMO  
MECANISMO DE RESISTENCIA A LA TIGECICLINA EN AISLADOS CLÍNICOS  
DE *Acinetobacter baumannii* ANALIZADOS EN EL INSPI-QUITO DURANTE EL  
PERÍODO 2015-2016”

**AUTORA DE LA DISERTACIÓN**

Viviana Atalía Albán Marañón.

**DIRECTOR**

Mtr. Andrés Esteban Zabala Parreño.

**QUITO, 2017**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Viviana Atalía Albán Marañón, C.I. 1804385233**; autora del trabajo de graduación titulado: “**IDENTIFICACIÓN DE LA BOMBA DE EFLUJO TIPO AdeABC COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A LA TIGECICLINA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* ANALIZADOS EN EL INSPI-QUITO DURANTE EL PERÍODO 2015-2016**”, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **FACULTAD DE MEDICINA**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



**VIVIANA ATALÍA ALBÁN MARAÑÓN**

**C.I. 1804385233**

## **DEDICATORIA**

*A mis personas favoritas,  
Mi familia.*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por protegerme y guiarme para convertir este gran sueño en realidad. A mis padres Rubén y Catana, un gracias inmenso por el total apoyo que me han brindado, por su amor, su paciencia, pero sobre todo por creer en mí y en mis capacidades. A mi Charito, porque su inmenso cariño estuvo siempre en los momentos difíciles, gracias por sus oraciones de todos los días.

Quiero agradecer a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica, y a todos los profesores que la conforman, por los conocimientos tanto profesionales como humanos que supieron brindarme en cada una de las etapas universitarias.

Mi agradecimiento va dirigido también al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, con especial atención a las personas que conforman el Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana, quienes a más de sus conocimientos técnicos, siempre tuvieron una sonrisa sincera y desinteresada durante todo el período de desarrollo de este trabajo.

De igual manera, agradezco a mi Director de Tesis, Mtr. Andrés Zabala y a mis lectores Mtr. Eduardo Villacís y Dr. Santiago Escalante, por la confianza en mí depositada y sobre todo por enseñarme el valor de un profesional formado con ética y calidad.

Agradezco también a mi novio por el amor, la paciencia y el apoyo que supo brindarme en cada triunfo, pero sobre todo en cada fracaso durante la realización de la presente investigación; a mis amigos, pues sé que siempre estuvieron cerca con su cariño y confianza.

## RESUMEN

*Acinetobacter baumannii* es uno de los microorganismos patógenos más prevalentes causantes de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), cuya gravedad aumenta por sus altos índices de resistencia antimicrobiana, ocasionando una implícita reducción de opciones terapéuticas; en donde, la tigeciclina ha sido considerado un antibiótico de última línea para el tratamiento de este microorganismo especialmente en infecciones de piel y tejidos blandos. Los mecanismos de resistencia antimicrobiana más relevantes en *Acinetobacter baumannii* son de carácter enzimático, como la producción de oxacilinasas, y no enzimáticos como la disminución de la expresión de proteínas OMP; sin embargo, los sistemas de secreción, como la bomba de eflujo tipo AdeABC, son considerados mecanismos asociados a la resistencia antibiótica. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es identificar la actividad de la bomba de eflujo tipo AdeABC como mecanismo de resistencia a la tigeciclina y correlacionarlo con perfiles de susceptibilidad presentados en los aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Con respecto a la metodología utilizada, en este estudio se analizaron 85 cepas de *Acinetobacter baumannii* provenientes del Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana RAM-Quito; los aislados fueron caracterizados a nivel de especie mediante identificación de secuencias especie-específicas del gen *gyrB*, y sus perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se obtuvieron mediante difusión en disco y microdilución en caldo en el caso de la tigeciclina. La acción de la bomba de eflujo sobre la susceptibilidad a la tigeciclina fue evidenciada mediante el uso del inhibidor Carbonil Cianida 3-Clorofenilhidrazona (CCCP). A nivel molecular, se amplificaron los genes reguladores *AdeS* y *AdeR* y el gen estructural *AdeB* correspondientes a la bomba de eflujo tipo AdeABC mediante PCR de punto final. Como resultados, no se encontraron cepas resistentes a tigeciclina, sin embargo, nueve aislados fueron positivos para los genes *AdeB*, *AdeS*, *AdeR* y seis de ellos presentaron aumento de una a tres diluciones con respecto a la susceptibilidad a tigeciclina en presencia de CCCP. En conclusión, los resultados demuestran que la bomba de eflujo tipo AdeABC, está presente en varias cepas de *Acinetobacter baumannii*, aunque no se demostró su relación con la resistencia a tigeciclina. Sin embargo, este es un mecanismo importante que podría estar involucrado en la generación de cepas con perfiles multiresistentes.

**Palabras clave:** *Acinetobacter baumannii*, Tigeciclina, Bombas de Eflujo, Resistencia Antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is one of the most relevant pathogenic microorganisms that cause Health Care Associated Infections, whose severity increases due to its high antimicrobial resistance rates, and therefore the reduction of therapeutic strategies, being tigecycline the top of the line antibiotic for the treatment caused by this microorganism especially in skin and soft tissues infections. The most relevant mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* are enzymatic mechanisms as the production of oxacillinases, and non-enzymatic as the decrease of protein expression OMP; however, secretion systems such as the AdeABC efflux pump, are also considered as an important mechanisms associated with antibiotic resistance. Therefore, the objective of this current research is to identify the activity of the AdeABC efflux pump as a resistance mechanism to tigecycline and to correlate it with the resistance profiles presented in the clinical isolates from *Acinetobacter baumannii*. In this study, 85 *Acinetobacter baumannii* strains were analyzed from the National Antimicrobial Resistance Reference Center RAM-Quito; the strains were characterized at specie level by identification of species-specific sequences of the *gyrB* gene, and their antimicrobial susceptibility profiles were obtained by disk diffusion and broth microdilution in the case of tigecycline. The action of the efflux pump on susceptibility to tigecycline was evidenced by the use of the inhibitor Carbonyl Cyanide 3- Chlorophenyl hydrazone (CCCP). The amplification of the regulator genes *AdeS*, *AdeR* and the structural gene *AdeB* of the efflux pump was performed by endpoint PCR. No strains resistant to tigecycline were found, however nine isolates were positive for the three *AdeB*, *AdeS* and *AdeR* genes and six of them showed an increase of one to three dilutions with respect to the susceptibility to tigecycline in the presence of CCCP. The results demonstrate that the AdeABC efflux pump is present in several strains of *Acinetobacter baumannii*, although its relation with resistance to tigecycline could not be demonstrated. However, this has to be considered as an important mechanism that could be involved in the generation of multi drug resistance strains.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, Tigecycline, Efflux Pumps, Antimicrobial Resistance.

## TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1 Objetivo general .....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2.1 ANTECEDENTES .....	5
2.2 MARCO TEÓRICO .....	6
2.2.1 Características microbiológicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	6
2.2.2 Factores de virulencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	7
2.2.3 Reservorios de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	8
2.2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> e Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)8	
2.2.5. Cuadros clínicos ocasionados por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	9
2.2.6. Resistencia antibiótica en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	9
2.2.6.1 Resistencia natural de <i>Acinetobacter</i> especies .....	10
2.2.6.2 Mecanismos de resistencia en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	10
2.2.6.3 Uso de tigeciclina en infecciones por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	14
2.2.7 Métodos de sensibilidad antimicrobiana .....	14
2.2.8 Clasificación de cepas resistentes a antibióticos .....	17
2.2.9 Métodos de identificación bacteriana .....	18
2.3 MARCO CONCEPTUAL .....	20
CAPÍTULO III .....	22
3.1 MARCO METODOLÓGICO .....	22
3.1.1 Tipo de estudio .....	22
3.1.3 Tamaño de muestra.....	22
3.1.4 Criterios de inclusión.....	23
3.1.5 Criterios de exclusión .....	23
3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	24
3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	25
3.3.1 Materiales .....	25
3.3.2 Equipos .....	25

3.3.3 Reactivos .....	25
3.4 PROCEDIMIENTO .....	26
3.4.1 Aislamiento e identificación de cepas .....	26
3.4.2 Pruebas de susceptibilidad antibiótica.....	26
3.4.3 Extracción de ADN a partir de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	29
3.4.4 Amplificación de los genes en estudio .....	29
3.5 CONTROL DE CALIDAD .....	32
3.5.1 Agar Mueller Hinton .....	32
3.5.2 Control de calidad de discos de susceptibilidad antimicrobiana .....	32
3.5.3 Control de calidad en el método de microdilución en caldo .....	32
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
CAPÍTULO IV .....	34
4.1 RESULTADOS .....	34
CAPITULO V .....	43
5.1 DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Resistencia antibiótica natural de <i>Acinetobacter</i> especies.....	10
<b>Tabla N° 2:</b> Clasificación de enzimas tipo betalactamasa descritas en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	11
<b>Tabla N° 3:</b> Tabla de operacionalización de variables .....	24
<b>Tabla N° 4:</b> Listado de antibióticos utilizados para determinar perfiles de susceptibilidad en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	27
<b>Tabla N° 5:</b> Secuencias de primers utilizados para identificación de especie de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	29
<b>Tabla N° 6:</b> Preparación de Master Mix para la identificación de secuencias especie-específicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	30
<b>Tabla N° 7:</b> Secuencia de primers utilizados para detección de la bomba de eflujo tipo AdeABC en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	31
<b>Tabla N° 8:</b> Preparación de las Master mix para los genes <i>AdeB</i> , <i>AdeR</i> y <i>AdeS</i> de la Bomba de Eflujo tipo AdeABC. ....	31
<b>Tabla N° 9:</b> Perfiles de susceptibilidad antibiótica obtenidos mediante técnica de Difusión en Disco.....	37
<b>Tabla N° 10:</b> Determinación de fenotipos resistentes de acuerdo a categorías de antimicrobianos utilizados en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	41
<b>Tabla N° 11:</b> Relación entre los aislados que presentan los genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC y la disminución de susceptibilidad antibiótica al usar CCCP.....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura N° 1:</b> Representación gráfica de la bomba de eflujo AdeABC en <i>Acinetobacter baumannii</i> y su sistema regulador .....	13
<b>Figura N° 2:</b> Representación gráfica del operón para el sistema de eflujo tipo AdeABC en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	14
<b>Figura N° 3:</b> Técnica de difusión en disco para Susceptibilidad Antimicrobiana .....	16
<b>Figura N° 4:</b> Técnica de macrodilución en caldo realizada en tubo con volumen final de 1000 ul. ....	17
<b>Figura N° 5:</b> Técnica de microdilución en caldo realizada en placa con volumen final de 100 ul. ....	17
<b>Figura N° 6:</b> Algoritmo para la identificación de <i>Acinetobacter</i> spp.....	19
<b>Figura N° 7:</b> Disposición de los discos de susceptibilidad antimicrobiana en caja petri 100 x 15mm de Agar Mueller Hinton Difco®. ....	28
<b>Figura N° 8:</b> A) Identificación macroscópica de <i>Acinetobacter</i> spp. en Agar Mc Conkey.; B) Tinción Gram de <i>Acinetobacter</i> spp.....	34
<b>Figura N° 9:</b> Tamaño del producto de PCR de las secuencias específicas Sp2-Sp4 y Sp4-Sp4 en un aislado de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	36
<b>Figura N° 10:</b> Sinergia positiva con EDTA en cepa de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	37
<b>Figura N° 11:</b> Tamaño de los productos de PCR de los genes <i>AdeB</i> , <i>AdeR</i> y <i>AdeS</i> en aislados de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 1:</b> Gráfico de barras de los porcentajes de aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. con respecto al Servicio Hospitalario.....	35
<b>Gráfico N° 2:</b> Gráfico de barras del porcentaje de aislados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. con respecto al tipo de muestra. ....	35
<b>Gráfico N° 3:</b> Número de aislados de <i>Acinetobacter baumannii</i> de acuerdo al valor de la Concentración Mínima Inhibitoria para tigeciclina.....	38
<b>Gráfico N° 4:</b> Número de cepas que presentaron disminución en los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de acuerdo al número de diluciones.....	39
<b>Gráfico N° 5:</b> Distribución de los genes de la Bomba de Eflujo tipo AdeABC de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	40

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo N° 1:</b> Preparación de Solución Madre de tigeciclina soluble en Dimetilsulfóxido (DMSO).....	64
<b>Anexo N° 2:</b> Preparación de diluciones a partir de la Solución Madre de tigeciclina.....	65
<b>Anexo N° 3:</b> Plantilla para recolección de datos de CMI tigeciclina.....	67
<b>Anexo N° 4:</b> Base de datos de los aislados de <i>Acinetobacter baumannii</i> para identificación microbiológica. ....	68
<b>Anexo N° 5:</b> Perfiles de susceptibilidad por Técnica de Difusión de Disco.....	74

## LISTA DE SIGLAS

<b>ADC:</b>	<i>(Acinetobacter- derived cephalosporinase)</i> . Cefalosporinasa Asociada a <i>Acinetobacter</i> .
<b>ATCC:</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CCCP:</b>	Carbonil Cianida 3-Clorofenilhidrazona
<b>CDC:</b>	<i>(Centers for Disease Control and Prevention)</i> . Centro de Control y Prevención de Enfermedades
<b>CLSI:</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
<b>FDA:</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>IAAS:</b>	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
<b>MBL:</b>	Metallo- Betalo Lactamasa
<b>MDR:</b>	Multi Drug Resistance
<b>MIC:</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>OXA:</b>	Oxacilinasas
<b>OMP:</b>	<i>(Outer Membrane Proteins)</i> . Proteínas Externas de Membrana
<b>PBP:</b>	<i>(Penicilling Binding Proteins)</i> . Proteínas de Unión a la Penicilina
<b>PCR:</b>	<i>(Polimerase Chain Reaction)</i> . Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDR:</b>	Pan Drug Resistance
<b>UCI:</b>	Unidad de Cuidados Intensivos
<b>XDR:</b>	Extremely Drug Resistance

## INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes al género *Acinetobacter*, se caracterizan por ser cocos bacilos Gram negativos, aerobios y no fermentadores de lactosa, presentes tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad formando parte de suelos y aguas ( Lin & Sharma, 2013), por lo que pueden estar relacionados con situaciones endémicas e incluso brotes epidémicos (Valencia et al., 2009).

*Acinetobacter baumannii* es una de las especies de este género que ha despertado gran interés en el campo microbiológico formando parte del grupo de microorganismos causantes de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), debido a que ha pasado de ser un microorganismo comensal y patógeno ocasional a ser una bacteria patógena oportunista (Gales et al., 2001), especialmente en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Lemos et al., 2011)

En el Ecuador, según el estudio realizado por Jimenez (2013) en el Hospital Carlos Andrade Marín, se encontró una prevalencia del 21% de aislados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la UCI relacionados principalmente con cuadros clínicos asociados a bacteriemia y neumonía por ventilación mecánica (Doi, Murray, & Peleg, 2016), que presentan característicos perfiles de multiresistencia antibiótica, lo que se ha convertido en un gran desafío para el personal de salud en cuanto al establecimiento de protocolos de tratamiento y sobre todo de medidas de prevención y control.

La resistencia antibiótica es un hecho complejo que ha ido adquiriendo suma importancia en el transcurso de los años, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha declarado a partir del 2001 como un problema de salud pública (The World Health Report, 2001). En *Acinetobacter baumannii*, esta resistencia es ocasionada principalmente por la expresión de las enzimas codificadas por genes obtenidos por transferencia horizontal; sin embargo, la coexistencia de este tipo de mecanismos con aquellos promovidos intrínsecamente por la propia bacteria como las bombas de eflujo podría contribuir de manera importante con la evolución de cepas multiresistentes, generando un grave problema tanto a nivel económico como a nivel social (Vila, Martí, & Sánchez-Céspedes, 2007).

*Acinetobacter baumannii* ha sido caracterizado como una bacteria multirresistente (Adams et al., 2008), cuyo tratamiento se ha reducido al uso de ampicilina/sulbactam, carbapenémicos y antimicrobianos de última línea como tigeciclina (Somily et al., 2012), siendo este último, un antibiótico útil para el tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* especialmente en infecciones de piel y tejidos blandos. Sin embargo, según el estudio realizado por Sun (2013), en Asia y Europa se han reportado índices elevados de resistencia a tigeciclina, es así que, países como Israel y Taiwan, demuestran una prevalencia entre 12 y 78%; en Italia, se evidencia un rango de 27,5 a 50% de resistencia a tigeciclina; mientras que Norteamérica muestra los índices más bajos que oscilan entre 3 y 5% de resistencia a tigeciclina en cepas de *Acinetobacter baumannii*.

El estudio realizado por Costello, Gales, Morfin, Jones, & Castanheira (2016) demostró que a nivel de Latinoamérica, la prevalencia de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a tigeciclina es del 5,2%; sin embargo, en Ecuador, la investigación de este microorganismo se ha enfocado únicamente al estudio de resistencia antibiótica mediada por enzimas principalmente a carbapenémicos más no a antibióticos como la tigeciclina (estudios no publicados).

La resistencia a la tigeciclina y la adaptación generada por parte del microorganismo ha sido atribuida a la acción y sobreexpresión de bombas de eflujo como mecanismo de resistencia especialmente la bomba de eflujo tipo AdeABC (Li et al., 2015). Este mecanismo de resistencia es intrínseco de la bacteria y se activa frente a la presencia de terapia antibiótica, generando resistencia no solo a la tigeciclina como tal sino también a otras familias de antimicrobianos como betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas (Opazo, Domínguez, Bello, González, & Mella, 2009).

Debido a la importancia de *Acinetobacter baumannii* a nivel clínico y a los datos presentados a nivel mundial sobre las resistencias que se han venido generando a la tigeciclina en esta bacteria (Sun et al., 2013), el presente estudio pretende responder a la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a la tigeciclina mediada por la expresión de la bomba de eflujo tipo AdeABC en el Ecuador?

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* están aumentando de manera alarmante a nivel mundial, y se han caracterizado por su dificultad en cuanto a tratamiento y por ende a la recuperación del paciente. La mayor parte de estudios realizados a nivel de Latinoamérica incluyendo el Ecuador, se han centrado en la caracterización de enzimas como principal mecanismo de resistencia antibiótica en cepas de *Acinetobacter baumannii*, existiendo muy pocos estudios enfocados en mecanismos de resistencia intrínseca de la bacteria como las bombas de eflujo que actúan sobre antibióticos importantes, como la tigeciclina.

En esta disertación, se plantea la necesidad de estudiar el rol que cumple la bomba de eflujo tipo AdeABC como mecanismo intrínseco de resistencia a la tigeciclina en aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* que presentan fenotipos MDR, e incluso XDR. De igual manera, se destaca la importancia de determinar el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para la tigeciclina con el fin de tener un valor real, debido a la inestabilidad de este antibiótico presentada en el agar Mueller Hinton utilizado para difusión en disco, al igual que la inexistencia de valores de puntos de corte para la interpretación del resultado de este antibiótico en esta metodología.

Los resultados del presente estudio, resaltarán datos epidemiológicos importantes sobre el estado actual de las cepas caracterizadas como *Acinetobacter baumannii*, tomando en cuenta sus perfiles de resistencia con especial enfoque a la tigeciclina. Además, se identificará la presencia de bombas de eflujo como mecanismo de resistencia importante en el desarrollo de cepas con fenotipos de multirresistencia en las cuales, las opciones terapéuticas son casi nulas, lo que causa un grave problema tanto a nivel social como a nivel económico por la estancia hospitalaria prolongada del paciente y los costos que esto conlleva.

El presente estudio fue financiado en su totalidad por parte del proyecto PUCE titulado: “Caracterización epidemiológica y molecular de *Acinetobacter baumannii* mediante la expresión del sistema de secreción tipo VI (T6SS) y su resistencia a los antimicrobianos” con código M13476. Tanto para pruebas microbiológicas como para pruebas moleculares, se utilizaron las instalaciones del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública y los Laboratorios

de Investigación en Biología Molecular y Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Identificar la actividad de la bomba de eflujo tipo AdeABC como mecanismo asociado a la resistencia ante tigeciclina en cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Establecer fenotípicamente la acción de la bomba de eflujo mediante el uso de Carbonil Cianida 3-Clorofenilhidrazona (CCCP).
- Determinar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de los genes *AdeB*, *AdeS* y *AdeR* en las cepas de *Acinetobacter baumannii*.
- Correlacionar la presencia de los genes *AdeB*, *AdeS* y *AdeR* y los patrones fenotípicos de aquellas cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a tigeciclina.

