



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**  
INFECTOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRAN

Análisis Clínico y Molecular de las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

**TESIS DE POSGRADO**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN MEDICINA (INFECTOLOGÍA)

PRESENTA  
DR. CAMILO QUIROGA VERGARA

TUTORES DE TESIS  
DR GUILLERMO M. RUIZ-PALACIOS Y SANTOS  
DR ALFREDO PONCE DE LEON GARDUÑO

MEXICO DF, NOVIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# **Análisis Clínico y Molecular de las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán”**

| <b>Índice</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Antecedentes</b>   | 4             |
| Mecanismos de Resistencia Antibiótica en <i>Acinetobacter baumannii</i>           | 5             |
| Impacto de la infección por <i>Acinetobacter baumannii</i> en desenlaces clínicos | 7             |
| Opciones Terapéuticas   | 8             |
| Definición de Multidrogo-resistencia  | 10            |
| Epidemiología e identificación molecular  | 12            |
| <b>Justificación del Estudio</b>  | 17            |
| <b>Objetivos</b>  | 18            |
| Objetivo General  | 18            |
| Objetivos Específicos   | 18            |
| <b>Diseño del Estudio</b>   | 19            |
| Población de Estudio  | 19            |
| Tamaño de Muestra   | 19            |
| Criterios de Inclusión  | 19            |
| Criterios de Eliminación  | 20            |
| Criterios de Exclusión  | 20            |
| Microbiología   | 20            |
| Métodos   | 20            |
| Análisis Estadístico  | 22            |
| <b>Resultados</b>   | 23            |
| Análisis Molecular  | 23            |

|                     |    |
|---------------------|----|
| Análisis Clínico    | 37 |
| <b>Discusión</b>    | 43 |
| <b>Perspectivas</b> | 46 |
| <b>Anexos</b>       | 47 |
| <b>Bibliografía</b> | 57 |

# Análisis Clínico y Molecular de las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

## Antecedentes

La presencia de gérmenes multidrogo-resistentes en los diferentes ámbitos hospitalarios es un problema frecuente. La colonización de salas generales y áreas de cuidado intensivo condicionan un riesgo de transmisión de forma epidémica de dichos patógenos, con el subsecuente aumento en la morbilidad, mortalidad, costos de atención y aumento en el tiempo de hospitalización.

Dentro de estos microorganismos, se encuentran las diferentes especies de *Acinetobacter*, destacándose en este género, el complejo *A. Calcoaceticus*–*A. Baumannii*, constituyéndose desde los años 80s como uno de los patógenos con mayor potencial de multidrogo-resistencia, al tener la capacidad de adquirir y acumular determinantes de resistencia, causante de múltiples infecciones intrahospitalarias como neumonía, infecciones de tejidos blandos, meningitis, infección urinaria, bacteriemia entre otros.

La mayoría de aislamientos de *Acinetobacter* spp. Proviene de especímenes clínicos, sin embargo también se han aislado de muestras provenientes del medio ambiente o como microorganismos saprofitos de individuos provenientes de la comunidad. Algunos estudios europeos han evidenciado la presencia de *Acinetobacter lwoffii* como especie colonizante principal de la piel de individuos sanos, sin embargo también se han identificado otras especies como *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter johnsonii* y *Acinetobacter radioresistens* en menor proporción<sup>2,3</sup> Sin embargo, se considera que la colonización asintomática en la comunidad es rara, al igual que su presencia en el medio ambiente tiene una prevalencia baja. Sin embargo su presencia en hospitales puede seguir una presentación endémica o epidémica, proviniendo de una o múltiples fuentes y con diferencias en el comportamiento epidemiológico, dependiendo de la cepa.<sup>1</sup>

Adicionalmente, *Acinetobacter* spp. Puede sobrevivir en ambientes hospitalarios por largo tiempo, resistiendo a la desecación y su transmisión intrahospitalaria puede darse a partir de un paciente fuente con transmisión por secreciones respiratorias, descamación de la piel, o de manera más importante, a través de las manos del personal de salud.<sup>1</sup>

Los factores de riesgo para la presentación de infecciones por especies de *Acinetobacter* son comunes a los factores descritos para colonización/ infección por otros gérmenes multidrogo-resistentes, incluyendo cirugía mayor, trauma, quemaduras severas, estancia prolongada intrahospitalaria, estancia en unidades de cuidado intensivo, ventilación mecánica, presencia de dispositivos intravasculares, catéteres y sondas de drenaje, el número de procedimientos quirúrgicos, uso previo de antibióticos<sup>4</sup> y más recientemente se han documentado como causantes de infecciones de heridas traumáticas incluyendo osteomielitis en personal militar en áreas de conflicto en el medio oriente y Afganistán.<sup>5,6</sup>

Dentro de las características biológicas más importantes de las diferentes especies

de *Acinetobacter* relacionadas con patogenicidad se incluyen la capacidad de expresar multidrogo resistencia, formación de “biofilm” y su capacidad de supervivencia prolongada en piel y mucosas . Se han identificado al menos 16 islas genómicas que contienen múltiples genes de virulencia que están relacionados con síntesis de la membrana plasmática, resistencia antibiótica, capacidad de producción de “biofilm” , síntesis de lípidos, adquisición de hierro, citotoxicidad e inducción de inmunoestimulación, entre otros. Adicionalmente, la secuencia de colonización y supervivencia al medio ambiente hospitalario, colonización del paciente y subsiguiente presentación de infección, evidencia la extraordinaria capacidad de adaptación a condiciones cambiantes, lo que sugiere la presencia de mecanismos de respuesta al estrés adicionales, que en conjunto con la extensa capacidad de resistencia a antibióticos, explica el éxito como colonizante y patógeno nosocomial.<sup>1</sup>

### **Mecanismos de Resistencia Antibiótica en *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* es considerado como uno de los patógenos intrahospitalarios mas importantes debido a su extensa capacidad de resistencia antimicrobiana y la documentación de cepas resistentes a todos los antimicrobianos disponibles <sup>7</sup> . Este microorganismo es intrínsecamente resistentes a aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y posee la capacidad de adquirir genes de resistencia a B-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas.

La resistencia a B-lactámicos es causada por los siguientes mecanismos:

a)Hidrólisis mediada por B-lactamasas b) cambios en “penicillin-binding proteins (PBPs)” c) alteraciones en la estructura y numero de proteínas constituyentes de porinas, resultando en disminución en la penetración de antimicrobianos.

Los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. Producen una gran variedad de B-lactamasas, algunas cromosómicas sin embargo la mayoría adquiridas a través de elementos genéticos móviles.

Dentro del grupo de B-lactamasas documentadas en *Acinetobacter baumannii*, se encuentran múltiples enzimas con actividad de B-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Dentro de las enzimas clase A descritas se encuentran TEM-1, TEM-92, TEM-116, PER-1, VEB-1, SHV-12, CTX-M-2. Variaciones geográficas existen en la expresión de dichos genes <sup>7</sup> .

La expresión de Metalo-B-lactamasas, enzimas clase B, es un fenómeno también descrito. Estas enzimas hidrolizan carbapenémicos al igual que otros B- lactámicos con excepción de aztreonam. Se ha descrito la expresión de varias enzimas, entre ellas IMP-1,IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, and IMP-11, VIM-1, SIM-1 en aislamientos principalmente de naciones orientales.<sup>7</sup>

*Acinetobacter* spp. Al igual que otras bacterias gram negativas, también expresa una B-lactamasa cromosómica clase C, sin embargo, se ha propuesto que este tipo de enzimas es filogenéticamente diferente a otras B- lactamasas cromosómicas (ampC) encontradas en otras bacterias. De acuerdo a esto se han denominado *Acinetobacter-derived cephalosporinases (ADCs)* codificadas por el gen *bla*. Este tipo de enzimas tienen actividad frente a penicilinas, cefalosporinas de espectro estrecho y ampliado, pero no cefepime o carbapenémicos. No es inducible y se expresa de forma constitutiva a niveles bajos<sup>19</sup> . Hasta el momento se han identificado 28 genes diferentes que codifican estas enzimas.<sup>8</sup>

Betalactamasas clase D (OXA) también han sido descritas en *Acinetobacter spp.* Este es un grupo heterogéneo de enzimas hidrolíticas, algunas con actividad de B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y otras con actividad de carbapenemasa. Entre estas se han encontrado expresión de múltiples tipos ya sean codificadas por plásmidos o cromosómicas. Este tipo de enzimas se han identificado en aislados en varios continentes.<sup>7</sup>

La resistencia a carbapenémicos también puede deberse a un fenómeno multifactorial. La disminución de la penetración de antimicrobianos combinado con la sobre expresión enzimática o modificación de el sitio de acción son mecanismos de resistencia descritos en *Acinetobacter spp.*

Estos patógenos tienen un número reducido de porinas comparados con Enterobacterias o *Pseudomonas* y un coeficiente de difusión mucho menor para moléculas pequeñas entre las cuales se encuentran antibióticos. Se han descrito al menos 5 porinas diferentes, de las cuales las mejor caracterizadas son HMP-AB y CarO. La primera conforma una porina monomérica, similar a ompA de *E. coli*.

La segunda es una proteína monomérica con selectividad a moléculas catiónicas.

La pérdida de porinas, asociado a sobre expresión de B-lactamasas o la mutación de porinas, algunas similares a la proteína oprD de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>9</sup> y la disminución combinada de la expresión de PBP-2<sup>10</sup> también condiciona la resistencia a carbapenémicos.

Adicional a lo anterior, también se han identificado bombas de exclusión, particularmente la bomba AdeABC, miembro de un grupo de enzimas denominado "resistance-nodulation-cell division family". Este complejo proteico excluye aminoglucósidos, Cefotaxime, Trimetoprim y Fluoroquinolonas, pero también pueden conferir resistencia a Tigeciclina<sup>19</sup> y producir resistencia de alto nivel a carbapenémicos cuando se combinan con oxacilinasas.<sup>11</sup>

Sin embargo, la contribución específica de cada uno de estos mecanismos a la resistencia a carbapenémicos, aun no se conoce.<sup>7</sup>

La resistencia a aminoglucósidos, aunque también se relaciona con la presencia de bombas de exclusión, también esta en relación con la síntesis de enzimas modificadoras de aminoglucósidos de varios tipos incluyendo fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidil transferasas. Los genes que codifican estas enzimas se han identificado en cepas no relacionadas y en aislados en diferentes partes del mundo.<sup>7</sup>

La resistencia a Quinolonas es causada por modificaciones en la estructura de la DNA girasa, proceso secundario a mutaciones en las regiones determinantes de resistencia en los genes *gyrA* y *parC*, que resultan en menor afinidad entre la molécula de quinola y el complejo enzima-DNA. Adicional a lo anterior, la resistencia también puede estar mediada por bombas de exclusión, como se menciono anteriormente.

La presencia de los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente han condicionado la necesidad de utilizar antimicrobianos de otras familias para el tratamiento de infecciones por *Acinetobacter* con resistencia a B-lactámicos, quinolonas o aminoglucósidos, sin embargo también se han identificado mecanismos de resistencia a tetraciclinas y Polimixinas.

La resistencia a tetraciclinas esta mediada por 2 mecanismos: El primero, la producción de bombas de exclusión codificadas por los genes *tetA* y *TetB*. El primero, media la exclusión de tetraciclina, mientras que el segundo media la exclusión de Tetraciclina y Minociclina<sup>12-13</sup>

El segundo mecanismo es la producción de proteínas protectoras ribosomales, que protege al ribosoma de la acción de las tetraciclinas. EL gen tet(M) codifica estas proteínas que confieren resistencia a tetraciclina, Doxiciclina y Minociclina. Ninguno de estos mecanismos afectan la acción de Tigeciclina, sin embargo la resistencia in vitro a Tigeciclina existe y probablemente este en relación con la sobre-expresión de la bomba de exclusión AdeABC. <sup>14</sup>.

El uso de polimixina B o polimixina E (colistina) se ha reservado como terapia de rescate en infecciones por cepas de *Acinetobacter* multidrogo resistente. Sin embargo también se han reportado cepas resistentes o heteroresistentes, es decir subpoblaciones de clones genéticamente idénticos con mayor resistencia que el clon parental <sup>15-15-7</sup>. El mecanismo de resistencia descrito para Polimixinas reside en la modificación del lipopolisacárido, por medio de acidificación o acilación. <sup>7</sup>

La coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia puede llevar a la multidrogo-resistencia (MDR), sin embargo la definición de este fenómeno es variable en la literatura, describiéndose como resistencia a carbapenémicos o resistencia a 3 o más clases de antibióticos. <sup>17</sup>

Adicionalmente, *Acinetobacter spp.* Tiene la capacidad de adquirir estos genes de resistencia a partir de otros patógenos o de otras cepas de *Acinetobacter*, debido a la gran plasticidad de su genoma, pero también tiene la capacidad de expresarlos con el tiempo; de igual manera, subpoblaciones coexistentes con mecanismos de resistencia previos pueden prevalecer con la presión de selección antibiótica y eventualmente predominar. Estos procesos no son mutuamente excluyentes y en conjunto contribuyen a la presentación de multidrogo-resistencia. <sup>18</sup>.

## **Impacto de la infección por *Acinetobacter baumannii* en desenlaces clínicos**

Aunque *Acinetobacter baumannii* se ha relacionado con una gran gama de infecciones graves, existe gran debate sobre el impacto y desenlaces clínicos asociados a esos cuadros. Teniendo en cuenta que la mayoría de infecciones por *Acinetobacter baumannii* ocurren predominantemente en pacientes en cuidado crítico, la mortalidad cruda es alta, documentándose entre el 26%-68% <sup>20-21-22</sup>. Con algunos estudios documentando mortalidad directamente atribuible a estas infecciones, al controlar por otros factores, entre el 10% y 43% <sup>32</sup>

La resistencia a carbapenémicos, al igual que la multidrogo resistencia, ha sido evaluada en numerosos estudios, confirmándose mayor mortalidad al compararse con infecciones por gérmenes sensibles, no solo en *Acinetobacter spp* sino también en infecciones por Enterobacterias o *Pseudomonas spp* <sup>73</sup>. Describiéndose mayor mortalidad en presencia de resistencia a carbapenémicos en infecciones por *Acinetobacter baumannii* al compararse con infecciones por cepas sensibles (46% vs 28.3%) <sup>33</sup>. Otros estudios, a pesar de no evidenciar mayor mortalidad intrahospitalaria general en pacientes con infecciones por cepas MDR, (47.8% vs 39.1%; OR, 1.43 [95%CI, 0.62-3.3]; P= 0.053, si se ha documentado una mayor mortalidad en infecciones graves (sepsis) causada por cepas MDR vs Sensibles (34% vs 13%, P=0.026). Sin embargo, dichos hallazgos no son consistentes en la literatura. Es por

lo anterior, que ha sido difícil establecer la mortalidad atribuible a las infecciones por este tipo de gérmenes. Algunos estudios han confirmado el aumento de mortalidad relacionado con colonización o infección por *Acinetobacter baumannii*<sup>22, 23, 33, 34, 36, 39</sup> sin embargo estos estudios tienen dificultades metodológicas, con tamaños de muestra limitados y no se ha controlado el análisis teniendo en cuenta la severidad del paciente.

Sin embargo, varios estudios con mejores diseños metodológicos, con adecuado control de variables de confusión incluyendo severidad de la enfermedad de base, no han encontrado esta asociación<sup>20, 24, 25, 26</sup>. Posibles explicaciones a este fenómeno incluyen que la infección por gérmenes multidrogo-resistentes es un marcador de aumento de la mortalidad en pacientes con enfermedad severa de base, mas no un factor independiente asociado a peores desenlaces. Sin embargo, la mortalidad también puede estar en relación con la administración de una adecuada terapia empírica y la posibilidad de un manejo antibiótico dirigido de acuerdo a la sensibilidad del germen. A pesar de lo anterior, otros estudios no han evidenciado aumento de mortalidad con una terapia empírica inapropiada o mayor mortalidad derivada de este tipo de infecciones<sup>20, 22, 27, 28</sup> pero si mayor tiempo de estancia hospitalaria<sup>26, 20, 30, 18</sup>. Las dificultades en establecer el papel exacto en los desenlaces clínicos y mortalidad atribuible puede estar en relación con dificultades en diferenciar si se trata de verdadera infección o colonización, diferencias metodológicas como se menciono anteriormente, presencia de infecciones polimicrobianas vs. Monomicrobianas al igual que dificultades para identificar especies y clones específicos que pueden tener factores de virulencia diferentes.<sup>30</sup>

## Opciones Terapéuticas

La evidencia es escasa en cuanto a recomendaciones para el manejo de infecciones graves por *Acinetobacter baumannii*, sin embargo, los carbapenémicos continúan siendo la terapia de elección en casos en los que se mantenga la sensibilidad. Algunos estudios han evidenciado discordancia entre la susceptibilidad esperada, favoreciendo Imipenem frente a Meropenem en cuanto a potencia antimicrobiana en manejo de infecciones por *A. baumannii* MDR<sup>39,40</sup>, sin embargo esta no es un hallazgo reportado de manera homogénea en la literatura<sup>41</sup>. Meropenem podría ser mas susceptible a bombas de exclusión, mientras que Imipenem es hidrolizado por B-lactamasas de forma mas eficiente.<sup>41</sup>, sin embargo la resistencia a carbapenémicos cada día es mas frecuente.

