



UNAM

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Factores de virulencia como adherencia, invasividad y resistencia antimicrobiana en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de pacientes pediátricos con sepsis

TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIZACIÓN EN  
BIOQUÍMICA CLÍNICA PRESENTA:

QC. AUREA AIDA AGUILAR FELIPE

TUTOR:

DR. JOSE MOLINA LÓPEZ



CDMX, MÉXICO. ENERO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Presentación

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad Periférica de Investigación Básica Clínica en Enfermedades Infecciosas/División de Investigación/Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM y en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana; Unidad de Hemato-Oncología e Investigación, Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, bajo la dirección del Dr. José Molina López.

# Agradecimientos

Esta lucha ha sido cansada, llena de muros, obstáculos y demasiadas dificultades, me ha tocado salir adelante en una crisis mundial donde las cosas comunes que hacíamos han sido totalmente cambiadas, pero a pesar de todas las adversidades que conseguí en mi camino, doy gracias primeramente a Dios por permitirme seguir con vida y llenarme de equilibrio y plenitud para seguir avanzando cuando me veía derrotada y con la mano abajo a punto de tirar la toalla, agradezco a mis padres Aurelio Aguilar e Isidora Felipe por ser un apoyo incondicional en esta etapa de mi vida, a mi hermano Aurelio Aguilar por apoyarme en momentos difíciles, agracias a Enrique Cárcamo por apoyarme en mis momentos de crisis y estrés, doy gracias a la familia Felipe Solís que me brindó estancia en CDMX durante mi curso en la especialidad, agradezco también a mis compañeros y a todas las personas que conocí en la especialidad José Luis, Lupita, Nelly, Luz Elena y Alex, no olvidaré todo lo que aprendí con ustedes y de cada uno de ustedes, tienen un lugar especial en mi corazón, muchas gracias a todos mis profesores por resolver mis dudas y retroalimentarnos siempre, agradezco también a mis compañeros de estancia en el Hospital Infantil de México Edgar, Yeri, Gisselle, Rubén, Edwin, a mi tutor José Molina por su paciencia y enseñanza, gracias a cada uno de los/as químicos/as que me encontré en cada estancia en los diferentes hospitales, pues me ayudaron muchísimo a complementar la teoría que llevaba. Pero quiero agradecer de manera especial a la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme en este plan de estudios, venir desde Oaxaca a cumplir este sueño no fue nada fácil, sin embargo, la UNAM me hizo sentir como en casa por lo cual me siento infinitamente agradecida, por brindarme esta maravillosa oportunidad.

*“Cada dolor te hace más fuerte,  
Cada traición más inteligente,  
Cada desilusión más hábil,  
Cada experiencia más sabio...”*

*– Kamisama*

# Contenido

Índice de tablas .....	6
Índice de figuras .....	7
Abreviaturas .....	8
Resumen .....	10
1 Introducción .....	13
1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	13
1.1.1 Taxonomía .....	13
1.1.2 Patogenia .....	15
1.1.2.1 Factores de Adherencia e Invasividad .....	19
1.1.2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos .....	26
1.1.3 Identificación y Susceptibilidad .....	36
1.1.4 Importancia clínica en México .....	38
2 Antecedentes .....	43
3 Pregunta de Investigación .....	46
4 Hipótesis .....	47
5 Objetivos .....	48
5.1 General .....	48
5.2 Particulares .....	48
6 Justificación .....	49
7 Materiales y Métodos .....	50
7.1 Diseño .....	50
7.2 Criterios .....	50

7.3 Cepas de <i>A. baumannii</i> .....	51
7.4 Cultivo Celular .....	51
7.5 Metodología general .....	51
7.5.1 Diagrama de trabajo .....	52
7.5.2 Etapa 1: Recuperación de Cepas .....	53
7.5.2.1 Viabilidad .....	53
7.5.2.2 Pureza .....	53
7.5.3 Etapa 2: Determinación de susceptibilidad .....	54
7.5.3.1 Difusión en disco .....	54
7.5.4 Etapa 3: Caracterización de las cepas .....	56
7.5.4.1 Ensayo de adherencia .....	56
7.5.4.1 Ensayo de invasividad .....	59
8 Resultados .....	63
8.1 Etapa 1: Recuperación de Cepas .....	63
8.2 Etapa 2: Determinación de susceptibilidad .....	63
8.3 Etapa 3: Caracterización de las cepas .....	65
9 Análisis de resultados .....	69
10 Discusiones .....	71
11 Conclusiones .....	74
12 Perspectivas .....	75
13 Bibliografía .....	76
14 Glosario .....	85

# Índice de tablas

Tabla 1: Tipos de fimbrias y adhesinas involucradas en la formación de biopelícula. ....	22
Tabla 2: Tipos de adhesinas no fimbriales demostradas experimentalmente como involucradas en la formación de biopelículas en el género <i>Acinetobacter</i> . ....	25
Tabla 3: Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción. ....	27
Tabla 4: Clasificación de la resistencia a antimicrobianos según Magiorakos y cols., 2012. ....	31
Tabla 5: Antibióticos recomendados por la CLSI, y sus criterios de resistencia y sensibilidad.....	55
Tabla 6: Escala para la medición cualitativa en la adherencia de <i>A. baumannii</i> en células HEP-2 ..	59
Tabla 7: Escala para la medición cualitativa en la invasividad de <i>A. baumannii</i> en células HEP-2...	62
Tabla 8: Conteo de cepas sometidas al ensayo de adherencia e invasividad. ....	65
Tabla 9: Escala cualitativa de cepas positivas al ensayo de adherencia e invasividad.....	66

## Índice de figuras

Figura 1: Captura de <i>A. baumannii</i> por neutrófilos humanos.....	19
Figura 2: Aspecto morfológico de <i>A. baumannii</i> .....	20
Figura 3: Mecanismos de transferencia génica en bacterias.....	29
Figura 4: Difusión en disco de la cepa 11. ....	55
Figura 5: Susceptibilidad a Ampicilina. ....	64
Figura 6: Resultados de la susceptibilidad a antibióticos.....	64
Figura 7: Gráfica representativa del tipo de resistencias identificadas.....	65
Figura 8: Relación entre cepas de <i>A. baumannii</i> de acuerdo al mecanismo de virulencia evaluado.....	66
Figura 9: Diagrama de Venn que muestra la relación entre mecanismos de virulencia. ....	67
Figura 10: Prueba negativa a la capacidad de adherencia en cepa en <i>A. baumannii</i> (A), comparándolo con el control positivo (B) y negativo (C).....	67
Figura 11: Ejemplos de cepas de <i>A. baumannii</i> con adherencia positiva a células HEp-2 de acuerdo a la escala cualitativa.....	67
Figura 12: Ejemplo de invasión a células HEp-2 de una cepa de <i>A. baumannii</i> . ....	67

# Abreviaturas

**ADC:** Acinetobacter-Derived Cephalosporinase

**AFLP:** Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado

**ARDRA:** Análisis de restricción del gen 16S rRNA amplificado

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute

**ECM:** Extracellular Matrix

**HEp-2:** Human Epidermoid Carcinoma Strain #2

**INP:** Instituto Nacional de Pediatría

**LAM:** Leeds Acinetobacter Medium

**MDR:** Multidrogorresistente

**NAC:** Neumonía Adquirida en la Comunidad

**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards

**NET:** Neutrophil Extracellular Traps

**OMPs:** Outer Membrane Proteins

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBP's:** Proteínas de Unión a Penicilinas

**PDR:** Pandrogorresistente

**PUCRA:** Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana

**RAPD-PCR:** Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction

**RN:** Recién Nacido

**SEM:** Scanning Electron Microscopy

**SGC:** Slanted Coverslip Technique

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos

**UMAE:** Unidades Médicas de Alta Especialidad

**XDR:** Extensivamente drogorresistente

## Resumen

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) es un bacilo gramnegativo aeróbico, pleomórfico y no móvil, tiene una alta incidencia entre los individuos inmunocomprometidos, particularmente aquellos que han experimentado una estadía prolongada de hasta 90 días en el hospital. Del género *Acinetobacter* se han descrito 23 genoespecies y *A. baumannii* es la más frecuentemente aislada y con mayor importancia clínica. Se han descrito estudios en cepas de referencia que sugieren la capacidad de adherirse a células hospederas, invasividad y diseminación de la bacteria entre células epiteliales, por lo que causa interés la investigación en pacientes pediátricos para evaluar si este tipos de cepas aisladas tienen la capacidad de adherencia y/o invasividad ya que son necesarios para el paso inicial de la colonización y en el desarrollo de procesos infecciosos, además de su alta resistencia a antibióticos.

Se evaluó la capacidad de adherencia, invasividad y resistencia a antibióticos de 26 cepas aisladas de hemocultivos en pacientes pediátricos con sepsis del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y se demostró que las cepas no mostraron una multirresistencia esperada, ya que 1 de las 26 cepas evaluadas es XDR y solo 2 fueron MDR, pero 15 presentan resistencia al menos a un antibiótico en pacientes desde RN hasta de 12 años, 18 de las cepas estudiadas mostraron adherencia a células HEp-2 pero sin algún patrón de adherencia como la agregativa, localizada o difusa; mientras que la invasividad que se encontró fue en cinco de las cepas, de las cuales, todas esas cepas muestran también adherencia. Concluyendo así que, a pesar de la disminuida multirresistencia que las cepas de *A. baumannii* presentan en pacientes pediátricos, pueden expresar la capacidad tanto de adherirse como invadir las células epiteliales, dando la pauta para continuar la investigación de este

tipos de cepas y estudiar el fenómeno que se encuentra en estos mecanismos de virulencia que podrían dificultar el restablecimiento del paciente, y un tratamiento prolongado.

## Abstract

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) is a non-mobile, pleomorphic, aerobic, gram-negative bacillus that has a high incidence among immunocompromised individuals, particularly those who have experienced a prolonged stay of up to 90 days in hospital. Of the genus *Acinetobacter*, 23 genospecies have been described and *A. baumannii* is the most frequently isolated and with the greatest clinical importance. Studies have been described in reference strains that suggest the ability to adhere to host cells, invasiveness and spread of the bacteria between epithelial cells, which is why research in pediatric patients is interesting to assess whether these types of isolated strains have the ability to adherence and / or invasiveness since they are necessary for the initial step of colonization and in the development of infectious processes, in addition to its high resistance to antibiotics.

The adherence, invasiveness and resistance to antibiotics of 26 isolates of blood cultures were evaluated in pediatric patients with sepsis of the Instituto Nacional de Pediatría (INP) and it was shown that the strains not showed an expected multiresistance, since 1 of the 26 strains evaluated is XDR and only 2 were MDR, but 15 show resistance to at least one antibiotic in patients from RN up to 12 years old, 18 of the studied strains showed adherence to HEp-2 cells but without any pattern of adherence such as aggregative, localized or disseminated; while the invasiveness found was in five of the strains, of which, all those strains also show adherence. Thus concluding that, despite the decreased multidrug resistance that the *A. baumannii* strains present in pediatric patients, they can express the ability to both adhere and invade epithelial cells, giving the guideline to continue the investigation of these types of strains and study the phenomenon found in these virulence mechanisms that could hinder patient recovery, and prolonged treatment.

# 1 Introducción

## 1.1 *Acinetobacter baumannii*

*A. baumannii* es un bacilo gramnegativo aeróbico, pleomórfico y no móvil. Tiene una alta incidencia entre los individuos inmunocomprometidos, particularmente aquellos que han experimentado una estancia prolongada de hasta 90 días en el hospital, comúnmente se encuentra en los ambientes acuáticos, pero se ha demostrado que coloniza la piel y se aísla en grandes cantidades de las secreciones respiratorias y de orofaringe de individuos infectados, por lo que, en los últimos 10 años ha sido designado como un patógeno humano de "alerta roja", en gran medida por su amplio espectro de resistencia a los antibióticos, dado que el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) en 2008 ha identificado la resistencia a los antimicrobianos como uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana, este fenómeno de patógenos multirresistente, se ha convertido cada vez más en un motivo de gran preocupación con respecto a las infecciones nosocomiales y las adquiridas en la comunidad (Howard y cols., 2012; Peters y cols, 2008).

### 1.1.1 Taxonomía

Las especies ahora clasificadas como miembros del género *Acinetobacter* han sufrido una larga historia de cambios taxonómicos, lo cual ha impedido su estudio adecuado; actualmente, el género *Acinetobacter* se ubica en la familia *Moraxellaceae*. Para la identificación de *Acinetobacter* a nivel de especie se han desarrollado métodos para un diagnóstico molecular más adecuado, estos incluyen:

- Análisis de restricción del gen 16S rRNA amplificado (ARDRA)

- Análisis de huellas digitales de alta resolución por polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP)
- Ribotipado
- Huellas digitales de espaciadores de tRNA
- Análisis de restricción de las secuencias espaciadoras intergénicas 16S – 23S rRNA
- Análisis de secuencia de la región espaciadora del gen 16S – 23S rRNA
- Secuenciación del gen *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa) y sus espaciadores flanqueantes.

Se han descrito 23 genopecies de *A. baumannii*, sin embargo, las especies de *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (antes geno especie 3) y *A. nosocomialis* (antes geno especie 13 TU) están muy relacionadas y es difícil diferenciarlas por sus propiedades fenotípicas, por lo que se creó el llamado “complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*” o “*Acinetobacter complex*” (Nemec y cols., 2011).

En la actualidad se considera importante realizar la diferenciación dentro del complejo antes mencionado debido a que *A. baumannii* y *A. pittii* producen infecciones graves; *A. nosocomialis* es un habitante del medio hospitalario, pero de baja patogenicidad y *A. calcoaceticus* predomina en el suelo patógeno excepcionalmente (Nodarse y cols., 2015). Dentro de la especie *A. baumannii* se han definido, a su vez, 19 biotipos, de los cuales 1, 2, 6 y 9 son los biotipos más frecuentemente aislados en las muestras clínicas como sangre, líquido cefalorraquídeo, esputo, tracto respiratorio alto, heridas y orina (Salazar de Vegasa y cols., 2005).

Dentro de la práctica hospitalaria habitual es necesario diferenciar de forma rápida las características que tiene *Acinetobacter* de las enterobacterias, para lo cual se creó un esquema de identificación, diseñado por Gerner-Smidt y cols. en 1991, el cual fue modificado en 1992, basado en el uso de diferentes temperaturas de incubación y reacciones bioquímicas, este esquema tiene la ventaja de poder aplicarse sin grandes recursos materiales; utilizando la terminología “complejo *A. calcoaceticus- A. baumannii*” o “*Acinetobacter complex*” que cumple las necesidades tanto de médicos como de laboratoristas para establecer un diagnóstico, sin embargo, con fines epidemiológicos se realizan estudios adicionales con pruebas que incluyen: la electroforesis en gel de campo pulsado que ha permitido la identificación de patrones monoclonales en brotes de infecciones intrahospitalarias, los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), la reacción en cadena de polimerasa de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR) y ribotipado (Rada-Cuentas, 2016; Marcos, 2000; García-Rada y cols., 2015; Peleg y cols., 2008).

### **1.1.2 Patogenia**

A pesar de que *Acinetobacter spp*, es considerado como un agente de baja patogenicidad, ciertas características le permiten aumentar la virulencia de cepas involucradas en infecciones ya que la patogenia de *A. baumannii* está relacionada con:

- Capacidad de adherencia a superficies abióticas por medio del pili Csu, mientras que la adhesión a superficies bióticas como células bronquiales se ve iniciada por la expresión del gen *bla<sub>PER</sub>*, el desarrollo de biopelícula (biofilm) tanto en superficies inertes y células epiteliales se ve influenciada por la proteína de membrana externa A (OmpA), una porina trimérica que actúa como un poro de difusión y a su vez la secreción de exopolisacáridos sirve para el

fortalecimiento del biofilm, aunque éstas se ven afectadas por la presencia de iones metálicos como el cobre (Lee y cols., 2006; Choi y Lee., 2008; Tomaras y cols., 2003; Pakharukova y cols., 2018).