## CAPÍTULO II

### 2.1 ANTECEDENTES

El género *Acinetobacter* fue descrito por primera vez en 1911, sin embargo su designación fue aprobada en 1968 siendo incluido en el primer Manual de Microbiología en el que se aseguraba la existencia de *Acinetobacter calcoaceticus* como única especie de este género (Rossau, Van Landschoot, Gillis, & De Ley, 1991). Posteriormente en el año de 1986, se observaron inconsistencias basadas en pruebas para catalizar sustratos, por lo que se concluyó la existencia de más de una especie incluida en el género *Acinetobacter* (Scola, Gundi, Khamis, & Raoult, 2006).

Con el desarrollo de la biología molecular, se realizaron pruebas genotípicas y desde ese instante se han caracterizado hasta el momento 21 especies pertenecientes a este género con una homología de alrededor del 70% a nivel de su DNA (Abbott, Cerqueira, Bhuiyan, & Peleg, 2013). *Acinetobacter baumannii* es la especie que ha presentado mayor importancia clínica debido a su frecuente aislamiento en IAAS (Peleg, Seifert, & Paterson, 2008) y a su alta tasa de mortalidad (Chuang et al., 2011). Esta especie es parte del llamado complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* que incluye cuatro especies: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis* (Abbott et al., 2013).

*Acinetobacter baumannii* es considerado uno de los patógenos multirresistentes más importantes, que según el reporte del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en el año 2013, en Estados Unidos, fue el causante del 2% del total de IAAS reportadas durante ese año, pero al tratarse de pacientes críticos dependientes de un ventilador mecánico, la tasa ascendía hasta un 7% (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

El 63% de las infecciones provocadas por *Acinetobacter baumannii* fueron reportadas como cepas MDR según la CDC, por lo que se le concede a este microorganismo aproximadamente unas 500 muertes en el año 2013 (Centers for Disease Control and Prevention, 2013); sin embargo existen reportes específicos en Brasil en los que se contradice este hecho reportándose una rara disminución de casos de infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* entre los años 1997 y 2011 de un 13.6% a un 2.2% (Gonzalez & Valverde, 2016).

A nivel de América Latina, estudios realizados por el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY reportaron que el mayor porcentaje de resistencia a los carbapenémicos, especialmente al imipenem (20%) fue encontrado en Argentina, seguido de un 14% de resistencia reportada en Colombia y un 8.5% en Brasil (Gales et al., 2001). Debido a estos patrones de resistencia antibiótica presentados, se han venido buscando nuevas opciones terapéuticas para tratar infecciones ocasionadas por *Acinetobacter baumannii*, siendo uno de ellos ha sido la tigeciclina (Sun et al., 2013).

La resistencia antibiótica generada por *Acinetobacter baumannii*, está mediada principalmente por su capacidad de adquirir y acumular genes de resistencia. Sin embargo, según últimos estudios, la multiresistencia presentada se debe a una combinación de mecanismos enzimáticos intrínsecos, mecanismos enzimáticos adquiridos y mecanismos no enzimáticos tales como la impermeabilidad de la membrana, alteración de las Proteínas de Unión a la Penicilina (PBP) y presencia de bombas de eflujo (Jia et al., 2015).

La tigeciclina, un derivado de la minociclina actúa a nivel de la síntesis de aminoácidos y tiene un espectro de acción amplio afectando así tanto a bacterias Gram negativas como Gram positivas incluyendo aquellas bacterias multidrogo resistentes como lo son la mayoría de cepas de *Acinetobacter* (Y. Sun et al., 2013). Aun cuando este antibiótico es considerado como recurso de última línea utilizado principalmente en infecciones de tejidos blandos, se han presentado ya resistencias ante el mismo en diferentes países como por ejemplo en Reino Unido (Hornsey et al., 2011), Taiwan (Chen et al., 2011) y Estados Unidos (Gallagher & Rouse, 2008), resistencias que han sido relacionadas con la sobre expresión constitutiva de los componentes de las bombas de eflujo, especialmente la de tipo AdeABC cuya regulación está dada por el sistema AdeRS (Sun et al., 2013).

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 Características microbiológicas de *Acinetobacter baumannii*.**

El género *Acinetobacter* ha sufrido numerosos cambios taxonómicos con el transcurso del tiempo, por lo que su estudio es un hecho complicado. Esta complejidad no nos permite hablar únicamente de la especie *Acinetobacter baumannii* sino más bien de un complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* que comparten idénticas características fenotípicas

lo que imposibilitan su diferenciación por sistemas bioquímicos comerciales (Abbott et al., 2013).

A nivel microbiológico, este género se caracteriza por ser bacilos Gram negativos en fase logarítmica y de forma cocoide en fase estacionaria, aerobios, no fermentadores, catalasa positiva, oxidasa negativo, pleomórficos, no mótils y no formadores de esporas (Zarrilli, Pournaras, Giannouli, & Tsakris, 2013).

La temperatura de crecimiento óptima es de 30 a 35°C y se recomienda la utilización de un medio que inhiba el crecimiento de ciertos microorganismos como lo es el medio Mac Conkey, en el que se observarán colonias lisas de color rosa pálido (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

### **2.2.2 Factores de virulencia de *Acinetobacter baumannii***

Comparado con otras bacterias Gram negativas, los factores de virulencia que posee *Acinetobacter baumannii* son pocos, sin embargo estas características pueden aumentar la virulencia de las cepas causantes de infecciones y son los siguientes (McConnell, Actis, & Pachón, 2013):

**a) Polisacárido capsular (*ptk* y *epsA*):** Compuesto por L-ramnosa, D-glucosa y D-ácido glucurónico, le proporciona una menor afinidad por compuestos hidrocarbonados permitiéndole al microorganismo evadir la fagocitosis mediada por células del sistema inmune del paciente invadiendo de esta manera por vía hemática (Russo et al., 2010).

**b) Lípido A:** Polisacárido de la pared celular con un potencial muy tóxico y capaz de activar de manera exacerbada la respuesta inmune del hospedero (McConnell et al., 2013).

**c) Enzimas:** Lipasa, gelatinasa, esterasa que causan daños irreversibles en cualquier tejido lipídico (Doi et al., 2016).

**d) Proteínas de Unión a la Penicilina (PBP's):** Además de inactivar antibióticos B-lactámicos, estas proteínas participan en los pasos finales de la síntesis de peptidoglicano, contribuyendo con la estabilidad celular de la bacteria (McConnell et al., 2013).

e) **Sideróforos:** En el caso de *Acinetobacter*, se lo conoce como acinetobactin sideróforo, y es un sistema capaz de quelar y captar hierro del hospedero con el fin de persistir dentro de las células y causar su apoptosis (Gaddy et al., 2012).

### **2.2.3 Reservorios de *Acinetobacter baumannii***

A nivel hospitalario, dada su capacidad de supervivencia en ambientes hostiles por largos períodos de tiempo y la habilidad de adquirir determinantes genéticos de resistencia, este microorganismo ha sido el causante de brotes epidémicos (Eveillard, Kempf, Belmonte, Pailhoriès, & Joly-Guillou, 2013). Se lo puede aislar directamente a partir de pacientes, de fómites en contacto con el paciente, personal de salud y en estructuras físicas como pisos, camas, veladores, etc. (Morgan et al., 2010).

A nivel comunitario, *Acinetobacter baumannii* es considerado un microorganismo ubicuo, puede ser aislado a partir de suelos, agua y petróleo contaminado que puede llegar a ser degradado por este microorganismo (Lin & Sharma, 2013); Así mismo se lo ha encontrado en varios vegetales procedentes de supermercados, animales como caballos o perros, ocasionando en estos infecciones en huesos y abscesos principalmente (Eveillard et al., 2013).

### **2.2.4. *Acinetobacter baumannii* e Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)**

*Acinetobacter baumannii* es uno de los patógenos de mayor relevancia clínica en IAAS. La infección a causa de este patógeno, está relacionado principalmente con pacientes inmunosuprimidos cuya estancia es la Unidad de Cuidados Intensivos y esta depende fundamentalmente de los factores predisponentes inherentes al paciente así como de la capacidad de virulencia del microorganismo (Lemos et al., 2011).

Entre los factores predisponentes del paciente se encuentran la edad, equipos invasivos presentes como lo son sondas o catéteres, tiempo de estancia prolongado, ventilación mecánica y sobre todo tratamiento previo con antimicrobianos y corticosteroides (Doi et al., 2016).

En EE.UU según un estudio realizado en el año 2010, se reportó el aislamiento de cepas de *Acinetobacter baumannii* procedentes de muestras del tracto respiratorio en un 57.6%, muestras de sangre en un 23.9% y en muestras de piel y tejidos blandos en un 9.1 % (Queenan, et al., 2010). La mortalidad por invasión de *Acinetobacter baumannii* es alta, especialmente cuando se trata de cepas multirresistentes, en cuyo caso el rango de mortalidad están dentro del 16 al 76% ( Lemos et al., 2014).

En nuestro país no existen datos concluyentes sobre el porcentaje de IAAS asociado a cada uno de los patógenos más prevalentes, sin embargo se ha encontrado datos reportados por estudios realizados en el Hospital Carlos Andrade Marín de la Ciudad de Quito en donde el 21 % de aislamientos microbiológicos en la UCI, corresponden a aislados de *A. baumannii*, seguido de *S. epidermidis* y *E. coli* con porcentajes de 21% y 14% respectivamente (Jimenez, 2013).

### **2.2.5. Cuadros clínicos ocasionados por *Acinetobacter baumannii***

Debido a la gran capacidad que tiene esta bacteria de sobrevivir por largos periodos de tiempo sobre todo en los ambientes cercanos a pacientes hospitalizados, resulta fácil su colonización y posterior infección de pacientes inmunosuprimidos que se encuentran en estado crítico debido a sus comorbilidades, especialmente aquellos pertenecientes a la UCI (Roncancio, 2014).

Los principales cuadros clínicos producidos por *Acinetobacter baumannii* son bacteriemia y neumonía asociada a ventiladores mecánicos (Garnacho et al., 2016), sin embargo, también se han descrito infecciones por esta bacteria en heridas quirúrgicas, tracto urinario, meningitis e infecciones en piel y tejido blandos en pacientes quemados y militares provenientes de la guerra (Barbut et al., 2013).

### **2.2.6. Resistencia antibiótica en *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* ha ido desarrollando ciertos mecanismos de resistencia antibiótica como la expresión de bombas de eflujo, modificación de la proteína blanco y pérdida de porinas, así como también la producción de enzimas principalmente de tipo  $\beta$ - lactamasas cuyo mecanismo de expresión es principalmente intrínseco de la especie (Roncancio, 2014).

### 2.2.6.1 Resistencia natural de *Acinetobacter* especies

Las cepas de *Acinetobacter* spp. catalogadas dentro del grupo de susceptibles, producen bajos niveles de una cefalosporinasa cromosómica no inducible de tipo AmpC, por lo que cefalosporinas de primera y segunda generación así como amoxicilina son hidrolizadas; así mismo este microorganismo presenta una actividad reducida ante aztreonam, trimethoprim y fosfomicina (Courvalin, Leclercq, & Rice, 2010).

Según los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorios (CLSI) la resistencia natural que presenta el género *Acinetobacter* es a los antimicrobianos descritos en la **Tabla N° 1**.

**Tabla N° 1:** Resistencia antibiótica natural de *Acinetobacter* especies.

Ampicilina	Amoxicilina	Amoxicilina/Ác. Clavulánico	Aztreonam	Ertapenem	Trimethoprim	Fosfomicina	Cloranfenicol
R	R	R	R	R	R	R	R

*Fuente:* Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. *Elaborado por:* Viviana Albán

### 2.2.6.2 Mecanismos de resistencia en *Acinetobacter baumannii*

La resistencia bacteriana puede ser innata o adquirida dependiendo del tipo de microorganismo. Los mecanismos innatos pueden estar ligados a genes presentes en el genoma de la bacteria y pueden ser de carácter enzimático y no enzimático (Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė, & Pavilionis, 2011). Así mismo, la resistencia adquirida o extrínseca ocurre mediante la adquisición de genes a través de plásmidos, transposones, integrones, bacteriófagos, mutaciones de genes celulares o una combinación de estos mecanismos y por lo general esta resistencia está mediada enzimas (Giedraitienė et al., 2011).

**Mecanismos de resistencia enzimáticos:** El mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica en *Acinetobacter baumannii* está dado por la presencia intrínseca de una cefalosporinasa de tipo AmpC. En esta especie, esta enzima es conocida como ADC (*Acinetobacter*- derived cephalosporinase) (Roncancio, 2014). Normalmente, cuando la

cefalosporinas ADC se expresa en niveles bajos, se presentan patrones de resistencia ante la ampicilina, sin embargo, según el estudio realizado por Peleg (2008), el 50% de las cepas estudiadas presentaron un patrón de hiperproducción de ADC por lo que sus rasgos de resistencia eran mucho más amplios incluyendo: cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Ciertas enzimas del tipo ADC han sido consideradas como AmpC de espectro extendido cuyo marcador es la resistencia presentada ante cefepime, una cefalosporina de cuarta generación (Tian et al., 2011).

Otro de los mecanismos intrínsecos para mostrar resistencia antibiótica en *Acinetobacter baumannii* es la presencia de una oxacilinasas específica, la OXA-51, enzima capaz de hidrolizar aunque débilmente penicilinas y carbapenémicos (Gordon & Wareham, 2010). Según varios estudios realizados, esta enzima tipo OXA-51 ha sido encontrada en todas las cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* al menos en Colombia y a nivel de América Latina, es por ello que se la utiliza como marcador genético en el proceso de identificación a nivel de especie (Chávez, Gómez, Cabrera, & Esparza, 2015).

De igual manera, se han descrito mecanismos enzimáticos extrínsecos, basados en la degradación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos principalmente por parte de enzimas denominadas betalactamasas, las mismas que pertenecen a las clases A, B o D según la clasificación de Ambler en 1980. En la **Tabla N° 2** podemos observar las principales enzimas tipo betalactamasas de Clase A, B o D que se han encontrado y se han descrito en cepas de *Acinetobacter baumannii*, juntamente con la acción que ejercen (Roncancio, 2014).

**Tabla N° 2:** Clasificación de enzimas tipo betalactamasa descritas en *Acinetobacter baumannii*.

CLASE	ENZIMAS	ACCIÓN
A	TEM-1, TEM-2, CARB-5.	Penicilinas.
	VEB-1, PER-1, TEM-92, CTX-M-2, KPC.	$\beta$ -lactámicos de espectro extendido.
B	IMP, VIM, SIM, SPM, NDM.	$\beta$ -lactámicos.
D	OXA-24, OXA-23, OXA-51, OXA-58.	Penicilinas y carbapenémicos.

*Fuente:* Roncancio, 2014. *Elaborado por:* Viviana Albán

**Mecanismos de resistencia no enzimáticos:** dentro de los mecanismos no enzimáticos presentes en cepas de *Acinetobacter baumannii* se encuentran los siguientes:

- **Alteración de las proteínas de membrana**

Mecanismo relacionado con la disminución de la expresión de OMPs (outer membrane proteins), porinas que normalmente facilitan el paso de los antibióticos pero que dada su baja expresión, disminuyen la permeabilidad de la bacteria para que los antibióticos ejerzan su acción (Murray et al., 2013).

- **Proteínas de unión a la penicilina**

Referente a la producción de PBPs que presentan menor afinidad por los antibióticos, es decir una proteína distinta. Este mecanismo tiene acción principal sobre los  $\beta$ -lactámicos (Roncancio, 2014).

- **Bombas de expulsión**

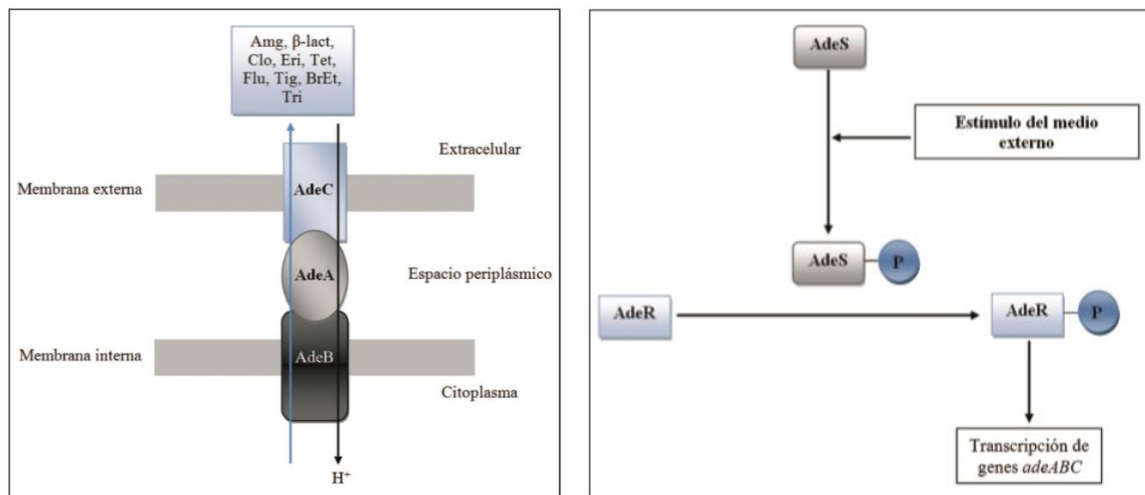
También conocidas como bombas de eflujo, actúan conjuntamente con las porinas ubicadas en la membrana externa de la bacteria para funcionar como un canal de expulsión inmediato del fármaco que se forma entre el citoplasma bacteriano y el medio extracelular excluyendo la interacción del espacio periplásmico y por ende la acción del antibiótico (Gordon & Wareham, 2010).

Las bombas de eflujo se clasifican de acuerdo a cuatro características: el número de proteínas que la constituyen, el número de dominios transmembrana pertenecientes a la proteína transportadora, el tipo de sustrato sobre el cual ejerce acción, y la fuente de energía que utilice (Martínez et al., 2009), constituyendo así 5 familias de bombas de eflujo: i) familia facilitadora mayor (MFS), ii) familia pequeña de multirresistencia (SMR), iii) familia de multirresistencia y extrusión de compuestos tóxicos (MATE), iv) familia de ATPasa (ATP) y v) familia de resistencia, nodulación y división celular (RND).

En *Acinetobacter baumannii* se han descrito tres tipos de bombas de eflujo: *AdeABC*, *AdeFGH* y *AdeIJK*, las mismas que pertenecen a la familia de las RND cuya fuente de energía para expulsar los antimicrobianos es una fuerza protón-motriz (Opazo, Domínguez, Bello, González, & Mella, 2009).

### a) Bomba de eflujo tipo AdeABC

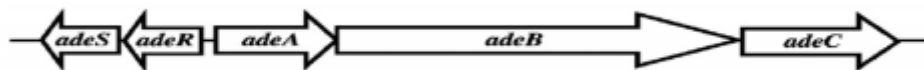
Está relacionada estrechamente con cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (Jia et al., 2015). Como se puede observar en la **Figura N° 1A**, esta bomba de eflujo está constituida por tres proteínas: AdeA, corresponde a una proteína de fusión de membrana, AdeB una proteína de transporte del antimicrobiano y AdeC una proteína de membrana externa, cuyos genes codificantes son conservados y regulados por un sistema de dos componentes AdeR y AdeS **Figura N° 1B**, dentro del cual AdeS es una proteína quinasa capaz de autofosforilarse como respuesta a un estímulo que puede ser la presencia de antibióticos, transfiriendo de esta manera un grupo fosfato a la proteína AdeR, la misma que al recibirlo, promueve la transcripción de los genes *AdeABC* y por ende la expresión de la bomba de eflujo (Opazo et al., 2009).



**Figura N° 1:** Representación gráfica de la bomba de eflujo AdeABC en *Acinetobacter baumannii* y su sistema regulador. **A)** Estructura de la bomba de eflujo tipo AdeABC. **B)** Sistema AdeSR que regula la expresión de la bomba de eflujo tipo AdeABC

*Fuente:* Opazo et al., 2009

Los genes que codifican para la bomba de eflujo tipo AdeABC, están organizados en un modelo tipo operón, en donde se encuentran genes tanto estructurales como reguladores, es así que los genes *AdeA*, *AdeB* y *AdeC* se encuentran contiguos y se transcriben en el mismo sentido, mientras que los genes *AdeR* y *AdeS* se transcriben en sentido opuesto a los genes de las proteínas estructurales de la bomba de eflujo **Figura N°2** (Patrice Courvalin, Perichon, & Coyne, 2011).