El uso de inhibidores de B-lactamasa, entre ellos el sulbactam, posee actividad antimicrobiana contra muchas cepas de *Acinetobacter*, al unirse a la PBP2, sin presentar sinergia con ampicilina<sup>42, 43</sup>. Las dosis requeridas son de al menos 8 gr/día de sulbactam, en pacientes con función renal normal<sup>53</sup>, sin embargo, el uso de monoterapia con sulbactam no se recomienda para manejo de infecciones graves por *A. baumannii*<sup>18</sup>. Sin embargo un estudio multicéntrico español evidencio sensibilidad a sulbactam únicamente en 46 % de los aislamientos<sup>62</sup>. Adicional a esto, un estudio taiwanés evidencio resistencia a ampicilina/sulbactam en 70% de los aislamientos<sup>63</sup>. Algunos estudios han demostrado sinergia in vitro con cefepime, carbapenémicos, aminoglucósidos y rifampicina, sin embargo estas combinaciones únicamente han sido reproducidas en modelos animales o de laboratorio<sup>46, 64, 65</sup>.

Los aminoglucósidos constituyen otra opción terapéutica en infecciones por *Acinetobacter Baumannii* MDR, en los casos en los que se mantiene la susceptibilidad

a esta clase de antimicrobianos, usualmente administrados con otro fármaco. La presencia de enzimas modificadoras de amino glucósidos limitan su utilización<sup>18</sup>.

Tigeciclina, antimicrobiano de la familia de gliciliclinas, posee actividad bacteriostática frente a las diferentes especies de *Acinetobacter spp.*<sup>44, 45</sup> sin embargo se han reportado fallas terapéuticas asociados a expresión de bombas de exclusión. Esto sumado a dudas sobre la posibilidad de lograr adecuadas concentraciones séricas, se prefiere dejar este fármaco como terapia de rescate.<sup>18,</sup>

Otro problema relevante con el uso de Tigeciclina, es la discrepancia entre los métodos de difusión de disco utilizados para susceptibilidad o determinación de MICs por técnica de E test, con relación a las técnicas de microdilución lo que puede alterar la interpretación de las pruebas de sensibilidad. Actualmente no hay puntos de corte de sensibilidad por métodos de difusión de disco o microdilución, autorizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) o por the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)<sup>53</sup> Sin embargo, varios estudios han establecido MIC 50 y MIC 90 para aislados de Europa, norte america y Asia/pacifico oscilando entre 0.5 mg/L a 2 mg/L.<sup>53, 54, 55,56</sup> . A pesar de la eficacia in vitro, la efectividad clínica aun presenta dudas. Varios estudios han evidenciado eficacia clínica entre el 64%-82%<sup>57, 58, 59</sup> en los que se incluyeron pacientes críticamente enfermos. Sin embargo 3 fenómenos importantes también han sido descrito en infecciones por gérmenes MDR tratados con Tigeciclina: El desarrollo de resistencia intra tratamiento, la sobreinfección por gérmenes intrínsecamente resistentes como *Pseudomonas*, *Providencia spp*, *Proteus spp*.

entre otros<sup>53</sup> y las bajas concentraciones séricas al igual que la baja penetración al tracto urinario, lo que condicionan riesgo de falla al tratamiento en bacteriemias e IVU<sup>46, 61</sup>

Dada la presencia de cepas multiresistentes, se requiere de la utilización de antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes para el tratamiento de infecciones graves por este tipo de gérmenes. Es por eso que la polimixina B o polimixina E (colistina) han recobrado un papel importante en las infecciones por fármacos MDR. Estos compuestos son detergentes catiónicos actúan a nivel de la membrana celular alterando su permeabilidad, llevando a la muerte celular<sup>51</sup>.

Colistina posee actividad bactericida y su actividad es dependiente de concentración y existen varios estudios que sustentan su utilización con tasas de curación o mejoría clínica entre 57%-77% en pacientes con infecciones severas como neumonía, bacteriemia, sepsis, infección intraabdominal y del SNC.<sup>16, 47,48</sup> . sin embargo estas tasas son variables en la literatura, y dependen del tipo de infección estudiada, teniendo en cuenta que su penetración a pulmón y SNC es variable<sup>18</sup>. Sumado a lo anterior existen, grandes vacíos en el conocimiento de variables farmacocinéticas de estos compuestos, por lo cual se ha planteado que las formulaciones usuales no alcanzan las concentraciones inhibitorias mínimas de *Acinetobacter*<sup>18, 49</sup>

La ausencia de estudios clínicos controlados hacen difícil de establecer el rol de la terapia combinada para establecer sinergismo en infecciones graves por *Acinetobacter baumannii*. La mayoría de recomendaciones provienen de series de casos no controlados y sensibilidad in vitro. Estos estudios han evaluado la actividad de combinaciones en las que se incluyen rifampicina, sulbactam, aminoglucósidos, colistina, carbapenémicos entre otros<sup>18</sup> sin embargo, los resultados no muestran superioridad frente al uso de colistina sola y en algunos se reportan resultados

contradictorios con combinaciones de carbapenémicos y rifampicina, en las cuales en algunos reportes evidencian superioridad de la terapia combinada, principalmente de la combinación colistina /meropenem<sup>52</sup>, mientras que otros no evidencian cambios en los desenlaces frente a la monoterapia<sup>18</sup>. Adicionalmente también se ha descrito el fenómeno de la heteroresistencia in vitro, es decir, subpoblaciones con diferentes niveles de resistencia a colistina, que podrían predominar en un momento específico de una infección tratada con monoterapia con colistina, por lo cual algunos autores continúan recomendando la terapia combinada.<sup>18</sup> sin embargo el verdadero impacto clínico de este fenómeno continua siendo desconocido.<sup>51,53</sup>

Otras moléculas incluyendo Minociclina y fosfomicina, también han sido estudiada como opciones terapéuticas en infecciones por *A. baumannii* MDR.

Minociclina, un derivado de tetraciclina, con actividad frente a gram positivos y gram negativos y logrando adecuadas concentraciones séricas, en tejido y SNC ha sido estudiado en infecciones por cepas sensibles. Sin embargo la evidencia es escasa. Algunos estudios han evaluado la efectividad en infecciones de tejidos blandos y neumonía asociada a ventilador con buenos resultados en presentaciones oral e intravenosa respectivamente, sin embargo, las series incluyen muy pocos pacientes por lo que no es posible dar una recomendación para su uso<sup>66,67</sup>

Fosfomicina, con actividad bactericida frente a gram positivos y gram negativos, actualmente constituye una opción efectiva en el tratamiento de infecciones por Enterobacterias MDR; sin embargo su utilización en infecciones por *Acinetobacter baumannii* es limitada dado que la mayoría de cepas son resistentes.<sup>53</sup>

## Definición de Multidrogo-resistencia

Una de las grandes dificultades en el estudio de infecciones por gérmenes multidrogo-resistentes es la falta de una definición uniforme que permita una vigilancia epidemiológica adecuada, establecer comparaciones entre los diferentes ámbitos hospitalarios y aislamientos a lo largo del mundo.

Las definiciones de multidrogo-resistente, extremadamente-resistente, extensamente drogo-resistente o pan-drogo-resistente no son universales por lo que se ha planteado un sistema de clasificación en diferentes especies de gérmenes relevantes en la clínica, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.<sup>68</sup>.

Miembros del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) y del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Estados Unidos se reunieron en 2008 para establecer objetivamente, definiciones precisas que describieran el fenómeno de multi-drogo-resistencia y pan-drogo-resistencia, incluyendo en su definición los patógenos anteriormente mencionados dada su relevancia clínica y como causantes de infección nosocomial, dándose una versión final de sus propuesta hasta 2010.<sup>68</sup>

Dentro de la literatura, se ha descrito la multidrogo-resistencia, como resistencia a 3 o más antibióticos o resistencia a un antibiótico "clave"<sup>68,69</sup>. El término XDR proviene de la resistencia a fármacos de primera línea, quinolonas y al menos uno de los fármacos parenterales, en el tratamiento de mycobacterias.<sup>70,71</sup> De acuerdo a lo anterior, en gérmenes diferentes a mycobacterias, este fenómeno se describe como resistencia a múltiples esquemas preferidos de tratamiento o a uno o más fármacos "clave"<sup>68</sup>. Finalmente, gérmenes Pan-resistentes se refiere a un fenómeno de resistencia a todos los agentes antimicrobianos; sin embargo, aun esta definición es variable,

describiéndose en la literatura como “resistente a casi todos los antimicrobianos comercialmente disponibles”, “ resistente a todos los antibióticos rutinariamente probados” y “resistente a todos los antimicrobianos disponibles para terapia empírica”<sup>68</sup> todas, definiciones ambiguas que dificultan el abordaje de este tipo de infecciones.

Debido a lo anterior, el mencionado grupo de expertos estableció las definiciones de *Acinetobacter baumannii*, MDR y XDR teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones: a) aprobación para uso en humanos por European Medicines Agency (EMA) o FDA b) disponibilidad de puntos de corte de sensibilidad de acuerdo a recomendaciones EUCAST, CLSI o FDA. Se excluyeron de la definición antimicrobianos en caso de resistencia intrínseca, casos en los cuales únicamente se alcanzan concentraciones terapéuticas en orina, como es el caso de nitrofurantoina, alta frecuencia de resistencia adquirida (como es el caso de resistencia a penicilina en *Staphylococcus*). Es importante mencionar que Tigeciclina no fue incluida en las definiciones debido a que no existen puntos de corte descritos para este medicamento en *Acinetobacter spp.* Adicionalmente, dentro de las definiciones de MDR y XDR, se considera resistente a una clase de antibióticos cuando se considera no-susceptible a al menos a un agente, dentro de esta categoría. De esta forma, la resistencia a un único agente dentro de una categoría se propone como un indicador “crudo” de resistencia a toda la categoría.<sup>68</sup>

De acuerdo a lo anterior, el panel definió multi-drogo-resistencia ( MDR) como no-susceptibilidad a al menos un agente en 3 o mas categorías. Extensamente Drogo-resistente (XDR) se definió como no susceptibilidad a al menos un agente, en todas las categorías, con excepción de 2 o menos categorías antibióticas, es decir, el aislamiento es susceptible a únicamente una o dos categorías. Pan- Drogo-resistencia se definió como no susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías.

De esta forma, un aislamiento XDR, también será MDR<sup>68</sup> Sin embargo, existen grandes limitaciones en esta definición. Un aislamiento resistente a trimethoprim-sulfmethoxazole, Cefalosporinas y Quinolonas podría tener un pronostico completamente diferente a uno con resistencia a carbapenémicos colistina y aminoglucósidos , ambos siendo MDR.

A continuación se exponen los agentes antibióticos propuestos por el panel, para ser incluidos dentro de los estudios de sensibilidad, y definir categorías de resistencias en *Acinetobacter sp*<sup>68</sup>.

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Aminoglucósidos                  | Gentamicina<br>Tobramicina<br>Amikacina<br>Netilmicina |
| Carbapenémicos                   | Imipenem<br>Meropenem<br>Doripenem                     |
| Fluoroquinolonas AntiPseudomonas | Ciprofloxacina   |

|   |   |
|---|---|
|   | Levofloxacin  |
| Combinaciones de Penicilinas antiPseudomonas/ inhibidor de B-lactamasas | Piperacilina/Tazobactam<br>Ticarcilina/ acido Clavulanico |
| Combinaciones de Penicilinas/ inhibidores de B-lactamasas               | Ampicilina/ sulbactam                                     |
| Cefalosporinas de espectro extendido                                    | Cefotaxime<br>Ceftriaxona<br>Ceftazidime<br>Cefepime      |
| Inhibidores del metabolismo de folatos                                  | Trimetoprim/sulfametoxazole                               |
| Polimixinas   | Colistina<br>Polimixina B                                 |
| Tetraciclinas   | Tetraciclina<br>Doxiciclina<br>Minociclina                |

## Epidemiología e identificación molecular

La identificación apropiada de los diferentes patógenos a nivel de "tipos" específicos es de vital importancia en el estudio de enfermedades infecciosas, principalmente cuando se estudia un brote de infección por un patógeno específico.

Cualquier método que intente aislar estos "tipos" debe proveer suficiente información para discriminar un tipo de otro, pero sin ser tan discriminatorio que cada aislamiento sea único. Es por esto que se ha considerado que un nivel adecuado de discriminación es aquel que puede identificar grupos diferentes de aislamientos que se encuentran relacionados denominados complejos clonales.<sup>79</sup>

En años recientes, los avances en la tecnología de secuenciación del DNA han producido avances importantes en el estudio de las poblaciones bacterianas, ayudando a entender diversos fenómenos evolutivos a través de adaptación genética asociada a mutaciones, pérdida y adquisición de genes.<sup>74</sup> Estos datos constituyen evidencia de una "microevolución" que diferencia a las poblaciones bacterianas.<sup>74</sup> Actualmente se reconoce que los genomas bacterianos están constituidos por 2 tipos de genes: El genoma principal y genes accesorios.

El genoma principal ("core genome"), que contiene los genes los genes encargados de las funciones metabólicas y de funcionamiento celular principal y usualmente son ubicuos en las determinadas especies. Los genes accesorios se encuentran de forma variable en las diferentes especies y cepas. Estos genes codifican enzimas involucradas en vías metabólicas accesorias, productos involucrados en la interacción

con el medio ambiente y proteínas de la membrana externa, pared celular o productos que son exportados fuera de la celular. Para bacterias patógenas, el medio ambiente es el huésped, así que dentro de estos genes accesorios se encuentran factores de virulencia, colonización y sistemas de secreción. Estos genes también se han denominado “dispensables” ya que al ser suprimidos, la bacteria no pierde su capacidad de replicación (“fitness”) pero sí virulencia.<sup>74</sup>. Usualmente estos genes no son nativos del genoma original, sino son importados de linajes no relacionados y usualmente se organizan en “islas genómicas”.

Basados en lo anterior, numerosas técnicas moleculares se han desarrollado para evaluar las poblaciones bacterianas basados en el genoma principal.

Inicialmente antes de 1995 cuando se logró la secuenciación completa del genoma de algunas bacterias como *H. influenzae*, técnicas como MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*) permitieron establecer el “paradigma clonal”. La mayoría de aislamientos en una población clonal pertenecen a un número limitado de “clústers genotípicos” conocidos como complejos clonales, los cuales se distribuyen a lo largo del mundo y tienden a ser estables a lo largo del tiempo. Sin embargo, las bacterias de un grupo clonal pueden “importar” nuevos genes, incluyendo material genético de genes principales (*core genome*), a través de procesos conocidos como conjugación. Este proceso condiciona una separación de linaje en los diferentes locos del material genético y aumenta la diversidad genética. De esta manera, cuando una población bacteriana que se recombina libremente adquiere una ventaja selectiva, se da una expansión clonal<sup>74</sup>.

Posteriormente desde 1998, avances en las técnicas moleculares permitieron la transición desde el uso de electroforesis a la secuenciación de nucleótidos para la evaluación de poblaciones bacterianas desarrollándose a la técnica MLST (*Multilocus sequence typing*). Esta técnica está basada en la amplificación por medio de PCR (*polimerase chain reaction*) de secciones entre 450-500 pares de bases de 7 genes del genoma principal (*housekeeping genes*) que pueden ser obtenidos a partir de muestras clínicas (Sangre, LCR etc.) o directamente de cultivo. De acuerdo a la identificación de los alelos en los diferentes *Loci* examinados, las cepas se identifican de acuerdo a su perfil (*sequence types*.)

Esta técnica puede identificar adecuadamente especies y cepas específicas de forma más precisa que técnicas inmunológicas convencionales al igual que provee información genealógica del aislamiento en particular

Una vez obtenida la amplificación, esta información puede ser comparada con los resultados de otros laboratorios y almacenada en un sitio web (MLST web site). Actualmente existe información de al menos 5100 aislados, representando 3500 *sequence types*, en 15 especies patógenas.<sup>74</sup>, existiendo de forma general información de 75 especies de bacterias, 3 especies de hongos y 1 especie protozoaria, conteniendo información que permite la identificación de la secuencia de un alelo y su comparación con la información almacenada al igual que la comparación de cepas específicas.<sup>75</sup>

Adicionalmente, diversos autores han considerado a MLST como superior a otras técnicas para la tipificación molecular, incluyendo MLEE, Electroforesis de campo pulsado (PFGE), *restriction fragment length polymorphism (RFLP)* o *amplified fragment length polymorphism (AFLP)*<sup>75</sup>

La integración de datos epidemiológicos, genómicos y geográficos a través de las bases de datos de MLST puede ayudar a rastrear y prevenir enfermedades por patógenos infecciosos<sup>75</sup>.

Sin embargo la técnica tiene algunas desventajas. La selección de los genes que serán evaluados requieren que exista un genoma de referencia. De igual forma, la especie en particular a ser evaluada debe poseer una amplia diversidad en todo su genoma o en los genes evaluados para lograr un adecuado poder discriminatorio<sup>76 77</sup>  
78

El análisis de los datos obtenidos a través de la técnica MLST puede realizarse de 2 maneras. a) Métodos basados en alelos, en los que el material genético analizado de cada *Locus*, se traduce a números de acuerdo a la información consignada en la "MLST Data base" con la intención de buscar una coincidencia, si esta no existe, se adjudica un número nuevo al descubrimiento. Una vez introducida la información en la base de datos se adquiere un perfil (*sequence typing profile*).

Estos métodos tienen la ventaja de simplicidad y velocidad necesarios para la realización de vigilancia epidemiológica<sup>75</sup>

b) Métodos basados en nucleótidos, diseñados para evaluar las relaciones filogenéticas, evolución del DNA o evaluación de especies bacterianas en las que los cambios del genoma se dan predominantemente a través de mutaciones en vez de recombinación o intercambio genético y se analizan a través de herramientas epidemiológicas especializadas<sup>75 80</sup>

Las aplicaciones de la técnica MLST son variadas; si bien fueron diseñadas inicialmente para la identificación y tipificación de patógenos, actualmente se utiliza para la detección y manejo de brotes, evaluación de emergencia de variantes multidrogo resistentes, asociación de genotipos específicos con virulencia o características antigénicas, estimación de tasas de prevalencia, estudios de transmisión vertical u horizontal de patógenos y desarrollo de vacunas y programas de vacunación específicamente frente a *Streptococcus pneumoniae* y *N. Meningitidis* al igual que la identificación de fuentes de infección humana a partir de huéspedes animales o el medio ambiente<sup>75</sup>.