- Cadenas de lipopolisacáridos compuesto de antígeno O, el núcleo de carbohidrato y lípido A en la membrana celular externa, siendo este último un agente quimiotáctico que recluta células inflamatorias y las obliga a liberar su material citotóxico, y actúa en sinergia con estructura capsular tipo K1 formado por L-ramnosa, D-glucosa, D-ácido glucurónico y D-manosa desempeña un papel central en la protección de *A. baumannii* contra la fagocitosis por parte del sistema inmune innato del hospedero además de bloquear el acceso del complemento a la pared celular microbiana y prevenir la activación de la vía alternativa de activación del complemento (Polanco y cols., 2012; Asif y cols., 2018; Joly-Guillou, 2005).
- Las bacterias en la naturaleza viven en estrecha asociación con otras bacterias y huéspedes eucariotas, por lo que necesitan constante comunicación entre ellas. Los autoinductores, son moléculas similares a las hormonas producidas por bacterias como señales para detectar la densidad celular y activar las adaptaciones, mediante un proceso denominado "*quorum sensing*" (QS), este sistema en *A. baumannii* funciona mediante la interacción de N-acil homoserina como molécula inductora, junto con componentes celulares, facilitan la adaptación y sobrevivencia en condiciones ambientales inapropiadas tales como sequedad extrema, bajas temperaturas y restricción en elementos nutricionales necesarios para su supervivencia (Bhargava y cols., 2010).
- Producción de enzimas como el butirato esterasa, caprilato esterasa, leucinaril-amidasa, gelatinasa y lipasa que pueden dañar tejidos lipídicos; anudando a esto, la producción de

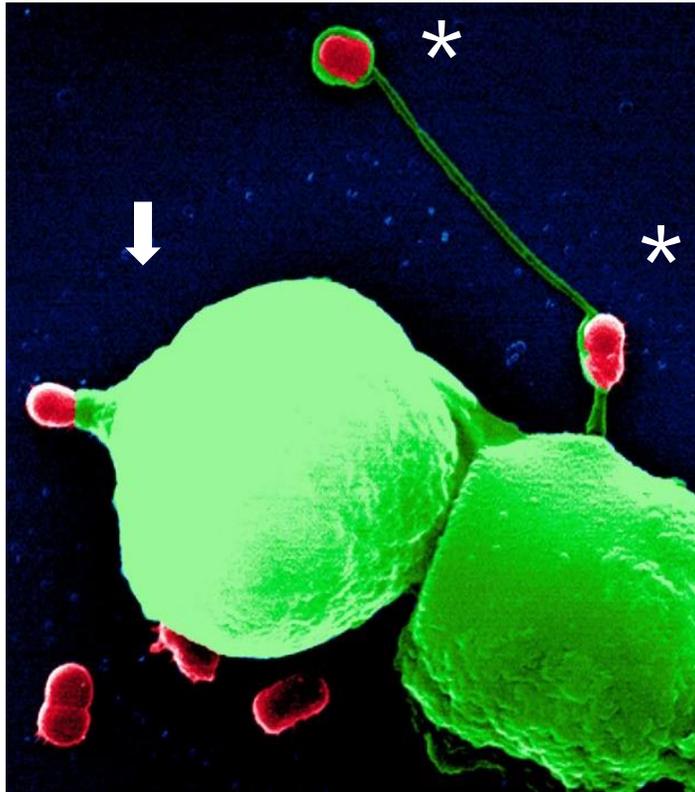
ureasa permite colonizar el estómago, aunque su actividad es variable entre especies. Por otra parte, la secreción de vesículas de la membrana externa que contienen diferentes proteínas relacionadas con la virulencia (proteasas, fosfolipasas, superóxido dismutasa y catalasa) en el sitio de infección acelera la respuesta inmune innata local y, en última instancia, daña los tejidos (Rathinavelu y cols., 2005; Asif y cols., 2018; Rada-Cuentas, 2016).

- A pesar de la abundancia de hierro en los sistemas biológicos, la disponibilidad de hierro férrico biológicamente activo es relativamente baja debido a su solubilidad disminuida en un entorno aeróbico y a la quelación por otros compuestos como la hemoglobina y la proteína de unión férrica llamada transferrina, dado que *A. baumannii* no puede adquirir hierro de la transferrina o la lactoferrina, posee sideróforos que tienen la capacidad de adquisición de hierro dedicada a la acumulación de hierro del hemo, como lo es la acinetobactina y otras proteínas de la membrana externa dependientes de hierro (Asif y cols., 2018; Penwell y cols., 2012; Zimbley y cols., 2009).
- Producción de bacteriocinas que incrementa su sobrevivencia inhibiendo el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas (Rada-Cuentas, 2016), además su exposición a etanol induce la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés y la patogénesis (Camarena y cols., 2010).
- Potencial para adquirir material genético de su entorno para incrementar su sobrevivencia y desarrollar un gran repertorio de mecanismos de resistencia antimicrobiana como se menciona más adelante (Venegas-Muñera y cols., 2014).

Los neutrófilos reclutados juegan un papel preponderante en la respuesta inmune del hospedero contra la infección por *Acinetobacter*, pues se sabe que la contribución relativa de los macrófagos y

neutrófilos en la fase inicial del encuentro con las cepas de *Acinetobacter*, los neutrófilos pueden aplanarse y convertirse en fagocíticos, sin embargo, la transición a la fagocitosis activa es repentina con la extensión del área de contacto célula-bacteria seguida de la aparición de pseudópodos para formar un brazo fagocítico que progresa para completar la fagocitosis bacteriana y se ha demostrado que, los neutrófilos comienzan a perder sus lóbulos nucleares individuales dando como resultado estructuras de forma globular o de herradura, durante la etapa final, pierden la integridad nuclear y citoplasmática, para finalmente redondearse nuevamente y liberar NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Muy ocasionalmente, las NETs forman agregados grandes de hasta 1 mm de longitud (Figura 1) (Lázaro-Díez y cols, 2017).

Por otra parte, *A. baumannii* evade la muerte mediada por la vía alterna del complemento neutralizando el factor H, un regulador clave de esta vía, con la ayuda de OmpA, este fenómeno es conocido como “resistencia sérica de *A. baumannii*”, en la cual OmpA induce la diferenciación de CD4 +, la activación y la maduración de las células dendríticas, y causa su apoptosis prematura (Asif y cols., 2018; Barletta-Farías y cols. 2018).

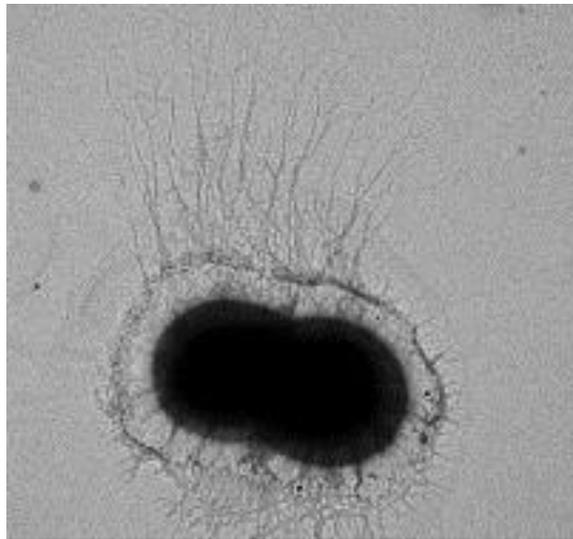


**Figura 1: Captura de *A. baumannii* por neutrófilos humanos.** La microfotografía fue por SEM, observándose grandes filopodios en cultivos infectados con *A. baumannii*; algunos de estos filopodios rodean por completo a dos bacterias (asteriscos) mientras que los seudópodos atrapan bacterias unidas a la superficie inerte (flechas). Obtenido de Lázaro-Díez y cols, 2017.

### 1.1.2.1 Factores de Adherencia e Invasividad

Se define como adherencia al proceso por el cual las bacterias se unen a las superficies de las células hospederas, siendo el paso principal en la evolución de la infección; por otro lado, invasividad o invasión es definido como el proceso a través del cual las bacterias penetran en las células hospederas y por consecuente se diseminan dentro del organismo (Brooks y cols. 2014)

La adherencia bacteriana a una superficie está determinada por la combinación de interacciones entre la superficie bacteriana, la superficie del sustrato y el medio ambiente que los rodea, para lo cual, de manera genérica las estructuras bacterianas que median este proceso de adherencia reciben el nombre de adhesinas, en las que puede haber dos tipos; adhesinas no fimbriales, y las adhesinas fimbriales que son polímeros con estructura de apéndice anclado en la membrana externa bacteriana cuyas subunidades proteicas son denominadas fimbrias o pilis. Normalmente, la proteína localizada en el extremo de la fimbria es la adhesina propiamente dicha que se adhiere a un receptor de la célula huésped constituido por regla general por residuos de hidratos de carbono de glucoproteínas o glucolípidos. Ocasionalmente, la proteína mayoritaria de la fimbria actúa como adhesina (Figura 2) (Vila y cols., 2008).



**Figura 2: Aspecto morfológico de *A. baumannii*.** Obtenido de Lázaro-Díez, 2018. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión tomada a  $\times 10000$  aumentos de *A. baumannii* ATCC® 19606™, mostrando una morfología típica de cocobacilo y la presencia de fimbrias (Lázaro-Díez; 2018).

Se han descrito dos paradigmas de entrada bacteriana a células no fagocíticas. El primero que es el paradigma de la “cremallera”, las bacterias expresan una proteína de superficie que se une con alta afinidad a un receptor de superficie eucariota que tiene una función en la adherencia o motilidad celular, como sucede con *Yersinia pseudotuberculosis* que se une a las integrinas B1, y *Listeria monocytogenes* que se une a la E-cadherina. El segundo es el paradigma “desencadenante” donde las bacterias al contactar con la superficie de la célula hospedera, secretan un conjunto de proteínas (invasinas) que forman un complejo que interactúa con la membrana eucariota, provocando señales que reorganizan masivamente el citoesqueleto celular induciendo polimerización de actina, por consiguiente, la bacteria queda atrapada e internalizada, si el daño es muy severo se puede ocasionar el desprendimiento celular (Sansoneetti y cols., 1998).

#### 1.1.2.1.1 Pili tipo I

Se sabe que la mayoría de las bacterias comensales y patógenas que interactúan con los hospedadores eucariotas expresan moléculas adhesivas en sus superficies que promueven la interacción con los receptores de las células hospederas o macromoléculas solubles (Tabla 1). Aunque la unión bacteriana a las células epiteliales puede ser beneficiosa para la colonización, la adhesión puede tener consecuencias ya que la unión bacteriana puede estimular a la infiltración celular, activación y fagocitosis de las células inmunes, lo que facilita la eliminación bacteriana. Sin embargo, muchas bacterias patógenas han logrado evadir al sistema inmunológico produciendo una capa superficial que impide el reconocimiento por parte de los leucocitos o evadiendo fagocitosis, además, expresan sus adhesinas en estructuras poliméricas que se extienden desde la superficie

celular, permitiendo interacciones iniciales con el hospedero a una distancia “segura” (Kline y cols., 2009).

**Tabla 1: Tipos de fimbrias y adhesinas involucradas en la formación de biopelícula.**

TIPO DE PILI	PRINCIPALES PROTEÍNAS DEL PILI	PROTEÍNAS MENORES Y PROTEÍNAS DE ENSAMBLAJE	BACTERIA
Chaperona	EcpA MatA (ECP pili)	EcpC, EcpD, EcpE	<i>E. coli</i>
	FimA (type I)	FimC, FimD, FimF, FimG, FimH	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>X. fastidiosa</i> , <i>E. amylovora</i> , <i>S. marcescans</i>
	CsuA/B (type I)	CsuC, CsuD, CsuE	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Obtenido y modificado de (Berne y cols., 2015)

Debido a la carga negativa neta de las envolturas celulares, las bacterias están sujetas a fuerzas electrostáticas repulsivas cuando se acercan a las superficies, por lo que, para superar estas fuerzas las bacterias recurren a la utilización de pilis. Los pilis son estructuras adhesivas similares a pelos que sobresalen de la superficie de las bacterias, dado que los pilis pueden usarse como apéndices para la transferencia de material genético durante la conjugación bacteriana, el término “fimbria” se usa más comúnmente para describir los pilis, cuya función se dedica a unir bacterias a una superficie. Los pilis y fimbrias fueron identificadas inicialmente en microorganismo gramnegativos como *Escherichia coli*, estas estructuras superficiales filamentosas comprenden una barra semejante a un andamio anclada a la membrana externa bacteriana y un factor de adherencia bacteriano o adhesina ubicada en el extremo del andamio que le confiere especificidad de unión e involucración en la transición entre la motilidad y el apego irreversible, como ocurre con la chaperona-usher pili (CUP).

(Berne y cols., 2015; Pizarro-Cerdá y cols., 2006). Muchas especies bacterianas tienen más de un tipo de pili, y estos se pueden dividir en cuatro subgrupos, generalmente definidos por sus procesos de secreción y ensamblaje: 1) CUP, 2) pili tipo IV, 3) pili de vía alternativa acompañante (chaperone-usher pathway) como el pili tipo I, pili P y adhesinas Afa/Dr, y 4) pili ensamblado por la ruta extracelular de nucleación-precipitación también conocida como “curli” (Berne y cols., 2015).

El éxito de las infecciones de *A. baumannii* puede atribuirse a varios factores de virulencia, como son su capacidad para formar biopelículas; resistir la desecación en superficies abióticas; capacidad de adherirse, colonizar e invadir células epiteliales humanas (França y cols., 2018; Gaddy y cols., 2009). En 2003, Tomaras y colaboradores realizaron la identificación en *A. baumannii* de un gen que codifica por una proteína muy similar a la codificada por el gen *CsuE* de *Vibrio parahaemolyticus*, como las *CsuA* y *CsuB* de la subunidad del pili tipo 1, también similar al de *E. coli*. Los pili tipo I constan de seis subunidades que se translocan y son una de las estructuras proteicas más comunes presentes en las superficies de los patógenos, desempeñan un papel importante en la adherencia y/o la formación de biopelículas de bacterias gramnegativas. El gen *CsuE* del operón *CsuA* /BABCDE, que codifica para un sistema de ensamblaje usher-chaperona y media la producción de pili es requerida para los pasos iniciales de unión bacteriana en superficies abióticas en *A. baumannii* ATCC 19606, sin embargo, su truncamiento causa una disminución en la formación de biopelículas, pero no afecta la capacidad para adherirse a las células epiteliales (Berne y cols., 2015; Tomaras y cols., 2003; Rumbo-Feal, 2018; Pizarro-Cerdá y cols., 2006; Werneburg y cols., 2018).

### 1.1.2.1.2 Proteína Bap

Las adhesinas no fimbriales son estructuras cortas monoméricas o triméricas, se propagan ampliamente entre las bacterias y están involucradas en la unión celular a superficies abióticas y/o células hospedadoras. Las adhesinas no fimbriales se anclan directamente a la membrana externa a través de interacciones covalentes o no covalentes y, debido a su tamaño relativamente corto, generalmente están involucrados en un contacto cercano entre célula bacteriana y el sustrato, aunque también están involucradas en interacciones y agregación célula-célula; además, también se ha demostrado que este tipo de adhesina interactúa con varios componentes de la matriz extracelular de la biopelícula uniendo a las bacterias con la matriz y manteniendo la arquitectura de la biopelícula. Aunque son muy diversas en términos de estructura y/o propiedades adhesivas, las adhesinas no fimbriales en bacterias gramnegativas generalmente se agrupan en dos categorías principales: a) las secretadas a través de un sistema de secreción tipo 1 (T1SS) y b) las secretadas a través de uno de los sistemas de secreción tipos 5 (T5SS) (Berne y cols., 2015).

Las primeras adhesinas no fimbriales descritas fueron las Baps (Proteína Asociada a Biopelículas) caracterizadas por primera vez en *S. aureus* y desde entonces se han identificado en otras bacterias patógenas tanto grampositivas como gramnegativas. Se definen por ser estructuras características y funcionales compartidas, que son esencialmente proteínas de superficie repetitivas de alto peso molecular involucradas en la formación de biopelículas, así como en la participación de adhesión (Loehfelm y cols., 2008). Loehfelm y cols. en 2008 identificaron una adhesina producida por *A. baumannii* que satisface todos los criterios para su inclusión en la familia Bap (Tabla 2), además demostraron que es un factor importante en la formación de biopelículas y para la adherencia en la

unión primaria entre la bacteria y el vidrio o poliestireno colonizado, posteriormente se mostró en un estudio la inhibición de la formación de biopelículas en superficies abióticas usando un anticuerpo específico de Bap, y también se han descrito como estructura de superficie involucrada en la adherencia a las células epiteliales bronquiales humanas y queratinocitos neonatales (Rumbo-Feal, 2018).

**Tabla 2: Tipos de adhesinas no fimbriales demostradas experimentalmente como involucradas en la formación de biopelículas en el género *Acinetobacter*.**

PROTEÍNA	MICROORGANISMO
Biofilm associated proteins (Bap) – T1SS Bap	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Trimeric autotransporter adhesins – T5SS AtaA	<i>Acinetobacter sp. Tol 5</i>

Obtenido y modificado de Berne y cols., 2015.

### 1.1.2.1.3 Proteína OmpA

Las proteínas de membrana externa A (OmpA) son porinas genéticamente relacionadas, modificables por calor y expuestas a la superficie, que se encuentran principalmente en bacterias gramnegativas y son clave para la patogénesis ya que pueden intervenir tanto en la adherencia como invasividad en el epitelio celular (Matínez-Miranda y cols., 2019; Choi, Hyun, y Lee, 2008).

La OmpA de *A. baumannii* (AbOmpA) es la proteína de superficie más abundante y juega un papel en la permeabilidad de los solutos pequeños. Las AbOmpA se unen a la superficie de células hospederas y se localizan tanto en la mitocondria como en los núcleos, lo que induce la muerte de las células huésped, basado en hallazgos previos en células HEP-2 que demuestran la adherencia e

invasión de *A. baumannii* en las células epiteliales durante la colonización y la etapa temprana de infección bacteriana (Choi, Hyun, y Lee, 2008; Choi y Lee, 2008).