**Figura N° 2:** Representación gráfica del operón para el sistema de eflujo tipo AdeABC en *Acinetobacter baumannii*.

**Fuente:** Opazo et al., 2009

### 2.2.6.3 Uso de tigeciclina en infecciones por *Acinetobacter baumannii*

Tigeciclina es un antibiótico que pertenece a la clase de las tetraciclinas, análogo a la minociclina y al igual que esta, la tigeciclina se une a la unidad 30S del ribosoma, bloqueando la entrada del ARN de transferencia (Greer, 2006). Su estructura química única le proporciona una mayor capacidad de evasión al desarrollo de resistencias al igual que un aumento de la actividad in vitro de amplio espectro, es decir que afectan a bacterias Gram positivas, Gram negativas y anaerobias (Schmidt, Osterberg, Soreth, & Milstein, 2005).

- **Farmacocinética de tigeciclina**

El uso de tigeciclina está aprobada por la FDA únicamente en infecciones complicadas de piel e infecciones intrabdominales (Pillar, Draghi, Dowzicky, & Sahm, 2008). Puesto que su administración es intravenosa y el porcentaje de unión a proteínas es alto (71-89%), su volumen de distribución es amplio. Su metabolismo no es extenso ni complicado y en su mayor parte ocurre vía glucuronidación a nivel hepático. El tiempo de eliminación del antibiótico es de aproximadamente 36 horas y la vía principal de excreción es por heces en un 59% y por orina en un 22% (Schmidt et al., 2005).

- **Resistencia a la tigeciclina**

Tigeciclina es utilizada como antibiótico de última línea para tratar infecciones por cepas con fenotipo resistente, sin embargo se han venido describiendo ya resistencias ante este antimicrobiano en cepas de *Klebsiella spp*, *Acinetobacter spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Sun et al., 2013). Tal resistencia ha sido atribuida a la sobre expresión de bombas de eflujo como mecanismo de resistencia bacteriano (Sun et al., 2013; Navon et al., 2007).

### 2.2.7 Métodos de sensibilidad antimicrobiana

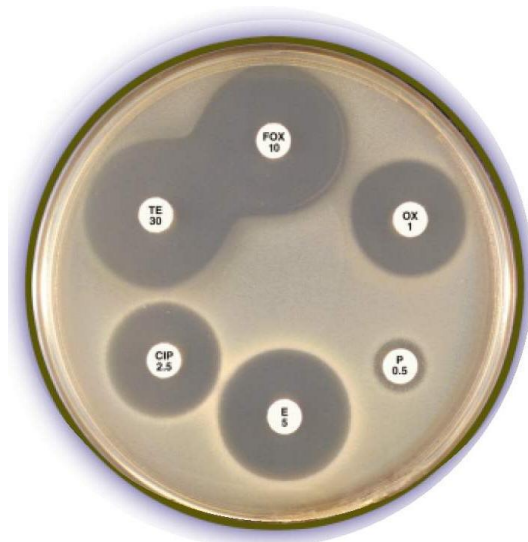
Son métodos que tienen la finalidad de evaluar la respuesta que tiene el microorganismo en términos de resistencia o sensibilidad ante la presencia de antimicrobianos. De esta manera

se define la capacidad que tiene el antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000). Varios métodos han sido descritos para determinar la susceptibilidad antibiótica, entre ellos se encuentran: difusión en disco, macrodilución en caldo, microdilución en caldo, microdilución por gradiente o métodos automatizados (Jorgensen & Ferraro, 2009)

#### **a) Técnica de difusión en disco**

Es el método más simple y práctico que puede ser aplicado en todos los laboratorios de Microbiología puesto que no requiere ningún equipo especial (Jorgensen & Ferraro, 2009), sin embargo la capacitación del personal es indispensable. Para la realización de este método, se necesita agar Mueller Hinton, el mismo que debe cumplir con las especificaciones establecidas por el CLSI en cuanto a la concentración de iones, aspecto físico, el volumen por caja y su respuesta ante varias cepas de tipo ATCC (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Para la interpretación de resultados, las zonas de inhibición de crecimiento son medidas en milímetros y el diámetro obtenido está relacionado con la susceptibilidad de la cepa al antibiótico (American Society for Microbiology, 2005).

Los resultados son cualitativos y categorizan las cepas en grupo de sensibles, intermedios o resistentes según los puntos de corte establecidos por institutos especializados como el CLSI, EUCAST o FDA. Las principales ventajas de este método es su simple implementación, la obtención de resultados categóricos de fácil interpretación para el personal de salud y la posibilidad de elegir los antibióticos necesarios y pertinentes para cada microorganismo. Por otro lado, la única desventaja es la falta de equipos automatizados para llevar a cabo este método (Jorgensen & Ferraro, 2009).

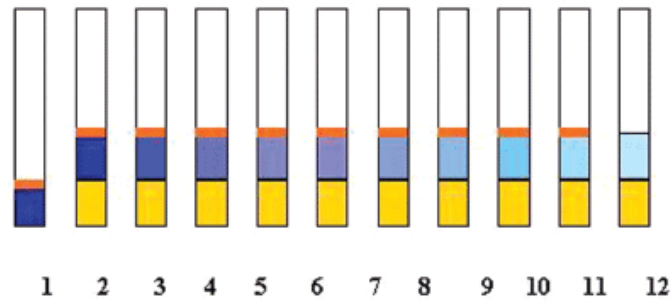


**Figura N° 3:** Técnica de Difusión en Disco para Susceptibilidad Antimicrobiana  
*Fuente: Bell, Carter, Hanrahan, & Nguyen, 2013*

#### **b) Técnicas de macrodilución y microdilución en caldo**

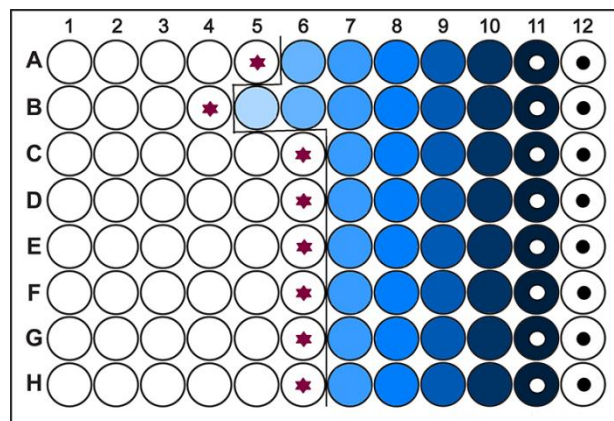
Es un método utilizado para la cuantificación in vitro de los antimicrobianos que se basa en la determinación de crecimiento de la bacteria en diluciones crecientes del antibiótico, con el fin de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antimicrobiano (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000).

En el caso de la macrodilución, ilustrada en la **Figura N° 4**, las diluciones y determinaciones serán realizadas en tubos de vidrio con un volumen final de al menos 1000  $\mu\text{l}$ ; mientras que en la **Figura N° 5**, en la microdilución, se utilizarán micropocillos con un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . La interpretación de resultados se realiza mediante la simple vista de turbidez en el medio, por lo tanto el valor de la CMI se define como la menor concentración del antibiótico que a simple vista ha inhibido totalmente el crecimiento bacteriano (American Society for Microbiology, 2005). Las ventajas de este método son la generación de un resultado cuantitativo y la capacidad de la técnica de detectar la CMI real del antimicrobiano frente a la bacteria estudiada. De igual manera, sus desventajas es que son procedimientos complicados de implementar, por la preparación de las soluciones por cada prueba y por consiguiente la probabilidad de error al momento de la preparación (Jorgensen & Ferraro, 2009)



**Figura N° 4:** Técnica de macrodilución en caldo realizada en tubo con volumen final de 1000 ul. Determinación de la CMI de acuerdo a la presencia de turbidez. La CMI en el ejemplo se localiza en la dilución del tubo 12.

*Fuente: Mazzola, Jozala, Novaes, Moriel, & Penna, 2009*



**Figura N° 5:** Técnica de microdilución en caldo realizada en placa con volumen final de 100 ul. Determinación de la CMI de acuerdo a la presencia de turbidez. En el ejemplo, los aislamientos están en filas y la CMI de cada una de ellas se encuentra en los pocillos que contiene una figura de estrella.

*Fuente: Microbiology and Cell Biology, 2017*

### 2.2.8 Clasificación de cepas resistentes a antibióticos

Las cepas de microorganismos antes susceptibles a la mayoría de antimicrobianos usados, han venido evolucionando mediante un proceso conocido como presión selectiva ejercida por la mano del hombre, lo que ha conllevado a la generación de fenotipos multirresistentes clasificados de la siguientes manera:

#### a) Cepas MDR (Multi Drug Resistance)

Al hablar de cepas MDR nos referimos a cepas aisladas que al ser sometidas a pruebas de sensibilidad antimicrobiana, presentan resistencias marcadas ante al menos 3 familias de antibióticos distintos, que tengan significancia clínica y epidemiológica, es decir que supongan dificultad en el tratamiento y posibilidad de la generación de brotes epidémicos o capacidad de transmisión de mecanismos de resistencia (López, Barcenilla, Amaya, & Garnacho, 2011).

### **b) Cepas XDR (Extremely Drug Resistance)**

Son cepas epidemiológicamente importantes, que muestran resistencia a casi todos los agentes antimicrobianos y que únicamente son sensibles a una o dos familias de antibióticos. Se toman en cuenta dos criterios principalmente para clasificar a una cepa XDR, el primero está basado en el número de antibióticos ante los cuales la cepa es resistente y el segundo si es resistente a uno o más antimicrobianos clave (Magiorakos et al., 2011).

### **c) Cepas PDR (Pan Drug Resistance)**

El término PAN, significa resistente a todos los agentes antimicrobianos. Para que una cepa sea clasificada como PDR, debe ser sometida a métodos de sensibilidad y mostrarse resistente ante todos los antibióticos aprobados. Es decir es resistente ante los antimicrobianos comercialmente disponibles, probados en la rutina de laboratorio y usados para tratamiento empírico (Magiorakos et al., 2011).

## **2.2.9 Métodos de identificación bacteriana**

### **a) Métodos fenotípicos**

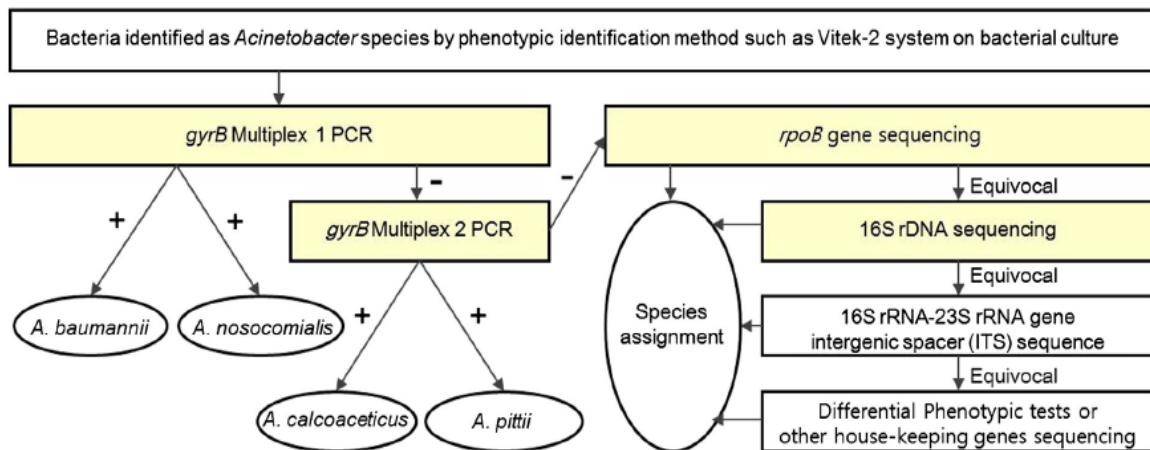
Los métodos de identificación fenotípica son los más utilizados a nivel de los laboratorios de microbiología clínica, son los primeros métodos en emplearse debido a su rapidez y a su bajo costo y sobre todo a su alta disponibilidad, principalmente la biotipificación que incluye pruebas como cultivo, caracterización macroscópica, microscópica, pruebas de lectura inmediata como es el caso de la catalasa y oxidasa, pruebas bioquímicas como fermentación de carbohidratos, utilización de citrato, utilización de malonato, reducción de nitratos (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010), entre otras sean estas manuales o automatizados. La biotipificación como la serotipificación, constituyen una información preliminar eficaz que puede ser reportada de inmediato al médico para empezar con un tratamiento (Vegas & Nieves, 2005).

### **b) Métodos genotípicos**

Como ya se ha mencionado, el género *Acinetobacter* contiene varias especies que tienen similitudes en los patrones fenotípicos, es por esto que se requiere una identificación a nivel genotípica de la especie *Acinetobacter baumannii*. Estos métodos son considerados complementarios o de referencia a las pruebas fenotípicas descritas anteriormente (Vegas & Nieves, 2005).

Existen varios genes que han sido empleados como dianas moleculares de identificación bacteriana como los son el ARN 16S, los espacios intergénicos entre las subunidades ARN 23S y ARN 16S, el gen *rpoB* y el gen *gyrB* que han venido siendo descubiertos a medida que las técnicas moleculares han ido avanzando (Fernández Olmos et al., 2010).

El gen *gyrB* codifica para la subunidad  $\beta$  de la enzima Topoisomerasa II que dada su distribución mundial y su alta tasa de sustituciones silentes, permite la identificación de especies bacterianas muy relacionadas y la diferenciación a nivel de género y especie mediante su amplificación de secuencias puntuales con primers específicos mas no universales (Fernández Olmos et al., 2010 ; Higgins, Lehmann, Wisplinghoff, & Seifert, 2010). La amplificación de secuencias específicas del gen *gyrB* ha sido propuesto como método inicial para diferenciación únicamente de las pertenecientes al Complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, es decir, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*; las técnicas de secuenciación de *rRNA 16S* o del gen *rpoB* son necesarias para caracterizar otras especies de *Acinetobacter* como se observa en el esquema de la **Figura N° 6** ( Lee et al., 2014).



**Figura N° 6:** Algoritmo para la identificación de *Acinetobacter* spp.  
**Fuente:** Lee et al., 2014.

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**Bacteriemia:** Término clínico que implica la presencia de bacterias en sangre, independiente de la respuesta que se genere en el huésped (Macedo, Algorta, Vola, & Pardo, 2012).

**Bacteriófago:** Denominado también fago, se lo considera como un virus capaz de lisar e infectar bacterias de manera específica (Nallelyt, Efrén, Oliver, & Oscar, 2010).

**Colonización bacteriana:** presencia de una especie bacteriana en un lugar no habitual sin ocasionar enfermedad (Spicer, 2009).

**Infecciones endémicas:** infecciones que aparecen en número usual o esperado en un área y tiempo determinado (Horcajada & Padilla, 2013).

**Infecciones epidémico:** infecciones que aparece en número inusual en un lugar y tiempo específico (Horcajada & Padilla, 2013).

**Factores de virulencia:** Mecanismos específicos mediante los cuales, un microorganismo produce daño a un hospedero susceptible (Cárdenas, Gándara, & Pérez, 2014).

**Fenotipo:** Conjunto de características propias de un microorganismo que son evidenciables (Rival & Durand- Gasselin, 2013).

**Genotipo:** Dotación genética intrínseca que porta un microorganismo. (Rival & Durand- Gasselin, 2013).

**Inmunosupresión:** defecto congénito o adquirido de la función de una célula efectora perteneciente al sistema inmune.

**Infección bacteriana:** se lo define como una multiplicación bacteriana que empieza con un proceso de colonización y puede generar o no síntomas de enfermedad (Spicer, 2009).

**Infecciones asociadas a la atención de la salud:** se reconoce como una infección contraída por un paciente durante su estancia en la unidad hospitalaria, que no estuvo presente en el momento de su admisión (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

**Neumonía por ventilación mecánica:** es un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar que se desarrolla dentro de las 45 horas después de que el paciente haya sido intubado y haya recibido ventilación de soporte mecánico (Díaz, Lorente, Valles, & Rello, 2010).

**Plásmidos:** Elementos genéticos móviles extracromosómicos que facilitan la transferencia de genes entre bacterias (Loeza Lara, Valdez Alarcon, BAizabal Aguirre, & López Meza, 2004).

**Resistencia antibiótica:** Mecanismo natural o adquirido mediante el cual un microorganismo permanece refractario parcial o totalmente ante la acción bactericida o bacteriostática de un antimicrobiano. (Fernandez, López, & Ponce, 2003)

## CAPÍTULO III

### 3.1 MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1 Tipo de estudio

Este estudio fue de tipo descriptivo y transversal. Es descriptivo porque se evaluó la relación existente entre la presencia de los genes que codifican la acción de la bomba de eflujo tipo AdeABC y su patrón fenotípico de resistencia a tigeciclina, y transversal porque se lo realizó en un período de tiempo determinado.

#### 3.1.2 Tipo de muestreo

Se llevó a cabo un muestreo de tipo aleatorio simple en el que cualquier cepa identificada como *Acinetobacter* spp. pudo formar parte del estudio.

#### 3.1.3 Tamaño de muestra

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la fórmula de población finita con un error alfa del 5% y un intervalo de confianza del 95%. Se usó una prevalencia del 5%, dato tomado del estudio realizado a nivel de Latinoamérica por Costello et al., (2016).

$$n = \frac{NZ^2\alpha \times p \times q}{d^2(N - 1) + Z^2\alpha \times p \times q}$$

**Dónde:**

**N**= Población total

**n**= Tamaño de la muestra

**Z $\alpha$** = Nivel de confianza: 95% con un coeficiente de 1.96

**p**= Proporción esperada: 5% (0.05)

**q**= 1-p

**d**= Precisión del estudio: 5% (0.05)

**Cálculo de la muestra**

$$n = \frac{NZ^2\alpha \times p \times q}{d^2(N - 1) + Z^2\alpha \times p \times q}$$
$$n = \frac{(487)(1.96)^2 \times 0.05 \times (1 - 0.05)}{(0.05)^2 (487 - 1) + (1.96)^2 \times 0.05 \times (1 - 0.05)}$$
$$n = 64 \text{ cepas}$$

**Decisión:** Con un nivel de confianza del 95% y un error alfa de 5%, se incluyó en el estudio un total de 64 cepas; pero por motivos de obtener datos más relevantes, el muestreo se amplió a 85 cepas.

### **3.1.4 Criterios de inclusión**

Se tomarán en cuenta a todas las muestras que cumplan los siguientes criterios:

- a) Aislamientos caracterizados como *Acinetobacter* spp.
- b) Cepas de *Acinetobacter* spp. con máximo un dato epidemiológico faltante.
- c) Cepas receptadas en el período comprendido entre los años 2015-2016.

### **3.1.5 Criterios de exclusión**

- a) Cepas contaminadas con otro microorganismo.
- b) Cepas de *Acinetobacter* spp. con más de un dato epidemiológico faltante.
- c) Cepas pertenecientes a diferente período de tiempo.