Actualmente existen al menos 32 especies dentro del género *Acinetobacter spp.* Sin embargo la mayoría de pruebas bioquímicas no pueden diferenciar adecuadamente dichas especies, en particular, genoespecies 1 (*Acinetobacter*

*Calcoaceticus*) genoespecies 2 (*A. baumannii*) y genoespecies 13TU ya que estas son casi indistinguibles por métodos bioquímicos, por lo cual desde 1992 se designó el complejo *A. calcoaceticus*-*A. Baumannii* para designar estas especies genotípicamente diferentes pero fenotípicamente muy similares.<sup>81</sup>

*Acinetobacter baumannii* es el patógeno más importante del género, y es causante de numerosas infecciones intrahospitalarias. Para evaluar su epidemiología y en particular su transmisión, se han diseñado varios tipos de tipificación molecular incluyendo métodos basados en tecnología de PCR y electroforesis de campo pulsado (PFGE). Entre las técnicas de PCR se han desarrollado varias herramientas, entre ellas: Random(ly) amplified polymorphic DNA analysis (RAPD-PCR), integrase gene PCR, infrequent-restriction-site PCR, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), ribotipificación, amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis, hibridación de los ácidos nucleicos, Microarreglos, secuenciación de productos de PCR (RNA16s), REP PCR entre otros.

Estos métodos se basan en la generación de patrones específicos de DNA ("DNA fingerprint") al realizarse la amplificación del material genético y visualización de las diferentes bandas mediante la separación electroforética en gel de agarosa, tinción con Bromuro de Etidio, tinciones de plata o también a través de la interpretación

digital en sistemas automatizados. Todas estas técnicas tienen ventajas y desventajas. La información aportada acerca de la epidemiología y diferenciación de las especies es variable, al igual que la capacidad de tipificar especies específicas o múltiples presentes en las muestras analizadas. Adicionalmente, las características técnicas de cada prueba, sus costos y reproducibilidad, son factores a tener en cuenta para la escogencia de una prueba.<sup>86</sup>

Entre las técnicas derivadas de Electroforesis de campo pulsado la técnica conocida como *PFGE restriction analysis* del DNA cromosómico se ha utilizado con excelentes resultados en el estudio de brotes epidémicos de infección por este microorganismo, considerándose como el “Gold standard” en cuanto a tipificación e investigación epidemiológica de brotes y poblaciones endémicas<sup>81</sup>. Sin embargo, utilizando este tipo de técnicas, tanto basadas en PCR como en electroforesis de campo pulsado, la información de la evolución filogenética es limitada, al igual que la posibilidad de comparación entre diversos laboratorios es pobre, debido a la baja reproducibilidad de estos procedimientos.

En el laboratorio de Infectología del instituto, se dispone de tecnología para la realización de RAPD y REP-PCR. RAPD genera una serie de perfiles derivados de la amplificación aleatoria de fragmentos de DNA, utilizando primers pequeños que se unen a secciones de DNA separadas por algunos miles de pares de bases y que contienen regiones repetitivas. Las especies diferentes se identifican por los patrones de bandas específicos que aparecen en gel de agarosa. No se requiere conocer la secuencia genómica específica para el desarrollo de los primers, sin embargo, la técnica es extremadamente dependiente de las condiciones del laboratorio (concentración del template de DNA, condiciones de la PCR y electroforesis etc.) lo que requiere de protocolos estrictos y estandarizados para obtener resultados fiables<sup>86</sup>. La técnica de REP-PCR está basada en la presencia de secuencias de DNA repetitivas, dispersas en múltiples copias en los genomas bacterianos. Estas secuencias están altamente conservadas en la naturaleza y presentes en múltiples especies bacterianas. Aunque su función es desconocida, pueden ser utilizados para la tipificación molecular de especies bacterianas. En REP-PCR se diseñan primers específicos complementarios a dichas secuencias, para amplificar secciones de DNA interpuestas entre las secuencias repetitivas. Actualmente existen 3 “familias” de secuencias repetitivas: 1) La secuencia Extragenica palindromica repetitiva de 35-40bp (REP) 2) La secuencia repetitiva intergénica consenso de Enterobacterias de 127-140 bp (ERIC) 3) “BOX element sequences” de 154 bp. Inicialmente la detección de los fragmentos de DNA se realizaba en gel de agarosa, sin embargo recientemente se han desarrollado Kits comerciales para la identificación a través de esta técnica de varias especies patógenas, completamente automatizados. (REP-PCR DiversiLab microbial typing system -Spectral Genomics Inc., Houston, TX); entre ellas *Streptococcus pneumoniae*, *M. Tuberculosis*, *Clostridium difficile*, *L. Monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii* entre otros. El Kit DiversiLab ofrece un software para la identificaciones de los diferentes patrones de DNA al igual que una “biblioteca virtual” para la identificación y comparación de especies. Sin embargo, al igual que el resto de las técnicas de PCR, está sujeto a variaciones entre diferentes laboratorios, al igual que es propenso a contaminación y altamente dependiente de la estandarización de la técnica y rigurosidad de los procedimientos de laboratorio para su uso eficiente y reproducibilidad dentro de un mismo laboratorio.<sup>87, 88, 89</sup>

Por lo anterior, actualmente numerosos autores han utilizado la técnica de MLST

para caracterizar aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, técnica que no presenta las desventajas previamente mencionadas.

Es reconocido que las cepas epidémicas de *Acinetobacter baumannii* son frecuentemente multidrogo resistentes y si bien existe una importante heterogeneidad genética, existen una serie de clones que han logrado una proliferación exitosa. Dentro de estos se encuentran una serie de clones que circulan en Europa, conocidos como Clones EU I, II, que predominan principalmente en Europa del Norte y el más diseminado clon EU III determinados por técnicas de ribotipificación y *amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis*. Estos clones también se han reportado en otras localizaciones fuera de Europa por lo cual se ha planteado la denominación de Clones internacionales. Sin embargo, la contribución de estos clones a la carga general de cepas epidémicas de este patógeno, aun esta por determinarse

81

Bartual y colaboradores<sup>81</sup> realizaron en 2005 la tipificación de 45 cepas de *A. Baumannii* diferentes tanto de muestras clínicas como de referencia, tomados de hospitales Alemanes y Españoles, utilizando Técnicas de MLST comparándola con otras técnicas incluyendo *amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis* Y *pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) restriction analysis*. Se identificaron varios genes potenciales de acuerdo al criterio de los autores y reportes previos en la literatura, escogiéndose los siguientes genes: *gltA*, (Citrato Sintasa) *gyrB* (DNA girasa sub-unidad B), *gdhB* (Glucosa Deshidrogenasa), *recA* (*Homologous recombination factor*), *cpn60* (Chaperonina de 60-kDa), *gpi* (Glucosa 6-fosfato isomerasa) y *rpoD* (RNA polimerasa Sigma), lográndose su amplificación en los 49 aislamientos analizados; se identificó una diversidad alélica de entre 2.1-18% considerándose una diversidad promedio y de acuerdo a criterio de los autores, siendo dichos genes apropiados para estudios de genética poblacional en *Acinetobacter baumannii*.

Se identificaron 20 STs diferentes, incluyendo cepas pertenecientes a los clones EU I y II, siendo ST6 la cepa involucrada en brotes en Barcelona y a la ciudad de Elche en España.

Otros autores<sup>82</sup> han utilizado el mismo set de genes descritos en el estudio de Bartual y colaboradores, encontrando que la cepa más frecuente (47.5%), en una serie de 729 cepas epidémicas recolectadas en 19 hospitales españoles, es ST2, correspondiente al Clon internacional II.

En ambos estudios, los datos derivados del análisis de las poblaciones a través de MLST fue concordantes y complementarios a los datos obtenidos a través de PFGE y AFLP. Sin embargo la ventaja de la tipificación a través de MLST es que esta permite la comparación entre diferentes laboratorios y la monitorización de aparición de diferentes clones a gran escala.

No todos los autores han reportado la utilización de los mismos esquemas de tipificación. Si bien Bartual y colaboradores describieron el primer esquema de primers, Diancourt et al (2010) en el Instituto Pasteur en Francia, utilizaron 4 de los mismos primers (*cpn60*, *gltA*, *recA*, y *rpoD*) al igual que diseñaron 4 primers adicionales (*fusA*, *pyrG* y *rplB*), para estudiar las relaciones filogenéticas en 154 muestras de *Acinetobacter* sp representativas de los 3 clones internacionales, demostrando que estos clones internacionales pertenecen a 3 complejos clonales con un genoma central similar y escasa variabilidad en algunos locos. Característicamente, en estos clones, la multidrogo resistencia es un hallazgo

predominante<sup>83</sup>.

Adams-Haduch y colaboradores, reportaron la epidemiología molecular de 65 aislamientos en 6 hospitales en diferentes ciudades en Estados Unidos, documentando por electroforesis de campo pulsado y análisis MLST, predominancia de ST122 seguido por ST 208 pertenecientes al Clon EU II y complejo clonal 92, con amplia expresión de *bla*OXA-23 y *bla*OXA-72 como mecanismo causante de resistencia a carbapenémicos. Estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura mundial en los que ST 92 es el tipo más frecuentemente aislado.<sup>84</sup>

Actualmente a pesar que existen múltiples estudios que han ampliado el conocimiento de la epidemiología molecular de *A. Baumannii*, utilizando varios grupos de genes, incluyendo la tipificación de genes que codifican enzimas tipo OXA específicas, existen 2 esquemas mayoritariamente aceptados de análisis a través de MLST : El esquema Bartual (Bartual et al, 2005, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2005, p. 4382–4390) (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) basándose en los genes previamente mencionados (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* y *rpoD*). Sin embargo se ha reportado en la literatura que los genes, *gyrB* y *gpi* pueden presentar recombinación.<sup>85</sup>, y el esquema del instituto Pasteur (Diancourt et al, 2010, PLoS ONE 5(4): e10034. doi:10.1371/journal.pone.0010034) (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>), que incluye 3 genes del esquema bartual (*gltA*, *recA*, and *cpn60*) asociado a otros 4 genes (*fusA*, *pyrG*, *rpoB*, y *rplB*). El análisis utilizando uno u otro esquema han reportado confiabilidad y resultados similares.<sup>85</sup> Actualmente, existen disponibles en línea bases de datos para el análisis y reporte de nuevos tipos (sequence types) de *A. Baumannii* utilizando cualesquiera de los dos esquemas.

## Justificación del Estudio

La infección nosocomial es el evento adverso más frecuentemente asociado al manejo intrahospitalario y se asocia con efectos adversos tanto clínicos como económicos. De igual manera, la infección por gérmenes multiresistentes es un fenómeno cada día más frecuente, en los que la secuencia colonización-infección de un huésped susceptible es usualmente el fenómeno epidemiológico predominante. Sin embargo, el verdadero impacto clínico derivado de la presencia de multidrogo-resistencia no se ha determinado con claridad. Como se ha mencionado previamente, infecciones por este tipo de gérmenes ocurre principalmente en pacientes con múltiples comorbilidades, tiempo de estancia hospitalaria prolongada, uso previo de antibióticos, con la subsecuente presión de selección microbiana y usualmente con enfermedades con curso clínico más severo. Es por esto, que es de gran importancia, establecer el verdadero impacto de la multidrogo-resistencia en los desenlaces clínicos de los pacientes, con el objetivo de optimizar las medidas de control y tratamiento, para finalmente disminuir su incidencia y mortalidad.

Adicional a lo anterior, las infecciones por este tipo de gérmenes que aparecen en brotes, usualmente presentan altas tasas de morbi-mortalidad, afectando a pacientes de localizaciones contiguas, usualmente en unidades de cuidado crítico, obligando a aumentar los recursos de vigilancia epidemiológica, contención del brote específico y modificación de conductas de prescripción de antibióticos, al igual que presentar evoluciones clínicas diferentes a las infecciones esporádicas. De igual manera, la determinación de la clonalidad relacionada con los brotes hospitalarios, vincula

directamente el origen la propagación con el incumplimiento de las medidas de control de infecciones, dado que encontrar cepas genotípicamente distintas, que usualmente tienen una fuente diferente, puede estar en relación con la presión de selección y “daño colateral” de uso de antibióticos de amplio espectro, mientras que la presencia de cepas idénticas o estrechamente relacionadas, pueden tener una fuente común que incluye un paciente fuente, el medio ambiente o pacientes colonizados<sup>93</sup>.

Es por esto que la identificación y tipificación específica de las cepas causantes de brotes de infección al igual que de infecciones esporádicas, es de vital importancia para optimizar las medidas de control que permitan reducir su incidencia.

## Objetivos

### Objetivo general

- Describir las características clínicas de los pacientes con infección por *Acinetobacter baumannii*, multidrogo-resistente (MDR), extensamente drogo-resistente (XDR) Pan drogo-resistente (PDR) y aislamientos sensibles, es decir aquellos que no cumplen las definiciones de multidrogo-resistencia previamente mencionadas, al igual que la distribución clonal de las diferentes cepas de *Acinetobacter baumannii*, tratados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, que estuvieron involucrados en los brotes de infección presentados en 2011 y 2012, al igual que casos seleccionados de infección esporádica, ocurridos en el periodo comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2012

### Objetivos específicos

1. Describir la mortalidad global de los pacientes con infección por *Acinetobacter baumannii*, Sensibles, MDR, XDR y PDR, tratados en el instituto nacional de ciencias medicas y nutrición que estuvieron involucrados en los brotes de infección presentados en 2011 y 2012, al igual que casos seleccionados de infección esporádica, ocurridos en el periodo comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2012.
2. Comparar las características clínicas relevantes y la mortalidad entre los pacientes que estuvieron involucrados en los brotes de infección por *Acinetobacter baumannii* en febrero de 2011 y julio de 2012 al igual que aquellos con infecciones esporádicas.

Para el análisis clínico, se tomaran 4 controles por cada caso, es decir, 4 pacientes con infección esporádica, por cada caso de infección epidémica. Los controles se escogerán con base en temporalidad; se seleccionaran a partir de la base de datos del departamento de Microbiología Clínica y la Unidad de Epidemiología Hospitalaria, de forma aleatoria, teniendo en cuenta

hubieren presentado infección durante el mismo año que el caso de infección epidémica

3. Realización de la tipificación molecular de las diferentes cepas de *Acinetobacter baumannii*, involucradas en los brotes mencionados previamente, al igual que cepas seleccionadas de infección esporádica ocurridas entre enero de 2009 y diciembre de 2012, a través de técnicas de PCR. Se realizara una caracterización inicial de las poblaciones bacterianas con el uso de Random(ly) amplified polymorphic DNA analysis (RAPD-PCR). Posteriormente, una vez agrupadas y diferenciadas las distintas poblaciones basados en los perfiles RAPD, se completara la evaluación molecular de cepas seleccionadas, de clonas específicas, a través de la técnica de MLST (multilocus sequence typing) . Para el análisis se utilizara el esquema del instituto Pasteur (Diancourt et al, 2010) , que requiere el análisis de los siguientes genes (gltA, recA,cpn60, fusA, pyrG, rpoB, y rplB).

Para el análisis y comparaciones de la epidemiología molecular, se realizara un pareamiento 1:1, es decir por cada cepa analizada por MLST, involucrada en un caso de infección epidémica, se tomara un control correspondiente a una cepa causante de infección esporádica.

## **Diseño del estudio**

Estudio de casos y controles pareado

## **Población de Estudio**

Pacientes incluidos en la base de datos del laboratorio de Microbiología Clínica y de la Unidad de epidemiología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Dr. Salvador Zubiran”, que estuvieron involucrados en los brotes de infección por *Acinetobacter baumannii* en 2011 y 2012 al igual que aquellos hospitalizados entre enero de 2009 a diciembre de 2012, en salas generales y cuidado intensivo, con aislamiento de *Acinetobacter baumannii* con perfil de multi-drogo resistencia (MDR) extensamente drogo-resistente (XDR) Pan-drogo-resistente (PanDR) o sensibilidad a antibióticos , es decir aquellos que no cumplen los criterios de multi-drogoresistencia previamente mencionados, a partir de sitios estériles

## **Tamaño de Muestra**

Teniendo en cuenta una mortalidad considerada como conservadora, reportada en alrededor del 45% para el brote de 2011 y teniendo en cuenta un  $\alpha$  de 0.05 a 2 colas y un poder del 80%, realizando un pareamiento por temporalidad 1:4, se calcula se deben incluir para el análisis al menos 130 episodios de infección.

## **Criterios de Inclusión**

Pacientes adultos con aislamiento de *Acinetobacter baumannii* con perfil de expresión de multidrogo-resistencia, Extensamente Drogo-resistente, pan drogo-resistencia o sensibilidad antimicrobiana, de acuerdo a las definiciones previamente mencionadas, involucrados en los brotes de infección de 2011 y 2012 al igual que infecciones esporádicas, atendidas en el instituto nacional de ciencias medicas y nutrición “Dr

Salvador Zubiran”, tanto en salas generales como en Cuidado intensivo, en el periodo comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2012

## **Criterios de Eliminación**

Pacientes en los cuales los cuales los aislamientos se consideren como colonización, definida como aislamiento de *Acinetobacter baumannii* en la piel, membranas mucosas, heridas abiertas, secreciones o excreciones que no causen signos o síntomas<sup>72</sup>

## **Criterios de Exclusión**

Aquellos pacientes en los cuales no se dispongan de los datos para el análisis

## **Microbiología:**

La identificación de las cepas de *Acinetobacter baumannii* se realizó a partir de sistemas automatizados (VITEK2 AutoMicrobic System (bioMerieux Vitek, Hazelwood, MO, USA) tomados de cultivos sembrados en medios microbiológicos Estándar (Agar sangre de carnero, Agar McConkey , Agar “Chocolate”) Sembrados directamente de muestras Clínicas.