#### **1.1.2.1.4 TFEB (Factor de Transcripción EB)**

El sistema endosoma/lisosoma está implicado en procesos fundamentales tales como la secreción, reparación de la membrana plasmática, señalización y en el metabolismo energético. El factor de transcripción EB (TFEB) forma parte de este sistema y podría estar implicado en la entrada y persistencia de *A. baumannii* en el huésped mediante su activación, un estudio en el 2015 por Oliveros-López y colaboradores determinaron el papel del TFEB en la entrada y la persistencia de *A. baumannii* en el huésped mediante el silenciamiento del ARN del TFEB, en la que disminuye la entrada bacteriana en las células epiteliales y su sobreexpresión *in vitro*, en la que hay una mayor invasión bacteriana (Oliveros-López y cols., 2015).

#### **1.1.2.2 Mecanismos de acción de los antibióticos**

Por el tipo de función que interfieren en la célula bacteriana, los agentes antimicrobianos se clasifican en seis grandes grupos: 1) los que inhiben la síntesis de la pared celular; 2) aquellos que alteran la permeabilidad de la membrana citoplasmática; 3) los que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos; 4) los que inhiben la función ribosomal y por tanto la síntesis proteica; 5) los que actúan por competencia metabólica (antimetabolitos) y 6) los que inactivan las betalactamasas (Tabla 3) (Molina-López y cols., 2019).

**Tabla 3: Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.**

<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>EJEMPLOS</b>
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, oxacilina, nafcilina
Daño a la membrana plasmática	Polimixina, nistatina, anfotericina B
Inhibición de la síntesis de proteínas	Aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina
Inhibición de las síntesis de los ácidos nucleicos	Rifampicina, actinomicina D, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina
Estructura análoga	Trimetoprim y sulfonamidas
Inhibidores de betalactamasas	Sulbactam, clavulanato y tazobactam

Obtenido de Molina-López y cols., 2019.

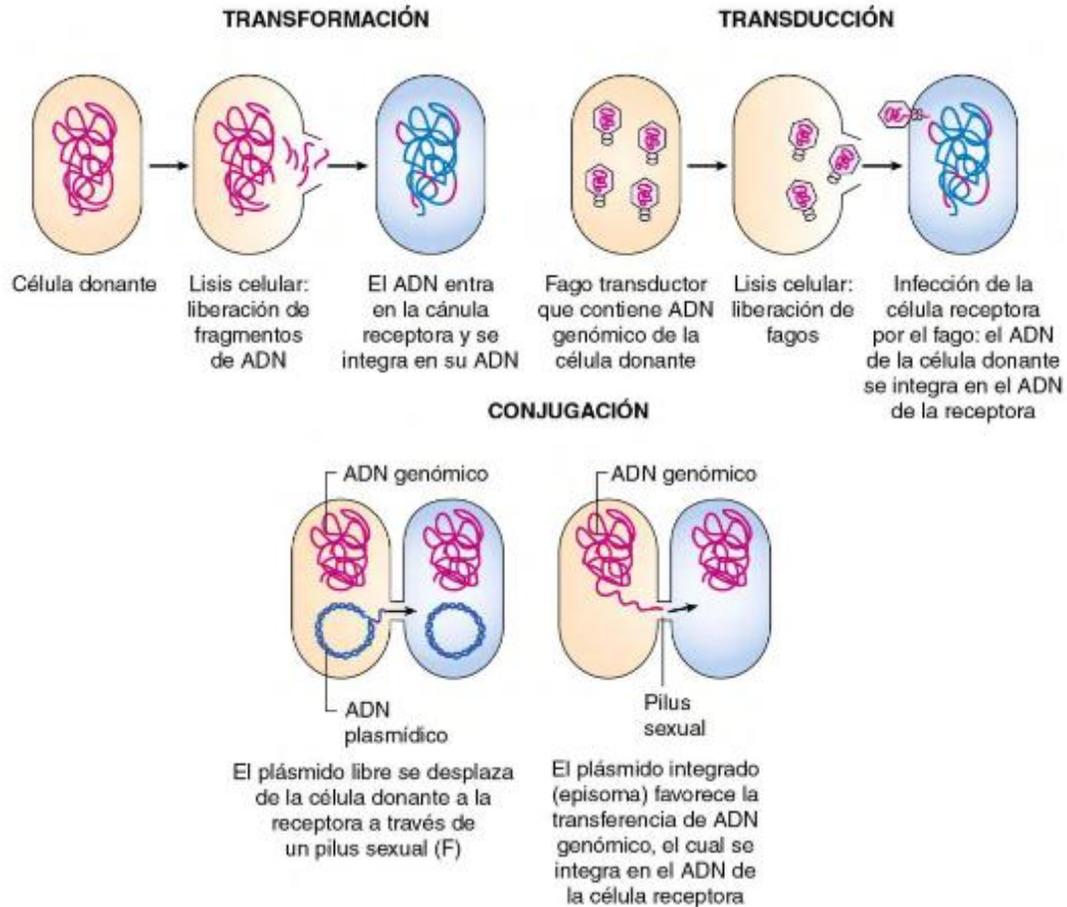
#### 1.1.2.2.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico, generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico, por lo que es más difícil tratar las infecciones bacterianas por la gran capacidad que han desarrollado las bacterias de seleccionarse resistentes a más de un agente microbiano (Bennett y cols., 2015).

La variabilidad genética es esencial para la evolución microbiana y los antibióticos ejercen fuertes presiones selectivas en las poblaciones bacterianas favoreciendo la supervivencia a los que son capaces de resistirlos. Los tipos de resistencia bacteriana que pueden encontrarse son: a) natural o intrínseco y b) adquirida (transferencia de información). La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico, lo que implica que no todas las especies

bacterianas son susceptibles naturalmente a los antimicrobianos; mientras que la resistencia adquirida es dada cuando una especie inicialmente susceptible desarrolla resistencia, tal resistencia adquirida puede ocurrir por mutación o derivarse de otro organismo por adquisición de nuevos genes al utilizar los mecanismos de intercambio genético (Figura 3). De los tres principales mecanismos de intercambio genético entre las bacterias (transformación, transducción y conjugación), la conjugación es uno de los más importantes en un sentido clínico (Kenneth, 2017; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013).

La transformación es el proceso mediante el cual las bacterias captan fragmentos de DNA desnudo y los incorporan a sus genomas; en la conjugación se produce una transferencia unidireccional de DNA desde un célula donante (o macho) hasta una célula receptora (o hembra) a través del llamado pili sexual; finalmente, la transferencia genética por transducción está mediada por virus bacterianos (bacteriófagos) que captan fragmentos de DNA y los almacenan en el interior de partículas de bacteriófago, donde el DNA suministrado a las células infectadas se incorpora luego al genoma bacteriano (Murray y cols., 2014).



**Figura 3: Mecanismos de transferencia génica en bacterias.** La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, naturalmente es sensible a un antibiótico, pero ha sido modificada genéticamente por mutación o por adquisición de genes de resistencia como los plásmidos. Obtenido de Murray y cols., 2014.

Existen cinco mecanismos principales en la generación de la resistencia bacteriana (intrínseca o adquirida), los cuales son: 1) disminución de la captación del antibiótico; 2) remoción del medicamento de la célula; 3) inactivación o destrucción del agente antimicrobiano mediante actividad enzimática como betalactamasas y cefalosporinas; 4) modificaciones del sitio diana y 5) modificación de la vía metabólica (Molina-López y cols., 2019).

La resistencia a betalactámicos, se puede producir por varios mecanismos, pero el más importante por su frecuencia y eficacia es la producción de betalactamasas, para lo cual Ambler propuso una

clasificación de ellas en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las betalactamasas en la que se distinguen cuatro clases de enzimas designados como A, B, C y D, mientras que Bush propuso una clasificación basada en la actividad enzimática o afinidad de las enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción inhibidora por el ácido clavulánico, en colaboración con Jacoby fue actualizada en 2010, y tanto la clasificación de Bush y Jacoby como la de Ambler están correlacionadas (ver anexo) (Bush, y Jacoby; 2010).

La aparición de resistencia a múltiples agentes antimicrobianos en bacterias patógenas es una amenaza importante para la salud pública, dada la disminución de disponibilidad de los agentes antimicrobianos efectivos para las infecciones causadas por estas bacterias, se requieren definiciones acordadas con las cuales la descripción y clasificación de las bacterias resistentes a múltiples agentes antimicrobianos faciliten la vigilancia epidemiológica en todos los entornos de atención médica y países (Tabla 4) (Magiorakos y cols., 2012).

Uno de los métodos utilizados por varios autores e instituciones para caracterizar microorganismos como MDR (Multidrogorresistente) o Multirresistentes se basa en los resultados de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos *in vitro*, cuando prueban ser "resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, clases o subclases de agentes antimicrobianos". La definición más utilizada de cepa multidrogorresistente para las bacterias grampositivas y gramnegativas es cuando demuestran ser "resistente a tres o más clases de antimicrobianos" (Magiorakos y cols., 2012).

Las bacterias que se clasifican como XDR son epidemiológicamente significativas debido su probabilidad de ser resistentes a todos o casi todos los agentes antimicrobianos aprobados, pues en

la literatura médica, XDR se ha utilizado como acrónimo de varios términos diferentes como "drogo-resistencia extrema a los medicamentos", "drogo-resistencia extensiva a los medicamentos ", y "extremadamente drogo-resistente a los medicamentos ". Existen dos conjuntos de criterios utilizados para caracterizar las bacterias como XDR; El primero se basa en el número de antimicrobianos o clases o subclases a las que una bacteria es resistente, y el segundo en si son "resistentes a uno o más agentes antimicrobianos clave" (Magiorakos y cols., 2012).

El prefijo griego "pan", que significa "todos" se utiliza para termino pandrogorresistente (PDR) significa "resistente a todos los agentes antimicrobianos". Las definiciones en la literatura para PDR varían a pesar de que este término es etimológicamente exacto y significa que, para que una especie en particular y un aislado bacteriano de esta especie se caracterice como PDR, debe probarse y ser resistente a todos los antimicrobianos aprobados y útiles, ejemplos de definiciones actuales son: 'resistente a casi todos los antimicrobianos disponibles en el mercado', 'resistente a todos los antimicrobianos probados rutinariamente' y 'resistente a todas las clases de antibióticos disponibles para el tratamiento empírico', lo que hace que la definición de PDR esté sujeta a un uso inconsistente y sea susceptible de potencial mala interpretación de los datos (Magiorakos y cols., 2012).

**Tabla 4: Clasificación de la resistencia a antimicrobianos según Magiorakos y cols., 2012.**

CATEGORÍA	CONSIDERACIÓN
MDR:	no susceptible a $\geq 1$ antibiotico en $\geq 3$ categorías antimicrobianas.
XDR:	no susceptible a $\geq 1$ antibiotico en todas menos $\leq 2$ categorías.
PDR:	no susceptible a todos los agentes antimicrobianos enumerados.

#### 1.1.2.2.2 Mecanismos de resistencia intrínseco

El grupo Amber 1 clase C de Bush y Jacoby se encuentran las  $\beta$ -lactamasas no inducibles que son codificadas cromosómicamente, como cefalosporinasas que hidrolizan a las penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, *A. baumannii* posee una cefalosporinasa tipo AmpC no inducible denominada ADC (*Acinetobacter-derived cephalosporinase*), por lo que este es el mecanismo de resistencia más frecuente a los  $\beta$ -lactámicos, donde la sobreexpresión de ADC está mediada por la presencia de secuencias de inserción que contienen promotores que favorecen la transcripción del gen, como la *ISAbA1* e *ISAbA125*. ADC expresado en un nivel bajo confiere resistencia a ampicilina, pero cuando es sobreexpresada produce una resistencia a cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Otro de los mecanismos de resistencia intrínseca de *Acinetobacter* es la presencia de oxacilinasas OXA-51 del grupo Amber 2 clase D, cuya expresión basal hidroliza débilmente penicilinas y carbapenémicos (Turton y cols., 2006; Venegas-Múñera y cols., 2014).

#### 1.1.2.2.3 Mecanismos de resistencia adquirida

El empleo inapropiado de antibióticos desencadena una respuesta bacteriana defensiva y, en consecuencia, la aparición de patógenos resistentes. Por ello, frente a los mecanismos de acción de los diferentes antibióticos, nos encontramos los mecanismos de resistencia que las bacterias desarrollan para protegerse de los mismos. La resistencia adquirida, aparece por cambios puntuales en el DNA (resistencia cromosómica) o por la adquisición de éste (plásmidos, transposones, integrones). De los antibióticos más importantes, están los  $\beta$ -lactámicos, y es frecuente encontrar cepas de *Acinetobacter* sensibles a todos los miembros de dicha familia. Los mecanismos de

resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos comprenden mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Venegas-Múñera y cols., 2014).

## **Mecanismos enzimáticos**

Los mecanismos enzimáticos consisten en la degradación del anillo  $\beta$ -lactámico mediada por diferentes tipos de enzimas  $\beta$ -lactamasas, dentro de las cuales se encuentran las  $\beta$ -lactamasas de clase A, B o D (clasificación de Ambler). Muchas de estas  $\beta$ -lactamasas pueden estar en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, por lo que el uso repetitivo de un antibiótico puede llevar a la expresión de múltiples mecanismos de resistencia que pueden fácilmente diseminarse hacia otras bacterias. Dentro de las  $\beta$ -lactamasas de clase A, se encuentran las de gran espectro relacionadas con resistencia a penicilinas (TEM-1, TEM-2 y la carbenicilinasa CARB-5), las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como VEB-1, PER-1, TEM-92 y CTX-M-2 y las de tipo KPC. Las  $\beta$  lactamasas de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas comprenden un grupo de enzimas que no son inhibidas por el ácido clavulánico ni por el tazobactam; de los seis grupos descritos hasta la fecha, cinco han sido identificados en *A. baumannii* incluyendo IMP, VIM, SIM, SPM y NDM, encontradas en integrones con determinantes de resistencia a aminoglucósidos. Las  $\beta$ -lactamasas de clase D u oxacilinasas son las que se describen con mayor frecuencia en cepas de *A. baumannii*, principalmente OXA-24, OXA-23, OXA-51 y OXA-58, estas tres últimas asociadas con el elemento de inserción ISAbal que aumenta su expresión. Estas enzimas pueden estar codificadas en plásmidos, excepto OXA-51, codificada en el cromosoma bacteriano y con frecuencia usada como marcador de especie (Venegas-Múñeras y cols., 2014; Fournier y cols, 2006; Mesli y cols., 2013).

## Mecanismos no enzimáticos

Incluyen la alteración de las proteínas de membrana externa denominadas OMPs (Outer Membrane Proteins), que conducen a una disminución de la permeabilidad de la membrana, bombas de flujo que expulsan el antibiótico y alteración de las proteínas de unión a penicilina o PBPs (penicillin binding protein), cuando estos son blanco del antibiótico (Venegas-Múñera y cols., 2014).

Con relación a los cambios en las OMPs se han descrito alteraciones en proteínas como la CarO asociada con resistencia a meropenem e imipenem y la OmpW, que disminuye la entrada de colistina y de los  $\beta$ -lactámicos al interior de la bacteria. También se ha descrito una OMP perteneciente a la familia de las OprD (OprD-like), relacionada con cierre de porinas (Pournaras y cols., 2014).

Dentro de las bombas de expulsión, la más estudiada es el sistema AdeABC, que puede expulsar  $\beta$ -lactámicos (incluyendo carbapenémicos); aminoglicósidos donde las enzimas modificantes son acetiltransferasas (AAC), nucleotiltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH) que producen diferentes fenotipos de resistencia selectiva y en combinación con bombas de expulsión como la AdeABC pueden conferir resistencia a todos los grupo; macrólidos; tigeciclina y tetraciclinas por medios de las bombas de expulsión que incluyen TetA y TetB, codificadas por los genes *tet(A)* y *tet(B)*; la primera confiere resistencia solo a tetraciclina, mientras que la segunda expulsa tetraciclina y minociclina; por otro lado, fluoroquinolonas, cloranfenicol y trimetoprim, donde la resistencia a sulfonamida está mediada por el gen *sul* que se encuentran en la región 3' de un integrón, el gen *dhfr* confiere resistencia a trimetoprim, mientras que la bomba de expulsión CraA (del inglés: *chloramphenicol resistance Acinetobacter*) confiere resistencia a cloranfenicol, y la bomba AdeABC

también otorga resistencia a estos dos últimos antibióticos (Vila y cols., 2007). Recientemente en el año 2008, se describió por primera vez una nueva bomba de expulsión perteneciente a la familia RND, denominada AdelJK; mientras la bomba AdeABC se encuentra presente en cepas multi-resistentes de *A. baumannii*, la bomba AdelJK se encuentra presente tanto en cepas susceptibles como resistentes, por lo cual representa un aporte a la resistencia intrínseca frente a algunos antimicrobianos. La bomba AdelJK contribuye a la resistencia a algunos antimicrobianos como los  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina y, en menor grado, a la resistencia a fluoroquinolonas, pero no se encuentra relacionada con la resistencia a azitromicina, lincosamida o rifampicina (Opazo y cols., 2009)

Finalmente, con relación a las proteínas de unión a penicilina, se ha descrito que la ausencia de la PBP2a podría conferir resistencia a imipenem y meropenem. La carencia simultánea de esta proteína y de la PBP2b se asocia con niveles de resistencia más elevada a estos antibióticos. En un estudio realizado por la Secretaría de Salud en el 2011 se encontró una incidencia de infección nosocomial por *A. baumannii* del 7%, mientras que en 2013 un estudio realizado por el IMSS encontraron una incidencia de *A. baumannii* del 5.7% con el mayor reporte en UMAE (Unidades Médicas de Alta Especialidad) de traumatología y ortopedia del 9.3%, todos en adultos, ya que en estancias pediátricas se han realizado muy pocas estadísticas (Hernández-Torres y cols., 2010; Arias-Flores y cols., 2016).