### 3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Tabla N° 3:** Operacionalización de variables

<b>OBJETIVO GENERAL: Identificar la actividad de la bomba de eflujo tipo AdeABC como mecanismo asociado a la resistencia ante tigeciclina en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> multidrogo resistentes.</b>						
<b>DEPENDIENTE</b>	<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>ESCALA</b>	<b>INSTRUMENTO DE MEDIDA</b>
	Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> con valores resistentes o intermedios a tigeciclina	Cepas que presenten un valor $\geq 4$ ug/ml de CMI a tigeciclina	Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	$\frac{N^{\circ} \text{ de aislamientos resistentes a Tigeciclina}}{\text{Total de aislamientos}}$	Cuantitativa	Base de datos WHONET
<b>INDEPENDIENTES</b>	<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>ESCALA</b>	<b>INSTRUMENTO DE MEDIDA</b>
	Servicio hospitalario	Aposento donde permanece un paciente hasta su alta	Unidad de cuidados intensivos, Unidad de Quemados, Aislamiento, Unidad Quirúrgica	$\frac{N^{\circ} \text{ de aislamientos de } A. \text{ baumannii por servicio hospitalario}}{\text{Total de aislamientos}}$	Cuantitativa	Formulario de Registro de Cepas
	Genes del complejo <i>AdeABC</i>	Genes que codifican y regulan la expresión de la bomba de eflujo tipo AdeABC	Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	Presencia del gen / Ausencia del gen	Cualitativa dicotómica	Formulario de Registro de Resultados
	Acción del CCCP	Diminución de la CMI de una cepa ante tigeciclina por acción del CCP	Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	CMI con inhibidor/ CMI sin inhibidor	Cuantitativa	Formulario de Registro de Resultados

*Elaborado por: Viviana Albán*

### **3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

#### **3.3.1 Materiales**

- a) Puntas para pipeta volumen 0.1-10  $\mu$ l; Marca: Axygen
- b) Puntas para pipeta volumen 0.1-10  $\mu$ l; Marca: Axygen
- c) Puntas para pipeta volumen 200  $\mu$ l; Marca: Axygen
- d) Puntas para pipeta volumen 1000  $\mu$ l; Marca: Axygen
- e) Tubos para PCR 0.2 mL tapa plana; Marca: Axygen
- f) Microtubos 1.5 mL; Marca: Axygen
- g) Microtubos 2.0 ml tapa rosca; Marca: Axygen
- h) Material de vidrio (frascos con tapa de 500 ml, 100 ml, 50 ml; probetas de 1000 ml, 100 ml y 20 ml).
- i) Micro pocillos para ELISA estériles de base cónica.
- j) Guantes de Nitrilo; Marca: Santa Cruz Biotechnology.
- k) Cajas plásticas Bi- Petri.

#### **3.3.2 Equipos**

- a) Microcentrífuga; Marca: Labnet; N° Serie: P101004.
- b) Termobloque; Marca: Labnet; N° Serie: S81B27143.
- c) Estación de Trabajo; Marca: CBS Scientific; N° Serie: 4400.
- d) Termociclador; Marca: Labnet; N° Serie: 12020020.
- e) Cámara Electroforética; Marca: Labnet; N° Serie: 120731026.
- f) Fotodocumentador; Marca: BioRad; N° Serie: 721BR12258.
- g) Incubadora 37°C; Marca: Labnet; N° Serie: 6091109.
- h) Vórtex; Marca: Labnet; N° Serie: Z2111688.
- i) Turbidímetro; Marca: Oxoid; N° Serie

#### **3.3.3 Reactivos**

- a) Agua grado molecular; Marca: Promega.
- b) Agar Mac Conkey; Marca: Oxoid. Número de Lote: 1727663. FV: 08/2020.
- c) Agar Nutritivo; Marca: Oxoid. Número de Lote: 1503396. FV: 05/2019.
- d) Agar Mueller Hinton. Marca: Difco. Número de Lote: 4350581. FV:08/2017.
- e) Caldo Mueller Hinton. Marca: Difco. Número de Lote: 518178. FV: 01/2019
- f) Agar TSI. Marca: Marca: Acumedia. Número de Lote: 106683A, FV: 2018

- g) Agar SIM. Marca: Oxoid. Número de Lote: 1492046. FV: 05/2019
- h) Caldo BHI. Marca: Difco. Número de Lote: 4363669. FV: 07/2018
- i) Agarosa 500 gr (Analytical Grade). Marca: Promega.
- j) GelStar GEL STAIN 10000 X; Marca: Lonza.
- k) GoTaq Green Master Mix (100 reacciones); Marca: Promega.
- l) Primers concentrados Forward y Reverse para *AdeB*, *AdeR*, *AdeS*.
- m) Tigeciclina Hidratada; Marca: Sigma Aldrich.
- n) Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone. Marca: Santa Cruz Biotechnology.

### **3.4 PROCEDIMIENTO**

#### **3.4.1 Aislamiento e identificación de cepas**

Las cepas fueron seleccionadas a partir de la base de datos filtrada del sistema WHONET perteneciente al Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (RAM INSPI-QUITO) de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión establecidos, con la continua elaboración de una base de datos en Excel. Los viales correspondientes se obtuvieron del cepario y los aislados fueron sembrados por método de agotamiento tanto en Agar selectivo Mac Conkey Lactosa Oxoid®, como en Agar Nutritivo Oxoid®, siendo las condiciones de crecimiento 37°C en aerobiosis durante 24 horas.

Aquellas cepas que mostraron crecimiento mixto, se les realizó un re aislamiento en agar Mac Conkey Lactosa Oxoid® para obtener colonias puras. Posterior a esto, la identificación microbiológica inició con una tinción Gram de todas las cepas, a continuación, las pruebas bioquímicas que se realizaron fueron: catalasa, oxidasa, fermentación de carbohidratos en Agar TSI Acumedia® y prueba de motilidad en Agar SIM Oxoid®.

#### **3.4.2 Pruebas de susceptibilidad antibiótica**

##### **3.4.2.1 Método de difusión en disco**

A partir de una solución bacteriana a escala 0.5 McFarland, obtenida mediante la dilución de cuatro a cinco colonias puras en solución salina al 0.9%, se inocularon las cajas Petri de plástico de tamaño 100 x 15 mm de Agar Mueller Hinton Difco®. Los discos de antibióticos utilizados para obtener los patrones de resistencia antimicrobiana están descritos en la **Tabla N°4** y en la **Figura N° 7** se observa su disposición, la cual fue establecida de acuerdo a las guías del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos para

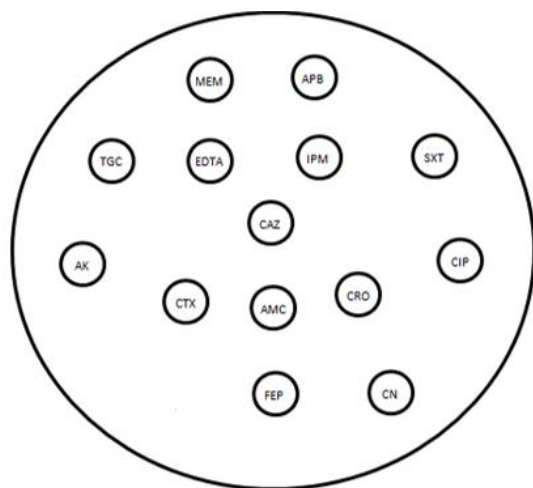
identificación fenotípica de mecanismos de resistencia enzimática en *Acinetobacter* especies.

**Tabla N° 4:** Listado de antibióticos utilizados para determinar perfiles de susceptibilidad en *Acinetobacter baumannii*.

<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>MARCA</b>
<b>Meropenem</b>	10 µg	CT0774B	Oxoid
<b>Imipenem</b>	10 µg	CT0455B	Oxoid
<b>Ertapenem</b>	10 µg	CT1761B	Oxoid
<b>Amoxicilina/ Ácido Clavulánico</b>	30 µg	CT0538B	Oxoid
<b>Ceftazidima</b>	30 µg	CT0412B	Oxoid
<b>Ceftriaxone</b>	30 µg	CT0417B	Oxoid
<b>Cefotaxima</b>	30 µg	CT0407B	Oxoid
<b>Cefepime</b>	30 µg	CT0538B	Oxoid
<b>Amikacina</b>	30 µg	CT0107B	Oxoid
<b>Tigeciclina</b>	15 µg	CT1841B	Oxoid
<b>Ciprofloxacina</b>	5 µg	CT1615B	Oxoid
<b>Gentamicina</b>	10 µg	CT0024B	Oxoid
<b>Trimetroprim/ Sulfametoxazol</b>	25 µg	CT0052B	Oxoid

*Fuente:* Oxoid - Thermo Fisher Scientific; *Elaborado por:* Viviana Albán.

Se usaron discos de papel filtro estériles impregnados con Ácido Borónico (APB) y EDTA, 6 ul y 5 ul respectivamente, los mismos que fueron colocados junto a los discos de imipenem y meropenem, con el fin de evidenciar la presencia de enzimas tipo serin  $\beta$ - lactamasas y enzimas tipo metalo  $\beta$ - lactamasas mediante la observación de sinergia entre carbapenémicos–APB y carbapenémicos–EDTA. Los resultados obtenidos fueron interpretados de acuerdo a los lineamientos del CLSI 2015 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).



**Figura N° 7:** Disposición de los Discos de Susceptibilidad Antibimicrobiana en caja petri 100 x 15mm de Agar Mueller Hinton Difco®. **MEM:** Meropenem, **IPM:** Imipenem, **APB:** Ácido Fenil Burónico, **CAZ:** Ceftazidima, **CRO:** Ceftriaxione, **FEP:** Cefepime, **CTX:** Cefotaxima, **AMC:** Amoxicilina/ Ácido Clavulánico, **TGC:** Tigeciclina, **SXT:** Trimetropim/ Sulfametoxazol, **AK:** Amikacina, **CIP:** Ciprofloxacina, **CN:** Gentamicina.

*Elaborado por: Viviana Albán.*

### 3.4.2.2 Método de microdilución en caldo para tigeciclina

Para determinar el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para la tigeciclina, se utilizó el método de microdilución en caldo, técnica que fue aplicada de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Guía M07-A10 del CLSI 2015 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Para esto se preparó una solución madre del antibiótico liofilizado (sustancia activa) a una concentración de 640 µg/ml (**Anexo N°1**) tomando en cuenta los datos de pureza, porcentaje de agua, potencia y fracción activa del antimicrobiano. Partiendo de esta solución cada día fue necesaria la preparación de una solución de trabajo con concentración de 128 µg/ml para llevar a cabo las 8 diluciones requeridas (**Anexo N° 2**) utilizando Caldo Mueller Hinton con ajuste catiónico, que tuvieron las siguientes concentraciones: 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0,125 µg/ml.

Para el inóculo bacteriano, se preparó una solución 0.5 McFarland de las colonias en solución salina al 0.9%. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 de la solución 0.5 McFarland. Las micro placas fueron inoculadas con 50 µl de las diluciones del antibiótico y 50 µl de la solución bacteriana, obteniendo un volumen final de 100µl. Se incubó las placas durante 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas cubiertas con parafilm®. La interpretación de la técnica se realizó mediante la presencia de turbidez con ayuda de un espejo invertido y los puntos de corte y ECOFFs proporcionados por EUCAST. Los resultados fueron recogidos en plantillas de acuerdo a la numeración y fecha de realización de la prueba. (**Anexo N° 3**)

### 3.4.2.3 Determinación fenotípica de la bomba de eflujo

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente en el apartado para microdilución en caldo, con la excepción de añadir 10 µl del inhibidor Carbonil Cianida3- Clorofenilhidazona (CCCP) a cada uno de los pocillos de acuerdo al protocolo obtenido de Ardebili (2014), cuya preparación esta descrita en el (Anexo N° 4) Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas cubiertas con parafilm. Su lectura se la interpretó mediante la presencia de turbidez con ayuda de un espejo invertido.

### 3.4.3 Extracción de ADN a partir de cepas de *Acinetobacter baumannii*

Se prepararon suspensiones bacterianas cargadas de cada una de las cepas en solución TE 1X, en crioviales de 2 ml. La extracción se llevó a cabo mediante el método de ebullición, el mismo que fue realizado en el Termobloque *Labnet* a una temperatura de 95°C durante 10 minutos. Posterior a esto las suspensiones fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos para proceder a separar el sobrenadante y cuantificar el ADN utilizando el equipo *Nanodrop Thermo Fisher Scientific®*. Una vez cuantificado, se procedió a almacenar a -20°C hasta su posterior uso.

### 3.4.4 Amplificación de los genes en estudio

#### 3.4.4.1 Identificación de la especie

Para la identificación de la especie *A. baumannii* se realizó una amplificación de las regiones especie-específicas del gen *gyrB*, para las cuales se utilizaron las secuencias de primers Sp2F, Sp4F y Sp4R detallados en la **Tabla N°5**, las mismas que fueron tomadas de (Higgins et al., 2010).

**Tabla N° 5:** Secuencias de primers utilizados para identificación de especie de *Acinetobacter baumannii*

PRIMER	SECUENCIA	CONCENTRACIÓN	PB
Sp2	Forward:	0.2 µM	490 pb
	5'-G TTCCTGATCCGAAATTCTCG-3'		
Sp4	Forward:	0.2 µM	294 pb
	5'-CACGCCGTAAGAGTGCATTA-3'		
	Reverse:	0.2 µM	
	5'-AACGGAGCTTGTCAGGGTTA-3'		

**Fuente:** Higgins, Lehmann, Wisplinghoff, & Seifert, 2010; **Elaborado por:** Viviana Albán

La preparación de la master mix para PCR fue realizada acorde a las cantidades y concentraciones detalladas en la **Tabla N° 6**.

**Tabla N° 6:** Preparación de Master Mix para la identificación de secuencias especie-específicas de *Acinetobacter baumannii*

<b>MASTER MIX IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE</b>			
	<b>Sp2-Sp4</b>	<b>Sp4-Sp4</b>	
	<b>Cantidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<b>Agua molecular</b>	10,5 µL	10,5 µL	-
<b>Primer Forward Sp2</b>	0,5 µL	0,5 µL	0,2µM
<b>Primer Reverse Sp4</b>	0,5 µL	0,5 µL	0,2µM
<b>Taq Master Mix</b>	12,5 µL	12,5 µL	1x
<b>DNA</b>	1 µL	1 µL	<250ng
<b>Volumen Final</b>	25 µL		

*Elaborado por: Viviana Albán.*

Las condiciones de la PCR fueron: denaturación inicial durante 5 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 45 segundos a 60°C y 1 minuto a 72 °C con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron analizados en gel de agarosa 2% peso/volumen, teñidos con *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain* con una corrida electroforética a 90 voltios durante 45 minutos y posteriormente visualizados con UV con la ayuda de un Fotodocumentador. Para comprobar que las bandas obtenidas pertenecían al fragmento esperado, estas fueron comparadas con la ayuda de un marcador de peso molecular que fue corrido conjuntamente con las muestras.

#### **3.4.4.2 Genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC**

Para evidenciar la presencia de la bomba de eflujo tipo AdeABC, se amplificaron tres genes, un gen estructural *AdeB* y los dos genes reguladores *AdeS* y *AdeR*, para lo cual se utilizó tres pares de primers: AdeBF, AdeBR, AdeRF, AdeRR, AdeSF y AdeSR detallados en la **Tabla N° 7**. Las secuencias de los primers fueron tomados de Lari, Beheshti, Ardebili, Bahador, & Talebi, (2014).

**Tabla N° 7:** Secuencia de primers utilizados para detección de la bomba de eflujo tipo AdeABC en *Acinetobacter baumannii*

PRIMER	SECUENCIA	CONCENTRACIÓN	PB
<b>AdeB</b>	Forward: 5'-TTAACGATAGCGTTGTAACC-3'	0.2 µM	541 pb
	Reverse: 5'-TGAGCAGACAATGGAATAGT-3'	0.2 µM	
<b>AdeR</b>	Forward: 5'-ACTACGATATTGGCGACATT-3'	0.2 µM	447 pb
	Reverse: 5'-GCGTCAGATTAAGCAAGATT-3'	0.2 µM	
<b>AdeS</b>	Forward: 5'-TTGGTTAGCCACTGTTATCT-3'	0.2 µM	544 pb
	Reverse: 5'-AGTGGACGTTAGGTCAAGTT-3'	0.2 µM	

*Fuente: Lari et al., 2014; Elaborado por: Viviana Albán*

La preparación de la master mix para PCR fue realizada acorde a las cantidades y concentraciones detalladas en la **Tabla N° 8**.

**Tabla N° 8:** Preparación de las Master mix para los genes *AdeB*, *AdeR* y *AdeS* de la bomba de eflujo tipo AdeABC.

MASTER MIX GENES BOMBA DE EFLUJO				
Reactivos	AdeB	AdeR	AdeS	Concentración
	Cantidad	Cantidad	Cantidad	
<b>Agua molecular</b>	10,5 µL	10,5 µL	10,5 µL	-
<b>Primer Forward</b>	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,2µM
<b>Primer Reverse</b>	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,2µM
<b>Taq Master Mix</b>	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	1x
<b>DNA</b>	1 µL	1 µL	1 µL	<250ng
<b>Volumen Final</b>	25 µL			

*Elaborado por: Viviana Albán.*

Las condiciones de la PCR fueron: 5 minutos de denaturación inicial a 94°C, 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, seguido de la fase de hibridación durante 45 segundos a 54°C, una extensión de 45 segundos a 72°C y terminando con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de la PCR fueron analizados en gel de agarosa 2% peso/volumen, teñidos con *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain* con una corrida electroforética a 90 voltios durante 45 minutos y posteriormente visualizados con UV con la ayuda de un Fotodocumentador. Para comprobar que las bandas obtenidas pertenecían al fragmento esperado, estas fueron comparadas con la ayuda de un marcador de peso molecular que fue corrido conjuntamente con las muestras.

### **3.5 CONTROL DE CALIDAD**

#### **3.5.1 Agar Mueller Hinton**

El control de calidad del agar Mueller Hinton utilizado para la determinación de perfiles de susceptibilidad mediante el método de Difusión en Disco se lo realizó siguiendo los lineamientos del instructivo M-100 del CLSI 2015.

#### **3.5.2 Control de calidad de discos de susceptibilidad antimicrobiana**

Para el control de calidad de los discos de susceptibilidad antimicrobiana se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 como cepa sensible y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como cepa resistente. A las dos cepas se les realizó un antibiograma completo para posteriormente medir los halos de inhibición y comparar estas medidas con los datos proporcionados por los lineamientos del CLSI.

#### **3.5.3 Control de calidad en el método de microdilución en caldo**

##### **3.5.3.1 Cepas para control de calidad**

Para el control de calidad de microdilución en caldo para tigeciclina, se utilizó como cepa sensible a *Escherichia coli* ATCC 25922 y como control resistente se utilizó una cepa de *Klebsiella pneumoniae* Kpn987 caracterizada como resistente a tigeciclina en el Centro de Resistencia a los Antimicrobianos (RAM). Ambas cepas fueron corridas en cada placa utilizada juntamente con las cepas de *Acinetobacter baumannii*.

##### **3.5.3.2 Control de calidad del inóculo bacteriano.**

El inóculo bacteriano utilizado en la microdilución en caldo debe ser controlado rigurosamente para poder obtener datos certeros y reproducibles. Debido a esto, se controló

en inóculo mediante la realización de una dilución 1:1000 de la solución 0.5 Mac Farland de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922; 100 ul de esta dilución fue inoculada y sembrada en Agar Nutritivo e incubada durante 16-24 horas a 37°C. El conteo de colonias presentes en el agar debió ser menor o igual a 50 colonias para poder asegurar el inóculo adecuado.

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

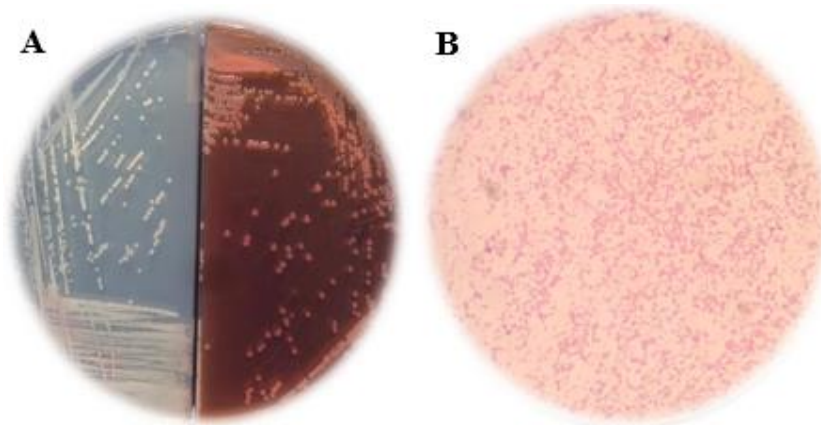
El análisis estadístico se lo llevó a cabo mediante análisis porcentuales de frecuencias con el fin de obtener una descripción clara de la distribución de las variables utilizando gráficos de estadística descriptiva tales como Tablas de Frecuencia, Gráficos en Círculo y Gráficos de Barra. Además se hizo uso del Software WHONET para ingreso de datos obtenidos y evaluación de los datos de perfiles de resistencia.