La sensibilidad antimicrobiana a carbapenémicos y colistina se realizó por la técnica de microdilución en caldo de 96 paneles de acuerdo a las convenciones de CLSI.

## **Métodos**

El presente estudio se plantea en 2 partes. La primera consiste en la evaluación clínica y molecular de los pacientes y Cepas de *Acinetobacter baumannii* que estuvieron involucrados en los brotes de infección de 2011 y 2012. En la segunda parte se evaluarán, de igual manera, las cepas y pacientes relacionados con infecciones esporádicas.

1. Identificación en la base de datos del laboratorio de Microbiología Clínica/ sistema MICROCLIN, de las muestras en las que se aisló *Acinetobacter baumannii*. Confirmación de la sensibilidad a carbapenémicos por técnica de microdilución en caldo y verificación de la sensibilidad a Colistina ya sea a través de la revisión de los datos consignados en los registros del Laboratorio de Microbiología Clínica o por la realización de técnica de microdilución en caldo de 96 paneles de acuerdo a las convenciones de CLSI, en aquellas cepas disponibles en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica, en las cuales no se halla realizado previamente
2. Análisis inicial de las cepas de *Acinetobacter baumannii* involucradas en infección epidémica y esporádica por medio de RAPD. Una vez identificados perfiles los diferentes perfiles y clonas específicas, se procederá a realizar MLST de cepas seleccionadas, de acuerdo a la disponibilidad de insumos en el laboratorio de Infectología, utilizando el esquema del instituto Pasteur de Paris (Diancourt et al, 2010).

3. Identificación de los pacientes con infección verdadera por *Acinetobacter baumannii* a través de la base de datos del laboratorio de microbiología clínica/sistema MICROCLIN, Registros del área de Epidemiología Hospitalarias y expedientes médicos, definida como con aislamiento de *Acinetobacter baumannii* con perfil de multi-drogo resistencia (MDR) extensamente drogo-resistente (XDR) o Pan-drogo-resistente (PanDR), de acuerdo a las definiciones anteriormente mencionadas, a partir de sitios estériles ( sangre, orina, ascitis, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo o líquido articular) , colecciones purulentas incluyendo secreción de heridas quirúrgicas en casos en los que la secreción se acompañe de otros signos de infección del sitio operatorio como: eritema perilesional, dolor, aumento de la temperatura local o fiebre . Aislamiento de dicho patógeno en cultivos de expectoración, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar en caso de presencia de expectoración purulenta, presencia de infiltrados radiológicos nuevos en radiografía de tórax o TAC de tórax, progresión de los mismos, presencia de cavitaciones o derrame pleural asociado, en pacientes con sospecha clínica y paraclínica compatible con neumonía nosocomial o asociada a la ventilación mecánica, o presencia de los mismos síntomas respiratorios en ausencia de infiltrados radiológicos acompañados de signos de respuesta inflamatoria, en aquellos pacientes con sospecha de traqueobronquitis nosocomial
  
4. Describir las variables clínicas relevantes seleccionadas y evaluadas en la literatura médica, relacionadas con infección por *Acinetobacter baumannii* entre las cuales se incluyen:
  - fecha de ingreso al instituto o cuidado intensivo
  - Edad
  - Sexo
  - Comorbilidades
  - Inmunosupresión farmacológica
  - Presencia de lesiones post traumáticas
  - Neutropenia febril durante episodio de infección por *Acinetobacter baumannii*
  - Residencia en hogar geriátrico o Unidad de cuidado crónico
  - Hospitalización previa en los últimos 90 días
  - Estancia en UCI o sales generales previo a la documentación de infección cumpliendo criterios de infección nosocomial de acuerdo a las definiciones de CDC/NHSN 2013 (*CDC/NHSN surveillance definition of healthcare-associated Infection and Criteria for specific types of infections in the acute care setting 2013*)
  - Severidad de enfermedad al ingreso al instituto o Unidad de cuidado intensivo medida de acuerdo a la escala APACHE II y a la escala Charlson Comorbidity index
  - Presencia de choque al momento del diagnóstico de la infección
  - Sitio primario de infección, definido por la historia clínica, estudios microbiológicos radiológicos etc.
  - Tiempo de estancia hospitalaria previo a la infección

- Tiempo de estancia en UCI. Previo a la infección en caso de haberlo requerido
- Tiempo de estancia en UTI posterior a la infección
- Tiempo total de estancia intrahospitalaria posterior al aislamiento de *Acinetobacter baumannii*
- Procedimientos invasivos realizados
- Monitorización Invasiva
  - Sonda Vesical
  - Sonda Nasogastrica
  - Catéter Venoso Central
  - Línea arterial
  - Monitorización de Presión Intra craneana
- Requerimiento de soportes Orgánicos previo a la infección en caso de estancia previa en UTI al igual que de forma aguda, relacionada con la infección por *Acinetobacter Baumannii*
  - Hemodiálisis
  - Presencia de Nutrición parenteral total
  - Ventilación mecánica invasiva
  - Soporte Hemodinámico
- Cubrimiento Antibiótico previo definido como administración de antimicrobianos durante 72 horas o mas, durante los 30 días previos al aislamiento de *Acinetobacter baumannii* y su tiempo de administración
- Presencia de infección nosocomial, definida como presentación de infección 48 horas después del ingreso hospitalario
- Terapia empírica administrada en las primeras 24h de adquisición de los cultivos,
- Terapia empírica apropiada, considerándose como si al obtener la sensibilidad in-vitro el aislamiento, este era sensible a alguno de los agentes antibióticos prescritos, siendo estos administrados a dosis y por rutas estándar; se considera terapia empírica inapropiada en caso en los que el aislamiento no presentaba sensibilidad in vitro a la terapia antibiótica prescrita de manera empírica
- Terapia definitiva de acuerdo a sensibilidad antimicrobiana
- Mortalidad global a 30 días

## **Análisis Estadístico**

Descripción de las variables demográficas con medidas de tendencia central, describiéndose para variables continuas medias, desviación estándar y medianas, realizándose comparaciones con T-student para variables cuantitativas; variables categóricas serán evaluadas con  $\chi^2$  de mantel-Haenzel o prueba exacta de Fisher. Se obtendrán razones de momios e intervalos de confianza al 95% a través de análisis estratificados y modelos de regresión logística condicionada para análisis de factores de riesgo de mortalidad

## Resultados

Se reportan a continuación los resultados de la primera parte del estudio, que incluyo el análisis clínico y molecular, de las cepas y pacientes involucrados en los brotes de infección.

### Análisis Molecular

Se realizó una evaluación preliminar de los perfiles de sensibilidad tanto de los brotes de 2011, 2012 y de cepas relacionadas con infección esporádica, en las que existía información disponible. Se evaluaron 278 aislamientos, de las cuales 154 (55%) presentaron resistencia a carbapenémicos. Sin embargo, al inicio del estudio, en solo el 50% de dichas cepas se había confirmado esta resistencia por la técnica de microdilución en caldo. De igual forma, solo se disponen de datos confirmados de sensibilidad a colistina de las cepas de 2011 y 2012 en los registros del laboratorio de microbiología; a pesar de lo anterior, hasta el momento no se ha documentado resistencia a colistina en el instituto.

De relevancia, en dicho análisis preliminar, es evidente que las cepas de *Acinetobacter baumannii* relacionadas con el brote de 2011 presentan una resistencia mucho mayor a carbapenémicos, Piperacilina-Tazobactam, cefalosporinas, Ciprofloxacina y Trimetoprim/sulfametoxazole comparado con las cepas relacionadas con el brote de 2012 y las cepas relacionadas con infecciones esporádicas (figura 2 y 3). Adicionalmente es notoria la similitud de los perfiles de sensibilidad entre las cepas del brote de 2012 y las infecciones esporádicas (figuras 2,3 y 4). En este último brote se identificaron al menos 8 perfiles diferentes de sensibilidad, incluyendo cepas pan-sensibles, por lo cual se sospecha que dentro de este último brote se encuentren tanto cepas epidémicas como cepas endémicas en el hospital. Lo anterior se refuerza la necesidad de el análisis de la epidemiología molecular de dichos brotes.

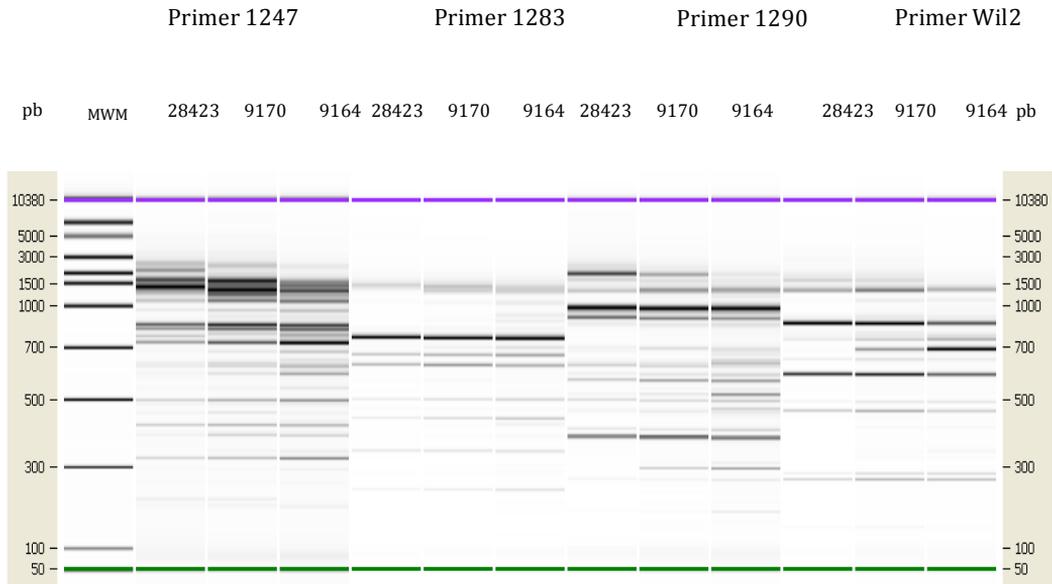
Inicialmente, se realizó una primera prueba, preliminar, con el objetivo de evaluar la capacidad de RAPD de identificar diferentes clones de *Acinetobacter baumannii* y diferenciar varios grupos para posteriormente realizar la prueba de MLST. Se analizaron inicialmente 5 cepas provenientes de aislados clínicos. Para la realización de la técnica RAPD, se realizó inicialmente la extracción de DNA basado en la técnica BOOM descrita para la utilización del equipo automatizado NUCLISENS (Biomerieux). Este método está basado en el aislamiento de material genético en fase sólida utilizando partículas de Sílica magnética como medio de captura de Ácidos nucleicos, tomando directamente las colonias bacterianas de *Acinetobacter baumannii* de 24 horas de duración, sembradas en agar Sangre de Carnero. La liberación de ácidos nucleicos se realiza adicionando la muestra, en este caso, las colonias bacterianas, al buffer de lisis que contiene Tiocianato de Guanidina y TRITON X-100, logrando así la desintegración de componentes celulares y partículas virales al igual que inactivación de RNAsas y DNAsas presentes en la muestra. Posteriormente se analizan las muestras en el equipo NUCLISENS, el cual realiza múltiples lavados con diferentes Buffers, logrando así la elución de los ácidos nucleicos de la fase sólida. Posteriormente se realiza la amplificación de Ácidos nucleicos descrita en estudios previos<sup>90</sup>. Para esta técnica se requiere obtener un volumen de elución de 110 µl. Posteriormente se realiza la determinación de la concentración de DNA de cada muestra a través de espectrofotometría. Se utilizaron 4 Primers arbitrarios con diferentes contenidos de G+C: 1247, 5-AAGAGCCCGT; 1283, 5-CGATCCCA; 1290, 5-GTGGATGCGA y Wil2, 5-TCACGATGCA. Se utilizaron aproximadamente 2 ng de

DNA genómico purificado de *Acinetobacter baumannii* como plantilla de amplificación en un volumen de 18 ml que contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de Desoxiribonucleótidos trifosfatados, 1 U de Taq DNA polimerasa (Boehringer, Mannheim, Germany) siendo amplificados en un termociclador (Genamp PCR system.). El programa de amplificación consistió en 1 ciclo de 94° por 10 min, 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 1 ciclo de 45 segundos a 36°C y 1 min a 72°C, mas un ciclo de extensión a 72°C por 7 minutos. Posteriormente el análisis de los perfiles se realizo en un bioanalizador (Agilent Bioanalyzer 2100, con una matriz de 1000 pb.

Este dispositivo utiliza un sistema automatizado para la detección de fragmentos de PCR, productos de digestión de DNA por enzimas de restricción entre otras, con amplia utilidad en el análisis de expresión génica por RT-PCR, DNA QC y detección de microorganismos. El dispositivo utiliza un chip comercial que contiene una serie de pozos en donde se deposita gel de celulosa con un pigmento fluorescente al igual que la muestra con los productos de amplificación por PCR. Entre dichos pozos se encuentra una red de microcapilares que los conectan.

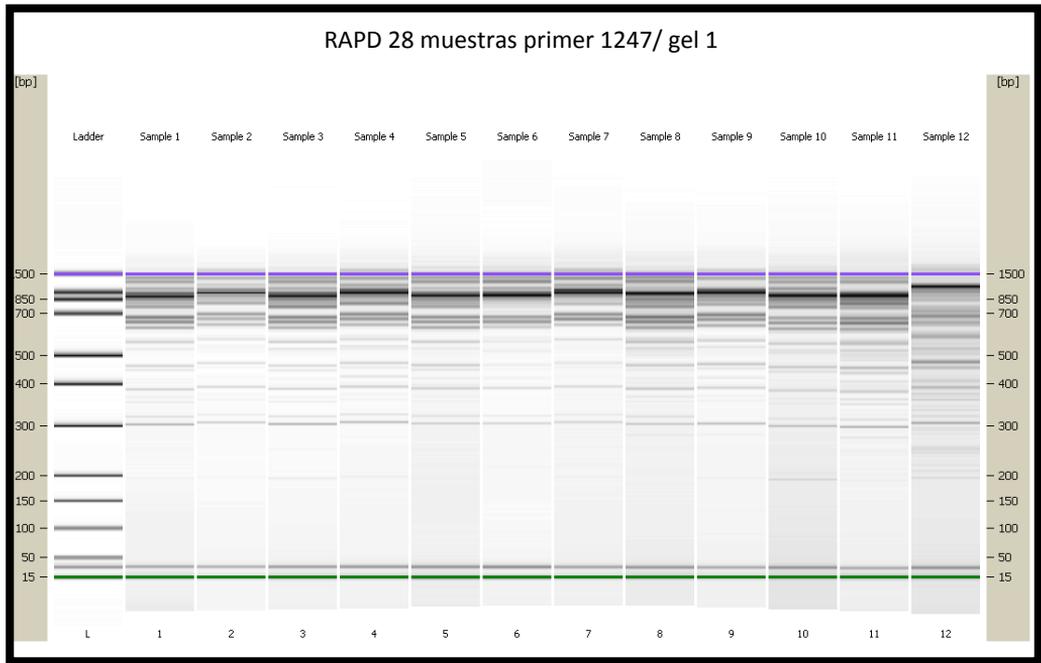
Una vez se adiciona el gel de celulosa con el pigmento, se aplica presión generada por un volumen de aire para llenar dichos capilares, convirtiéndose así en un circuito eléctrico integrado. Las moléculas eléctricamente cargadas como DNA o RNA presentan un movimiento electroforético específico mediado por un gradiente de voltaje y la relación masa-carga. De acuerdo a lo anterior, las moléculas mas livianas migran mas rápidamente que las mas pesadas. Para la detección de dicho comportamiento, el compuesto fluorescente se integra a dichas moléculas formando complejos que son detectados por fluorescencia activada por laser. Los datos son traducidos a imágenes similares a las obtenidas al realizar electroforesis de campo pulsado, produciendo una serie de bandas, al igual que a electroferogramas, que describen picos característicos de señal. Durante cada corrimiento, siempre se incluye una muestra de estandarización, que contiene fragmentos de DNA con peso y comportamiento electroforético conocido para comparar con las muestras a analizar. El software integrado compara automáticamente las muestras a analizar con la muestra estándar para determinar la concentración en kilobases, de cada fragmento fluorescente.