### 1.1.3 Identificación y Susceptibilidad

El género *Acinetobacter* tiene forma de bacilo durante la etapa de crecimiento rápido y de cocobacilo en la fase estacionaria, por lo que la morfología celular varía considerablemente, observándose formas cocoides, cocobacilares, diplocóccicas, bastoncillos, diplobacilos y algunas formas filamentosas. Generalmente se presenta capsula, es aerobio, no esporulado, inmóvil, no hidroliza la gelatina, no fermentador, carente de lisina descarboxilasa, indol y oxidasa negativo, catalasa positivo (Nodarse y cols., 2015; Martínez y cols., 2001).

En el aislamiento primario son muy similares a las enterobacterias en cuanto a su patrón de crecimiento y morfología de las colonias, no pigmentadas, pero se caracterizan por ser abombadas y mucoides con superficies que pueden ser lisas o tener depresiones. *A. baumannii* crece sin dificultad en los medios de cultivo habituales como en agar sangre, algunas características fenotípicas que se utilizan para distinguir las cepas de *Acinetobacter* de las enterobacterias son mediante la reacción negativa a la oxidasa, incapacidad para reducir nitratos a nitritos y no fermentar glucosa, no desarrollarse en un medio anaeróbico, la hemólisis de los eritrocitos, la acidificación de la glucosa, el crecimiento a 44°C y la variabilidad en el uso de las fuentes de carbono. (Martínez-Izquierdo y cols., 2001; Marcos, 2000).

Las muestras clínicas se pueden sembrar en cualquiera de los medios selectivos habituales para bacterias gramnegativas, por ejemplo, agar sangre o agar MacConkey, inclusive en sospecha de *Acinetobacter multirresistente* se puede emplear el medio LAM (*Leeds Acinetobacter Medium*), que está suplementado de vancomicina (10 mg/L), cefsulodina (15 mg/L) y cefradina (50 mg/L) para el

aislamiento en muestras clínicas o ambientales. Como una gran mayoría de cepas son resistentes a gentamicina, muchos protocolos aconsejan también el uso de agar MacConkey suplementado con gentamicina a una concentración de 8 mg/L (Cercenado y cols., 2007; Cano y cols., 2008).

La identificación presuntiva de las colonias de *A. baumannii* se basa en la morfología de las colonias, que suelen ser brillantes, a veces de aspecto mucoso, y de color blanco amarillento, a veces ligeramente pardo. En la identificación bioquímica muchos laboratorios utilizan los tubos de TSI (Agar Triple Azúcar) para corroborar la no fermentación y el MIO (Movilidad, Indol, Ornitina) ya que *A. baumannii* es inmóvil. Aunado a todo lo anterior también se puede emplear la identificación de especies de *Acinetobacter* (diferenciando entre *Acinetobacter complex* de las demás especies) basándose en el desarrollo a las diferentes temperaturas de incubación (37°, 41° y 44°), tomando en cuenta que para la identificación exacta se debe distinguir por técnicas moleculares (Fernandez y cols., 2011).

La determinación de sensibilidad antimicrobiana para *Acinetobacter baumannii* se realiza por los métodos de: difusión en disco, microdilución y E-test. El fenotipo de resistencia heterogénea a carbapenems es relativamente frecuente, y sólo puede ponerse en manifiesto utilizando los métodos mencionados, ya que este se determina por la visualización de las colonias que crecen en el interior de los halos de inhibición. Entre los años 2000 y el 2010 se ha observado un incremento en las tasas de resistencia a ceftazidima, piperacilina y colistina. La multiresistencia a los antimicrobianos de *A. baumannii* es un proceso multifactorial en el que están implicados la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas tipo AmpC, y en aislamientos estudiados se encuentra un gen *ISAba1* de

carbapenemasas tipo blaOXA-51; algunas cepas con blaOXA-23-like y/o blaOXA-58-like, sobreexpresión de bombas de expulsión, pérdida de porinas y modificación del blanco de acción de los antibióticos (Venegas-Múñera y cols., 2014; Turton y cols., 2006; Fariñas y Martínez-Martínez., 2013).

#### **1.1.4 Importancia clínica en México**

Al igual que con la mayor parte de los microorganismos el aislamiento de *Acinetobacter* de material clínico no define la infección, porque en casi el 100% de las muestras de suelo y agua se logra cultivar *Acinetobacter*, también es aislado de muchas fuentes, como leche pasteurizada, alimentos congelados, vegetales, carne de ave congelada y pescado. Aparece con frecuencia en desarrollo a partir de numerosas fuentes humanas, incluida la piel, esputo, orina, heces y secreciones vaginales (Martínez y cols., 2001).

Es el microorganismo gramnegativo que con mayor frecuencia porta en la piel de forma persistente el personal hospitalario. Hasta el 25% de los adultos sanos en la comunidad presentan colonización cutánea y el 7% de los adultos y lactantes presentan colonización faríngea transitoria; así mismo, coloniza los tubos de traqueostomía de los pacientes internados. A menudo se encuentra durante semanas o meses como contaminante de casi cualquier superficie húmeda o seca, lo que incluye el aire nosocomial, humidificadores, agua de grifo, baños de dializado peritoneal, objetos que permiten micciones en la cama (pato), toallas, almohadas, cortinas, piscinas de hidroterapia, catéteres de angiografía, respiradores mecánicos, bombas de infusión, laringoscopios, duodenoscopios, equipos con control digital, medicación con multidosis, fraccionadores de proteínas plasmáticas y

dispensadores de jabón que se comportan como verdaderos reservorios del microorganismo (Nodarse-Hernández y cols., 2015).

Desde la década de 1970, *Acinetobacter* ha surgido como un importante patógeno nosocomial que puede dar lugar a diversas infecciones incluyendo bacteriemia, neumonía e infecciones de heridas, con mayor frecuencia infecta el sistema respiratorio debido a la colonización faríngea transitoria que ocurre en personas sanas y la tasa elevada de colonización en los tubos de traqueostomía. La incidencia de este microorganismo varía de un sitio a otro (Lee y cols., 2006).

La mayoría de las cepas patógenas de *A. baumannii* son aislados de las vías respiratorias de pacientes hospitalizados y es muy difícil diferenciar entre la colonización de las vías respiratorias superiores y la neumonía verdadera. Siendo esta última la infección más común que ocurre en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) con una frecuencia del 3 al 5% y con tasas de mortalidad del 30 al 75%, seguida de la infección de vías urinarias e infecciones de tejidos blandos. En niños sanos suele causar bronquiolitis y traqueobronquitis adquiridas en la comunidad. Se describe Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) severa por *Acinetobacter* que se presenta durante los meses de calor y humedad en regiones tropicales. La NAC en adultos, se presenta en general, en hospederos con defensas disminuidas (p.ej., alcohólicos, fumadores, con diabetes mellitus, insuficiencia renal o enfermedad pulmonar subyacente). Se asocia con una alta incidencia de bacteriemia, síndrome de insuficiencia respiratoria, sepsis, choque y muerte de  $\geq 50\%$ . La mortalidad de la NAC es más elevada que la infección adquirida en el hospital, aunque se desconocen las razones de esta presentación fulminante. Rara vez, la NAC por especies de *Acinetobacter* se

presenta con imágenes de consolidación y abscesos pulmonares múltiples. El mayor impacto que ha producido *Acinetobacter* es haberse constituido como un agente causal importante de la neumonía nosocomial, que se caracteriza por ser de inicio tardío en especial, en casos asociados a ventilación mecánica, provocando mayor mortalidad y una estancia hospitalaria prolongada. Las infecciones respiratorias nosocomiales han sido rastreadas a equipo de inhaloterapia contaminado y bacteriemia por catéteres intravenosos infectados (Almasaudi, 2018).

En México, Ramírez-Sandoval y colaboradores, describen un brote de infección nosocomial de vías respiratorias bajas por *A. baumannii* en un servicio de Medicina Interna de un hospital general de la Ciudad de México, en la cual el 53% de todos los casos fueron de pacientes mayores de 65 años, con alguna enfermedad pulmonar preexistente, enfermedades de base debilitantes y con tratamiento antimicrobiano prolongado por más de 10 días, teniendo similitud con lo sucedido en otros países (Ramírez-Sandoval y cols., 2013). Por otro lado, Martínez-Herrera y cols., en 2008, realizaron un estudio de frecuencia de aislamientos microbiológicos en hemocultivos de pacientes internados en un hospital de segundo nivel de la ciudad de México, y la distribución por edad fue de 72 (13.5%) hemocultivos positivos en recién nacidos, 170 (31.9%) en niños de 1 mes a 18 años y 291 (54.6%) en mayores de 18 años, concluyendo que los más afectados son los pacientes adultos (Martínez-Herrera y cols., 2008).

La mayoría de los informes de bacteriemias nosocomiales por *A. baumannii* son de brotes en unidades de cuidados intensivos de adultos produciendo un cuadro de sepsis ya que esta complicación tiene lugar cuando el organismo se ve comprometido debido a un agente casual externo como las bacterias, produciendo una respuesta inmunitaria desregulada y anómala frente a

la infección; o en su caso, si no hay una atención adecuada o a tiempo, puede producirse un shock séptico consecuente de una respuesta inflamatoria sistémica severa que lleva a un colapso cardiovascular y/o microcirculatorio (Bruhn y cols., 2011).

En un análisis de infecciones por *Acinetobacter* de 1977 a 2000, donde se incluyeron 51 aislados de 16 países, 75 % se localizó en las unidades de cuidados intensivos de pacientes adultos (Huang y cols., 2012). En México existe el Plan UCRA compuesto de 14 hospitales tanto de tercer como segundo nivel, el cual emitió en el 2018 pero con la información consensada en 2016-2017 un reporte, donde el 7.3% del total de hemocultivos es causado por *A. baumannii*, pero ningún hospital infantil forma parte de ese porcentaje, sin embargo, muestra los más altos niveles de resistencia (PUCRA, 2018).

*A. baumannii* ha sido un importante patógeno nosocomial durante los últimos 30 años, y está frecuentemente implicado en la neumonía asociada al ventilador y el torrente sanguíneo, el tracto urinario y las infecciones de tejidos blandos. La propensión a desarrollar resistencia a los antibióticos hace que *A. baumannii* sea un patógeno difícil de tratar (Pournaras y cols., 2014). Se han reportado cepas resistentes a casi todos los antimicrobianos disponibles comercialmente, lo que limita el tratamiento. Las cepas MDR son definidas como aquellas que son susceptibles únicamente a meropenem, amikacina, sulbactam, minociclina; mientras que las cepas PDR son aquellas que muestran resistencia a meropenem y poseen sensibilidad única a polimixina (como colistina), sin embargo, estos estudios no incluyen la capacidad de adherencia e invasividad en cepas aisladas de pacientes pediátricos, ni el mecanismo de adherencia e invasividad involucrado en la infección por

*Acinetobacter*, realizando únicamente la investigación de las moléculas involucradas en dichos procesos (Díaz-Jiménez, 2010).

Las medidas a tomar ante un agente como *A. baumannii* son: a) restringir el uso de antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas y carbapenémicos en unidades de alto riesgo como las salas de urgencias y terapia intensiva; b) evaluar si la presencia de bacteria se trata de una verdadera infección o de una colonización; c) aislar al paciente para evitar la diseminación del microorganismo (Díaz-Jiménez, 2010).

En la actualidad, los microorganismos aislados en las salas de internamiento de hospitales representan un problema de salud importante, pues son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los mismos e implican disminución en la calidad de vida, estancia hospitalaria prolongada y costos de salud elevados. La tasa de infección depende de cada unidad, el tipo de pacientes que acoge, los procedimientos, los antibióticos prescritos y la microbiota hospitalaria. El hemocultivo aún es el estudio de elección para confirmar una bacteriemia cuando se sospecha en pacientes con o sin foco obvio de infección. La evolución clínica de los pacientes con hemocultivos positivos depende de diversos factores, como: edad, foco de infección primaria, origen comunitario o nosocomial de la infección, tipo de microorganismos, enfermedad subyacente, estado de inmunodepresión y tratamientos antibióticos previos (Martínez y cols., 2008; Ramirez y cols., 2013).

## 2 Antecedentes

A lo largo de los años, estudios muestran como *A. baumannii* ha surgido e incrementando su frecuencia como unos de los microorganismos aislados en pacientes pediátricos, y la importancia de evaluar los factores de virulencia que puede presentar para llevar a cabo una infección exitosa:

En 2008 Martínez-Herrera y cols. realizaron un estudio en el cual revisan la frecuencia de hemocultivos positivos y microorganismos aislados de pacientes pediátricos y adultos internados en el Hospital General Dr. Manuel Gea González de la ciudad del México. Analizaron resultados de pacientes hospitalizados entre junio de 2005 y mayo de 2007; de 4 381 hemocultivos, de los cuales 533 (12.17%) dieron positivo a bacterias y hongos, la distribución por edad fue de 72 (13.5%) hemocultivos positivos en recién nacidos, 170 (31.9%) en niños de 1 mes a 18 años, y 291 (54.6%) en mayores de 18 años, donde solo se reportan 17 casos de *A. baumannii* sin especificar la edad (Martínez-Herrera y cols, 2008).

Ramírez-Sandoval y cols. en 2013 describieron la resistencia de *A. baumannii* a diferentes antibióticos en pacientes ingresados del 01 de enero del 2011 al 30 de mayo del 2012 en el Hospital General de Zona No 32 “Mario Madrazo Navarro” en el Instituto Mexicano del Seguro social (HGZ32), se portaron 50 cepas de *A. baumannii*, de las cuales 49 fueron de pacientes adultos y 1 de pediatría. Las cepas mostraron una alta tasa de resistencia a antibióticos, por lo que sugirieron instaurar estrategias fundamentales para evitar infecciones nosocomiales (Ramírez-Sandoval y cols., 2013).

En 2014 García y cols., en la UCIN del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social de la Ciudad de México un estudio para la identificación de los factores de riesgo asociados a IN en ese hospital, observaron que la sepsis fue más frecuente y se identificaron 140 microorganismos por medio de hemocultivos incluyendo *A. baumannii* (1 caso), y concluyeron que aunado a factores de riesgo anteriormente reportados el número de cirugías al que se somete el neonato también puede influir en el desarrollo de una infección nosocomial (García y cols., 2015).

En León, Guanajuato, se realizó un estudio a pacientes de cardiocirugía pediátrica (<1 – 15 años) en el 2016, Duarte-Raya y Baeza-Zarco calcularon que de 67 pacientes el 40.7% (27 pacientes) cursaron con sepsis después de la cirugía, donde al realizar el hemocultivo de seguimiento se encontraron que el 25% (6 pacientes) correspondía a *A. baumannii*, concluyendo que la edad, la desnutrición, el uso de sonda pleural, sonda nasogástrica y cánula orotraqueal y la estancia hospitalaria prolongada, son factores de riesgo para la infección (Duarte-Raya y Baeza-Zarco, 2016).

Álvarez-Fraga en 2018 realizó una tesis doctoral donde caracterizó dos nuevos genes que podrían explicar parcialmente la capacidad que tiene *A. baumannii* para causar una infección, por una parte, el gen *LH92\_11085* de *A. baumannii* MAR002, implicado en la formación de un pilis tipo chaperona-usher, se encontró sobreexpresado en células del biofilm con células planctónicas, por consecuente la inactivación de este gen resultó en una reducción de la capacidad que la cepa posee para formar biofilm y de adherirse a células epiteliales además de un descenso en la virulencia. Por otro lado, el gen *A1S\_0242* (*feoA*) de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, que está implicado en la captación de

hierro, que encontró sobreexpresado durante un proceso de neumonía, este gen también juega un papel en la adhesión, la formación de biofilm, la resistencia al estrés oxidativo y en la virulencia *in vivo*.