## CAPÍTULO IV

### 4.1 RESULTADOS

#### 4.1.1 Identificación microbiológica

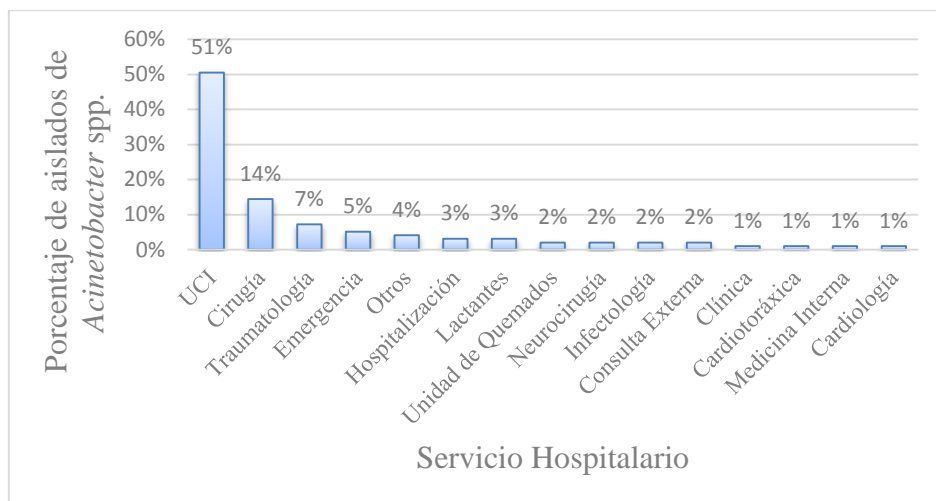
Todas las cepas incluidas en el estudio fueron caracterizadas como *Acinetobacter* spp. mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y microbiológicas. A nivel macroscópico, con la siembra en agar Mac Conkey se las logró identificar como colonias medianas, convexas color rosado y no fermentadoras, como se observa en la **Figura N° 8A**; por otro lado, a nivel microscópico, en la **Figura N° 8B** se evidencia la tinción Gram realizada en la que se observan coco bacilos Gram negativos. Para la identificación microbiológica, se utilizaron pruebas tales como: oxidasa con resultado negativo, catalasa con resultado positivo, fermentación de carbohidratos en agar TSI con resultado K/K y prueba de motilidad en agar SIM con resultado negativo. (**Anexo N° 5**)



**Figura N° 8:** A) Identificación macroscópica de *Acinetobacter* spp. en Agar Mc Conkey; B) Tinción Gram de *Acinetobacter* spp.  
*Elaborado por:* Viviana Albán

#### 4.1.2 Aislamientos clínicos

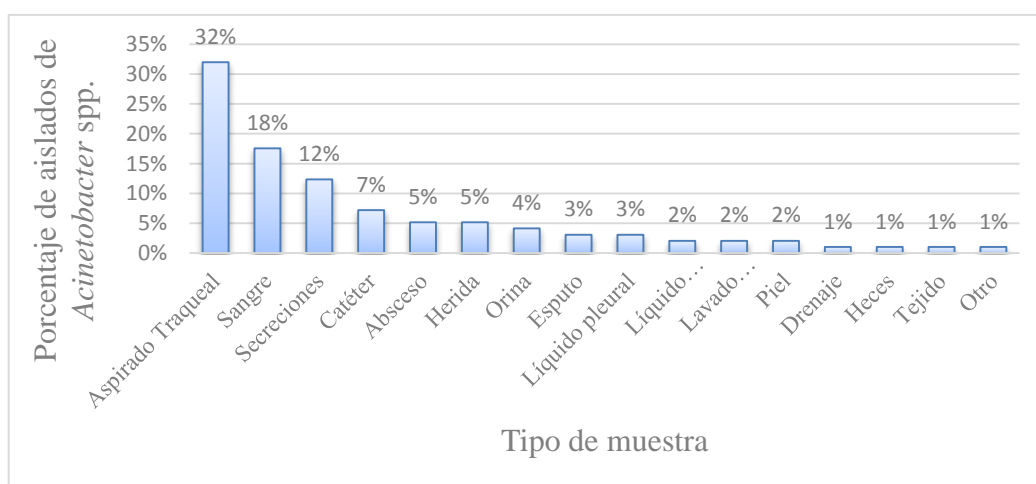
Los aislados clínicos utilizados en este estudio provienen en un 51% de la Unidad de Cuidados Intensivos, seguido de las áreas de cirugía y traumatología con un 14% y 7% respectivamente; por otro lado, en servicios importantes en términos de inmunodeficiencias como Unidad de Quemados, Cardiotorácica y Medicina Interna el porcentaje de *Acinetobacter baumannii* va del 1 al 2% como se observa en el **Gráfico N° 1**.



**Gráfico N° 1:** Gráfico de barras de los porcentajes de aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. con respecto al Servicio Hospitalario.

**Elaborado por:** Viviana Albán

En cuanto al tipo de muestra, un 32% de aislados provienen de aspirado traqueal, seguido del 18% que corresponden a hemocultivos y el 12% de aislados provenientes de muestras de secreciones en general. En muestras de abscesos, orina y esputo es raro el aislamiento de *Acinetobacter* spp.; y, el menor porcentaje de aislamientos de esta especie se encuentran en muestra de heces y tejidos de acuerdo a las frecuencias establecidas en el **Gráfico N° 2**.



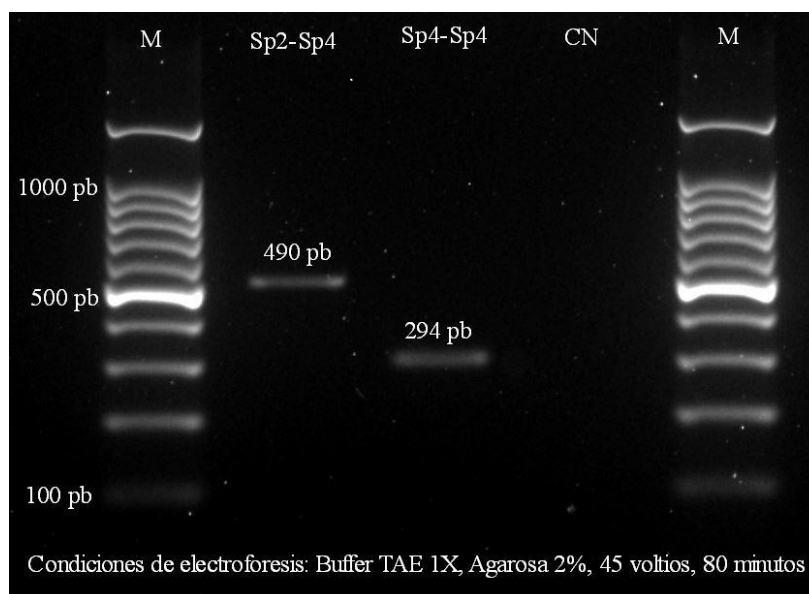
**Gráfico N° 2:** Gráfico de barras del porcentaje de aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. con respecto al tipo de muestra.

**Elaborado por:** Viviana Albán

#### 4.1.3 Identificación de *Acinetobacter baumannii*

Mediante la amplificación de dos secuencias especie-específicas del gen *gyrB* Sp2-Sp4 y Sp4-Sp4, se identificaron las cepas pertenecientes a la especie *Acinetobacter baumannii*. De

las 93 cepas identificadas como *Acinetobacter* spp., 85 de ellas pertenecen a la especie *Acinetobacter baumannii*, mostrando amplicones de 490 pb y 294 pb como se evidencia en la **Figura N° 9**; 4 aislados amplificaron únicamente la región Sp4- Sp4 (294 pb) por lo que podrían pertenecer a la especie *Acinetobacter nosocomialis*; y, los 4 restantes no amplificaron para ninguna de las dos regiones lo que señala que puede tratarse de cualquier otro tipo de especie de *Acinetobacter*.



**Figura N° 9:** Tamaño del producto de PCR de las secuencias específicas Sp2-Sp4 y Sp4-Sp4 en un aislado de *Acinetobacter baumannii*. **M:** Marcador de peso molecular. **CN:** Control Negativo con agua molecular.

*Elaborado por: Viviana Albán*

#### 4.1.4 Susceptibilidad antibiótica

El 100% de los aislados presentan resistencia a antibióticos carbapenémicos tanto imipenem como meropenem (**Anexo N° 6**). La sensibilidad a ceftazidima se muestra en un 44, 8 %, mientras que el porcentaje de sensibilidad a cefepime es menor al 1%. Con respecto a tigeciclina, el 95.8% de los aislados se muestran sensibles a este antibiótico y el 4,2% de los aislados restantes muestra un perfil de resistencia intermedio en metodología de difusión en disco como se evidencia en la **Tabla N° 8**.

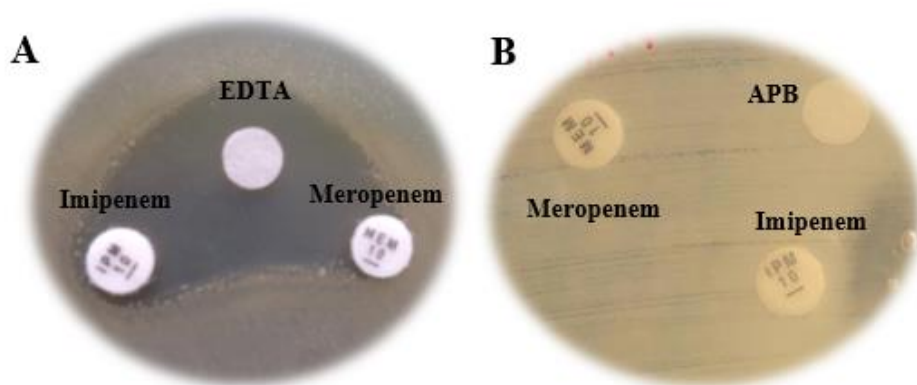
Con respecto a la sinergia con EDTA y carbapenémicos, las cepas codificadas con los números 20, y 81 fueron positivas como se observa en la **Figura N° 9A**, por lo tanto se deduce la presencia de enzimas tipo metalo  $\beta$ -lactamasas en estos aislados. Por otro lado,

ninguno de los aislados presentó sinergia Acido Fenil Borónico y carbapenémicos. **Figura N° 9B.**

**Tabla N° 9:** Perfiles de susceptibilidad antibiótica obtenidos mediante técnica de Difusión en Disco. Interpretación con puntos de corte CLSI 2015.

ANTIMICROBIANO	% RESISTENTES	% INTERMEDIOS	% SENSIBLES
<b>Amoxicilina/Ácido clavulánico</b>	100	0	0
<b>Piperacilina/Tazobactam</b>	100	0	0
<b>Ceftazidima</b>	51,8	1,2	47,1
<b>Ceftriaxona</b>	68,2	31,8	0
<b>Cefotaxima</b>	84,7	14,1	1,2
<b>Cefepime</b>	96,5	3,5	0
<b>Imipenem</b>	100	0	0
<b>Meropenem</b>	100	0	0
<b>Amicacina</b>	90,6	4,7	4,7
<b>Gentamicina</b>	67,1	4,7	28,2
<b>Ciprofloxacina</b>	88,2	5,9	5,9
<b>Trimetoprima/Sulfametoxazol</b>	97,6	0	2,4
<b>Tigeciclina</b>	0	4,7	95,3

*Elaborado por: Viviana Albán*



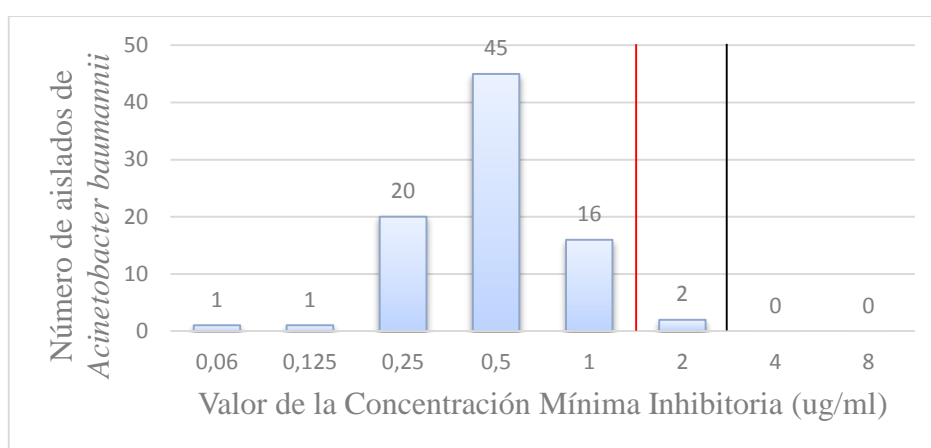
**Figura N° 10:** A) Sinergia positiva con EDTA en cepa de *Acinetobacter baumannii*.

B) Sinergia negativa con APB en cepa de *Acinetobacter baumannii*

*Elaborado por: Viviana Albán.*

#### 4.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para tigeciclina.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó mediante microdilución en caldo, técnica que fue estandarizada con un volumen final de 100  $\mu$ l en placas de micropocillos con base redonda. Los resultados se encuentran detallados en el **Gráfico N° 5**, donde se observa que la mayor cantidad de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* tienen un valor de CMI con patrón sensible que va entre 0.25, 0.5 y 1  $\mu$ g/ml correspondiente a 20, 45 y 10 aislamientos respectivamente; 2 cepas presentaron valores de 2  $\mu$ g/ml y no se encontraron cepas con valores de CMI para 4 y 8  $\mu$ g/ml, de acuerdo a los puntos de corte establecidos por EUCAST de tigeciclina para Enterobacterias (WHONET, 2017).

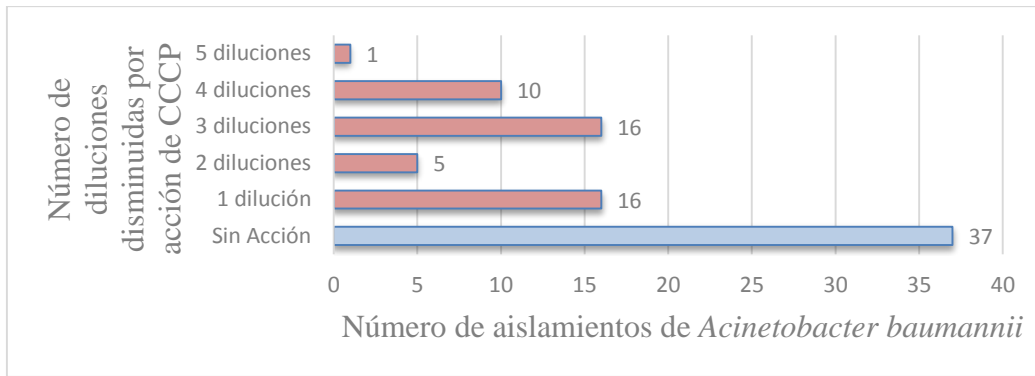


**Gráfico N° 3:** Número de aislados de *Acinetobacter baumannii* de acuerdo al valor de la Concentración Mínima Inhibitoria para tigeciclina.

*Elaborado por:* Viviana Albán

#### 4.1.6 Acción fenotípica de la bomba de eflujo mediante el uso del Inhibidor Carbonil Cianida 3-Clorofenilhidrazona (CCCP)

Los resultados obtenidos fueron tabulados de acuerdo al número de diluciones que disminuyó el valor de la CMI al usar el inhibidor CCCP. De los 85 aislados, 37 no presentaron disminución alguna con respecto al valor de la CMI usando el inhibidor; sin embargo, 48 aislados presentaron disminución en 1, 2, 3, 4 y 5 diluciones de la CMI, como se observa en el **Gráfico N° 6**.

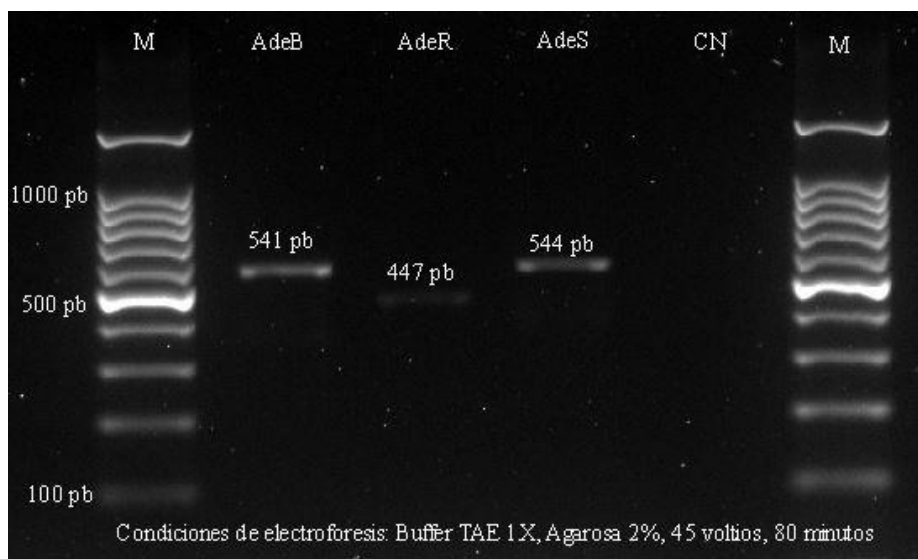


**Gráfico N° 4:** Número de cepas que presentaron disminución en los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de acuerdo al número de diluciones.

*Elaborado por: Viviana Albán*

#### 4.1.7 Genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC en *Acinetobacter baumannii*

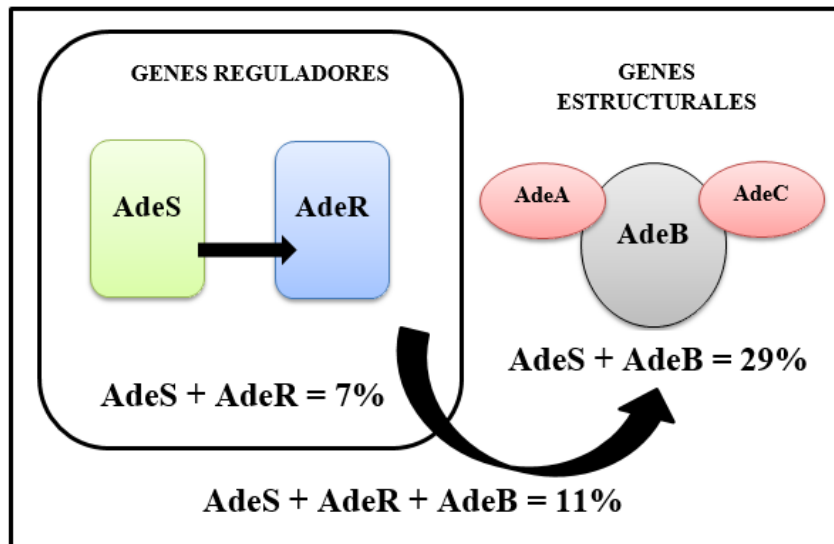
La presencia de la bomba de eflujo tipo AdeABC, fue determinada mediante la amplificación por técnica de PCR de punto final de un gen estructural *AdeB* (441 pb) y dos genes reguladores *AdeR* (447pb) y *AdeS* (544 pb), como se observa en la **Figura N° 11**.



**Figura N° 11:** Tamaño de los productos de PCR de los genes *AdeB*, *AdeR* y *AdeS* en aislados de *Acinetobacter baumannii*. **M:** Marcador de peso molecular. **CN:** Control Negativo con agua molecular.

*Elaborado por: Viviana Albán*

Los resultados obtenidos de los aislados correspondientes a los genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC fueron los siguientes: el 7% (6/85) amplificaron únicamente los dos genes reguladores tanto *AdeS* como *AdeR*, el 29% (25/85) amplificó los genes *AdeS* y *AdeB*, mientras que el 11 % (9/85) de las cepas además de amplificar los genes reguladores, amplificaron el gen estructural *AdeB* como se demuestra en el esquema del **Gráfico N° 5**



**Gráfico N° 5:** Distribución de los genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC de *Acinetobacter baumannii*.

*Elaborado por:* Viviana Albán

#### 4.1.8 Relación entre los genes de la bomba de eflujo y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana

Tomando en cuenta los 9 aislados que amplificaron los tres genes de la Bomba de Eflujo tipo AdeABC, se determinaron los fenotipos de resistencia analizando 8 categorías de antimicrobianos clasificados de acuerdo a su sitio de acción. De acuerdo a la **Tabla N° 9**, todas cepas analizadas presentan un perfil de resistencia de tipo XDR. No se pudo realizar una correlación con los datos de susceptibilidad antimicrobiana de la tigeciclina pues no se obtuvieron cepas resistentes a este antibiótico.