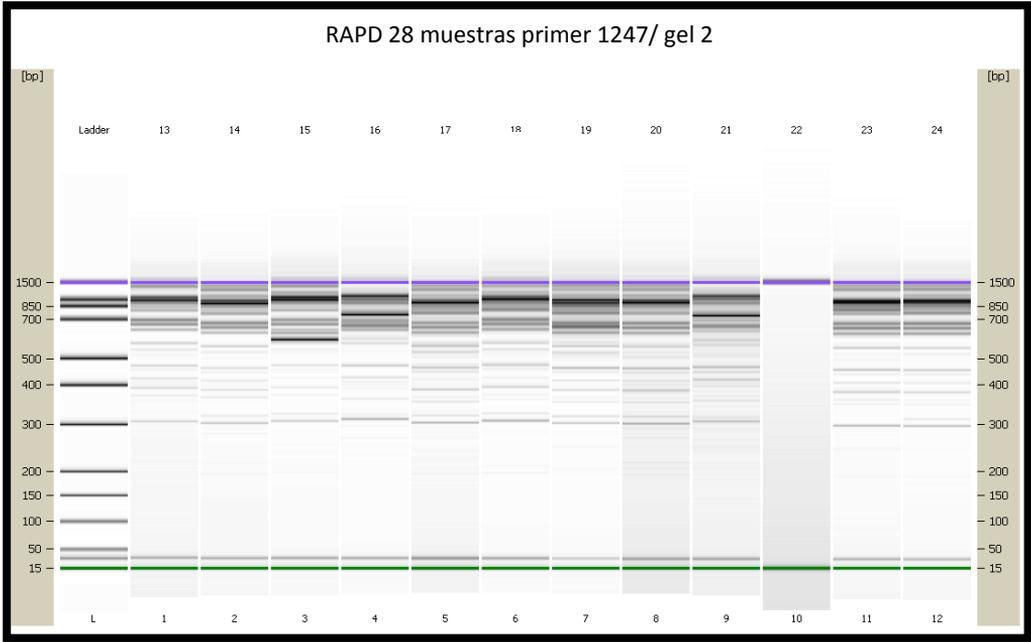
Posterior al análisis se obtuvieron los siguientes perfiles:

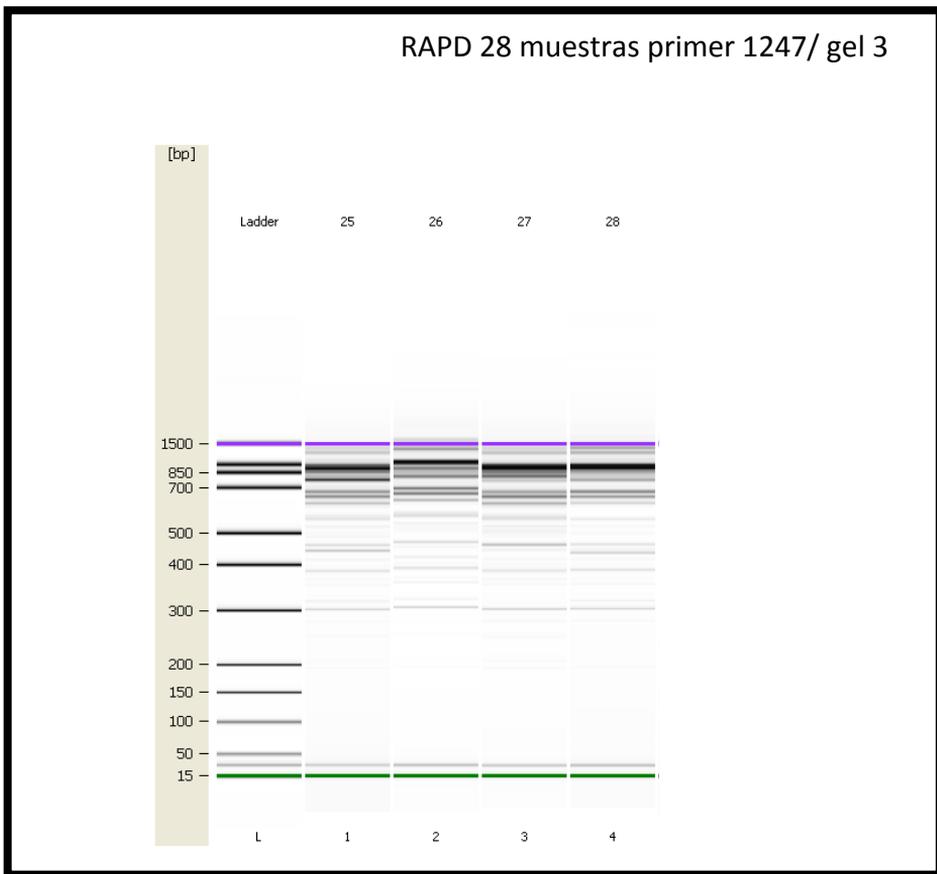


De acuerdo a los perfiles RAPD, se identifican clones diferentes sin embargo dado el bajo numero de muestras se considero la realización de una segunda prueba utilizando 18 aislados clínicos incluyendo cepas de 2011, 2012 y 2013. De acuerdo a el análisis de los perfiles ( ver anexos figura 5a -5d.). Se evidencio una mejor discriminación e identificación de grupos específicos utilizando los Primers 1247 y 1290, por lo cual se inicio el análisis de las cepas de los brotes amplificando con dichos *primers*.

# Primer 1247



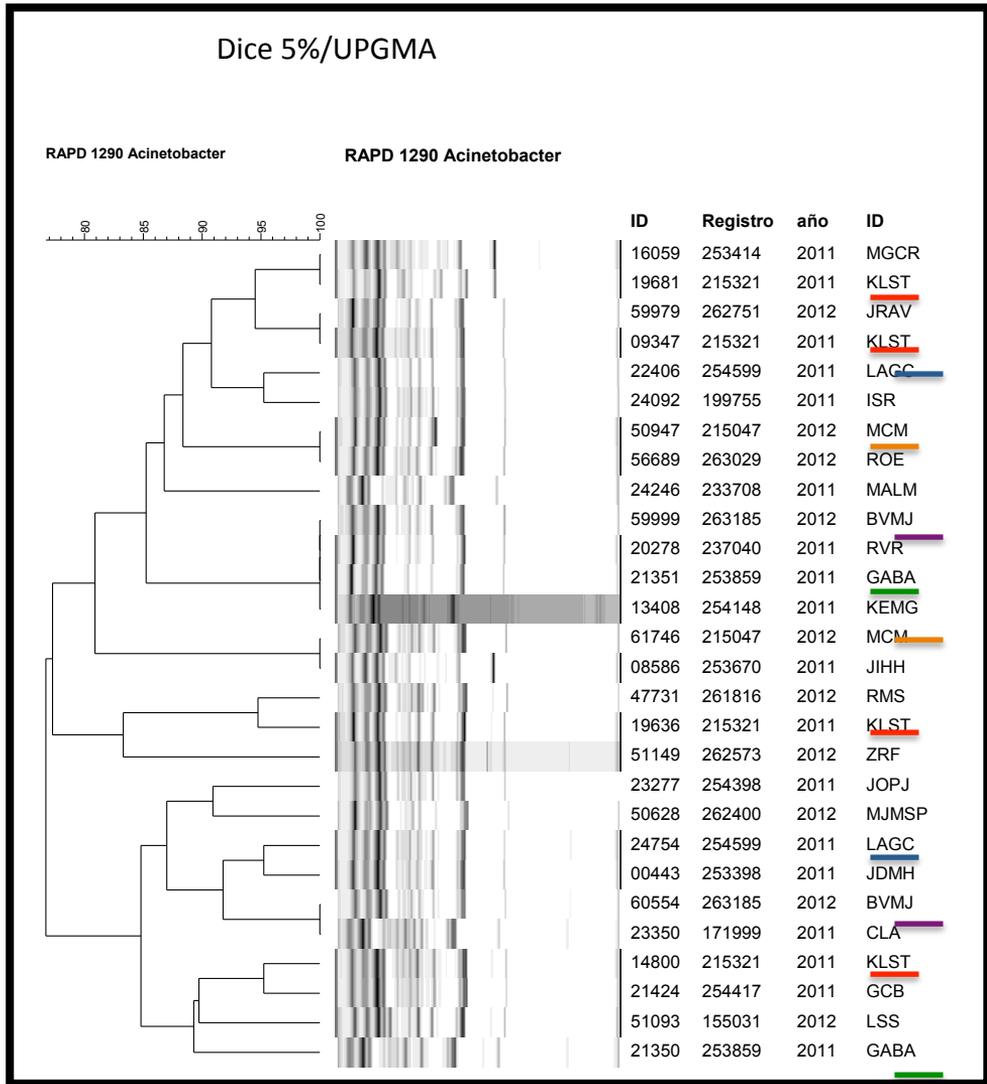




Utilizando el *Primer* 1247, no se documenta una adecuada discriminación de las cepas ya que los perfiles de las bandas de DNA son muy similares, por lo cual no se considero adecuado para continuar con el análisis molecular de las cepas de los brotes. A diferencia de lo anterior, el *Primer* 1290 mostro una adecuada diferenciación entre las cepas por lo cual se procedió a completar el análisis y construcción del Dendrograma con los perfiles obtenidos con dicho *Primer*.

Se analizaron los perfiles con el programa Bionumerics 7.1 de Applied Maths que contiene la aplicación Gel Compar II utilizando un índice de similitud del 5% (*Dice's coefficient* 5%)<sup>91 92</sup> para considerar que una similitud genómica del 95% entre una cepa y otra correspondían en realidad a una misma cepa. Adicionalmente, utilizando diferentes análisis de Clusters, (*Unwegted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)*, *Ward's Method (Hierarchical Cluster analysis)*, *Single Linkage* y *complete Linkage*) se obtuvieron los siguientes dendrogramas:

# Primer 1290

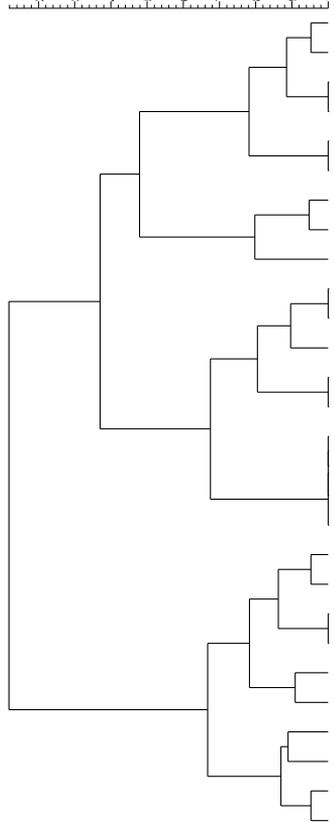


## Dice 5%/Ward

RAPD 1290 Acinetobacter

RAPD 1290 Acinetobacter

20 30 40 50 60 70 80 90 100

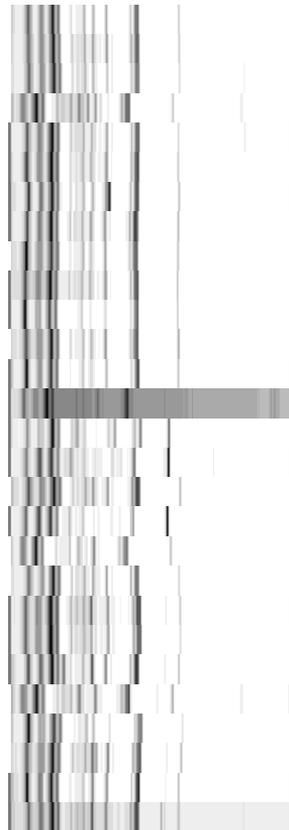
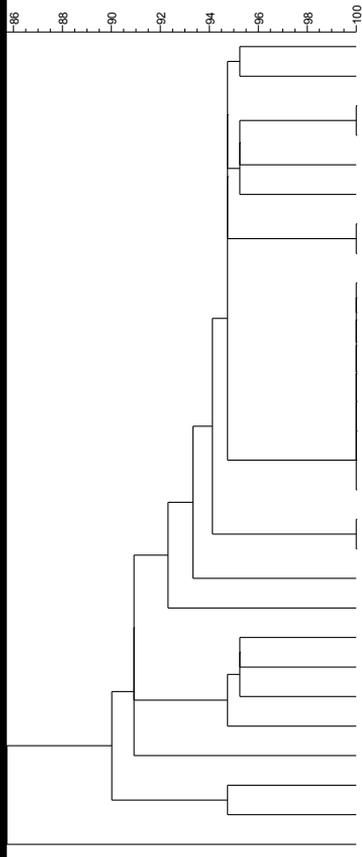


| ID    | Registro | año  | ID    |
|-------|----------|------|-------|
| 22406 | 254599   | 2011 | LAGC  |
| 24092 | 199755   | 2011 | ISR   |
| 16059 | 253414   | 2011 | MGCR  |
| 19681 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 61746 | 215047   | 2012 | MCM   |
| 08586 | 253670   | 2011 | JIHH  |
| 47731 | 261816   | 2012 | RMS   |
| 19636 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 51149 | 262573   | 2012 | ZRF   |
| 59979 | 262751   | 2012 | JRAV  |
| 09347 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 24246 | 233708   | 2011 | MALM  |
| 50947 | 215047   | 2012 | MCM   |
| 56689 | 263029   | 2012 | ROE   |
| 59999 | 263185   | 2012 | BVMJ  |
| 20278 | 237040   | 2011 | RVR   |
| 21351 | 253859   | 2011 | GABA  |
| 13408 | 254148   | 2011 | KEMG  |
| 24754 | 254599   | 2011 | LAGC  |
| 00443 | 253398   | 2011 | JDMH  |
| 60554 | 263185   | 2012 | BVMJ  |
| 23350 | 171999   | 2011 | CLA   |
| 23277 | 254398   | 2011 | JOPJ  |
| 50628 | 262400   | 2012 | MJMSP |
| 21350 | 253859   | 2011 | GABA  |
| 51093 | 155031   | 2012 | LSS   |
| 14800 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 21424 | 254417   | 2011 | GCB   |

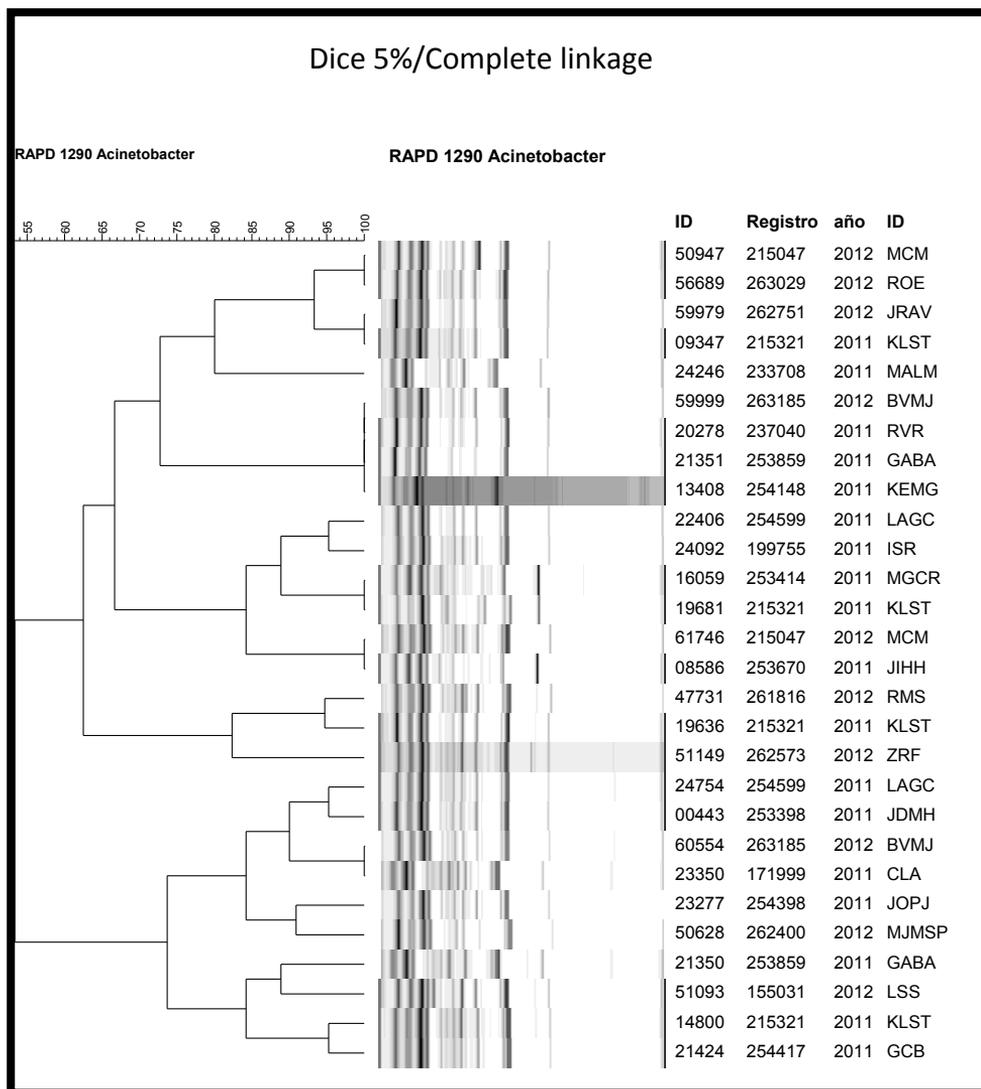
## Dice 5%/Single linkage

RAPD 1290 Acinetobacter

RAPD 1290 Acinetobacter



| ID    | Registro | año  | ID    |
|-------|----------|------|-------|
| 22406 | 254599   | 2011 | LAGC  |
| 24092 | 199755   | 2011 | ISR   |
| 60554 | 263185   | 2012 | BVMJ  |
| 23350 | 171999   | 2011 | CLA   |
| 24754 | 254599   | 2011 | LAGC  |
| 00443 | 253398   | 2011 | JDMH  |
| 50947 | 215047   | 2012 | MCM   |
| 56689 | 263029   | 2012 | ROE   |
| 59979 | 262751   | 2012 | JRAV  |
| 09347 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 21351 | 253859   | 2011 | GABA  |
| 59999 | 263185   | 2012 | BVMJ  |
| 20278 | 237040   | 2011 | RVR   |
| 13408 | 254148   | 2011 | KEMG  |
| 19681 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 16059 | 253414   | 2011 | MGCR  |
| 61746 | 215047   | 2012 | MCM   |
| 08586 | 253670   | 2011 | JHH   |
| 24246 | 233708   | 2011 | MALM  |
| 23277 | 254398   | 2011 | JOPJ  |
| 14800 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 21424 | 254417   | 2011 | GCB   |
| 51093 | 155031   | 2012 | LSS   |
| 21350 | 253859   | 2011 | GABA  |
| 50628 | 262400   | 2012 | MJMSP |
| 47731 | 261816   | 2012 | RMS   |
| 19636 | 215321   | 2011 | KLST  |
| 51149 | 262573   | 2012 | ZRF   |