En 2018 por parte de Ramalingam y Lee, utilizaron las matrices extracelulares (ECM: *extracellular matrix*) y la técnica de cubreobjetos inclinado (SGC: *slanted coverslip technique*) como sustratos de biopelículas investigadas por microscopia electrónica de barrido (SEM: *scanning electron microscopy*), tinción confocal y cristal violeta. Donde *A. baumannii* mostró mayores capacidades de formación de biopelículas con ECM. Concluyendo que, para el paso inicial de la formación de biopelículas, la adherencia es un factor importante y, en consecuencia, las cepas con una capacidad comparativamente alta para adherirse a matrices extracelulares y cubreobjetos de vidrio inclinado proporcionan un nuevo método de crecimiento mejorado de biopelículas para ensayos *in vitro*.

### **3 Pregunta de Investigación**

¿Las cepas de *A. baumannii* aislados en pacientes pediátricos con sepsis tienen la capacidad de adherencia, invasividad y multirresistencia?

## 4 Hipótesis

Todas las cepas de *A. baumannii* aisladas de hemocultivos en pacientes pediátricos tienen la capacidad de adherirse, invadir y presentar multirresistencia a antimicrobianos.

## 5 Objetivos

### 5.1 *General*

Conocer si las cepas de *A. baumannii* aisladas de hemocultivo de pacientes pediátricos con sepsis tienen la capacidad de adherencia, invasividad y multirresistencia a los antimicrobianos de uso clínico.

### 5.2 *Particulares*

- Evaluar la capacidad de adherencia de las cepas aisladas de *A. baumannii* en línea celular HEp-2.
- Evaluar la capacidad de invasividad de las cepas aisladas de *A. baumannii* en la línea celular HEp-2.
- Mostrar la susceptibilidad de las cepas las cepas aisladas de *A. baumannii* en estudio frente a 13 antibióticos de uso clínico.

## 6 Justificación

*A. baumannii* se ha presentado a lo largo de la historia como un agente nosocomial, en relación con infecciones y a neumonías adquiridas en la comunidad, provocando sepsis que se asocian a una tasa de mortalidad significativa, y a choque séptico por ser de las principales manifestaciones, dado que puede permanecer viable en ambientes secos por semanas o meses, múltiples resistencias a los antibióticos y otros factores de virulencia importantes. *A. baumannii* y sus genes o mecanismos de virulencia han sido investigado, hasta ahora en cepas de referencia o en cepas aisladas en pacientes adultos que en su mayoría son los afectados, no obstante no se descarta la infección en pacientes pediátricos y es de gran interés investigar primeramente cuales son los factores de virulencia que puede expresar *A. baumannii* en este tipo de pacientes, por lo que el propósito de este trabajo es conocer la capacidad de adherencia e invasividad que esta bacteria puede expresar en cepas aisladas de hemocultivos, y determinar cuál es la resistencia a los antimicrobianos que presenta.

## 7 Materiales y Métodos

### 7.1 Diseño

Este estudio sigue un diseño observacional, transversal, retrospectivo, cualitativo.

#### Variables cualitativas

- Independientes: Adherencia y Resistencia
- Dependiente: Invasividad

### 7.2 Criterios

#### Inclusión

- Cepas aisladas de hemocultivos de pacientes pediátricos en un periodo de enero – diciembre 2018.
- Cepas previamente identificadas como *A. baumannii*

#### Exclusión

- Aislamientos repetidos del mismo paciente

#### Eliminación

- Cepas no viables
- Cepas contaminadas
- Cepas mal identificadas
- Cepas sin identificación previa

### **7.3 Cepas de *A. baumannii***

Las cepas *A. baumannii* en estudio fueron donadas y previamente identificadas por el método automatizado de BACTEC y Espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el Instituto Nacional de Pediatría, representan aislamientos obtenidos de hemocultivos en pacientes pediátricos de entre RN y 12 años durante el periodo enero – diciembre del 2018.

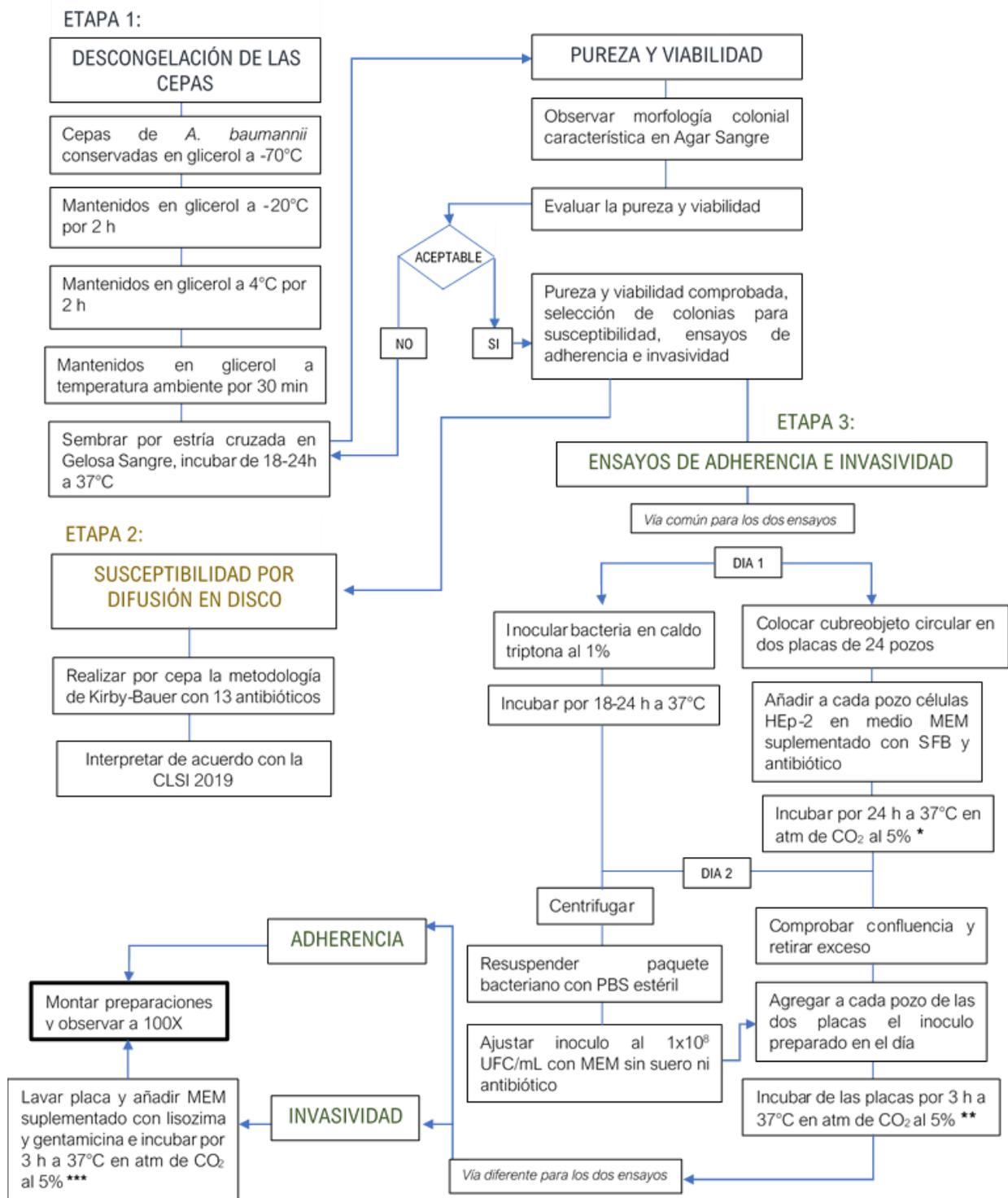
### **7.4 Cultivo celular**

Se utilizaron células HEp-2 (*Human Epidermoid carcinoma strain #2*) cultivadas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% en medio MEM (Medio Mínimo Esencial) suplementado y con 10% de suero fetal bovino (SFB), en frascos para cultivo celular de 5mL y 25 mL. En el 90% de confluencia (proliferación de células), se desprendió la monocapa del frasco con tripsina y se prepararon nuevos cultivos en MEM con suplementos.

### **7.5 Metodología general**

El trabajo constó de tres etapas mostradas en el diagrama de flujo; en la primera se realizó la recuperación de cepas bacterianas que se encontraban en congelación para valorar su estado de viabilidad y pureza, en la segunda se realizó la sensibilidad antimicrobiana, empleando 13 antibióticos según las recomendaciones de la CLSI 2019, la tercera se investigó si las cepas aisladas tenían la capacidad de adherirse e invadir *in vitro* un cultivo celular HEp-2.

## 7.5.1 Diagrama de trabajo



(\*), (\*\*), (\*\*\*) Si las placas posterior a la incubación muestran signos de contaminación se debe desechar la placa y realizar el procedimiento desde el "día 1" nuevamente. O en su caso si la confluencia no se ha cumplido a un ~90% se deben dejar más tiempo de incubación hasta cumplir la confluencia adecuada.

## **7.5.2 Etapa 1: Recuperación de las cepas**

Las cepas se habían mantenido conservadas con glicerol en el ultracongelador (REVCO) hasta su utilización, por lo que se tuvieron que descongelar gradualmente, de -70°C a -20°C por 2 h, después a 4°C por 2h, y finalmente a temperatura ambiente por 30 min.

Se tomó una asada e inoculó por estría cruzada en Agar Sangre (AS con 7% de sangre) para evaluar la pureza, ya que puede crecer en medios convencionales para bacterias gramnegativas, posteriormente se incubó a 37°C de 18-24 h, y los tubos de cada cepa se devolvieron a congelar de manera paulatina en el orden inverso al que se descongelaron.

### **7.5.2.1 Viabilidad**

Para determinar la viabilidad de las cepas, se tomaron 100uL de la cepa a partir de los viales descongelados e inoculó en caldo triptona incubándose a 37°C de 18 a 24 h. Posterior al crecimiento de la cepa se realizó la siembra por estría cruzada en placas con AS al 7 % en iguales condiciones de incubación. Transcurrida la incubación se realizó la observación a simple vista de las placas para determinar la viabilidad a partir de la visualización del crecimiento de colonias en las estrías del medio.

### **7.5.2.2 Pureza**

Se evaluó también el estado de pureza de cada cepa después de la incubación (18-24 h en AS a 37°C) observando que no hubiera dos o más morfologías diferentes de colonias en las placas. La descripción fenotípica característica en medios de cultivos de las cepas de *A. baumannii* es que

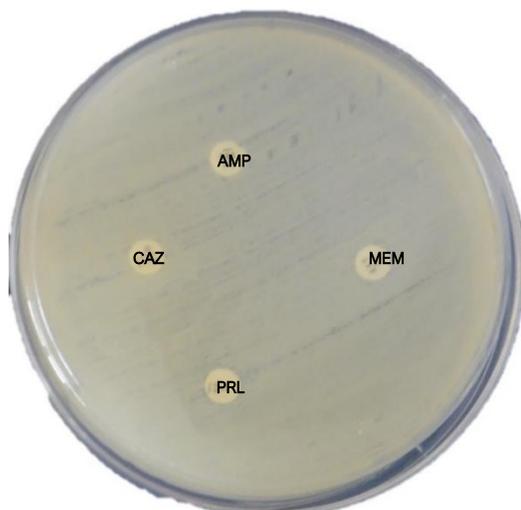
pueden ser brillantes o de aspecto mucoso, color blanco, amarillento o ligeramente pardo; a los que se les realizó tinción de Gram para describir su morfología por observación microscópica.

### **7.5.3 Etapa 2: Determinación de susceptibilidad**

La metodología utilizada fue basada en el trabajo de Kirby-Bauer y colaboradores, aprobada y validada actualmente por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para la determinación de la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

#### **7.5.3.1 Difusión en disco**

Consistió en sembrar por estría masiva en Agar Müller Hinton (MH) (Figura 4), la cepa de interés ajustada a 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), y colocando en la superficie de la placa (100mm x 15 mm) hasta cuatro discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos, en este caso se utilizaron 13 antibióticos donde 12 fueron los recomendados por la CLSI para probar la sensibilidad a antimicrobianos, y uno (Ampicilina) para evaluar la resistencia intrínseca (Tabla 5), posteriormente se incubó 18 h a 37°C. Los antibióticos fueron evaluados previamente por personal técnico del laboratorio



**Figura 4: Difusión en disco de la cepa 11.** Se aprecia resistencia de la cepa clasificada como multiresistencia por ser resistente a  $\geq 1$  de 3 diferentes categorías de antibióticos.

**Tabla 5: Antibióticos recomendados por la CLSI, y sus criterios de resistencia y sensibilidad.** RI: Resistencia Intrínseca dependiente del nivel de cefalosporinasa ADC.

	ABREVIATURA	CONCENTRACIÓN EN $\mu\text{g}$	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN EN mm (S: SENSIBILIDAD / R: RESISTENCIA)
<b>PENICILINAS</b>			
Piperacilina <sup>RI</sup>	PRL	100	$\geq 21$ / $\leq 17$
Ampicilina <sup>RI</sup>	AMP	10	
<b>BETALÁCTMICOS CON INHIBIDOR</b>			
Piperacilina-Tazobactam	TZP110	100/10	$\geq 21$ / $\leq 17$
<b>CEFALOSPORINAS</b>			
Cefepima	FEP	30	$\geq 18$ / $\leq 14$
Ceftazidima <sup>RI</sup>	CAZ	30	$\geq 18$ / $\leq 14$
Ceftriaxona	CRO	30	$\geq 21$ / $\leq 13$
<b>CARBAPENEMES</b>			
Meropenem	MEM	10	$\geq 18$ / $\leq 14$
<b>AMINOGLUCÓSIDOS</b>			
Tobramicina	TOB	10	$\geq 15$ / $\leq 12$
Gentamicina	CN	10	$\geq 15$ / $\leq 12$
Amikacina	AK	30	$\geq 17$ / $\leq 14$
<b>TETRACICLINAS</b>			

Tetraciclina	TE	30	$\geq 15 / \leq 11$
<b>FLUOROQUINOLONAS</b>			
Ciprofloxacino	CIP	5	$\geq 21 / \leq 15$
<b>INHIBIDORES DE LA VÍA DE LOS FOLATOS</b>			
Trimetoprim/Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	$\geq 16 / \leq 10$

### 7.5.4 Etapa 3: Caracterización de las cepas

Los ensayos de adherencia e invasividad se llevaron a cabo en tres fases, se utilizaron como control positivo laminillas con los diferentes patrones de adherencia descritos para *E. coli* 49766, para los ensayos de invasividad se usaron como control positivo laminillas con *Shigella boydii*, y para ambos ensayos se tomó como control negativo laminillas con cepas de *E. coli* K-12, además se agregó un control e células HEp-2 sin infectar (González-Villalobos, 2019).

#### 7.5.4.1 Ensayo de adherencia

Día 1:

##### 7.5.4.1.1 Preparación de la placa

En una placa para cultivo celular de 24 pozos marca “Falcon”, se colocó un cubreobjetos circular en cada pozo y a cada uno se le agregó 100 000 células HEp-2, con MEM de la marca “IVD” suplementado con 10% de SFB de la marca Biowest, para favorecer el crecimiento de las células; y una mezcla de penicilina-estreptomicina 10 0000 U/ $\mu$ g/mL para prevenir contaminación. Después las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 h de acuerdo con los ensayos de González-Villalobos en 2019.

#### 7.5.4.1.2 Preparación de inóculo

Se inocularon cada una de las cepas de interés a partir de las cepas aisladas de AS en caldo triptona al 1% (para la aportación de aminoácidos que estimulan el crecimiento del microorganismo) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

**Día 2:**

#### 7.5.4.1.3 Preparación del inóculo

Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 3 500 rpm por 20 min y se desechó el sobrenadante, el paquete celular fue resuspendido con PBS (*phosphate buffered saline*) estéril, pH 7.0, posteriormente se ajustó a  $1 \times 10^8$  UFC/mL, se tomaron 100  $\mu$ L de esta suspensión bacteriana y añadió a 900  $\mu$ L de medio MEM sin suero y sin antibiótico (González-Villalobos, 2019).