**Tabla N° 10:** Determinación de fenotipos resistentes de acuerdo a categorías de antimicrobianos utilizados en *Acinetobacter baumannii*

Cepas	Categorías de Antimicrobianos									Fenotipo Resistente
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
51							NT	NT		XDR
52							NT	NT		XDR
55							NT	NT		XDR
56							NT	NT		XDR
62							NT	NT		XDR
72							NT	NT		XDR
74							NT	NT		XDR
78							NT	NT		XDR
79							NT	NT		XDR

**Categorías:** **A:** Aminoglucósidos; **B:** Carbapenémicos; **C:** Fluoroquinolonas; **D:** Inhibidores B-lasctamasas; **E:** Cefalosporinas; **F:** Inhibidores vía del Folato; **G:** Penicilinas+ Inhibidores de B-lasctamasas; **H:** Polimixinas; **I:** Tetraciclinas. El aislado es susceptible a todos los antimicrobianos pertenecientes a la categoría. El aislado es resistente a algunos, pero no todos los antimicrobianos listados en la categoría. El aislado es resistente a todos los antimicrobianos de la categoría. **NT** El aislado no fue probado ante ningún antimicrobiano de la categoría

*Elaborado por: Viviana Albán*

#### **4.1.9 Relación entre la presencia de los genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC y la acción fenotípica de la misma mediante el uso de CCCP.**

De acuerdo a los datos de la **Tabla N° 10**, partiendo de los nueve aislados que presentaron los genes de bomba de Eflujo, cuatro de ellos presentaron una disminución de tres diluciones en cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana ante tigeciclina al usar CCCP, dos de ellos, presentaron una disminución de una dilución, mientras que los tres restantes, no presentaron diferencia alguna entre el valor de la CMI con y sin inhibidor.

**Tabla N° 11:** Relación entre los aislados que presentan los genes de la Bomba de Eflujo y la disminución de susceptibilidad antimicrobiana al usar CCCP.

<b>Número de Aislados</b>	<b>CMI Tigeciclina (µg/ ml)</b>	<b>CMI Tigeciclina+CCCP (µg/ ml)</b>	<b>Diluciones reducidas</b>	<b>AdeB</b>	<b>AdeS</b>	<b>AdeR</b>
<b>4</b>	0,5	0,06	3	+	+	+
<b>2</b>	0,5	0,25	1	+	+	+
<b>1</b>	0,5	0,5	0	+	+	+
<b>2</b>	0,25	0,25	0	+	+	+

*Elaborado por: Viviana Albán*

## CAPITULO V

### 5.1 DISCUSIÓN

Las infecciones ocasionadas por *Acinetobacter* spp. han sido relacionadas con enfermedades intrahospitalarias principalmente asociadas a pacientes inmunocomprometidos (Lemos et al., 2011). La mayor cantidad de aislamientos de *Acinetobacter* spp. analizados en este estudio provinieron de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) con un porcentaje de 51%, dato que se relaciona con los descritos en varias publicaciones tanto en América Latina como en Ecuador en donde se obtuvieron porcentajes que van desde un 21 a 52% de aislados provenientes de esta unidad correspondientes a cepas de *Acinetobacter* spp. (Jimenez, 2013; Royer et al., 2015).

De igual manera, también se describen aislados de este microorganismo, aunque en menor porcentaje provenientes de unidades como traumatología y cirugía, debido a la capacidad que tiene *Acinetobacter* spp. de mantenerse viable durante períodos de tiempo prolongados en superficies inanimadas e inclusive en personal de salud, lo que facilita su diseminación (Morgan et al., 2010). La Unidad de Quemados (UQ) es un área que presenta una elevada cantidad de pacientes inmunocomprometidos, sin embargo, los aislados analizados en este estudio alcanzaron únicamente un porcentaje de aproximadamente 2%, resultado que se contradice con publicaciones donde se describe una alta tasa de infecciones por *Acinetobacter* spp. en esta unidad y por lo tanto un grave problema de reservorio de este microorganismo a nivel hospitalario por el riesgo de ocasionar brotes. Esta discrepancia podría ser atribuida a la profilaxis antibiótica impuesta por el personal de salud para el manejo preventivo en dichos pacientes (Barbut et al., 2013).

Los cuadros clínicos principales relacionados con infecciones causadas por *Acinetobacter* spp. son neumonía asociada a ventilación mecánica y bacteriemia (Garnacho et al., 2016), esta información está relacionada con los resultados obtenidos en el presente estudio con respecto al tipo de muestra; en donde se encontró que tanto las muestras de aspirado traqueal como muestras de sangre son las más frecuentes. Estos datos obtenidos concuerdan con resultados de otros estudios en los que se menciona que aproximadamente del 39 al 52 % de los aislados fueron procedentes de muestras de aspirado traqueal (Royer et al., 2015; Roncancio et al., 2014).

Con respecto a la identificación de los aislados de *Acinetobacter* spp., 85 cepas amplificaron las secuencias específicas (Sp2-Sp4 y Sp4-Sp4), caracterizándolas como cepas de *Acinetobacter baumannii*; por otro lado, 4 muestras de las 8 que no pertenecen a la especie *Acinetobacter baumannii*, amplificaron únicamente la región Sp4-Sp4 mientras que las 4 restantes no amplificaron ninguna de las secuencias específicas, resultado que concuerda con el reportado por Lee (2014), en el que se reporta que cerca del 75% de las cepas analizadas en el estudio, pertenecen a la especie *Acinetobacter baumannii* y por lo tanto se relaciona a esta especie en especial con infecciones intrahospitalarias. De acuerdo al protocolo de PCR *gyrB* 1 propuesto por Higgins (2010), aquellos aislados que mostraron únicamente la secuencia Sp4-Sp4 podrían ser microorganismos pertenecientes a la especie *Acinetobacter* GS13TU y aquellos que no amplificaron ninguna de las dos secuencias, para su identificación se debería seguir el protocolo de PCR *gyrB* 2 propuesto por Higgins (2010) o aquel descrito por Lee (2014) para identificar la especie específica mediante secuenciación del gen *rpo* o *16rRNA*.

De acuerdo a los datos de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, se observa una resistencia del 100% a ambos antibióticos carbapenémicos, tanto imipenem como meropenem, resultado que concuerda con lo descrito por Sotomayor (2016) en su trabajo de caracterización de aislados clínicos y ambiental de *Acinetobacter baumannii* en Ecuador, en donde al igual que en el presente trabajo, se describe el mismo porcentaje de resistencia a esta clase de antimicrobianos. De igual manera, Dall (2015) demuestra gran parte de fenotipos resistentes de cepas de *Acinetobacter baumannii* con CMI  $\geq$  16 ug/ml para meropenem en Brasil; sin embargo el trabajo de investigación realizado por Rada & Parra (2016) en Bolivia, señala porcentajes de resistencia diferentes a los obtenidos en este estudio, aproximadamente de 38% y 39% a Imipenem y Meropenem respectivamente, discrepancia que podría deberse a factores ambientales, distribución geográfica de las resistencias, control de calidad de los discos utilizados o patrones de antibióticos usados para tratamiento de este microorganismo. Los tres estudios citados, concuerdan en que la resistencia a carbapenémicos está mediada por la presencia de enzimas tipo *bla*<sub>OXA</sub>, dentro de las cuales las más predominantes se encuentran las enzimas *bla*<sub>OXA-23</sub> y *bla*<sub>OXA-51</sub>, conociéndose que esta última es constitutiva en especies de *Acinetobacter baumannii* (Roncancio et al., 2014).

*Acinetobacter baumannii*, en su genoma expresa una cefalosporinasa cromosomal de tipo AmpC (Roncancio et al., 2014), cuya expresión tiene efecto sobre los antibióticos como

ampicilina, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, sin causar resistencia alguna frente a carbapenémicos, ni cefalosporinas de cuarta generación como cefepime a menos que se presente una sobre expresión de esta enzima (Diomedi, 2005). En este estudio se observa una resistencia que va desde el 51% al 84% frente a cefalosporinas de segunda y tercera generación, resultado que podría deberse a la presencia de enzimas tipo AmpC cromosómicas propias de la especie y que se pueden encontrar sobre expresadas en algunos de los aislados.

Así mismo se destaca un porcentaje de resistencia de 96.5% a cefepime, resultado que podría deberse a la presencia de enzimas tipo BLEE, las mismas que fueron analizadas en el presente estudio mediante la disposición de amoxicilina/ác. clavulánico junto con ceftazidima, cefepime y ceftriaxona; pese a esto, fenotípicamente no se logró observar un efecto de sinergia entre estos antibióticos en ninguno de los aislados, lo que indica la posible ausencia de enzimas tipo BLEE. Sin embargo se debe tomar en cuenta que, según el estudio realizado por Pino et al., (2007) en Chile, en el cual se analizaron 132 cepas de *Acinetobacter baumannii*, 7 presentaron un fenotipo BLEE positivo en la prueba de sinergia con ácido clavulánico, utilizando cloxacilina como inhibidor de la acción de cefalosporinasas cromosomales permitiendo de esta manera visualizar la acción inhibitoria por parte del ácido clavulánico; estos hallazgos fueron confirmados por estudios moleculares, donde se encontró que la mayor parte de cepas con BLEE positivo, poseían enzimas  $\beta$ - lactamasas de tipo TEM (Pino et al., 2007).

De los aislados analizados, el 14% han mostrado fenotipos de resistencia inusuales con respecto a la susceptibilidad de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, reportándose resistencia a cefepime y susceptibilidad a ceftazidima. En *Acinetobacter baumannii*, este patrón no ha sido atribuido a ninguna clase de mecanismo en especial; sin embargo en *Pseudomonas aeruginosa* este fenotipo ya ha sido descrito y explicado por la acción de enzimas tipo Oxacilinasas, específicamente la *bla*<sub>OXA-31</sub> que tiene una homología de aproximadamente el 98% con la *bla*<sub>OXA-1</sub> por lo que se ha manifestado que cumplen el mismo rol en cuanto a hidrolizar cefepime y cefpirome sin causar acción alguna sobre ceftazidima y cefotaxima (Aubert et al., 2001).

Adicionalmente, en dos de los aislados pertenecientes a la especie *Acinetobacter baumannii* se observó sinergia entre EDTA y carbapenémicos, sugiriendo la presencia de enzimas

pertenecientes a la clase de metalo  $\beta$ -lactamasas, hallazgo que se ha atribuido principalmente a la familia *Enterobacteriaceae* y muy rara vez a *Acinetobacter* spp. (Bonnin, Naas, Poirel, & Nordmann, 2012). En *Acinetobacter baumannii* se ha descrito últimamente la presencia de enzimas tipo NDM, dato epidemiológico importante como fuente de diseminación de resistencia antimicrobiana (Bonnin et al., 2012; Boulanger, Naas, Fortineau, Figueiredo, & Nordmann, 2012).

La resistencia a tigeciclina en *Acinetobacter baumannii* ha sido reportada en varios países, siendo los estudios más representativos los realizados por Hornsey et al., (2011) en el Reino Unido, Kopterides et al., (2010) en Grecia y en Estados Unidos por Gallagher & Rouse, (2008); Peleg et al., (2007) y Hornsey et al., (2011), caracterizándose por ser casos muy raros y que principalmente se han presentado después de tratamientos mono terapéuticos con tigeciclina; a nivel de Latinoamérica, el estudio realizado por Costello et al., (2016) con cepas de *Acinetobacter baumannii* entre los años 2005 - 2011, reportó un incremento en cuanto a la resistencia presentada por este microorganismo frente a tigeciclina de un 5% a un 10.5% en los años analizados.

Tigeciclina es un antibiótico inestable químicamente, cuya oxidación es rápida y su afección ante la presencia de iones tales como el magnesio, que ha sido descrito por Casal et al., (2009). Según el estudio realizado por Fernández et al., (2009), elevadas concentraciones de este ion en el Agar Mueller Hinton, disminuye los halos de la zona de inhibición al aplicar la metodología de difusión en disco para evaluar tigeciclina en cepas de *Acinetobacter* spp.; las razones aún son desconocidas, pero se presume que la tigeciclina puede tener la capacidad de formar complejos con el manganeso, disminuyendo de esta manera su actividad. Por lo tanto las pruebas de susceptibilidad frente a tigeciclina, se la debe realizar en medios bajos en magnesio, que simulen las concentraciones de este ion en sangre, para que el valor pueda ser clínicamente significativo (Fernández et al., 2009).

La concentración de iones magnesio en el agar Mueller Hinton y la no existencia de puntos de corte para tigeciclina mediante técnica de difusión en disco en *Acinetobacter* spp. anulan completamente la interpretación de estos resultados. Tampoco existen puntos de corte para tigeciclina en *Acinetobacter* spp. con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), sin embargo, la recomendación del protocolo establecido por (WHONET, 2017), es utilizar los puntos de corte nuevos establecidos por EUCAST de tigeciclina para la familia

*Enterobacteriaceae* cuyos valores son  $\leq 1$  ug/ml Sensible y  $\geq 4$  ug/ml Resistente, valores que concuerdan con el ECOFF determinado por el mismo comité. Por lo tanto, en este estudio, el 97,64% de las cepas presentaron valores de CMI que van de 0.06 a 1  $\mu\text{g/ml}$ , considerándose aislados sensibles a este antibiótico, mientras que el 2.35% restante presentó valores de CMI de 2  $\mu\text{g/ml}$ , valor que puede ser interpretado como intermedio.

Varios estudios realizados en *Acinetobacter baumannii* han demostrado que la expresión de la bomba de eflujo tipo AdeABC juega un rol importante en cuanto a resistencia antimicrobiana incluyendo antibióticos como carbapenémicos (Lee et al., 2010), aminoglucósidos (Magnet, Courvalin, & Lambert, 2001), fluoroquinolonas (Ardebili, Lari, & Talebi, 2014), tetraciclinas (Beheshti, Talebi, Ardebili, & Bahador, 2014) y tigeciclina (Li et al., 2015).

La Bomba de Eflujo tipo AdeABC está compuesta por tres proteínas estructurales: AdeA funciona como proteína de fusión a la membrana (MFP), AdeB como proteína transportadora y AdeC actúa como una proteína de membrana externa (OMP) (Opazo et al., 2009). La expresión de estas proteínas está regulada por el sistema AdeRS, cuyos genes se transcriben en sentido opuesto a los genes de las proteínas estructurales de la bomba, formando de esta manera un sistema tipo operón, cuyas vías de traducción están reguladas por estímulos ambientales, en este caso la presencia de antimicrobianos, quienes actuarían como inductores del sistema regulador y por ende de la transcripción de los genes que dan lugar a las proteínas que forman la bomba de eflujo tipo AdeABC (Wieczorek et al., 2008).

En la presente investigación, se analizó la presencia de los genes reguladores *AdeR* como *AdeS* y del gen estructural *AdeB* debido a la estabilidad e importancia en la acción de la bomba de eflujo; donde, se obtuvo que el 11% (9/85) de los aislados clínicos presentaron los tres genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC, lo que representa que el mecanismo se encuentra presente en esas cepas. El porcentaje encontrado en el estudio es considerablemente bajo en comparación con otros estudios realizados con respecto a la tigeciclina (Sun et al., 2014; Yuhan, Ziyun, Yongbo, Fuqiang, & Qinghua, 2016). También se puede mencionar que el 29% (25/85) de las cepas presentó los genes *AdeS* (regulador) y *AdeB* (estructural), patrón que según el estudio de Lopes & Amyes, (2013), se debe a una modificación en el gen *AdeR* (regulador) ocasionada por la presencia de una secuencia de inserción de tipo *ISAbal6*, lo que impide la amplificación de este gen. Pese a esto, cabe

mencionar que la falta de amplificación del gen *AdeR* no está relacionado con la ausencia de la bomba de eflujo según este estudio.

Adicionalmente un 7% (6/85) de las cepas estudiadas presentaron únicamente los genes reguladores, patrón que no está totalmente descrito en cuanto a la presencia o no de la Bomba de Eflujo tipo AdeABC. Aquellas cepas que no presentaron ninguno de los genes, no se puede descartar totalmente la expresión de bombas de eflujo, puesto que puede tratarse de otro tipo de bombas de eflujo tales como la AdeFGH, AdeIJK o AdeDE (Rosenfeld, Lambert, Courvalin, & Pe, 2010; Lopes & Amyes, 2013).

El 11% de los aislados estudiados que presentaron la bomba de eflujo tipo AdeABC, se los clasificó en dos grupos: 1) Aquellas cepas que fueron positivas para los genes *AdeB*, *AdeR*, *AdeS* y que mostraron disminución en cuanto a la susceptibilidad ante tigeciclina con el uso de CCCP, existiendo cuatro aislados que mostraron una disminución de 3 diluciones y un aislado que se redujo en una dilución al usar el inhibidor, resultado que realza la presencia de la bomba de eflujo que podría contribuir con resistencia a la tigeciclina, concordando así con los datos expuestos por Deng et al., (2014), estudio en el que se demuestra la acción del CCCP como inhibidor de la acción de bombas de eflujo y por ende se lo considera como una herramienta para detección fenotípica inespecífica de sistemas de eflujo; 2) Aquellas cepas que fueron *AdeB*, *AdeR* y *AdeS* positivo y que no mostraron cambio alguno en cuanto a la susceptibilidad ante tigeciclina con el uso de CCCP dando como resultado tres aislados que no mostraron diferencias en sus valores de CMI para tigeciclina con inhibidor, hecho que sugiere que la bomba de eflujo a pesar de estar presente, no es un mecanismo importante que contribuye a la resistencia a tigeciclina en dichos aislados

Las cepas de *Acinetobacter baumannii* se caracterizan por ser multi drogo resistentes y más aún cuando tienen presente un mecanismo de bombas de eflujo (Ruzin, Keeney, & Bradford, 2007). Aunque la bomba de eflujo tipo AdeABC, se la ha relacionado con la resistencia presentada a tigeciclina, es un mecanismo no específico, capaz de expulsar cualquier tipo de antimicrobianos (Gordon & Wareham, 2010). En el presente estudio, las nueve cepas que presentaron la bomba de eflujo tipo AdeABC fueron clasificadas en fenotipos MDR, XDR o PDR de acuerdo a los conceptos propuestos por Magiorakos et al., (2012), en los que se tomaron en cuenta ocho categorías de antimicrobianos que incluyeron Aminoglucósidos, carbapenémicos, fluoroquinolonas, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas, inhibidores

de la vía del folato, penicilinas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, Polimixinas y tetraciclinas, que se prueban generalmente en *Acinetobacter baumannii*, observándose que ocho de los nueve aislados compartían el mismo patrón de resistencia antibiótica y uno de los aislados presentaba susceptibilidad ante fluoroquinolonas, sin embargo todos las cepas fueron clasificadas como cepas tipo XDR, lo que quiere decir que únicamente existen una o dos categorías de antimicrobianos disponibles para su tratamiento.

Las cepas de *Acinetobacter baumannii* han sido descritas como cepas MDR, sin embargo, en el presente estudio se las ha caracterizado como cepas XDR que posiblemente pueden llegar a ser PDR por la facilidad que tiene este microorganismo de generar mecanismos de resistencia por cuenta propia, al igual que de adquirir determinantes genéticos. Esta conducta de resistencia es sin lugar a duda un hecho que debe ser abordado de manera inmediata con el fin de prolongar la vida y el uso de los pocos antimicrobianos que nos quedan disponibles para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *Acinetobacter baumannii*.

## CONCLUSIONES

*Acinetobacter baumannii* es un microorganismo asociado a infecciones intrahospitalarias en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos dependientes de equipos tales como ventiladores mecánico, cuya estancia hospitalaria por lo general es la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). La capacidad de este microorganismo que mantenerse viable incluso en condiciones desfavorables, lo define como una de las bacterias capaces de generar brotes epidémicos, cuyo tratamiento es complicado debido a las pocas opciones terapéuticas que quedan disponibles.

De acuerdo a los patrones de susceptibilidad presentados, los aislados analizados son considerados resistentes a la mayor parte de antimicrobianos probados incluyendo carbapenémicos y cefalosporinas que han venido siendo útiles como tratamiento a infecciones por *Acinetobacter baumannii*; no obstante, todos los aislados fueron totalmente sensibles a tigeciclina, dato determinado por la técnica de microdilución en caldo. La tigeciclina es un antibiótico prometedor frente a infecciones causadas por este patógeno, sin embargo, de acuerdo a la aprobación del uso de este antimicrobiano por la FDA, únicamente puede ser utilizado en infección de piel y tejidos blandos siguiendo la dosis adecuada y su uso no debería ser en monoterapia, debido a la resistencia total o parcial que puede llegar a generarse al final o incluso durante el período de tratamiento.