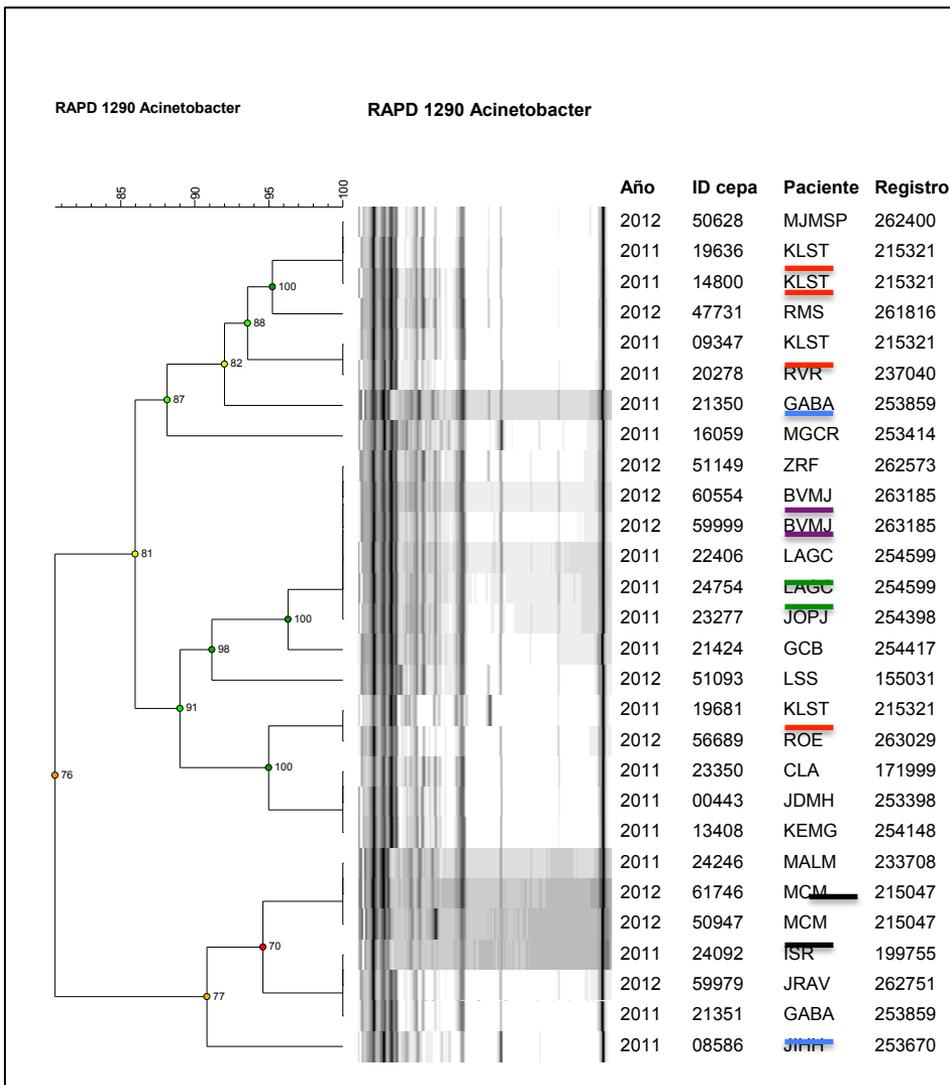


Sin embargo, es evidente que muestras tomadas del mismo paciente, pertenecen o son clasificadas por este método, a *Clusters* diferentes. Esta es una de las desventajas reportadas en la literatura con todas la técnicas de tipificación molecular basadas en PCR , ya que variaciones pequeñas en las bandas de DNA pueden clasificar erróneamente las cepas. Debido a esto, se considero Realizar 3 nuevas pruebas, es decir, repetir la amplificación del DNA en 3 oportunidades diferentes al igual que realizar el corrimiento en el bioanalizador para comparar los patrones de bandas y así evaluar la variabilidad intrínseca de la prueba.

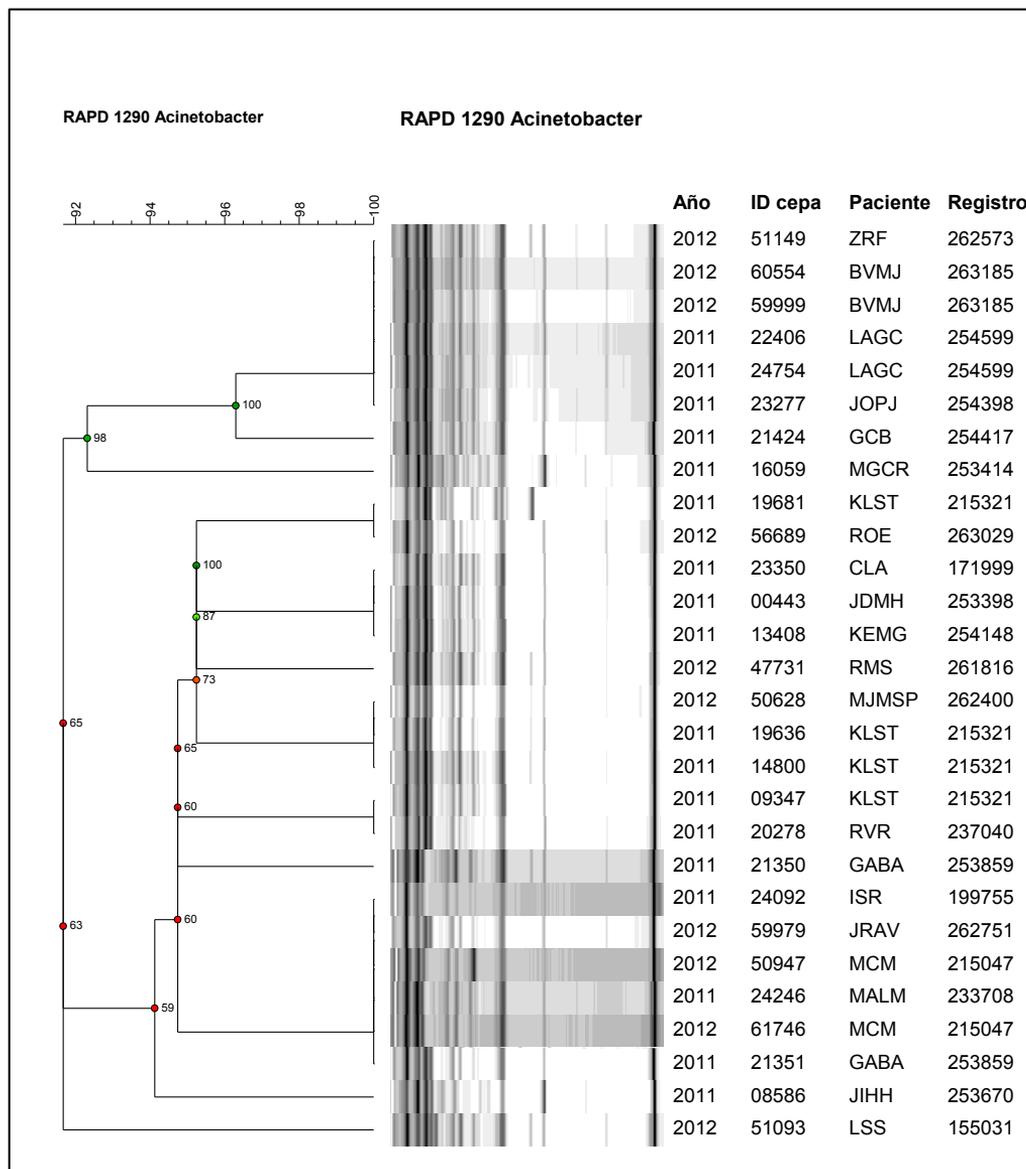
La evaluación de dichos patrones no mostro una variabilidad mayor (imágenes no incluidas), así que se considero que la prueba es fiable y reproducible dentro del mismo laboratorio al mantenerse un estricto control de la técnica.

Posteriormente, se realizo un nuevo corrimiento y análisis en el bioanalizador, esta vez incluyendo en el mismo chip de corrimiento todas las cepas de un mismo paciente y manteniendo como control interno la muestra denominada como 22406, obteniéndose los siguientes dendrogramas:

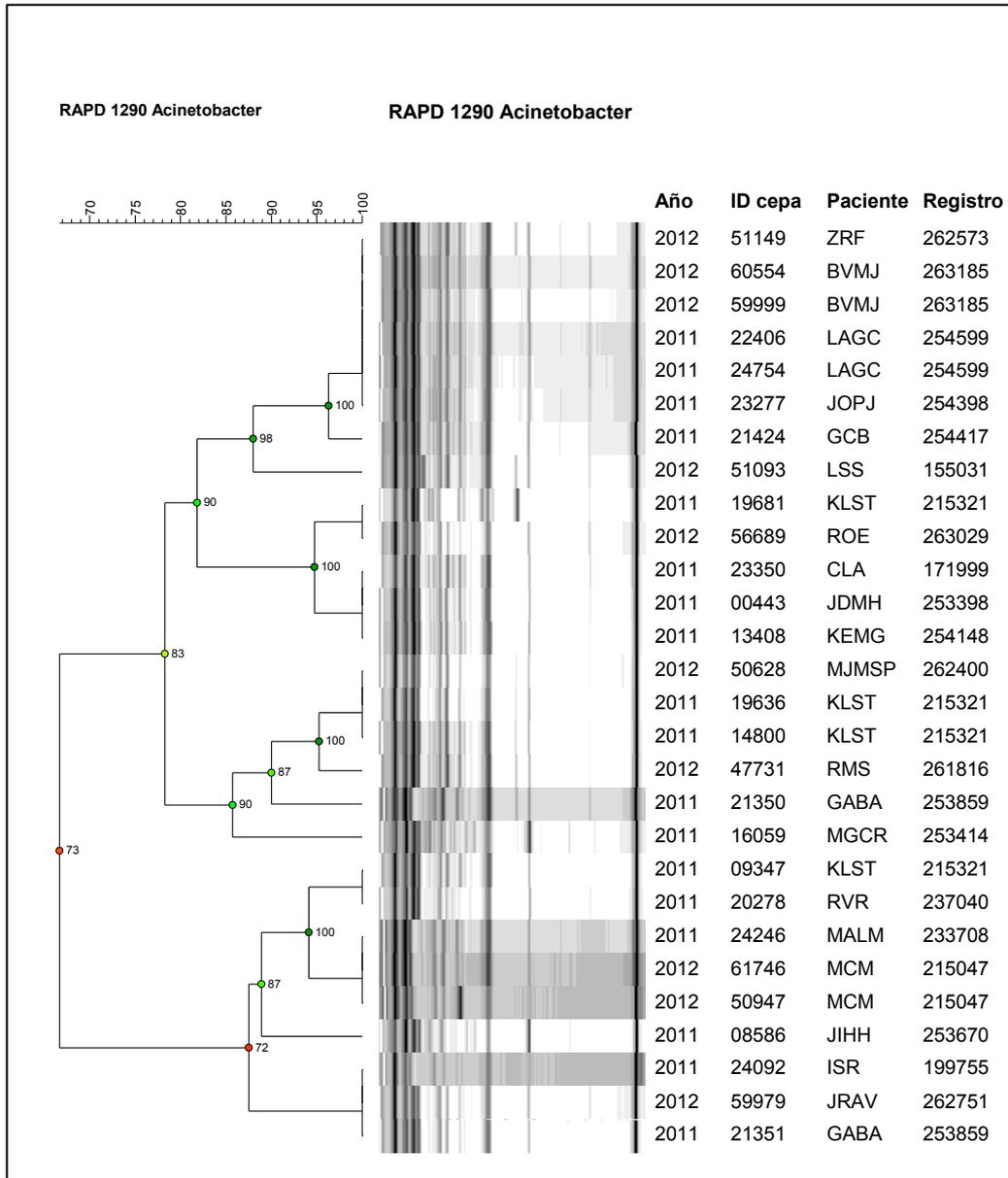
### Dice 5%/UPGMA



## Dice 5%/Single linkage



## Dice 5%/Complete linkage



En esta segunda prueba, utilizando el método de análisis UPGMA, se logra una mejor clasificación de las cepas, evidenciándose que la mayoría de los aislados de un mismo paciente se agrupan dentro de un mismo clúster, sin embargo, por el método de RAPD el hallazgo de cepas derivadas de un mismo paciente se siguen clasificando dentro de clústers diferentes. Es posible que esto se deba a que el método no posea un adecuado nivel de discriminación, ya que se basa en la clasificación molecular utilizando un único marcador molecular (Primer 1290) o que en realidad se trate de la presencia de mas de una clona durante los brotes. Adicionalmente, al analizar la distribución por año de las cepas, es evidente que existen 3 Clúster diferentes y estos no están relacionados, en la totalidad de los casos, con el año del brote o pacientes en particular. Si bien si existe alguna clonalidad relacionada con el año, esto no ocurre en el 100% de los aislados, es por eso que también se plantea que estas variaciones no estén únicamente en relación a la presencia de una o mas cepas o clonas específicas, sino también a un clúster de genes o cassettes genómicos específicos que se han transmitido y variado con el tiempo. Es por esto, que es de fundamental importancia, completar la tipificación molecular con MLST y de acuerdo a los hallazgos, plantear la secuenciación completa del genoma.

Se escogió el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para la construcción del dendrograma dado que este método es apropiado para el análisis de series de datos, o en este caso cepas, que no presentan una gran variación entre si, como es el caso particular de *Acinetobacter baumannii*, quien no presenta una gran variación genética entre diferentes clonas o cepas, sin embargo tienen una gran capacidad de adquisición de genes y determinantes de resistencia, que podrían generar diferencias radicales entre clonas o cepas específicas. Este método inicialmente fue diseñado para el análisis de patrones de bandas generados por electroforesis de campo pulsado. Es un método de agrupamiento (Clustering) jerárquico que se basa en la clasificación de las cepas o unidades de estudio, de acuerdo a las similitudes pareadas de dichas unidades. Dado que este método estadístico analiza los patrones de bandas comparándolos entre ellos, puede agrupar las cepas de acuerdo al tamaño y peso molecular de las bandas individuales; A pesar de haber sido diseñado para el análisis de patrones generados por electroforesis de campo pulsado, actualmente se utiliza para la construcción de dendrogramas, utilizando técnicas moleculares mas sofisticadas. Estos dendrogramas se construyen de acuerdo a la similitud pareada entre dos cepas. En cada paso de la construcción del dendrograma, 2 clústers cercanos son agrupados para formar un clúster superior. La distancia entre dos clústers es el promedio de todas las distancias entre pares de objetos.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se considero realizar MLST en las cepas clasificadas como diferentes por la técnica de RAPD .Utilizando el criterio de igualdad al ser 95% similares, se realizo el análisis de al menos una cepa dentro de un mismo clúster. Sin embargo, teniendo en cuenta que dentro de dichos clústers existían cepas de diferentes años, se realizo el análisis MLST en cepas de 2011 y 2012 a pesar de pertenecer a clústers iguales.

Debido a lo anterior, se incluyeron para el análisis las siguientes muestras:

| Año  | ID CEPA | Paciente | registro |
|------|---------|----------|----------|
| 2012 | 50628   | MJMSP    | 262400   |
| 2011 | 19636   | KLST     | 215321   |
| 2011 | 20278   | RVR      | 237040   |
| 2011 | 21350   | GABA     | 253859   |
| 2011 | 16059   | MGCR     | 253414   |
| 2012 | 51149   | ZRF      | 262573   |
| 2011 | 23277   | JOPJ     | 254398   |
| 2012 | 51093   | LSS      | 155031   |
| 2011 | 19681   | KLST     | 215321   |
| 2012 | 56689   | ROE      | 263029   |
| 2011 | 24246   | MALM     | 233708   |
| 2012 | 50947   | MCM      | 215047   |
| 2012 | 59979   | JRAV     | 262751   |
| 2011 | 21351   | GABA     | 253859   |
| 2011 | 08586   | JJHH     | 253670   |

Posteriormente se utilizó el DNA ya extraído de las cepas mencionadas en la tabla anterior. Se prepararon las reacciones de acuerdo al protocolo recomendado por el instituto Pasteur de Paris, y se utilizaron los primers mencionados en el marco teórico:

- *cpn60* (60-KDa chaperonin)
- *fusA* (elongation factor EF-G)
- *gltA* (citrate synthase)
- *pyrG* (CTP synthase)
- *recA* (homologous recombination factor)
- *rplB* (50S ribosomal protein L2)
- *rpoB* (RNA polymerase subunit B)

Se realizó la amplificación del DNA en el termociclador con los siguientes parámetros: 1 ciclo a 94°C por 2 min, un ciclo a 94°C por 30 segundos, 35 ciclos a 50°C por 30 segundos, un ciclo de 72 °C por 30 segundos y finalmente un ciclo a 72 °C por 5 min.

Una vez completado el paso anterior, se realiza la purificación de los productos de PCR y posteriormente se realiza la reacción de secuenciación que también requiere un segundo paso de purificación, para así obtener la secuencia de los genes analizados. Al momento del presente informe, aun no se dispone de los resultados finales del análisis MLST, los cuales se encuentran en curso.