#### 7.5.4.1.4 Preparación de la placa

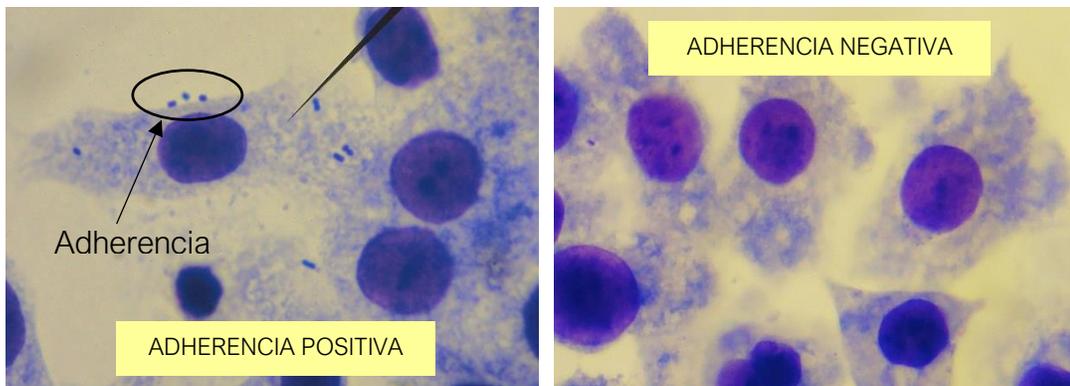
Posterior a la incubación se corroboró que la confluencia de la monocapa fuese por lo menos del 90% bajo la observación de las placas en el Microscopio Invertido de Contraste de Fases modelo NIB-10 de la marca “Numak”, y el exceso de células flotantes en el medio que no forman parte de la monocapa fueron desechadas con tres lavados de PBS 1X estéril, una vez lavado se añadió a cada pozo 1 mL del inóculo de la suspensión bacteriana realizada en el punto 7.5.4.1.3 y se incubó 3 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (González-Villalobos, 2019).

#### 7.5.4.1.5 Montaje de la preparación

Posterior a la incubación, se realizaron tres lavados con PBS estéril para desechar el exceso de células en medio MEM, luego se fijó con metanol por 1 min, se tiñó con Giemsa por 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de tinción, se realizaron tres lavados con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante, y después se llevó a cabo la deshidratación de las lentes, una por una en el tren de los siguientes solventes: acetona, acetona-xilol en una proporción 1:1, y xilol. Finalmente se montaron los cubreobjetos en un portaobjetos con resina (para su conservación), se dejaron secar y se observaron a 100x en el Microscopio óptico modelo “Primo Star” marca Carl Zeiss.

#### **Criterios e Interpretación**

El criterio de positividad para la adherencia es que a través del análisis de la preparación a 100x, se puedan observar las bacterias adheridas en las células HEp-2, y por el contrario si no se observa adherencia en las células HEp-2 se considera negativo como a continuación se muestra:



Para medir cualitativamente y con la única finalidad de evaluar la capacidad de adherencia de *A. baumannii* se establecieron arbitrariamente las siguientes escalas según nuestros criterios de percepción (Tabla 6).

**Tabla 6: Escala para la medición cualitativa en la adherencia de *A. baumannii* en células HEp-2**

<b>ADHERENCIA</b>	<b>ESCALA CUALITATIVA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Bacterias contables 5 – 15	+	Escaso
Bacterias contables de 16 – 50	++	Moderado
Bacterias incontables > 51	+++	Abundante

#### **7.5.4.2 Ensayo de invasividad**

Día 1:

##### **7.5.4.2.1 Preparación de la placa**

En una placa para cultivo celular de 24 pozos marca “Falcon”, se colocó un cubreobjetos circular en cada pozo y a cada uno se le agregó 100 000 células HEp-2, con MEM de la marca “IVD” suplementado con 10% de SFB de la marca Biowest, para favorecer el crecimiento de las células; y una mezcla de penicilina-estreptomicina 10 0000 U/μg/mL para evitar contaminación. Después las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 h de acuerdo con los ensayos de González-Villalobos en 2019.

##### **7.5.4.2.2 Preparación de inóculo**

Se inocularon cada una de las cepas de interés a partir de las cepas aisladas de AS en caldo triptona al 1% (para la aportación de aminoácidos que estimulan el crecimiento del microorganismo) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

**Día 2:**

#### **7.5.4.2.3 Preparación del inóculo**

Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 3 500 rpm por 20 min y se desechó el sobrenadante, el paquete celular fue resuspendido con PBS estéril, posteriormente se ajustó a  $1 \times 10^8$  UFC/mL para lo cual, se tomó 100 $\mu$ L de esta suspensión bacteriana y añadió a 900 $\mu$ L de medio MEM sin suero y sin antibiótico (González-Villalobos, 2019).

#### **7.5.4.2.4 Preparación de la placa**

Posterior a la incubación se corroboró que la confluencia de la monocapa fuese por lo menos del 90% bajo la observación de las placas en el Microscopio Invertido de Contraste de Fases modelo NIB-10 de la marca "Numak", y el exceso de células flotantes en el medio que no forman parte de la monocapa fueron desechadas con tres lavados de PBS 1X estéril, una vez lavado se añadió a cada pozo 1 mL del inóculo de la suspensión bacteriana realizada en el punto 7.5.4.1.3 y se incubó 3 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (González-Villalobos, 2019).

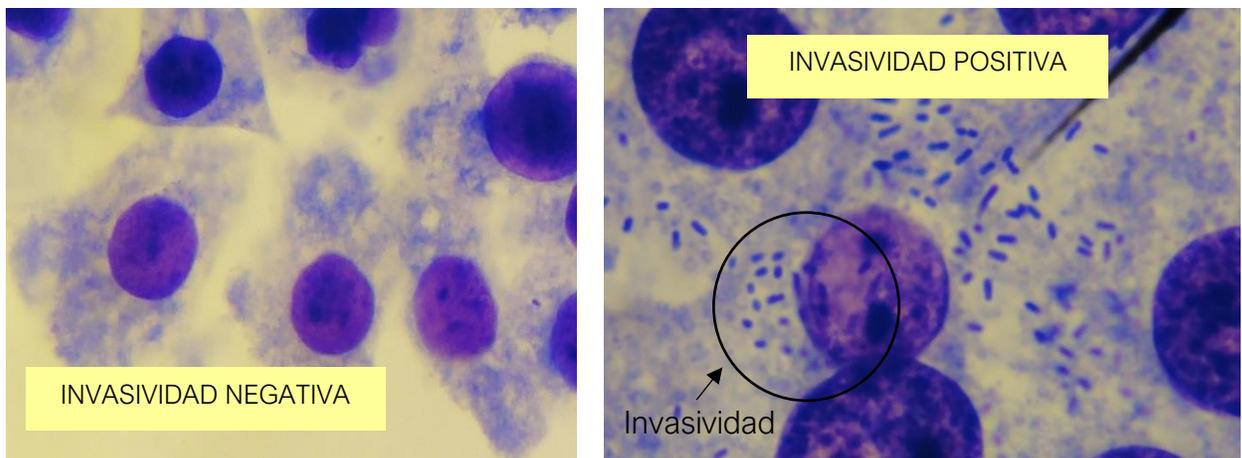
Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a lavar con PBS 1X estéril cada uno de los pozos, posteriormente se añadió 1 mL de MEM suplementado con lisozima (300 $\mu$ g/mL) y gentamicina (100 $\mu$ g/mL) para lisar a las bacterias adheridas y evitar su propagación respectivamente. Nuevamente se incubó por 3 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (González-Villalobos, 2019).

#### 7.5.4.2.5 Montaje de la preparación

Posterior a la incubación, se realizaron tres lavados con PBS estéril para desechar el exceso de células en medio MEM, luego se fijó con metanol por 1 min, se tiñó con Giemsa por 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de tinción, se realizaron tres lavados con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante, y después se llevó a cabo la deshidratación de las lentes, una por una en el tren de los siguientes solventes: acetona, acetona-xilol en una proporción 1:1, y xilol. Finalmente se montaron los cubreobjetos en un portaobjetos con resina (para su conservación), se dejaron secar y se observaron a 100x en el microscopio óptico modelo "Primo Star" marca Carl Zeiss.

#### Crterios e interpretación

El criterio de positividad para la invasividad es que a través del análisis de la preparación a 100X, se puedan observar las bacterias en el mismo plano focal que el núcleo en las células HEp-2, y por el contrario si no se observan en el mismo plano focal en las células HEp-2 se considera negativo como a continuación se muestra:



Para medir cualitativamente y con la única finalidad de evaluar la capacidad de invasividad de *A. baumannii* se establecieron arbitrariamente las siguientes escalas según nuestros criterios de percepción (Tabla 7).

**Tabla 7: Escala para la medición cualitativa en la invasividad de *A. baumannii* en células HEP-2**

<b>INVASIVIDAD</b>	<b>ESCALA CUALITATIVA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Bacterias contables 5 – 15	+	Escaso
Bacterias de 16 – 50	++	Moderado
Bacterias incontables > 51	+++	Abundante

## 8 Resultados

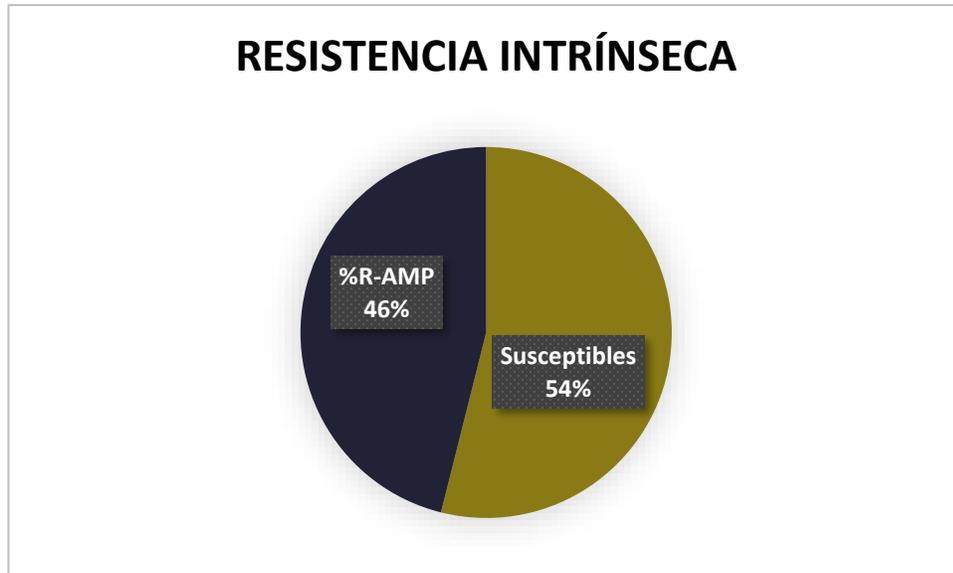
En total se trabajaron 26 cepas previamente identificadas como *A. baumannii*, con la finalidad de evaluar si estas cepas aisladas de pacientes pediátricos con sepsis del INP tienen la capacidad de adherencia e invasividad; y demostrar su resistencia a los 13 antibióticos evaluados.

### **8.1 Etapa 1: Recuperación de las cepas**

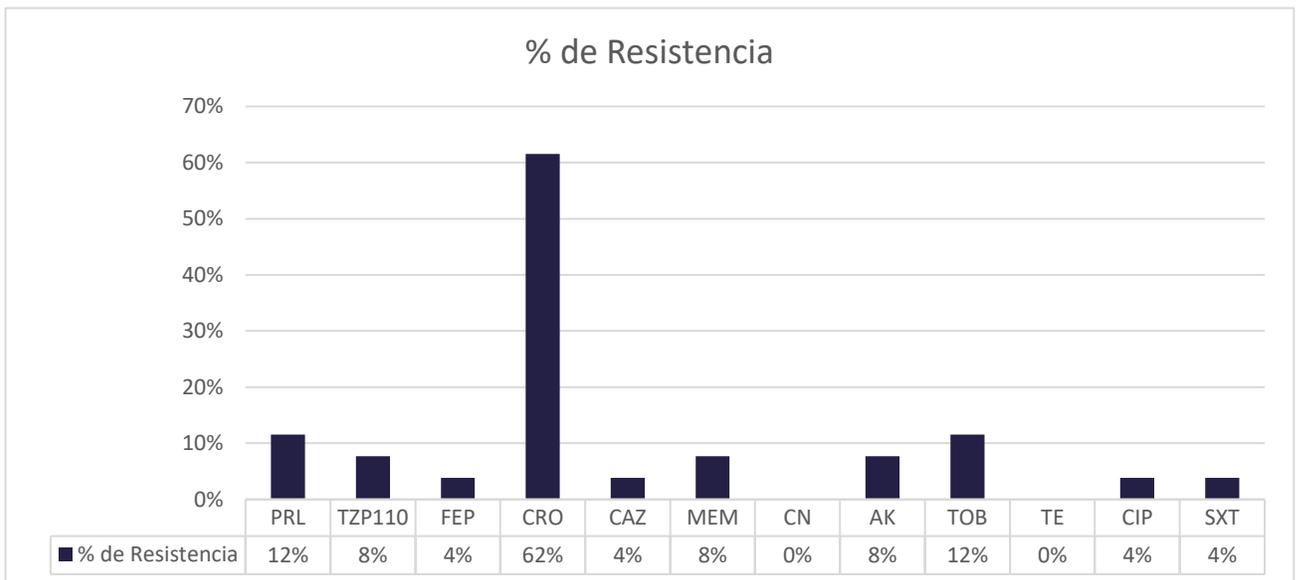
El 100 % de las cepas y las réplicas estudiadas mostraron sus características de crecimiento típicas en los medios sólidos manifestando una viabilidad y pureza adecuada.

### **8.2 Etapa 2: Sensibilidad antimicrobiana**

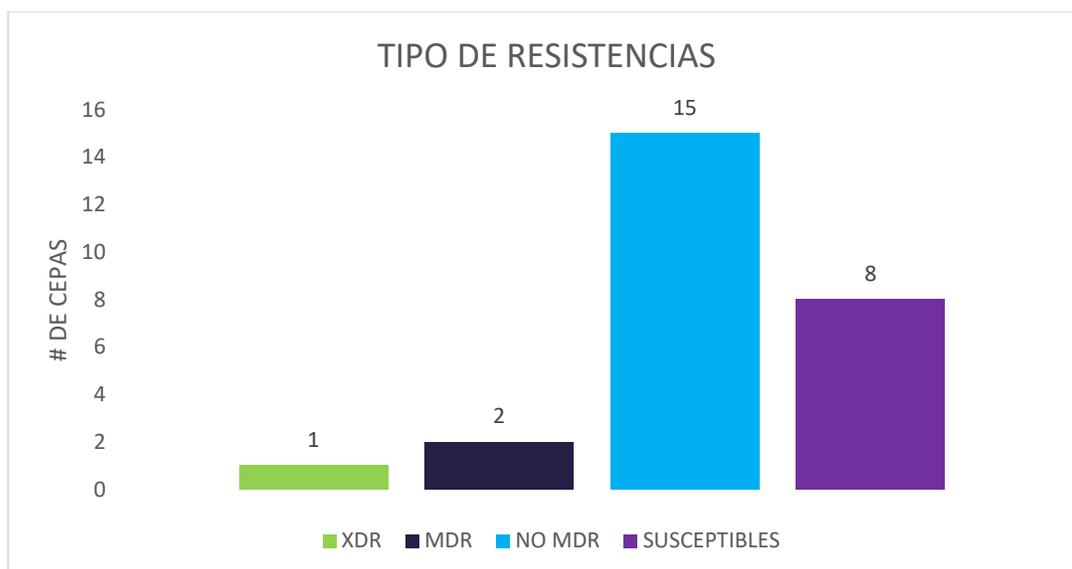
En la prueba de sensibilidad se valoraron las cepas con las familias de antibióticos mostrados anteriormente; ya que se ha demostrado que *A. baumannii* puede tener resistencia intrínseca a Ampicilina se expuso a este antibiótico, donde casi el 50% de las cepas expresaba una resistencia a Ampicilina (AMP) (Figura 5), una mayor resistencia se dirigió a Ceftriaxona (CRO), por su parte la resistencia menor se observó con Piperacilina (PRL), Piperacilina-Tazobactam (TZP110), Cefepima (FEP), Ceftazidima (CAZ), Meropenem (MEM), Amikacina (AK), Tobramicina (TOB), Ciprofloxacino (CIP) y Trimetoprim con Sulfametoxazol (SXT), mientras que a Tetraciclina (TE) y Gentamicina (CN) no se observó resistencia (Figura 6). También se clasificaron las resistencias según los criterios de Magiorakos y cols., 2012, con la modificación de que las cepas con resistencia a uno o dos antibióticos de una o dos diferentes categorías de antibióticos, se les denominó como NMDR (No Multirresistente) (Figura 7).



**Figura 5: Susceptibilidad a Ampicilina.** Del total de cepas, se muestran cuantas de ellas presentan una resistencia y susceptibilidad a Ampicilina.



**Figura 6: Resultados de la susceptibilidad a antibióticos.** En el gráfico se muestran cual es el porcentaje de cepas susceptible a cada antibiótico evaluado.



**Figura 7: Gráfica representativa del tipo de resistencias identificadas.** Con respecto al total de 26 cepas, se muestran el número de cepas de acuerdo con el tipo de resistencia que presenta, o en su caso, al número de cepas susceptibles clasificado según Magiorakos y cols., 2012

### 8.3 Etapa 3: Caracterización de las cepas

Del total de las 26 cepas evaluadas, en la tabla 8 se muestran las positivas y negativas tanto para el ensayo de adherencia como de invasividad, mientras que en la tabla 9 se clasifican las cepas adherentes e invasivas de acuerdo con la escala mencionada en la metodología, además de que en la figura 8 se gráfica cuantas cepas con algún tipo de resistencia presenta adherencia y/o invasividad; y en la figura 9 se relaciona por medio de un diagrama de Venn las capacidades de la cepas. Por otro lado, también se muestran fotografías de laminillas en las que se observan la adherencia e invasividad dadas por las cepas en las figuras 10, 11 y 12.