Si bien es cierto, a nivel mundial ya se han reportado cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a tigeciclina, realidad que ha recaído sobre la presencia de bombas de eflujo capaces de expulsar varios tipos de antibióticos anulando de esta manera su acción. Una de estas bombas más estudiada y relacionada con la resistencia a tigeciclina es la bomba de eflujo tipo AdeABC, cuya acción fenotípica se la puede evidenciar mediante el uso de un inhibidor de porinas como lo es el Carbonil Cianida 3-Clorofenilhidrazona (CCCP).

Para la presencia de la bomba de eflujo, se logró identificar tanto el gen estructural *AdeB*, como los genes reguladores *AdeR* y *AdeS* utilizando la técnica de PCR de punto final. Los genes de la bomba de eflujo tipo AdeABC fueron encontrados en 9 aislados de *Acinetobacter baumannii*, lo que demuestra la presencia del mecanismo; dato que va correlacionado con la determinación de la acción fenotípica de los 9 aislados en donde, 6 de ellos presentaron un

aumento en la susceptibilidad antibiótica a tigeciclina con la consecuente disminución de 1 a 3 diluciones con respecto al valor de la CMI.

Puesto que no se obtuvieron cepas resistentes a tigeciclina, no se pudo correlacionar la presencia de la bomba de eflujo con la acción fenotípica en estas cepas, no obstante se las relacionó con los fenotipos resistentes que estas presentaron, siendo así que todas aquellas cepas poseedoras de la bomba de eflujo tipo AdeABC fueron categorizadas como cepas XDR.

Con fines epidemiológicos, los aislados pertenecientes al género *Acinetobacter*, podrían ser caracterizados a nivel de especie mediante el uso de la amplificación de secuencias específicas del gen *gyrB*, técnica que puede ser implementada en laboratorios en donde se disponga de laboratorio básico de técnicas moleculares. La amplificación de las secuencias específicas del gen *gyrB* se utiliza únicamente para diferenciar las especies pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, si se tratare de otro tipo de especie, se debe recurrir a otras técnicas moleculares, tales como secuenciación del gen *rpo* o *16rRNA*.

En el Ecuador, aún no existen aislados de *Acinetobacter baumannii* que presenten resistencia a tigeciclina, por lo tanto, de acuerdo a la realidad del paciente y sobre todo al tipo de muestra del que se esté hablando, se puede utilizar a este antimicrobiano como opción terapéutica; sin embargo, con el fin de prolongar la vida útil del mismo, se recomienda usarlo en terapia combinada con otro antimicrobiano que queda a consideración del médico.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda la realización de estudios posteriores sobre *Acinetobacter baumannii* y su perfil de susceptibilidad frente a tigeciclina para mantener activo el proceso de vigilancia epidemiológica de este microorganismo, no solo a nivel de centro de referencia de resistencia antimicrobiana si no en cada una de las casas de salud, de acuerdo a la realidad epidemiológica en particular.

Para estandarizar la técnica de microdilución en caldo, se recomienda analizar los datos de porcentaje de agua, pureza, fracción activa y solvente adecuado para preparar la solución madre del antibiótico. De igual manera, es necesaria la utilización de caldo Mueller Hinton con ajuste catiónico para brindar las concentraciones de iones adecuadas en el medio, asegurando de esta manera la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

Para mantener la continuidad del estudio propuesto, se recomienda cuantificar la expresión de los genes que conforman la bomba de eflujo tipo AdeABC por RT-PCR (Real time- PCR) para identificar cepas con sobreexpresión de este mecanismo de resistencia.

Igualmente, se recomendaría secuenciar los genes *AdeR* y *AdeS* de las cepas que presentan la bomba de eflujo, para identificar mutaciones que puedan ser las responsables de la sobreexpresión de este mecanismo de resistencia y por lo tanto la generación de fenotipos resistentes tipo XDR o PDR.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, I., Cerqueira, G., Bhuiyan, S., & Peleg, A. Y. (2013). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(4), 395–409. <http://doi.org/10.1586/eri.13.21>
- Adams, J., Paterson, D., Sidjabat, H., Pasculle, A., Potoski, B., Muto, C., Doi, Y. (2008). Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 3837–3843. <http://doi.org/10.1128/AAC.00570-08>
- American Society for Microbiology. (2005). *Manual of antimicrobial susceptibility testing. Manual of antimicrobial susceptibility testing*. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Ardebili, A., Lari, A., & Talebi, M. (2014). Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Annals of Laboratory Medicine*, 34(6), 433–438. <http://doi.org/10.3343/alm.2014.34.6.433>
- Ardebili, A., Talebi, M., Azimi, L., & Rastegar, A. (2014). Effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on the minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1), 3–7. <http://doi.org/10.5812/jjm.8691>
- Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S., Pages, J., & Nordmann, P. (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1615–1620. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1615-1620.2001>
- Barbut, F., Yezli, S., Mimoun, M., Pham, J., Chaouat, M., & Otter, J. (2013). Reducing the spread of *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burns unit through the intervention of an infection control bundle. *Burns*, 39(3), 395–403. <http://doi.org/10.1016/j.burns.2012.07.007>
- Beheshti, M., Talebi, M., Ardebili, A., & Bahador, A. (2014). Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(3), 54–57.
- Bell, S., Carter, J., Hanrahan, I., & Nguyen, T. (2013). Antibiotic susceptibility testing by the CDS method, (April), 93. Retrieved from <http://web.med.unsw.edu.au/cdstest>
- Bonnin, R., Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- $\beta$ -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1419–1421. <http://doi.org/10.1128/JCM.06276-11>

- Boulangier, A., Naas, T., Fortineau, N., Figueiredo, S., & Nordmann, P. (2012). NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2214–2215. <http://doi.org/10.1128/AAC.05653-11>
- Cárdenas, M., Gándara, J., & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94, 94, 35–43.
- Casal, M., Rodriguez, F., Johnson, B., Garduno, E., Tubau, F., Lejarazu, R., García, N. (2009). Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 69–72. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp169>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic resistance threats. *Cdc*, 22–50. <http://doi.org/CS239559-B>
- Chávez, M., Gómez, R., Cabrera, C., & Esparza, M. (2015). Patrones de resistencia a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* en un hospital de Colombia. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(1), 21. <http://doi.org/10.15381/anales.v76i1.11071>
- Chen, L., Chen, T., Chen, Y., Lin, C., Lin, W., & Lu, P. (2011). Microbial isolation and emergence of antimicrobial resistance associated with tigecycline usage. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(5), 352–357. <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.01.033>
- Chuang, Y., Sheng, W., Li, S., Lin, Y., Wang, J., Chen, Y., & Chang, S. (2011). Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *acinetobacter* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 52(3), 352–360. <http://doi.org/10.1093/cid/ciq154>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015a). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard* (Vol. 35). Retrieved from [http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/M07A10\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015b). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute* (Vol. 32).
- Costello, S., Gales, A., Morfin, R., Jones, R., & Castanheira, M. (2016). Mechanisms of Resistance, Clonal Expansion, and Increasing Prevalence of *Acinetobacter baumannii* Strains Displaying Elevated Tigecycline MIC Values in Latin America. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 22(4), 253–8. <http://doi.org/10.1089/mdr.2015.0168>
- Courvalin, P., Leclercq, R., & Rice, L. (2010). *Acinetobacter* and B-lactams. In *Antibiogram* (pp. 407–420). Canada: ESKA Publishing.
- Courvalin, P., Perichon, B., & Coyne, S. (2011). Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 947–953. <http://doi.org/10.1128/AAC.01388-10>

- Dall, G., Gutberlet, A., Ferreira, J., Ferreira, L., Deglmann, R., Westphal, G., & França, P. (2015). Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(6), 699–705. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0233-2015>
- Deng, M., Zhu, M., Li, J., Bi, S., Sheng, Z., Hu, F., Li, L. (2014). Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a chinese university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 297–303. <http://doi.org/10.1128/AAC.01727-13>
- Diaz, E., Lorente, L., Valles, J., & Rello, J. (2010). Mechanical ventilation associated pneumonia. *Medicina Intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva Y Unidades Coronarias*, 34(5), 318–24. <http://doi.org/10.1016/j.medin.2010.03.004>
- Diomedi P, (2005). Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Revista Chilena de Infectología*, 22(4), 298–320. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182005000600003>
- Doi, Y., Murray, G., & Peleg, A. (2016). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance —Treatment Options, 36(1), 85–98. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1398388.Acinetobacter>
- Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhoriès, H., & Joly-Guillou, M. (2013). Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(10), 802–805. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.021>
- Fernández, C., Mazarrasa, O., Calvo, J., Del Arco, A., & Martínez, L. (2009). High concentrations of manganese in mueller-hinton agar increase MICs of tigecycline determined by etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 827–829. <http://doi.org/10.1128/JCM.02464-08>
- Fernandez, F., López, J., & Ponce, L. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina*, 57(10), 44–80. <http://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Gaddy, J., Actis, L., Arivett, B., Mcconnell, M., Rafael, L., & Pachón, J. (2012). Role of Acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infection and Immunity*, 80(3), 1015–1024. <http://doi.org/10.1128/IAI.06279-11>
- Gales, C., Jones, R., Forward, K., Liñares, J., Sader, H., & Verhoef, J. (2001). Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns,

- Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Prog. *Clinical Infectious Diseases*, 32(s2), S104–S113. <http://doi.org/10.1086/320183>
- Gales, C., Jones, R., Forward, K., Liñares, J., Sader, H., & Verhoef, J. (2001). Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Prog. *Clinical Infectious Diseases*, 32(2), 104–113. <http://doi.org/10.1086/320183>
- Gallagher, J., & Rouse, H. (2008). Tigecycline for the treatment of *Acinetobacter* infections: A case series. *Annals of Pharmacotherapy*, 42(9), 1188–1194. <http://doi.org/10.1345/aph.1L171>
- Garnacho, J., Gutiérrez, A., Díaz, A., Cisneros, J., Cano, M., Gato, E., Rodríguez, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: Molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, (xx), 5–12. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.018>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822035>
- Gonzalez, A., & Valverde, V. (2016). Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. *Journal of Pathogens*, 2016, 7318075. <http://doi.org/10.1155/2016/7318075>
- Gordon, N., & Wareham, D. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219–226. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024>
- Greer, N. (2006). Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylicycline class of antibiotics. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 19(2), 155–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609746> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1426172>
- Higgins, P., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., & Seifert, H. (2010). gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4592–4594. <http://doi.org/10.1128/JCM.01765-10>
- Horcajada, J., & Padilla, B. (2013). Endemia y epidemia. Investigación de un brote epidémico nosocomial. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(3), 181–186. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.10.010>
- Hornsey, M., Loman, N., Wareham, D., Ellington, M., Pallen, M., Turton, J., Woodford, N. (2011). Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(7), 1499–1503. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr168>

- Jia, W., Li, C., Zhang, H., Li, G., Liu, X., & Wei, J. (2015). Prevalence of Genes of OXA-23 Carbapenemase and AdeABC Efflux Pump Associated with Multidrug Resistance of *Acinetobacter baumannii* Isolates in the ICU of a Comprehensive Hospital of Northwestern China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 10079–10092. <http://doi.org/10.3390/ijerph120810079>
- Jimenez, M. (2013). *Vigilancia microbiologica año 2011: una herramienta para el control de las infecciones intrahospitalarias (IIH), area de cuidados intensivos (ACI) HCAM*. Universidad San Francisco de Quito.
- Jorgensen, J., & Ferraro, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Infectious Diseases Society of America*, 7750, 1749–1755. <http://doi.org/10.1086/647952>
- Kopterides, P., Papageorgiou, C., Antoniadou, A., Papadomichelakis, E., Tsangaris, I., Dimopoulou, I., & Armaganidis, A. (2010). Failure of tigecycline to treat severe *Clostridium difficile* infection. *Anaesthesia and Intensive Care*, 38(4), 755–758.
- Lari, A., Beheshti, M., Ardebili, A., Bahador, A., & Talebi, M. (2014). Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(4), 229. <http://doi.org/10.4103/0975-7406.142949>
- Lee, M., Jang, S., Li, X., Park, G., Kook, J., Kim, M. J., Moon, D. (2014). Comparison of rpoB gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, gyrB multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(1), 29–34. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.013>
- Lee, Y., Yum, J., Kim, C., Yong, D., Jeon, E., Jeong, S., Lee, K. (2010). Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 40(1), 43–48. <http://doi.org/40/1/43> [pii]
- Lemos, E., De la Hoz, F., Einarson, T., McGhan, W., Quevedo, E., Castañeda, C., & Kawai, K. (2014). Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(5), 416–23. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12363>
- Lemos, E., Restrepo, H., Alvis, N., Quevedo, E., & Cañon, O. (2011). Mortalidad por *Acinetobacter baumannii* en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Revista de Panama Salud Publica*, 30(4), 287–294. <http://doi.org/10.1590/S1020-49892011001000001>
- Li, H., Wang, X., Zhang, Y., Zhao, C., Hongbin, C., Jiang, S., Hui, W. (2015). The role of RND efflux pump and global regulators in tigecycline resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Future Microbiology*, 10(3), 337–346. <http://doi.org/10.2217/fmb.15.7>

- Lin, J., & Sharma, V. (2013). Quantitative PCR analysis of diesel degrading genes of *Acinetobacter calcoaceticus* isolates, 7(50), 5613–5624. <http://doi.org/10.5897/AJMR2013.5791>
- Loeza, P., Valdez, J., Baizabal, V., & López, J. (2004). Mecanismos De Replicación De Los Plásmidos Bacterianos. *Reb*, 23(2), 71–78.
- Lopes, B., & Amyes, S. (2013). Insertion sequence disruption of *adeR* and ciprofloxacin resistance caused by efflux pumps and *gyrA* and *parC* mutations in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(2), 117–121. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.012>
- López, M., Barcenilla, F., Amaya, R., & Garnacho, J. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*, 35(1), 41–53. <http://doi.org/10.1016/j.medin.2010.07.011>
- Macedo, M., Algorta, G., Vola, M., & Pardo, L. (2012). Bacteriemias y sepsis . Endocarditis, 1, 197–212.
- Magiorakos, P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Monnet, D. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Hindler, J. (2011). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Microbiology*, 18(3), 268–281. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in. *Society*, 45(12), 3375–3380. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3375>
- Martinez, J., Sánchez, M., Martínez, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 430–449. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x>
- Mazzola, P., Jozala, A., Novaes, L., Moriel, P., & Penna, T. (2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(2), 241–248. <http://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008>
- McConnell, M., Actis, L., & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 130–155. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>

- Microbiology and Cell Biology, (2017). Minimum Inhibitory (MIC) and Minimal Bactericidal (MBC) Concentration Testing. Retrieved from <http://emerypharma.com/services/minimum-inhibitory-concentration-testing/>
- Morgan, D., Liang, S., Smith, C., Johnson, J., Harris, A., Furuno, J., Perencevich, E. (2010). Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(7), 716–21. <http://doi.org/10.1086/653201>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Microbiología Médica* (Séptima ed). España: Elsevier Masson SAS.
- Nallelyt, S., Efrén, H., Oliver, L., & Oscar, T. (2010). Los bacteriofagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(3), 17–26.
- Navon, S., Leavitt, A., & Carmeli, Y. (2007). High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 772–774. <http://doi.org/10.1093/jac/dkm018>
- Opazo, A., Domínguez, M., Bello, H., González, G., & Mella, S. (2009). Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Rev Chil Infect*, 26(6), 499–503. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182009000700002>
- Organización Panamericana de la Salud. (2012). *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud. Módulo III : información para gerentes y personal directivo*.
- Peleg, A., Potoski, B., Rea, R., Adams, J., Sethi, J., Capitano, B., Paterson, D. (2007). *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: A cautionary report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(1), 128–131. <http://doi.org/10.1093/jac/dkl441>
- Peleg, A., Seifert, H., & Paterson, D. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538–582. <http://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- Pillar, C., Draghi, D., Dowzicky, M., & Sahm, D. (2008). In vitro activity of tigecycline against gram-positive and gram-negative pathogens as evaluated by broth microdilution and Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 2862–2867. <http://doi.org/10.1128/JCM.00637-08>
- Pino, C., Domínguez, M., González, G., Bello, H., Sepúlveda, M., Mella, S., Zemelman, R. (2007). Extended spectrum beta lactamases (ESBL) production in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII Region. *Revista Chilena de Infectología : Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 24(2), 137–141. <http://doi.org/S0716-10182007000200008> [pii]r/S0716-10182007000200008

- Queenan, A., Pillar, C., Deane, J., Sahn, D., Simon, A., Flamm, R., Davies, T. (2010). Multidrug resistance among *Acinetobacter* spp. in the USA and activity profile of key agents: results from CAPITAL Surveillance 2010. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(3), 267–270. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=26042655>
- Rada, J., & Parra, D. (2016). Perfil de Sensibilidad y Resistencia Antimicrobiana de *Acinetobacter* spp . en el Hospital Municipal Boliviano Holandés. *Rev Soc Bol Ped*, 55(1), 3–10.
- Rival, A., & Durand, T. (2013). Genotipo y fenotipo. Exploración de la caja negra de los mejoradores... *Revista Palmas*, 34, 161–167.
- Roncancio, G., Johanna, V., & Jimenez, J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Revista CES MEDICINA*, 28(2), 233–246.
- Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., & Pe, B. (2010). Overexpression of Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeFGH Confers Multidrug Resistance. *American Society for Microbiology*, 54(10), 4389–4393. <http://doi.org/10.1128/AAC.00155-10>
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., & De Ley, J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), 310–319. <http://doi.org/10.1099/00207713-41-2-310>
- Royer, S., Faria, A., Seki, L., Chagas, T., Campos, P., Batistão, D., Ribas, R. (2015). Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(4), 350–357. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>
- Russo, T., Luke, N., Beanan, J., Olson, R., Sauberan, S., MacDonald, U., Campagnari, A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and Immunity*, 78(9), 3993–4000. <http://doi.org/10.1128/IAI.00366-10>
- Ruzin, A., Keeney, D., & Bradford, P. A. (2007). AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(March), 1001–1004. <http://doi.org/10.1093/jac/dkm058>
- Schmidt, W., Osterberg, R., Soreth, J., & Milstein, J. (2005). Pharmacology / Toxicology Review and Evaluation. *Food and Drug Administration*, 1–21.
- Scola, B., Gundi, V., Khamis, A., & Raoult, D. (2006). The principles of DNA Sequencing. *Society*, 44(3), 827–832. <http://doi.org/10.1128/JCM.44.3.827>

- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. España.
- Somily, A., Absar, M., Arshad, M., Aska, A., Shakoor, Z., Fatani, A., Murray, T. (2012). Antimicrobial susceptibility patterns of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* against carbapenems, colistin, and tigecycline. *Saudi Med*, 33(32), 750–755.
- Sotomayor, N. (2016). *Caracterización de la resistencia a los carbapenémicos de Acinetobacter spp. a partir de aislados clínicos y ambientales de la ciudad de Quito, Ecuador, 2016*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12632/Sotomayor\\_Nicole.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12632/Sotomayor_Nicole.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Spicer, J. (2009). *Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*. (Elsevier, Ed.) (Cuarta Edición). España: Elsevier. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=BqVq\\_VbdZdwC&pg=PA8&dq=definicion+colonizacion+microbiologia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjB943Y9uXSAhWDyyYKHf4VBaoQ6AEIGDAA#v=onepage&q=definicion+colonizacion+microbiologia&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=BqVq_VbdZdwC&pg=PA8&dq=definicion+colonizacion+microbiologia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjB943Y9uXSAhWDyyYKHf4VBaoQ6AEIGDAA#v=onepage&q=definicion+colonizacion+microbiologia&f=false)
- Sun, J., Perng, C., Lin, J., Yang, Y., Chan, M., Chang, T., Chiueh, T. (2014). AdeRS combination codes differentiate the response to efflux pump inhibitors in tigecycline-resistant isolates of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(12), 2141–2147. <http://doi.org/10.1007/s10096-014-2179-7>
- Sun, Y., Cai, Y., Liu, X., Bai, N., Liang, B., & Wang, R. (2013). The emergence of clinical resistance to tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(2), 110–116. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.005>
- The World Health Organization. (2001). ORIGINAL : ENGLISH WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. *World Health, WHO/CDS/CS*, 105.
- Tian, B., Adams, J., Taracila, M., Bonomo, R., Wang, H., & Doi, Y. (2011). Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4922–4925. <http://doi.org/10.1128/AAC.00704-11>
- Valencia, R., Arroyo, L. A., Conde, M., Aldana, J. M., Torres, M., Fernández, F., Aznar, J. (2009). Nosocomial Outbreak of Infection With Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care University Hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30(3), 257–263. <http://doi.org/10.1086/595977>
- Vegas, E., & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25, 64–71.