## Análisis Clínico

En el instituto, a partir del año 2005, se evidencia una franca disminución en la incidencia de casos de infección por *Acinetobacter baumannii* con excepción de los años en los que se presentaron los brotes.

En la presente serie de casos correspondiente a 2 brotes de infección nosocomial por *Acinetobacter baumannii*, el primero presentándose en 2011, detectándose al menos 15 pacientes y un segundo brote, el cual se presentó en 2012 documentándose al menos 11 pacientes con infección nosocomial por este germen.

Sin embargo, solo se dispone de datos completos para el análisis clínico y aislamientos microbiológicos para el análisis molecular en 13 pacientes del brote de 2011 y 8 del brote de 2012, para un total de 21 pacientes.

El brote de 2011 inicio en el área de terapia intensiva de urgencias extendiéndose posteriormente por el área de terapia intensiva medico-quirúrgica y hospitalización en salas generales. De igual forma, el brote de 2012 inicio en el área de terapia intensiva medico-quirúrgica y posteriormente extendiéndose a las áreas de hospitalización.

Analizando ambos grupos por separado (tabla 1), encontramos que durante el brote de 2011 la mediana de edad fue de 52 años (21-88 años), mientras que durante el brote de 2012 fue de 37 (16-85 años) sin diferencias significativas entre los grupos ( $P=0.25$ ).

Todos los pacientes de ambos brotes residían en la comunidad, sin encontrarse residencia en unidades de cuidado crónico u hogares geriátricos. Durante el primer brote 8 pacientes (61.54%) eran hombres y 5 (38.46%) eran mujeres, mientras que durante el segundo brote, la mayoría de los pacientes fueron mujeres: 5 (62.5%) y 3 hombres (37.5%), sin diferencias significativas entre los grupos ( $P=0.38$ ). En la presente serie, la mayoría de los pacientes no presentaban inmunosupresión farmacológica, encontrándose en 2011, 6 pacientes (46.15%) con dicha medicación y en 2012 2 pacientes (25%), sin diferencias significativas entre los grupos ( $P=0.40$ ). De igual forma, solo un paciente ingreso con neutropenia febril durante el 2011, mientras que durante 2012 ningún paciente presento esta patología. Adicionalmente, muy pocos pacientes tenían historia de trauma, encontrándose durante el 2011 2 pacientes (15.38%) y un solo paciente (12.5%) en 2012.

En cuanto a las comorbilidades que presentaban los pacientes, durante el brote de 2011, 1 paciente (7.6%) tenía 3 comorbilidades, 6 pacientes (46%) tenían 2 comorbilidades y 4 pacientes (30%) tenían una sola comorbilidad. Para el brote de 2012, 3 pacientes (37%) tenían 5 comorbilidades, 1 paciente tenia 4 (12.5%), 3 (37.5%) pacientes tenían 2 comorbilidades y 2 pacientes no presentaban ninguna. La distribución de dichas comorbilidades se presenta en la tabla 2.

La mayoría de los pacientes presentaban historia de hospitalización en los últimos 90 días: 8 pacientes (61.54%) en 2011 y 5 pacientes (62.5%) en 2012. El 100% de los casos de la infección por *Acinetobacter baumannii* se considero de origen nosocomial. Adicionalmente, el 100% de los pacientes requirieron monitorización invasiva con catéter venoso central o sonda vesical.

En cuanto a la localización de los pacientes en el hospital previo al evento índice de infección, durante el brote de 2011 8 pacientes (61.54%) se encontraban en las áreas de cuidado intensivo, 4 pacientes (30.77%) en salas generales de hospitalización y un paciente en el servicio de urgencias. Durante el brote de 2012 la mayoría de los pacientes también se encontraban en cuidado intensivo, correspondiendo a 7 pacientes (87.50%), mientras que solo un paciente se encontraba en salas generales y ninguno en urgencias.

El tiempo de estancia hospitalaria previo a la infección fue mayor en los pacientes del brote de 2011, con una media de 23.07+/- 18.98 días, mientras que en 2012 fue de 11.5 +/- 4.44 días, sin embargo no se alcanzó la significancia estadística ( $P=0.10$ ).

Durante el brote de 2011, 7 pacientes (53.85%) requirieron algún procedimiento quirúrgico derivado de la patología que condiciono la hospitalización destacándose la realización de una traqueostomía, 2 laparotomías, un lavado de esternotomía y

colocación de VAC, una cirugía de Whipple y una amputación infracondílea; durante el brote de 2012 solo 4 pacientes (50%) requirieron dicho manejo, realizándose en 3 pacientes múltiples laparotomías, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (P=0.86).

En el análisis de los eventos específicos de infección por *Acinetobacter baumannii*, encontramos que durante el brote de 2011, 7 pacientes (53.85%) presentaron choque séptico asociado al evento índice, mientras que en 2012 solo 3 pacientes (37.50%) presentaron dicho cuadro, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P=0.65). Algunos pacientes fueron hospitalizados de forma primaria en salas generales antes del episodio de infección y posteriormente se trasladaron a las áreas de cuidado crítico. Durante 2011, 10 de los 13 pacientes (76%) requirieron algún tipo de soporte orgánico antes del evento índice de infección. En estos pacientes el soporte ventilatorio y el soporte nutricional (NPT/NET) fueron los más frecuentes (9 pacientes respectivamente; 69%). 2 pacientes (15.38%) requirieron soporte vasopresor o inotrópico previo al evento de infección y ninguno se encontraba en terapia de reemplazo renal. Durante el brote de 2012, 6 de los 8 pacientes (75%) requirieron algún tipo de soporte antes del evento de infección; entre ellos los más frecuentes fueron la ventilación mecánica (6 pacientes; 75%), seguido por el soporte nutricional con NET/NPT (4 pacientes; 50%), la terapia de reemplazo renal (2 pacientes; 25%). Ninguno requirió soporte vasopresor o inotrópico previo al evento de infección.

La mayoría de los pacientes requirió algún tipo de soporte orgánico en terapia intensiva de forma aguda, encontrándose en 2011, 12 pacientes (92.31%) con dicho requerimiento. En estos pacientes, los soportes más frecuentemente requeridos fueron el soporte vasopresor/inotrópico en 5 pacientes (38.4%), seguido por la ventilación mecánica en 2 pacientes (15.3%); solo un paciente requirió terapia de reemplazo renal al igual que un solo caso de requerimiento de soporte nutricional.

Durante el brote de 2012, 7 pacientes (87.50%) requirieron soporte orgánico de forma aguda, nuevamente, sin diferencias significativas entre ambos grupos. (P=0.71). En este último brote, 2 pacientes (25%) requirieron soporte ventilatorio, 2 pacientes requirieron soporte vasopresor y solo un paciente requirió terapia de reemplazo renal o soporte nutricional.

En cuanto al foco primario de infección encontramos que durante el brote de 2011 la infección pulmonar fue la más frecuente (10 pacientes (76.92%)), seguido por la infección intra-abdominal (2 pacientes (15.38%)) y un caso de infección derivada de la vía biliar. De igual manera, durante el brote de 2012, 6 pacientes (75%) presentaron infección primaria pulmonar, seguido por un igual número de casos de infección genito-urinaria y bacteriemia primaria (1 caso (12.50%)) respectivamente. No se encontró diferencia estadísticamente significativa (P=0.27).

Durante el brote de 2011, 7 pacientes presentaron infección polimicrobiana, es decir, la presencia de otro aislamiento en la misma muestra en la que se identificó *Acinetobacter baumannii*, mientras que en 2012 solo se identificó infección polimicrobiana en un solo paciente. Durante el primer brote se identificó un paciente con infección concomitante de *Pseudomonas aeruginosa* XDR, un caso de aislamiento de *Pneumocystis jirovecii*, dos casos de aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* BLEE, un caso de aislamiento concomitante de *Staphylococcus aureus* Metilino-resistente (MRSA), un caso de aislamiento de *Klebsiella oxytoca* multi-sensible y un caso de aislamiento de *E. coli* BLEE. Durante el segundo brote, solo se presentó co-infección por *Pseudomonas aeruginosa* XDR.

El número de antibióticos recibidos previo al evento de infección durante 2011 fue de 4.30 +/- 1.75 mientras que durante el brote de 2012 fue de 5.25 +/- 2.31 (P=0.30),

con una mediana de tiempo de administración de 15 días (8-56) durante 2011, contrastando con una mediana de 8 días (4-17) encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (P=0.04). El tipo específico de antimicrobianos administrados en ambos brotes se presenta en la tabla 3.

En cuanto a los perfiles de resistencia de las cepas involucradas en los brotes, encontramos que en 2011 la mayoría de las cepas eran XDR ( 11 pacientes (84.62%) y 2 cepas eran MDR (15.38%)), mientras que en 2012 la mayoría de las cepas eran MDR (6 pacientes (75%) y solo 2 (25%) eran XDR) encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (P=0.018). No se presentaron infecciones por cepas denominadas sensibles o PAN DR en ninguno de los 2 años.

La terapia empírica fue apropiada en un solo paciente en el brote de 2011 y en 3 pacientes en 2012. Los esquemas antibióticos definitivos se muestran en la tabla 4.

El tiempo de estancia en terapia intensiva posterior al evento índice de infección en quienes lo requirieron, durante el brote de 2011 tuvo una media de 15,92 días (1-35) mientras que para el brote de 2012 fue de 13,12 días (3-55). El tiempo de Estancia hospitalaria total, posterior a el evento índice fue para el brote de 2011 de (media) 32 días (1-122) mientras que para 2012 fue de 28,37 (2-75)

La mortalidad durante el brote de 2011 fue de 6 pacientes (46.15%) mientras que en 2012 fue de 4 pacientes (50%) sin diferencias estadísticamente significativas( P=1.00).

**Tabla 1 Características Demográficas**

| <b>Variable</b>                                   | <b>2011</b>          | <b>2012</b>     | <b>Valor de P</b> |
|---|----------------------|-----------------|-------------------|
| Edad (mediana)                                    | 52 años (21-88 años) | 37 (16-85 años) | 0.25              |
| Sexo  |                      |                 | 0.38              |
| Masculino   | 8 (61.54%)           | 3 (37.5%),      |                   |
| Femenino  | 5 (38.46%)           | 5 (62.5%)       |                   |
| Inmunosupresión                                   | 6 (46.15%)           | 2 (25%),        | P=0.40            |
| Neutropenia febril                                | 1                    | 0               | 0.40              |
| Historia previa de Trauma                         | 2 (15.38%)           | 1 (12.5%)       | 1.00              |
| Numero de comorbilidades                          |                      |                 | 0.01              |
| 5   | 0                    | 3 (37%)         |                   |
| 4   | 0                    | 1 (12.5%)       |                   |
| 3   | 1 (7.6%)             | 0               |                   |
| 2   | 6 (46%)              | 3 (37.5%)       |                   |
| 1   | 4 (30%)              | 0               |                   |
| 0   | 0                    | 2 (25%)         |                   |
| Historia de Hospitalización en los ultimo 90 días | 8 (61.54%)           | 5 (62.5%)       | 1.00              |

|  |                |               |      |
|--|----------------|---------------|------|
| <b>Área de hospitalización previo a Infección</b>                        |                |               | 0.75 |
| Áreas de Terapia Intensiva   | 8 (61.54%)     | 7 (87.50%)    |      |
| Salas Generales  | 4 (30.77%)     | 1 (12.5%)     |      |
| Urgencias  | 1 (7.6%)       | 0             |      |
| Tiempo de Estancia hospitalaria Previa (media) en días                   | 23.07+/- 18.98 | 11.5 +/- 4.44 | 0.10 |
| Manejo Qx. durante Hospitalización                                       | 7 (53.85%)     | 4 (50%)       | 0.86 |
| <b>Evento Índice de Infección</b>  |                |               |      |
| Choque Séptico   | 7 (53.85%)     | 3 (37.50%)    | 0.65 |
| <b>Requerimiento Previo de Soporte Orgánico</b>                          | 10 (76%)       | 6 (75%)       | 1.0  |
| Ventilación Mecánica   | 9 (69%)        | 6 (75%)       | 1.00 |
| NET/NPT  | 9 (69%)        | 4 (50%)       | 0.64 |
| Hemodinámico   | 2 (15.38%)     | 0             | 0.50 |
| Terapia de Reemplazo Renal   | 0              | 2 (25%)       | 0.13 |
| <b>Requerimiento Agudo de Soporte Orgánico</b>                           | 12 (92.31%)    | 7 (87.50%)    | 0.62 |
| Hemodinámico   | 5 (38.4%)      | 2 (25%)       | 0.65 |
| Ventilación Mecánica   | 2 (15.3%);     | 2 (25%)       | 0.61 |
| Terapia de Reemplazo Renal   | 1 (7.6%)       | 1 (12.5%)     | 1.00 |
| NET/NPT  | 1(7.6%)        | 1 (12.5%)     | 1.00 |
| <b>Foco Primario de Infección</b>  |                |               | 0.29 |
| Pulmonar   | 10 (76.92%)    | 6 (75%)       | 1.00 |
| Intrabdominal  | 2 (15.38%)     | 0             | 0.50 |
| Vía biliar   | 1 (7.6%)       | 0             | 1.00 |
| Genitourinaria   | 0              | 1 (12.5%)     | 0.38 |
| Bacteriemia Primaria   | 0              | 1 (12.5%)     | 0.38 |
| Infección Polimicrobiana   | 7 (53%)        | 1 (12.5%)     | 0.07 |
| Numero de Antimicrobianos Administrados Previo a Infección               | 4.30 +/- 1.75  | 5.25 +/- 2.31 | 0.30 |
| Tiempo de Administración de Antimicrobianos Previo a Infección (mediana) | 15 días (8-56) | 8 días (4-17) | 0.04 |

|  |                          |                      |       |
|--|--------------------------|----------------------|-------|
| Perfil de Resistencia  |                          |                      | 0.018 |
| PANDR  | 0                        | 0                    |       |
| XDR  | 11 (84.62%)              | 2 (25%)              | 0.01  |
| MDR  | 2 (15.38%)               | 6 (75%)              | 0.01  |
| Sensibles  | 0                        | 0                    |       |
| Terapia Empírica Apropiaada  | 1 (7.6%)                 | 3 (37.5%)            | 0.25  |
| Mediana de Tiempo de Estancia en Terapia intensiva posterior a Infección (Rango) | 14 días +/- 11.57 (0-35) | 5 días +/- 18 (0-55) | 0.42  |
| Mediana de Tiempo de Estancia Hospitalaria Total Posterior a infección (Rango)   | 31 días (0-122)          | 16.5(0-75)           | 0.10  |
| Mortalidad General   | 6 (46.15%)               | 4 (50%)              | 1.00  |

## Tabla 2 Comorbilidades

| Comorbilidades                            | 2011 | 2012 |
|---|------|------|
| VIH                                       | 2    | 0    |
| Artritis Reumatoide                       | 2    | 0    |
| Neoplasia Solida                          | 2    | 1    |
| Hipertensión Arterial Sistémica           | 2    | 3    |
| Lupus Eritematoso Sistémico               | 1    | 3    |
| IVU Recurrente                            | 1    | 0    |
| Neoplasia Hematológica                    | 2    | 1    |
| Diabetes Mellitus                         | 2    | 1    |
| Obesidad                                  | 1    | 1    |
| Poliangeitis con Granulomatosis (Wegener) | 1    | 0    |
| Enfermedad Renal Crónica                  | 1    | 2    |
| Anemia Aplásica                           | 1    | 0    |
| Sind. Anti Fosfolípidos                   | 0    | 2    |
| Sind. De Lisis Tumoral                    | 0    | 1    |
| SAHOS                                     | 0    | 1    |
| Sind. Metabólico                          | 0    | 1    |
| Cardiopatía Isquémica                     | 0    | 1    |
| Depresión                                 | 0    | 1    |
| Enfermedad Acido-Péptica                  | 0    | 1    |
| Enfermedad Arterial Periférica            | 1    | 0    |

**Tabla 3 Tipos de anti Microbianos Administrados Previo a la Infección**

| <b>Antimicrobiano</b>   | <b>2011</b> | <b>2012</b> |
|-------------------------|-------------|-------------|
| Piperacilina-Tazobactam | 7           | 4           |
| Cefalosporinas          | 6           | 2           |
| Carbapenémicos          | 7           | 6           |
| Fluoroquinolonas        | 2           | 1           |
| Aminoglucósidos         | 2           | 4           |
| Vancomicina             | 10          | 8           |
| Fluconazol              | 2           | 2           |
| Ganciclovir             | 0           | 1           |
| TMP/SMX                 | 2           | 0           |
| Claritromicina          | 0           | 1           |
| Linezolid               | 3           | 3           |
| Voriconazole            | 2           | 0           |
| Anfotericina B          | 2           | 0           |
| Anidulafungina          | 2           | 2           |
| Clindamicina            | 1           | 1           |
| Metronidazol            | 2           | 3           |
| Amino-Penicilinas       | 0           | 1           |
| Aciclovir               | 0           | 1           |

**Tabla 4 Terapia antibiótica Definitiva para la Infección por *Acinetobacter baumannii***

| <b>Antimicrobiano</b>   | <b>2011</b> | <b>2012</b> |
|-------------------------|-------------|-------------|
| Piperacilina-Tazobactam | 0           | 1           |
| Cefalosporinas          | 1           | 0           |
| Carbapenémicos          | 12          | 5           |
| Fluoroquinolonas        | 1           | 1           |
| Aminoglucósidos         | 3           | 3           |
| Vancomicina             | 1           | 0           |
| Tigeciclina             | 2           | 0           |
| Rifampicina             | 2           | 0           |
| TMP/SMX                 | 1           | 0           |
| Colistina               | 7           | 6           |

**Discusión**

En el presente estudio, en muchas de las variables de análisis, no se alcanzó la significancia estadística, muy probablemente en relación con el escaso tamaño de muestra, derivada del pequeño número de pacientes involucrados en ambos brotes. Sin embargo, hay una serie de hallazgos importantes. Entre ellos encontramos que la mayoría de los pacientes eran adultos jóvenes, en edad productiva. Durante el primer brote, casi la mitad presentaron inmunosupresión farmacológica mientras que el segundo brote, solo 2 pacientes, correspondientes al 25% de el número total de

pacientes de 2012, presentaron inmunosupresión, lo que refuerza las observaciones reportadas en la literatura, en la que la infección nosocomial por gérmenes MDR puede ocurrir en cualquier paciente susceptible, independiente de su estado inmune.