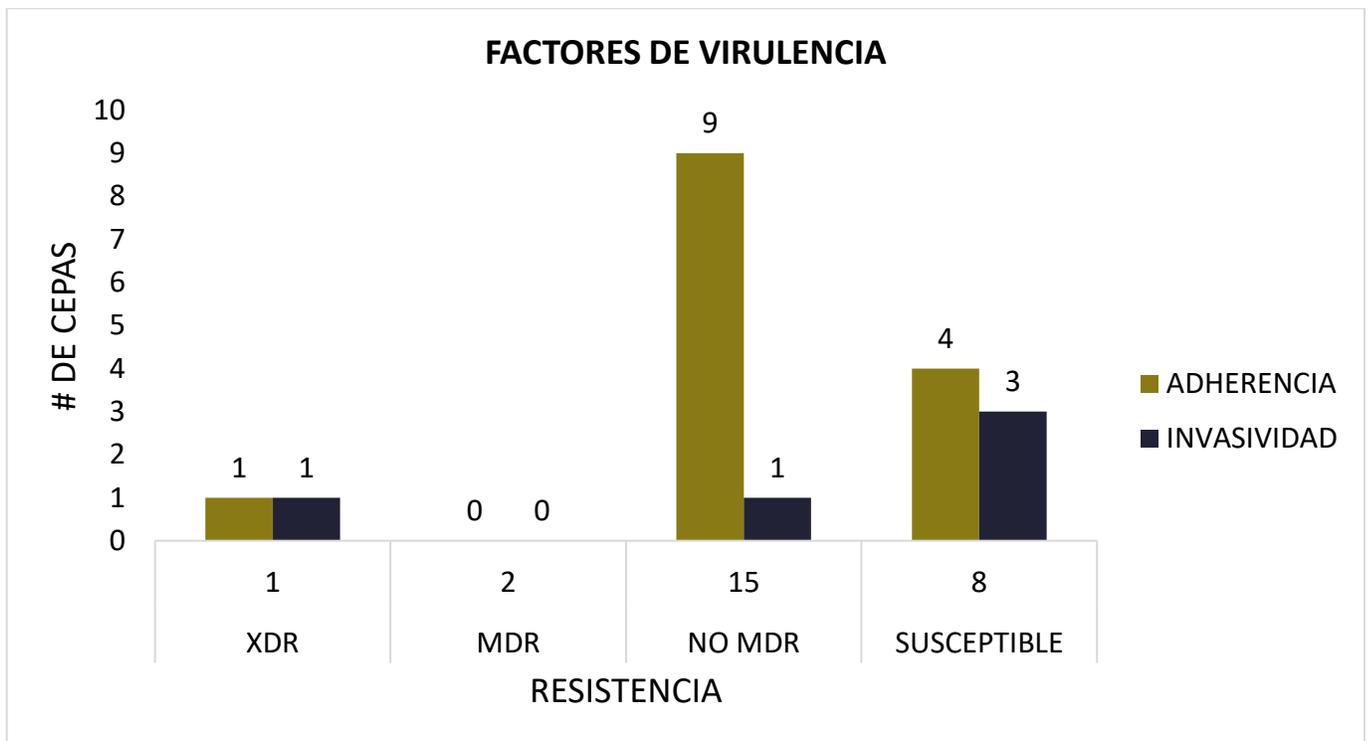
**Tabla 8: Conteo de cepas sometidas al ensayo de adherencia e invasividad.** Del total de 26 cepas, se realizó el recuento de cepas positivas o negativas al ensayo de adherencia e invasividad.

	ADHERENCIA	INVASIVIDAD
POSITIVO	15	5
NEGATIVO	11	21

**Tabla 9: Escala cualitativa de cepas positivas al ensayo de adherencia e invasividad.** Se muestran el número de cepas de *A. baumannii* basados en nuestra escala cualitativa tomando en cuenta las bacterias contables; escasa + (5 - 15), moderada ++ (16-50), abundante +++ (>51 – incontable).

		ADHERENCIA	INVASIVIDAD
POSITIVO	+	2	0
	++	5	0
	+++	7	5
DC		1	0

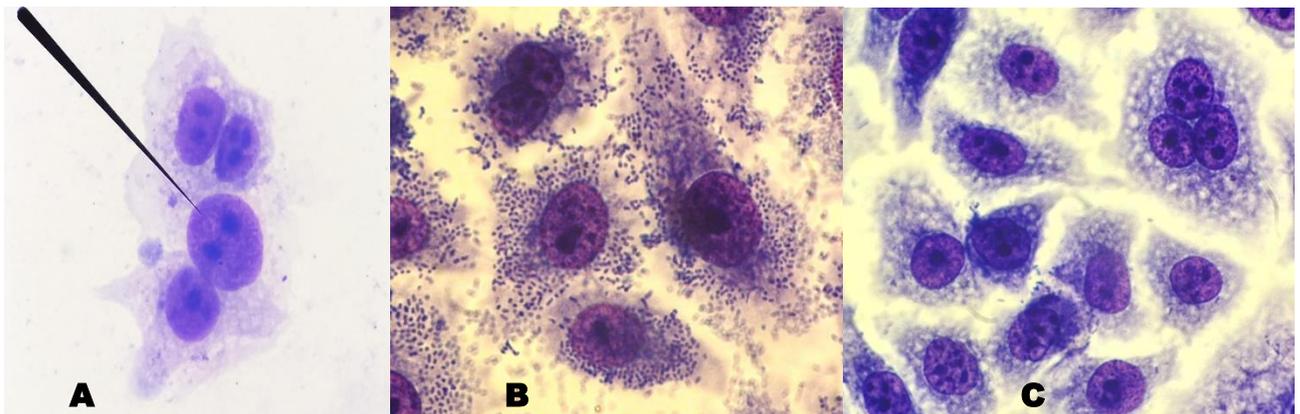
DC: desprendimiento celular.



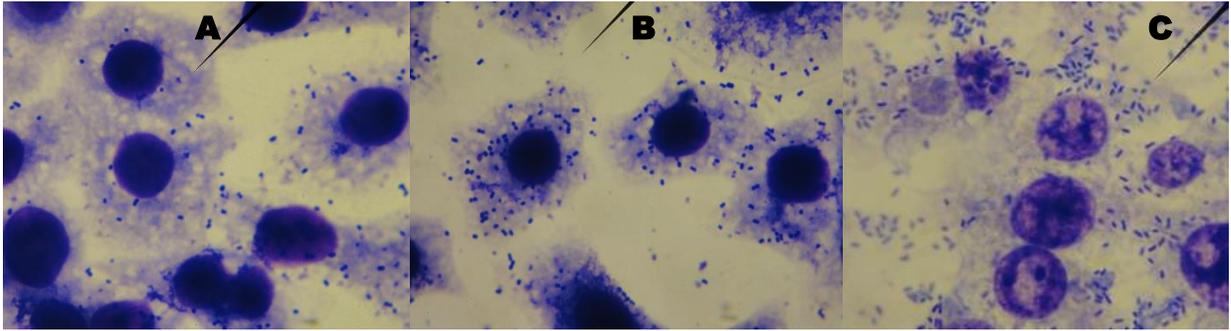
**Figura 8: Relación entre cepas de *A. baumannii* de acuerdo con el mecanismo de virulencia evaluado.** Se muestra la capacidad de adherencia e invasividad que presentan las cepas de acuerdo con el tipo de resistencia que tienen, en la que se observa claramente que las cepas no multirresistentes presentan una mayor adherencia.



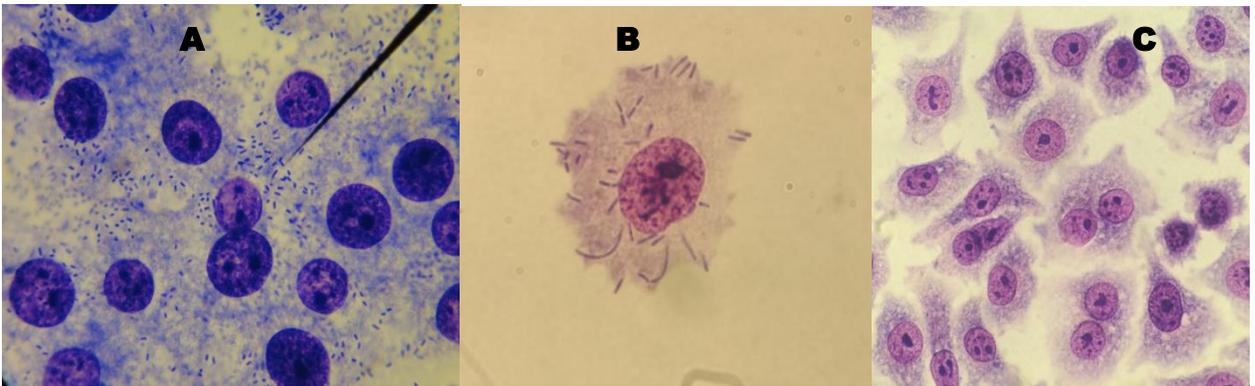
**Figura 9: Diagrama de Venn que muestra la relación entre mecanismos de virulencia.** De acuerdo con los mecanismos de virulencia evaluados, se asocian entre ellas para conocer cuantas de cepas de *A. baumannii* pueden expresar dos o más factores de virulencia al mismo tiempo.



**Figura 10: Prueba negativa a la capacidad de adherencia en cepa en *A. baumannii* (A), comparándolo con el control positivo (B) y negativo (C).** Se usó como control positivo *E. coli* 47966 y como control negativo *E. coli* K-12.



**Figura 11: Ejemplos de cepas de *A. baumannii* con adherencia positiva a células HEp-2 de acuerdo con la escala cualitativa. A) Escasa. B) Moderada, C) Abundante**



**Figura 12: Ejemplo de invasión a células HEp-2 de una cepa de *A. baumannii*. (A) La cepa ejemplificada fue evaluada con invasividad abundante en la escala cualitativa, en (B) se observa *Shigella boydii* ATCC 12030 como control positivo, y (C) *E. coli* K-12 como control negativo.**

## 9 Análisis de resultados

Con respecto a los resultados obtenidos podemos analizar que, no hubo ningún inconveniente con la recuperación y manipulación de las cepas trabajadas, pues conservaron la morfología colonial característica que *A. baumannii* presenta.

En tanto la susceptibilidad antimicrobiana, hubo variación en comparación con las bibliografías reportadas para la resistencia intrínseca, ya que de las cepas aisladas de hemocultivo en pacientes pediátricos la resistencia en Ampicilina fue del 46% (Figura 5), un 12% a Piperacilina, el 4% a Ceftazidima (Figura 6) y el resto no presentó una resistencia intrínseca, no obstante, la resistencia a ceftriaxona fue del 62% siendo notoriamente mayor comparado con los demás antibióticos, además de no presentar resistencia a gentamicina ni tetraciclina (Figura 6), coincidiendo así con lo reportado en bibliografía. Por otro lado, del total de cepas de *A. baumannii* evaluadas solo tres fueron categorizadas como multidrogorresistente y extensivamente drogorresistente, donde las cepas consideradas como MDR llegaron a presentar resistencia a AMP, PRL, TZP110, CRO y MEM, mientras que la cepa considerada como XDR tuvo resistencia a AMP, PRL, TZP110, FEP, CRO, CAZ, MEM, AK, TOB, CIP y SXT; el resto de cepas que presentaron resistencia pero no MDR se denominaron No Multidrogorresistentes (NMDR), debido a que solo fueron resistentes a uno o dos antibióticos y por consiguiente no entraban en las categorías estimadas (Figura 7).

Por otro lado, como era de esperarse algunas cepas de *A. baumannii* mostraron la capacidad de adherencia e invasividad (Figuras 12 y 13), por lo cual en los ensayos se establecieron criterios para clasificar a las cepas de como positivas y su escalada cualitativa, o negativas (Tabla 9), así mismo

se realizó un conteo de las cepas positivas y negativas para ambos ensayos (Tabla 8), donde 15 de las 26 cepas evaluadas presentaron adherencia a las células HEp-2 y cinco de las 21 fueron positivas para el ensayo de invasividad.

Finalmente se relacionaron las capacidades de adherencia e invasividad, así como la categoría de resistencia que las cepas de *A. baumannii* presentaban, con la intención de conocer cuántas cepas podían expresarse al mismo tiempo los diferentes mecanismos de virulencia evaluados (Figuras 8 y 9).

## 10 Discusiones

Los patrones de sensibilidad a los antimicrobianos pueden variar en función de factores ambientales, del tiempo de evolución de la endemia o epidemia y de las distintas políticas de uso de antimicrobianos en los hospitales. Actualmente, en lugares endémicos, la mayoría de las cepas de *A. baumannii* son resistentes a los aminoglucósidos, ureidopenicilinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas, y no tienen indicación estos antimicrobianos en el tratamiento empírico de infecciones en las que se sospeche la presencia de *A. baumannii*. El tratamiento empírico de las infecciones por *Acinetobacter spp* reviste a veces un grave problema debido a la frecuente y cambiante aparición de resistencias, y además por la gravedad clínica y el bajo índice de sospecha (Garnacho-Montero , 2004).

Las cepas aisladas de hemocultivo en pacientes pediátricos no mostraron una multirresistencia esperada, ya que solo una de las 26 cepas evaluadas es XDR y dos fueron MDR, sin embargo 15 presentan resistencia al menos a un antibiótico en pacientes desde RN hasta de 12 años, esto podría deberse a que en este tipo de pacientes se mantienen mayor control en la administración y la constante la exposición previa a antimicrobianos para prevenir la resistencia en los tratamientos, aunque también debe considerarse que dependiendo del biotipo de *A. baumannii* puede variar la expresión de genes y con ello la resistencia que manifieste a ciertos antibióticos (Garnacho-Montero , 2004; Rada-Cuentas; 2016).

La resistencia intrínseca a ceftazidima y a piperacilina que puede presentar *A. baumannii* está dada a la hiperproducción de la enzima ADC, una cefalosporinasa tipo AmpC no inducible y si esta enzima

se expresa en bajo nivel entonces será resistente a ampicilina, y en este caso solo el 4% es resistente a este ceftazidima, 12% a piperacilina, y el 42% fue resistente a ampicilina, dado que la sobreexpresión o baja expresión de ADC está mediada por la presencia de secuencias de inserción que contienen promotores que favorecen la transcripción del gen *ISAba1* e *ISAba125*, se puede inferir que solo algunas cepas de *A. baumannii* contenían este gen mientras que el resto carecían de gen o no estaban siendo expresados debido a los factores ambientales en las que se desarrolló la infección (Venegas-Múñera y cols., 2014).

A pesar de que la adherencia es el proceso inicial para establecer una infección, existen pocos estudios que aborden este fenómeno en pacientes pediátricos con un curso de sepsis, la mayoría de estos se han centrado en la multirresistencia y la frecuencia de *A. baumannii* en aislamientos por neumonía, y de adhesinas en cepas ATCC; el 54% de las cepas estudiadas mostraron adherencia a células HEp-2 y aunque no se encontró algún patrón de adherencia como las estudiadas en *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*, esta capacidad refleja una estrategia importante para su adaptación en el epitelio para posterior infección; También se evaluó la invasividad, en la cual se encontró que solo el 19% de las cepas con adherencia tienen esta capacidad, y esto da cabida para estudiar el mecanismo de adherencia e invasividad que estas cepas clínicas aisladas de hemocultivo presentan, y compararlo con otros estudios en cepas ATCC (Ramírez-Sandoval y cols., 2013; Duarte-Escalante y cols. 2016; Martínez-Hernández y cols., 2016; Tomaras y cols., 2003; Tomaras y cols., 2008; Martínez y cols., 2005; Riveros y cols., 2011).

Un estudio ha demostrado que en *A. baumannii* hay una correlación entre la resistencia a los antibióticos y la capacidad de adherencia en superficies abióticas y bióticas, lo cual podría contribuir a la sobrevivencia de este microorganismo y su diseminación en el entorno hospitalario, dada esta asociación, se logró correlacionar que de las 14 cepas que presentan la capacidad de adherencia, por un lado, 10 tienen un tipo de resistencia a antibióticos, y por el otro, cinco de ellas tienen la capacidad de invadir células HEp-2, de estas últimas, solo dos cepas presentan un tipo de resistencia antimicrobiana, y finalmente del total de las 26 en estudio, únicamente dos cepas manifestaron los tres mecanismos de virulencia al mismo tiempo, lo que sugiere que hay una baja incidencia de cepas con esta última particularidad (Tomaras y cols., 2003).