- Vila, J., Martí, S., & Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210–1215. <http://doi.org/10.1093/jac/dkl509>
- WHONET. (2017). *Protocolo de trabajo Red WHONET Argentina*. Rosario. Retrieved from <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>
- Wieczorek, P., Sacha, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Krawczyk, M., & Tryniszewska, E. (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* - The role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46(3), 257–267. <http://doi.org/10.2478/v10042-008-0056-x>
- Yuhan, Y., Ziyun, Y., Yongbo, Z., Fuqiang, L., & Qinghua, Z. (2016). Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(2), 165–171. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0411-2015>
- Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., & Tsakris, A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(1), 11–19. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>

# **ANEXOS**

*Anexo N° 1: Preparación de Solución Madre de tigeciclina soluble en Dimetilsulfóxido (DMSO).*

DATOS ANTIBIÓTICO	
Lote: <b>110M47H12V</b>	Casa Comercial: <b>SIGMA</b>
Potencia: <b>286.209 µg/mg</b>	Almacenamiento: <b>2-8°C</b>
Solvente: <b>DMSO</b>	Pureza: <b>98% (HPLC)</b>
Fracción Activa: <b>31%</b>	Porcentaje de Agua: <b>5.79%</b>

**CÁLCULO PORCENTAJE DE AGUA**

*Fórmula:* C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> · 2H<sub>2</sub>O

$$585.65 \frac{g}{mol} + 36 \frac{g}{mol} = 621.65 \frac{g}{mol}$$

**CÁLCULO POTENCIA**

*Potencia = Pureza × Fracción Activa (1 - % H<sub>2</sub>O)*

$$Potencia = 980 \times 0.31 (1 - 0.0579)$$

$$Potencia = 286.208 \frac{\mu g}{mg}$$

**PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE (SM)**

**Volumen final:** 2 ml

**Concentración:** 640 ug/ml

$$Peso Tigeciclina = \frac{Volumen (ml) \times Concentración \left(\frac{\mu g}{ml}\right)}{Potencia \mu g/mg}$$

$$Peso Tigeciclina = \frac{2 ml \times 640 \frac{\mu g}{ml}}{286.209 \frac{\mu g}{mg}}$$

$$Peso Tigeciclina = 4.47 mg$$

**4.47 mg tigeciclina en Polvo + 1000 ul de DMSO + 1000 ul de Agua Destilada**

**Alicuotar y Almacenar a -70° C.**

*Anexo N° 2: Preparación de diluciones a partir de la Solución Madre de tigeciclina*

**PREPARACIÓN SOLUCIÓN DE TRABAJO (ST)**

**Concentración Final:** 32 ug/ml

A partir de una alícuota de la SM preparar: **250 ul de SM + 4850 ul de MHB.**

**Almacenar -20°C**

**DILUCIONES**

**Solución de Trabajo 1 (ST1) :** 32 ug/ml

*Guía para preparación de diluciones*

<b>Concentración solución (ug/ml)</b>	<b>Concentración pocillo (ug/ml)</b>	<b>Volumen ST 1 (ul)</b>	<b>Volumen Solvente (ul)</b>
<b>16</b>	8	1000	1000
<b>8</b>	4	500	1500
<b>4</b>	2	250	1750
<b>2</b>	1	125	1875
<b>1</b>	0.5	62,5	1937,5
<b>0.5</b>	0.25	31,25	1968,75
<b>0.25</b>	0.125	15,62	1985,27
<b>0.125</b>	0.06	7,81	1992,19

**PROCEDIMIENTO**

**Preparación de la suspensión bacteriana**

- Sembrar loss en Agar nutritivo e incubar 24 horas incluida la cepa control.
- Preparar una solución Mc Farland 0,5 ( $1-2 \times 10^8$ UFC/ml) en solución salina al 0,9%
- Hacer una dilución 1:100 de las cepas tomando 10 ul de solución 0,5 McFarland + 990 ul de SSE ( $1 \times 10^6$ UFC/ml)

**Preparación de los pocillos**

- Preparar las diluciones de los antibióticos conforme a la Tabla 1.
- Rotular los micropocillos
- Añadir 50ul de cada dilución en cada pocillo como corresponda y 50ul de la suspensión bacteriana. Cubrir las placas con parafilm® e incubar 24 horas a 37°C.

**Control de calidad**

- a) Para control de calidad tomar 10 ul del pocillo de control de crecimiento de la Cepa ATCC 25922, hacer una dilución 1:1000 (10 ul + 990 SS (1:100); 100 ul + 900 ul SS (1:10)), sembrarlo en agar nutritivo para su respectivo contaje (50 colonias).

**Anexo N° 3: Plantilla para recolección de datos de MIC tigeciclina**

N° placa:		MUESTRAS											
DILUCIONES	8												
	4												
	2												
	1												
	0,5												
	0,25												
	0,12												
	0,06												

Fecha lectura  
Observaciones

N° placa:		MUESTRAS											
DILUCIONES	8												
	4												
	2												
	1												
	0,5												
	0,25												
	0,12												
	0,06												

Fecha lectura  
Observaciones

N° placa:		MUESTRAS											
DILUCIONES	8												
	4												
	2												
	1												
	0,5												
	0,25												
	0,12												
	0,06												

Fecha lectura  
Observaciones

*Anexo N° 4: Protocolo de preparación del inhibidor Carbonil Cianida 3-Clorofenilhidrazona (CCCP)*

**DATOS INHIBIDOR**

<b>Pureza:</b> 97%	<b>Cantidad:</b> 250 mg
<b>Peso Molecular:</b> 204.62 g/mol	<b>Solubilidad:</b> DMSO

**PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE**

**Concentración:** 500 ug/ml

**Volumen Final:** 5 ml

*2.5mg de CCCP + 5000 ul de DMSO.*

*5 ALICUOTA DE 1000 ul. Almacenar a -20° C*

**PREPARACIÓN SOLUCIÓN DE TRABAJO**

**Concentración:** 250 ug/ml

**Volumen Final:** 2 ml

*1000 ul de Solución Madre + 1000 ul de Agua Destilada.*

**PROCEDIMIENTO:**

- Colocar 10 ul de Solución de Trabajo en cada uno de los pocillos. (Concentración final en pocillo: 25 ug/ml (1:10))

**Anexo N° 5: Base de datos de los aislados de *Acinetobacter baumannii* para identificación microbiológica.**

<b>#</b>	<b>AÑO</b>	<b>COD INSPI</b>	<b>SIGLAS</b>	<b>CATALASA</b>	<b>OXIDASA</b>	<b>TSI</b>	<b>MOTILIDAD</b>
<b>1</b>	2016	HEE 0023-0116 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>2</b>	2016	HCA 0135-0116 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>3</b>	2016	HEE 0179-0216 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>4</b>	2016	HEE 0220-0216 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>5</b>	2016	HEE 0346-0316 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>6</b>	2016	HVCM 0425-0416 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>7</b>	2016	HVCM 0431-0416 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>9</b>	2016	HVCM 0445-0416 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>13</b>	2016	HSQ 0549-0416 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>16</b>	2016	HVCM 0664-0516 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>17</b>	2016	HVCM 0665-0516 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>20</b>	2016	HDV 0764-0616 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>21</b>	2016	HEE 0853-0616 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>22</b>	2016	HPY 0903-0716 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>24</b>	2016	HCA 0994-0816 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>25</b>	2016	HEE 1019-0816 RAM-Q	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>26</b>	2015	HEG15- 0107	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>27</b>	2015	HEFFAA15-0114	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>28</b>	2015	HPA15-0122	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg

*Anexo N°5. Continuación...*

<b>30</b>	<b>2015</b>	<b>HVCM15-0204</b>	<b>ABA</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>K/K</b>	<b>Neg</b>
<b>31</b>	2015	HVCM15-0206	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>32</b>	2015	HGDA15-0323	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>33</b>	2015	HEE15-0454	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>34</b>	2015	HBO15-0577	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>35</b>	2015	HBO15-0578	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>36</b>	2015	HBO15-0579	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>37</b>	2015	HBO15-0580	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>38</b>	2015	HBO15-0581	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>39</b>	2015	HBO15-0582	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>40</b>	2015	HBO15-0589	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>41</b>	2015	HBO15-0590	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>43</b>	2015	HEE15-0599	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>44</b>	2015	HBO15-0608	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>45</b>	2015	HBO15-0610	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>46</b>	2015	HEE15-0624	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>47</b>	2015	HEE15-0639	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>48</b>	2015	HGDA15-0642	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>49</b>	2015	HGDA15-0643	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>51</b>	2015	HBO15-0659	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg

*Anexo N°5. Continuación...*

<b>52</b>	<b>2015</b>	<b>HBO15-0669</b>	<b>ABA</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>K/K</b>	<b>Neg</b>
<b>53</b>	2015	HEE15-0678	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>54</b>	2015	HEE15-0681	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>55</b>	2015	HBO15-0687	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>56</b>	2015	HBO15-0690	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>57</b>	2015	HBO15-0691	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>58</b>	2015	HEE15-0695	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>59</b>	2015	HEE15-0698	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>60</b>	2015	HEE15-0717	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>61</b>	2015	HEE15-0719	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>62</b>	2015	HBO15-0780	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>63</b>	2015	HEE15-0788	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>64</b>	2015	HPAS15-0795	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>65</b>	2015	HPAS15-0853	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>66</b>	2015	HEE15-0862	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>67</b>	2015	HEE15-0863	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>68</b>	2015	HEE15-0864	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>69</b>	2015	HEE15-0870	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>70</b>	2015	HEE15-0871	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>71</b>	2015	HEE15-0892	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg

*Anexo N°5. Continuación...*

<b>72</b>	<b>2015</b>	<b>HEE15-0893</b>	<b>ABA</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>K/K</b>	<b>Neg</b>
<b>73</b>	2015	HEE15-0895	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>74</b>	2015	HBO15-0900	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>75</b>	2015	HEE15-0914	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>76</b>	2015	HEE15-0915	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>77</b>	2015	HBO15-0923	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>78</b>	2015	HBO15-0973	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>79</b>	2015	HBO15-0985	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>80</b>	2015	HBO15-0989	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>81</b>	2015	HBO15-0997	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>82</b>	2015	HBO15-0998	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>83</b>	2015	HBO15-1004	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>84</b>	2015	IESS AMBATO15-1007	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>85</b>	2015	HBO15-1028	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>86</b>	2015	HEE15-1035	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>87</b>	2015	HEE15-1038	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>88</b>	2015	HBO15-1064	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>89</b>	2015	HEE15-1090	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>91</b>	2015	HBO15-1109	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>92</b>	2015	HBO15-1119	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg

*Anexo N°5. Continuación...*

<b>93</b>	<b>2015</b>	<b>HBO15-1138</b>	<b>ABA</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>K/K</b>	<b>Neg</b>
<b>94</b>	2015	HBO15-1139	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>96</b>	2015	HEE15-1273	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>97</b>	2015	HEG15-1352	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>98</b>	2015	HSF15-1367	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>100</b>	2015	HEE15-1450	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>101</b>	2015	HEE15-1451	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>103</b>	2015	HEE15-1463	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>104</b>	2016	HEE1102-0916	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>105</b>	2016	HEE1157-0916	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>106</b>	2016	HEE1172-0916	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>107</b>	2016	HEE1174-0916	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg
<b>108</b>	2016	HEE1251-1016	ABA	Pos	Neg	K/K	Neg

**Anexo N° 6: Perfiles de susceptibilidad por Técnica de Difusión de Disco**

<b>#</b>	<b>IPM</b>	<b>MEM</b>	<b>CAZ</b>	<b>CRO</b>	<b>CTX</b>	<b>FEP</b>	<b>SXT</b>	<b>TPZ</b>	<b>AMC</b>	<b>AK</b>	<b>CIP</b>	<b>CN</b>	<b>CT</b>	<b>TGC</b>
<b>1</b>	9	10	21	14	14	9	6	10	6	13	6	6	15	23
<b>2</b>	9	9	21	15	15	10	6	11	6	14	6	6	16	22
<b>3</b>	14	13	20	13	12	11	6	12	6	12	6	17	15	21
<b>4</b>	10	10	16	6	6	10	6	11	6	17	6	9	16	25
<b>5</b>	11	9	21	14	14	12	6	11	6	10	8	6	15	22
<b>6</b>	6	6	6	6	6	9	8	10	6	13	6	6	15	24
<b>7</b>	6	6	6	6	6	9	9	15	6	14	6	6	15	24
<b>9</b>	6	6	6	6	6	10	6	12	6	13	6	6	14	23
<b>13</b>	11	11	6	6	6	12	6	6	6	15	6	6	15	23
<b>16</b>	7	7	6	6	6	12	9	13	6	13	6	6	14	23
<b>17</b>	8	8	6	6	6	14	6	13	6	14	6	6	14	23
<b>20</b>	6	6	6	6	6	6	19	12	12	21	29	21	15	24
<b>21</b>	9	8	20	14	13	9	6	10	6	13	8	6	15	21
<b>22</b>	6	6	8	6	6	6	6	11	6	15	6	6	15	22
<b>24</b>	11	9	21	14	15	12	6	13	6	13	17	17	15	19
<b>25</b>	6	6	6	6	6	6	9	11	6	11	6	6	14	24
<b>26</b>	16	13	22	18	18	13	6	15	6	9	27	6	15	24
<b>27</b>	9	8	19	14	13	10	6	11	6	12	17	6	13	19
<b>28</b>	8	8	19	13	13	9	6	9	6	13	8	6	14	18

*Anexo N°6. Continuación...*

<b>30</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>24</b>
<b>31</b>	10	10	6	6	6	12	6	11	6	15	6	6	15	21
<b>32</b>	6	6	7	6	6	12	6	12	6	14	6	6	15	21
<b>33</b>	6	6	6	6	6	15	6	11	6	12	6	6	15	22
<b>34</b>	9	9	6	6	6	10	6	9	6	11	6	15	14	21
<b>35</b>	10	8	6	6	6	9	6	9	6	11	6	15	15	22
<b>36</b>	9	9	6	6	6	9	6	9	6	11	6	15	15	20
<b>37</b>	9	9	6	6	6	9	6	8	6	10	6	15	15	20
<b>38</b>	10	10	6	6	6	8	6	8	6	7	6	14	15	21
<b>39</b>	10	8	6	6	6	10	6	8	6	10	6	6	15	22
<b>40</b>	10	8	6	6	6	12	6	11	6	6	6	17	15	22
<b>41</b>	10	8	6	6	6	10	6	8	6	6	6	14	14	20
<b>43</b>	9	6	19	14	14	7	6	10	6	12	6	6	14	20
<b>44</b>	10	8	6	6	6	10	6	9	6	11	6	16	14	20
<b>45</b>	10	9	6	6	6	11	6	11	6	6	6	16	14	20
<b>46</b>	7	7	12	10	12	8	6	9	6	12	6	6	15	21
<b>47</b>	7	6	11	9	11	7	6	9	6	12	6	6	14	20
<b>48</b>	6	7	6	6	6	11	6	11	6	13	6	6	14	19
<b>49</b>	10	8	18	14	13	9	6	11	6	11	17	6	14	20
<b>51</b>	10	8	6	6	6	7	6	10	6	10	6	15	14	20

*Anexo N°6. Continuación...*

<b>52</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>19</b>
<b>53</b>	8	7	10	14	13	9	6	8	6	12	6	6	14	18
<b>54</b>	8	7	19	13	13	8	6	9	6	12	6	6	15	20
<b>55</b>	10	10	6	6	6	10	6	11	6	6	6	16	14	21
<b>56</b>	10	9	6	6	6	9	6	10	6	9	6	16	15	20
<b>57</b>	6	6	6	6	6	6	22	9	13	15	28	23	14	24
<b>58</b>	8	8	21	13	13	9	6	9	6	12	6	6	15	23
<b>59</b>	10	7	20	13	13	9	6	9	6	11	6	6	15	22
<b>60</b>	9	8	19	13	13	8	6	10	6	11	6	6	15	20
<b>61</b>	9	8	19	13	12	8	6	9	6	12	6	6	14	22
<b>62</b>	10	8	6	6	6	7	6	9	6	9	6	14	15	22
<b>63</b>	8	7	19	13	13	8	6	9	6	12	6	6	14	22
<b>64</b>	9	9	20	13	14	10	6	10	6	12	6	6	15	19
<b>65</b>	12	10	18	13	13	9	6	8	6	11	6	6	14	18
<b>66</b>	9	9	20	14	13	10	6	8	6	12	6	6	15	24
<b>67</b>	9	8	19	14	14	8	6	10	6	12	6	6	15	22
<b>68</b>	9	8	20	14	13	9	6	9	6	12	6	6	15	22
<b>69</b>	9	7	20	12	10	6	6	9	6	11	6	6	15	22
<b>70</b>	8	7	22	14	14	11	6	10	6	12	6	6	15	23
<b>71</b>	10	7	20	12	11	6	6	8	6	11	6	6	17	24

*Anexo N°6. Continuación...*

<b>72</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>23</b>
<b>73</b>	8	7	20	15	15	11	6	10	6	12	6	6	16	24
<b>74</b>	10	9	6	6	6	10	6	10	6	10	6	17	15	24
<b>75</b>	9	8	21	14	15	11	6	9	6	12	7	6	14	23
<b>76</b>	14	13	24	19	20	20	25	16	6	24	31	24	15	27
<b>77</b>	9	8	6	6	6	11	6	10	6	10	6	17	15	23
<b>78</b>	9	9	6	6	6	11	6	10	6	9	6	17	15	23
<b>79</b>	9	9	6	6	6	11	6	10	6	10	6	17	15	23
<b>80</b>	11	9	6	6	6	11	6	10	6	9	6	16	15	24
<b>81</b>	6	6	6	6	6	6	19	12	12	21	29	23	15	29
<b>82</b>	6	6	6	6	6	6	23	12	17	18	28	25	15	25
<b>83</b>	10	8	6	6	6	11	6	10	6	10	6	16	14	23
<b>84</b>	10	9	23	14	16	12	6	11	6	10	18	6	15	23
<b>85</b>	6	6	6	6	6	6	24	14	16	17	31	23	16	26
<b>86</b>	9	8	21	14	16	10	6	9	6	11	8	6	16	23
<b>87</b>	10	8	21	14	15	11	6	10	6	11	6	6	16	23
<b>88</b>	10	8	6	6	6	12	6	10	6	10	6	14	16	23
<b>89</b>	9	7	21	14	14	11	6	9	6	11	6	6	16	23
<b>91</b>	10	8	6	6	6	12	6	10	6	10	6	18	16	23
<b>92</b>	8	7	6	6	6	12	6	10	6	9	6	17	16	22

*Anexo N°6. Continuación...*

<b>93</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>22</b>
<b>94</b>	11	9	6	6	6	11	6	11	6	10	6	17	16	23
<b>96</b>	6	6	6	6	6	10	6	8	6	12	6	6	16	24
<b>97</b>	13	12	20	17	17	14	6	15	6	12	28	6	16	20
<b>98</b>	11	12	6	6	6	11	6	11	6	12	6	6	16	24
<b>100</b>	10	12	22	15	16	14	6	11	6	13	13	8	15	29
<b>101</b>	10	12	20	15	14	15	6	11	6	17	12	6	16	28
<b>103</b>	12	12	22	16	17	15	6	11	6	12	13	6	16	28
<b>104</b>	10	9	20	17	17	12	6	15	6	12	6	6	15	24
<b>105</b>	9	9	20	14	15	10	6	9	6	9	6	6	16	14
<b>106</b>	9	7	20	14	15	10	6	10	6	10	6	6	16	15
<b>107</b>	9	8	19	14	14	10	6	9	6	10	6	6	16	14
<b>108</b>	11	12	18	12	13	12	6	10	6	14	6	6	17	13