## 11 Conclusiones

- Se evaluó la capacidad de adherencia e invasividad de las cepas en estudio, demostrándose que el 64% de ellas pueden presentar adherencia sin invasividad, y el 36% una adherencia con invasividad causando una infección severa en pacientes pediátricos.
- Se mostró que *A. baumannii* tiene la capacidad de multidrogorresistencia a antibióticos, no obstante, en nuestras cepas no fue la esperada en comparación con otros autores en las que la multidrogorresistencia es alta, dejando así en claro que factores ambientales, los criterios de tratamiento y principalmente el biotipo y genes de patogenicidad son determinantes en la susceptibilidad a los antibióticos.

## 12 Perspectivas

- Identificación molecular de las cepas, para observar si hay alguna relación entre el biotipo de *A. baumannii* y sus mecanismos de virulencia.
- Realizar prueba de susceptibilidad a antimicrobianos en cepas de infecciones recientes (del 2017 a la actualidad) con *A. baumannii* aisladas de hemocultivos en pacientes pediátricos del INP para demostrar el crecimiento en la resistencia.
- Conocer las moléculas involucradas y expresadas en los mecanismos de adherencia e invasividad en las cepas de *A. baumannii* que fueron positivas para dichos ensayos.

## 13 Bibliografía

- Almasaudi, S. B. (2018). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Scien*, 25, 586–596.
- Álvarez Fraga, L. (2018). Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. España: Programa de doctorado en Biología Celular y Molecular. Universidad de Coruña.
- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., & Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 54(1), 20-4. Obtenido de [http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista\\_medica/article/view/227/618](http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/view/227/618)
- Asif, M., Alvi, I. A., & Rehman, S. U. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect Drug Resistance*, 11, 1249–1260.
- Barletta Farías, R. C., Pérez Ponce, L. J., Castro Vega, G., Pujol Pérez, M., Barletta del Castillo, J. E., Dueñas Pérez, Y. (2018). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. *Medisur*, 16 (2), 322-334.
- Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2015). *Enfermedades Infecciosas: Principios y práctica* (8va ed.). ELSEVIER.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V. (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectrum*, 3(4), 1-27.
- Bhargava, N., Sharma, P., & Capalash, N. (2010). Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol*, 36(4), 349–360.
- Bruhn, C. J., Pairumani, M. R., & Hernandez, P. G. (2011). Manejo del paciente en Shock séptico. *Rev Med Clin CONDES*, 22(3), 293-301.
- Bush K, & Jacoby GA. (2010). MINIREVIEW: Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(3), 969–976.

- Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., & Snyder, M. (2010). Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1-14.
- Cano, M. E., Domínguez, M. Á., Ezpeleta, C., Padilla, B., Ramírez de Arellano, E., & Martínez-Martínez, L. (2008). Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26(4), 220-229.
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2007). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Obtenido de Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>
- Choi, C. H., Hyun, S. H., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Lee, J. C. (2008). Nuclear translocation and DNase I-like enzymatic activity of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. *FEMS Microbiol Lett*, 288, 62-67. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01323.x
- Choi, C. H., Hyun, S. H., Lee, J. Y., Lee, J. S., Lee, Y. S., Kim, S. A., Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*, 10(2), 309-319.
- Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I., & Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *Bio Med Central*, 8, 216-226.
- Díaz-Jiménez, V. (2010). *Acinetobacter baumannii*: actualidades. *Rev Enf Infec Ped*, 23(92), 104-5.
- Duarte-Escalante, E., Reyes-Montes, M., Cureño-Díaz, M., Acosta-Altamirano, G., Martínez-Herrera, E., & Frías-De León, M. G. (2016). Variabilidad genética de *Acinetobacter baumannii* en un hospital de la Ciudad de México. *Rev Hosp Jua Mex*, 83(4), 129-135.
- Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(6), 402-409.
- Fernández-Cuenca, F., López-Cortés, L. E., & Rodríguez-Baño, J. (2011). Contribución del laboratorio de microbiología en la vigilancia y el control de brotes nosocomiales producidos por bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(Supl 3), 40-45.

- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Claverie, J. M. (2006). Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genetics*, 2(1), 62-72.
- França, R. O., Costa, P. S., Milanez, G. L., Bomfim, M. R., Gonçalves, R., Farias, L. M., Santos, S. G. (2018). Molecular association of pathogenicity and resistance to multiple antimicrobials in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from patients with diverse infectious diseases. *J Bras Patol Med Lab*, 54(5), 288-295.
- Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*, 4(3), 273-278.
- García, H., Torres-Gutiérrez, J., Peregrino-Bejarano, L., & Cruz-Castañeda, M. A. (2015). Factores de riesgo asociados a infección nosocomial (IN) en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) de tercer nivel. *GACETA MÉDICA DE MÉXICO*, 711-719.
- García-Rada, G., Damiani, E., Copa, H., Ruiz, E., Santalla, J., Revollo, C., Mamani, A. (2015). Huellas digitales de cepas de *Acinetobacter baumannii* procedentes de pacientes hospitalizados en la Caja Petrolera de Salud de Obrajés, mediante el método de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). *J Selva Andina Res Soc*, 8(1), 83-89.
- Garnacho-Montero, J. (2004). Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por *Acinetobacter spp.* *REMI*, 4(6), 1-9.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., & Ursing, J. (1991). Reliability of Phenotypic Tests for Identification of *Acinetobacter* Species. *J Clin Microbiol*, 29(2), 277-282.
- Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse & Timothy A. Mietzner (2014). *Microbiología médica* (26va ed.) Capítulo 9: Patogenia de la infección bacteriana. *Medicina*. McGraw-Hill Medical.
- González-Villalobos, E. (2019). Tesis doctoral: Efecto de fagos líticos en cepas de *Escherichia coli* uropatógena multiresistentes, adherentes y formadoras de biopelícula. CDMX: Instituto Politécnico Nacional.
- Hernández-Torres, A., García-Vázquez, E., Yagüe, G., & Gómez-Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter*, 23(1), 12-19.

- Hospitales de la Red del PUCRA. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México. Ciudad de México: PUCRA.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 3(3), 243-250. doi:10.4161/viru.19700
- Huang, Y. C., Su, L. H., Wu, T. L., Leu, H. S., Hsieh, W. S., Chang, T. M., & Lin, T. Y. (Diciembre de 2012). Outbreak of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a neonatal intensive care unit: clinical implications and genotyping analysis. *Pediatr Infect Dis J.*, 21(12), 1105-9. doi:10.1097/00006454-200212000-00004
- Joly-Guillou, L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*, 11, 868–873.
- Kenneth, J. R., & Ray, C. G. (2017). Microbiología medica de Sherris (6ta ed.). EE.UU.: McGraw-Hill.
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 580-592.
- Lázaro-Díez (2018). Tesis Doctoral: Interacciones clave hospedador-patógeno en especie de *Acinetobacter* de relevancia clínica. Santander: Universidad de Cantabria.
- Lázaro-Díez, M., Chapartegui-González, I., Redondo-Salvo, S., Leigh, C., Merino, D., San Segundo, D., Ramos-Vivas, J. (2017). Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*. *Scientific Reports*, 7(4571), 1-11. doi:10.1038/s41598-017-04870-8
- Lee, J. C., Koerten, H., Broek, P., Beekhuizen, H., Wolterbeek, R., Barselaar, M., Dijkshoorn, L. (2006). Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *ELSEVIER*, 157, 360–366.
- Liu, D., Liu, Z.-S., Hu, P., Hui, Q., Fu, B.-Q., Lu, S.-Y., Ren, H.-L. (2016). Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China. *Microbiol Immunol*, 60, 533–539.
- Loehfelm, T. W., Luke, N. R., & Campagnari, A. A. (2008). Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. *J Bacter*, 190(3), 1036–1044.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an

- international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18, 268–281.
- Marcos, M. A. (2000). *Acinetobacter baumannii*. España: Departamento de Microbiología y Parasitología. Hospital Clínica. Universidad de Barcelona.
- Martínez, F., Gómez, S., Rodríguez, P., Páez, J., Urbina, G., & Ortiz, B. (2005). *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas de niños con diarrea: adherencia y citotoxicidad en líneas celulares. *Redalyc*, 25(2), 236-243.
- Martínez-Hernández, E., Sánchez-Velázquez, L. D., & Rodríguez-Terán, G. (2016). *Acinetobacter baumannii*, un patógeno emergente: estudio prospectivo en una unidad de terapia intensiva respiratoria. *Rev Asoc Mex Med Crit Ter Int*, 30(3), 187-191.
- Martínez-Herrera, E., Esteves-Jaramillo, A., Tenorio Barragán, I., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barrón, D., & Arenas-Guzmán, R. (2008). Frecuencia de aislamientos microbiológicos en hemocultivos de pacientes internados en un hospital de segundo nivel de la ciudad de México. *Medigraphic: Med Int Mex*, 24(5), 338-41.
- Martínez-Izquierdo, A. M., & Pérez-Amarillo, J. I. (2001). *Acinetobacter* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. En A. Llop-Hernandez, M. M. Váldez-Dapena Vivanco, & J. L. Zuazo-Silva, *Microbiología y Parasitología Médicas: Tomo I* (págs. 313-323). La Habana: Ciencias Médicas.
- Matínez-Miranda, H. A., Balam-Romero, J. B., & Dzul-Rosado, K. R. (2019). Importancia de las proteínas OmpA y OmpB en el desarrollo de vacunas contra la Rickettsiosis. *Biomédica*, 30(2), 73-81.
- Mesli, E., Rolain, J. M., Berrazeg, M., Drissi, M., & Bekkhoucha, S. N. (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *ELSEVIER: International Journal of Infectious Diseases*, 17, e739–e743.
- Molina-López, J., López-Matínez, R., & Sánchez-Vega, J. T. (2019). *Microbiología y Parasitología Médicas de Tay* (5ta ed.). Ciudad de México: MÉNDEZ EDITORES.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2014). *Microbiología médica* (7ma ed.). Barcelona: ELSEVIER.

- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., J.K, T., Reijden, V., Deschaght, P., Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly Ac. ELSEVIER: *Research in Microbiology/Institute Pasteur*, 393-404.
- Nodarse-Hernandez, R., & Fuente-Calvo, M. E. (2015). Identificación fenotípica de cepas de *Acinetobacter* circulantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44(1), 33-40.
- Oliveros-López, M. D., Parra-Millán, R., Pachón, J., & Smani, Y. (2015). Papel del Factor de Transcripción EB (TFEB) en la entrada de *Acinetobacter baumannii* en el huésped. *Biosaia*, 4.
- Opazo-C, A., Mella-M, S., Domínguez-Y, M., Bello-T, H., González-R, G., (2009). Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Rev Chil Infect*. 26 (6), 499-503.
- Pakharukova, N., Tuittila, M., Paavilainen, S., Malmi, H., Parilova, O., Teneberg, S., Zavialov, A. V. (2018). Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *PNAS*, 115(21), 5558–5563.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(3), 538–582.
- Penwell, W. F., Arivett, B. A., & Actis, L. A. (2012). The *Acinetobacter baumannii* entA Gene Located Outside the Acinetobactin Cluster Is Critical for Siderophore Production, Iron Acquisition and Virulence. *PLoS ONE*, 7(5), e36493.
- Pérez-Cano, H. J., & Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *MD (Revista Médica)*, 4(3), 186-191.
- Peters, N. K., Dixon, D. M., Holland, S. M., & Fauci, A. S. (2008). The Research Agenda of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases for Antimicrobial Resistance. *JID*, 197, 1087-1093.
- Picazo, J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Obtenido de Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

- Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2006). Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*, 124, 715-727.
- Polanco, N., Méndez, K., Flores, I., & Coronel, P. (2012). *Acinetobacter baumannii*: Nuevo agente enterotoxigénico, aislado de niños con diarrea aguda. *VITAE*(51), 1-9.
- Pournaras, S., Poulou, A., Dafopoulou, K., Chabane, Y. N., Kristo, I., Makris, D., Dé, E. (2014). Growth Retardation, Reduced Invasiveness, and Impaired Colistin-Mediated Cell Death Associated with Colistin Resistance Development in *Acinetobacter baumannii*. *American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 828 – 832.
- Rada-Cuentas, J. (2016). *Acinetobacter* un patógeno actual. *Rev Soc Bol Ped*, 55 (1), 29 - 48.
- Ramalingam, K., & Lee, V. (2019). Biotic and abiotic substrates for enhancing *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: New approach using extracellular matrix and slanted coverslip technique. *J. Gen. Appl. Microbiology*, 65, 64–71.
- Ramirez-Sandoval, M. P. (2013). *Acinetobacter baumannii* y resistencia a los antimicrobianos en un hospital de segundo nivel de la ciudad de México. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 26(104), 300-306.
- Ramírez-Sandoval, M. P., Aranza-Aguilar, J. L., Varela-Ramírez, M. A., García-González, A., Vélez-Castro, G., Salcedo-Romero, R., Moreno-Pérez, F. J. (2013). Brote de infección nosocomial de vías respiratorias bajas por *Acinetobacter baumannii* en un servicio de Medicina Interna de un hospital general de la Ciudad de México. *Med Int Mex*, 29, 250-256.
- Ramalingam, K., & Lee, V. (2019). Biotic and abiotic substrates for enhancing *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: New approach using extracellular matrix and slanted coverslip technique. *J Gen Appl Microbiol*, 65, 64–71.
- Rathinavelu, S., Zavros, Y., & Merchant, J. (2005). *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. *Microbes and Infection* 5 , 651–657.
- Reyes-Sáenz, R. A. (2017). Prevalencia, sensibilidad y resistencia de las cepas bacterianas de *Acinetobacter baumannii*, *A. junii* y *A. lwoffii* multirresistente utilizando los registros del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” en el periodo del año 2012 a 2016. Managua: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.

- Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E. H., Contreras, C., Ochoa, T. J. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(1), 21-28.
- Rumbo-Feal, S. (2018). Transcriptional analysis reveals new factors involved in the biofilm formation ability of "*Acinetobacter baumannii*". Coruña: Universidad de Coruña. Obtenido de Dialnet: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=173693>
- Salazar de Vegasa, E. Z., & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter spp.*: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Venezuela.
- Sansonetti, P. J., & Egile, C. (1998). Molecular bases of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 191-197.
- Silva, G., & López, H. (2012). Genes involved Pathogenesis, persistence, excretion of *Salmonella* in animal models. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 2(1225), 107-122.
- Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., & Actis, L. A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, 149, 3473–3484.
- Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*, 154, 3398–3409.
- Trigo-Tasende, N. (2018). Sistema de biosíntesis de acinetobactina en *Acinetobacter baumannii*. Implicación en virulencia y caracterización de nuevas dianas terapéuticas. *Trabajo de Fin de Máster*. Universidad de Coruña.
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*, 258, 72-77. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x
- Venegas-Múñera, J. M., Roncancio-Villamil, G., & Jimenez-Quiceno, J. N. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28(2), 233-246.

- Vidal, R., Dominguez, M., Urrutia, H., Bello, H., García, A., Gonzalez, G., & Zemelman, R. (1997). Effect of imipenem and sulbactam on sessile cells of *Acinetobacter baumannii* growing in biofilm. *Microbios*, *91*, 79-87.
- Vila, J., Martí, S., & Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrobial Chemotherapy*, *59*, 1210–1215.
- Vila, J., Mensa, J., & Soriano, A. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *26*(1), 48-55.
- Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSalPlus*, 1-37.
- Zimble, D. L., Penwell, W. F., Gaddy, J. A., Menke, S. M., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., & Actis, L. A. (2009). Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals*, *22*, 23-32.
- Zúñiga-Bahamon, A., Tobar, F., Duque, J. F., & Moreno, P. (2013). *Acinetobacter baumannii*: Resistencia y Virulencia mediada por el Sistema de Secreción Bacteriano Tipo IV. *Revista estomatol. salud*, *21*(2), 37-45. doi:10.25100/re.v21i2.5764

## 14 Glosario

GENOESPECIE: Especie considerada en función de criterios genéticos. La especie como conjunto reproductor natural mantiene unas características hereditarias comunes. En el intercambio de genes se presentan normalmente diversos factores (geográficos, etológicos, fisiológicos, etc.).

ADHERENCIA: Proceso por medio del cual las bacterias se unen a las superficies de las células hospederas.

BACTERIOCINAS: Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana, segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores. Generalmente, estos péptidos actúan sobre la membrana celular. Existe una gran diversidad de bacteriocinas reportadas en la mayoría de las especies bacterianas, e incluso dentro de una misma especie podrían producirse distintos tipos de bacteriocinas. La acinetobactina es una bacteriocina secretada por *A. baumannii*.

FILOPODIOS: Protuberancias finas, similares a espigas, que contienen filamentos de actina que sirven para detectar el entorno local pero también para detectar y retener bacterias durante la fagocitosis.

INVASIVIDAD/INVASIÓN: Proceso a través del cual las bacterias penetran en las células hospederas y por consecuente se diseminan dentro del organismo.

TRAQUEOSTOMÍA: Procedimiento quirúrgico realizado con objeto de crear una abertura dentro de la tráquea, a través de una incisión ejecutada en el cuello, y la inserción de un tubo o cánula para facilitar el paso del aire a los pulmones.