Adicionalmente, el número de comorbilidades fue significativamente mayor en los pacientes durante el brote de 2012, lo que puede estar en relación no solo con la susceptibilidad a la infección por este tipo de gérmenes, sino también con mortalidad. El tipo de comorbilidades encontradas fue muy heterogéneo y no se evidenció una tendencia a presentar una mayor frecuencia de patologías condicionantes de inmunosupresión en uno u otro grupo.

Sin embargo, es llamativo que a pesar de un menor número de comorbilidades, la mortalidad también fue significativa en el brote de 2011. Adicionalmente, el escaso tamaño de muestra puede influir en la ausencia de significancia estadística entre las asociaciones. Teniendo el escaso tamaño de muestra no se realizó un modelo multivariado o univariado para correlacionar con mortalidad. Este se planea realizar al finalizar la segunda parte del estudio para incluir los controles y diseñar modelos multivariados.

Por otro lado, la mayor parte de los pacientes tenían historia de hospitalización en los últimos 90 días o se encontraban en las áreas de cuidado crítico y tenían requerimiento de algún tipo de soporte orgánico antes del evento índice de infección, lo que los predispone al mayor uso de antimicrobianos, presión de selección de la flora y colonización por gérmenes intrahospitalarios, entre ellos gérmenes multidrogo-resistentes. De igual manera, la estancia en las áreas de cuidado crítico, somete a los pacientes a un ambiente de sobre-intervención y pérdida de las barreras naturales como es la intubación oro-traqueal, la presencia de sondas vesicales o accesos vasculares centrales, que predisponen al fenómeno de colonización-infección.

También es importante mencionar que en la presente serie se evidencia, al igual que lo reportado en la literatura, que los pacientes involucrados en los brotes eran pacientes complejos, con un tiempo considerable de hospitalización (más de 10 días), más del 50% presentaron alguna intervención quirúrgica, la mayor parte requirieron algún tiempo de estancia en terapia intensiva, con requerimiento de soporte multi-sistémico y extenso uso de antimicrobianos por tiempo prolongado.

En esta serie, la mayoría de los pacientes recibieron antibióticos de amplio espectro, entre los que se destaca el extenso uso de carbapenémicos, Piperacilina/Tazobactam, cefalosporinas de tercera generación y esquemas combinados con Vancomicina.

Es interesante que los pacientes del brote de 2011 presentaron casi el doble del tiempo de estancia hospitalaria previa al evento índice de infección al compararse con los pacientes involucrados en el brote de 2012. Sin embargo la propagación de la infección en este último brote, estaba en clara relación con la cercanía de los pacientes en la unidad de cuidado intensivo médico-quirúrgico y probablemente facilitada por el personal de salud, esto de acuerdo a los datos de la unidad de Epidemiología del instituto (figura 7).

En cuanto a los episodios índice de infección, si bien no se cuenta con datos completos para el cálculo del Score APACHE II o el Índice de Charlson en el momento específico en el que se presenta la infección, si es notorio que estas condicionaron un cuadro de enfermedad crítica, con alto requerimiento de soporte de forma aguda y emergente, en los que se destaca el requerimiento de soporte ventilatorio y hemodinámico, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el tipo de soporte requerido entre ambos grupos. Un muy escaso número de pacientes recibieron terapia empírica apropiada, probablemente en relación con la extensa

resistencia antimicrobiana encontrada en las cepas, destacándose una diferencia significativa en cuanto a los perfiles de resistencia entre ambos brotes, entre los que es evidente un mayor número de cepas XDR en 2011 y MDR en 2012. Sin embargo, a pesar de una mayor resistencia antibiótica en 2011, la mortalidad también fue considerable en 2012.

La mayoría de los pacientes recibieron esquemas combinados de tratamiento ajustado a la sensibilidad del aislamiento con carbapenémicos y Colistina y en algunos casos uso de Tigeciclina o triple terapia en la que se incluyó TMP/SMX o Rifampicina.

Es interesante que en la mayoría de los casos, el foco primario de infección fue pulmonar y en un número importante de casos durante el brote de 2011, se presentó infección polimicrobiana siendo esta diferencia estadísticamente significativa, lo que también podría tener un impacto en la mortalidad, de acuerdo a la virulencia del germen acompañante y a la posibilidad de una terapia antimicrobiana específica eficiente en cuanto a actividad bactericida y penetración a tejidos.

Esta diferencia en cuanto a co-infección puede ser explicada por el tiempo de ventilación mecánica y también podría tener impacto en mortalidad, dado que es bien reconocido que la infección pulmonar es una infección de alto inoculo y la neumonía nosocomial o asociada a la ventilación mecánica, condiciona un exceso de mortalidad hospitalaria, independiente de la patología de base.

En la presente serie, las consecuencias de las infecciones en cuestión tuvieron un impacto severo en los pacientes, encontrándose una prolongada estancia en terapia intensiva posterior al evento infeccioso, al igual que una muy prolongada estancia hospitalaria total, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos. La mortalidad general en la serie fue de 46% y 50% respectivamente. Estos últimos hallazgos evidencian los graves desenlaces de los pacientes involucrados en los brotes de infección.

Teniendo en cuenta el bajo número de pacientes, no se realizó un modelo multi o univariado para evaluar factores relacionados con mortalidad. Dicho análisis se realizó en la segunda fase del estudio al disponerse de los controles y completarse la evaluación molecular.

En cuanto a la epidemiología molecular encontramos que el método RAPD utilizando el Primer 1290 muestra la presencia de al menos 3 clústers diferentes. Este hallazgo está en concordancia con lo reportado en la literatura, en la que se describe que la variación clonal de *Acinetobacter* no es muy amplia, debido al nicho ecológico tan adverso en el que sobrevive, sin embargo si es capaz de adquirir fácilmente material genético proveniente de otras clonas, incluyendo múltiples determinantes de resistencia.

Si bien existe cierta clonalidad de acuerdo al año, este fenómeno no se repite en todos los casos.

De igual manera, a pesar de repetir la técnica en varias ocasiones, bajo estrictas medidas y estandarización de los protocolos en el laboratorio, con el objetivo de mantener la reproducibilidad de la prueba y al realizar el análisis de todas las muestras de un mismo paciente dentro de un mismo Chip en el Bioanalizador, algunas cepas derivadas de un mismo paciente continúan clasificándose en clústers diferentes. Por lo tanto, es posible que trate de infección por más de una clona de *Acinetobacter baumannii* o que el presente método no tenga la capacidad de clasificar de forma más precisa las diferentes cepas, teniendo en cuenta se basa en un único

marcador molecular (primer 1290) y que la técnica de MLST provea un resultado definitivo. Sin embargo dentro de cepas muy parecidas, también existe la posibilidad que las diferencias estén basadas en islas genómicas o Cassettes, que contengan genes que codifiquen enzimas u otros determinantes de resistencia que las diferencien además de tener la capacidad de transmitirse y perpetuarse o inclusive condicionen mayor morbi-mortalidad.

## **Perspectivas**

Los factores relacionados con mortalidad en infecciones asociadas a gérmenes multidrogo resistentes y específicamente *Acinetobacter baumannii* Multidrogo Resistente no se conocen de forma precisa. Es por eso que el estudio de esta clase de infecciones es de vital importancia para optimizar las estrategias de prevención control y tratamiento específico. Es obvio que el número actual de pacientes no permite obtener conclusiones definitivas o diseñar modelos multivariados que identifiquen factores específicos con mortalidad, incluyendo factores relacionados con la epidemiología molecular o condicionantes de virulencia o resistencia. Sin embargo, evidencia los factores asociados a su presentación, los serios desenlaces en morbi mortalidad y las variaciones en la epidemiología molecular. Adicionalmente es un buen ejemplo de cómo las técnicas de tipificación más modernas basadas en la secuenciación de múltiples genes o inclusive todo el genoma, pueden ayudar a establecer diferencias entre clonas específicas y tal vez correlacionarse con peores desenlaces.

Es muy importante completar el análisis molecular de las cepas relacionadas con infecciones no epidémicas, al igual que el análisis clínico de dichas infecciones para establecer diferencias importantes y así diseñar modelos que identifiquen factores relacionados con mortalidad, para de esta manera, diseñar estrategias terapéuticas y preventivas que disminuyan la morbi-mortalidad en este tipo de infecciones.

# Anexos

Figura 1

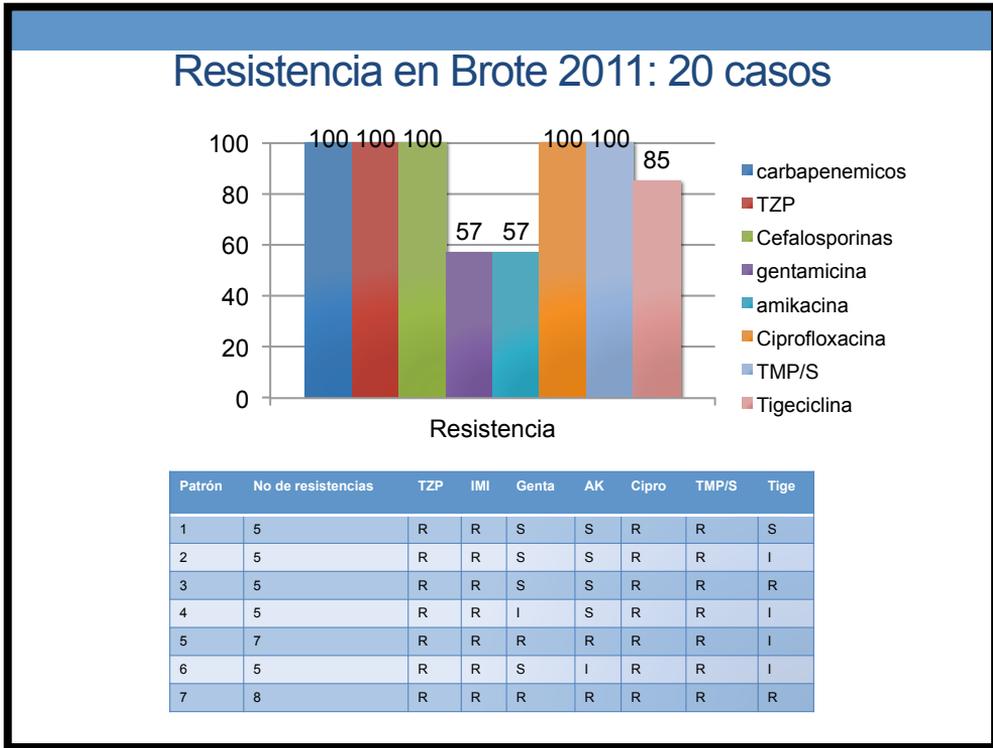


Figura 2

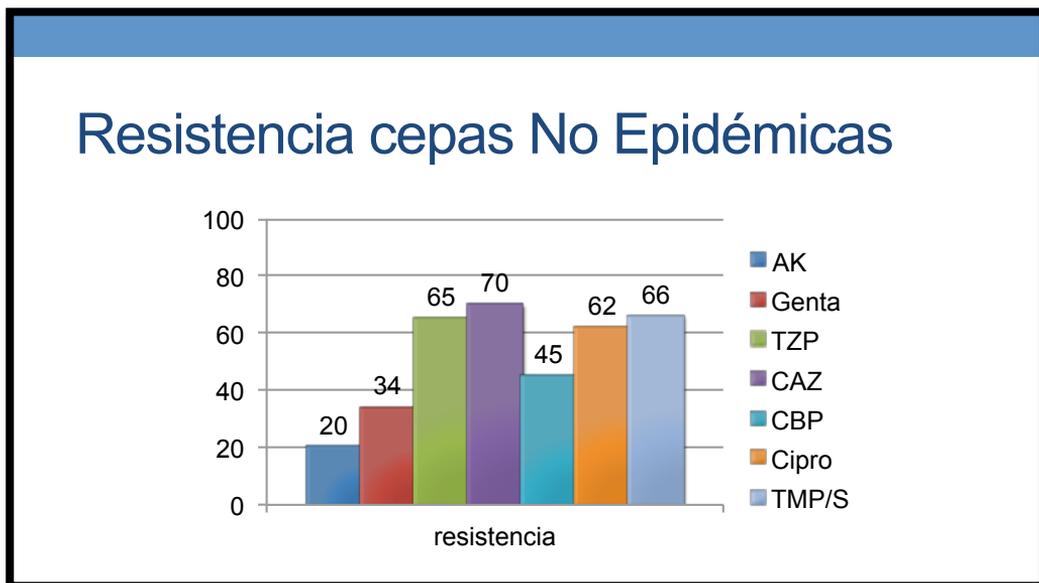
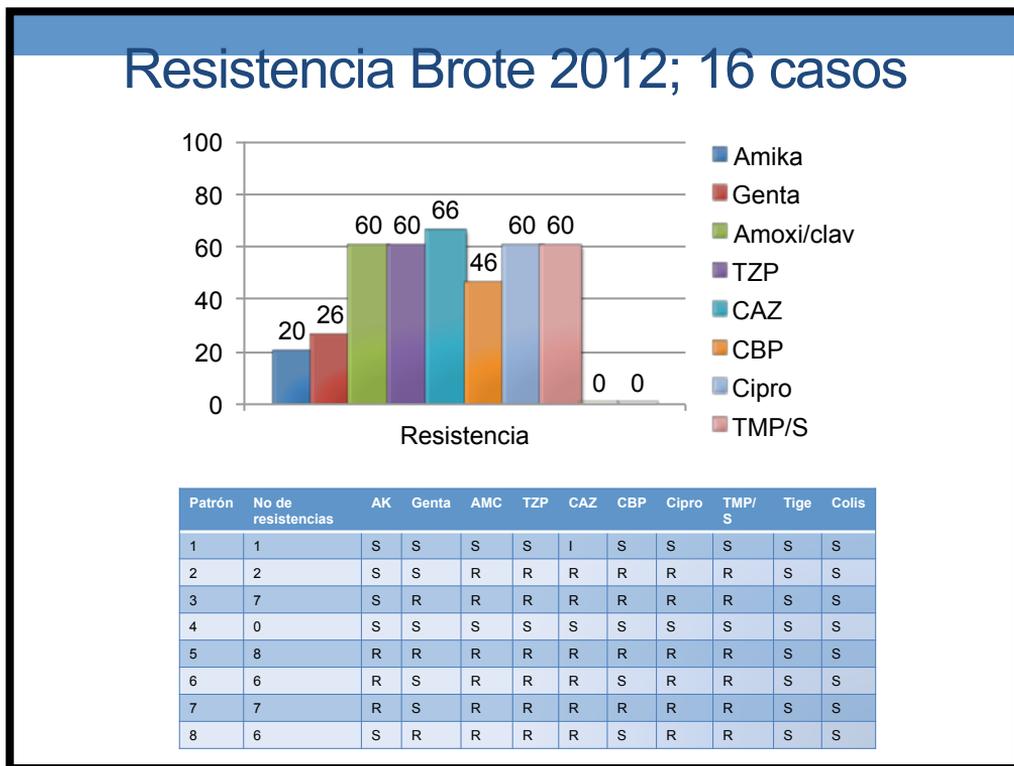


Figura 3



**Figura 4**



## Perfiles de Sensibilidad Brote 2012

|    | amika | genta | amoxiclav | TZP | CAZ | carbapenemicos | cipro | TMP/S | Tige | colis |   |
|----|-------|-------|-----------|-----|-----|----------------|-------|-------|------|-------|---|
| 1  | S     | S     | S         | S   | I   | S              | S     | S     | S    | S     | 1 |
| 2  | S     | S     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 2 |
| 3  | S     | R     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 3 |
| 4  | S     | S     | S         | S   | S   | S              | S     | S     | S    | S     | 4 |
| 5  | S     | S     | S         | S   | S   | S              | S     | S     | S    | S     | 4 |
| 6  | R     | R     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 5 |
| 7  | S     | S     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 2 |
| 8  | R     | S     | R         | R   | R   | S              | R     | R     | S    | S     | 6 |
| 9  | S     | R     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 3 |
| 10 |       |       |           |     |     |                |       |       |      |       |   |
| 11 | S     | S     | S         | S   | S   | S              | S     | S     | S    | S     | 4 |
| 12 | S     | S     | S         | S   | S   | S              | S     | S     | S    | S     | 4 |
| 13 | R     | S     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 7 |
| 14 | S     | S     | S         | S   | S   | S              | S     | S     | S    | S     | 4 |
| 15 | S     | R     | R         | R   | R   | S              | R     | R     | S    | S     | 8 |
| 16 | S     | S     | R         | R   | R   | R              | R     | R     | S    | S     | 2 |

**Fig. 4**

El análisis del perfil de sensibilidad del brote de 2012 evidencia 5 cepas con sensibilidad a todos los antimicrobianos, al igual que al menos 8 perfiles diferentes de sensibilidad, lo que sugiere la presencia de más de un clon de *Acinetobacter baumannii* relacionado con estas infecciones.

Figura 5 a.

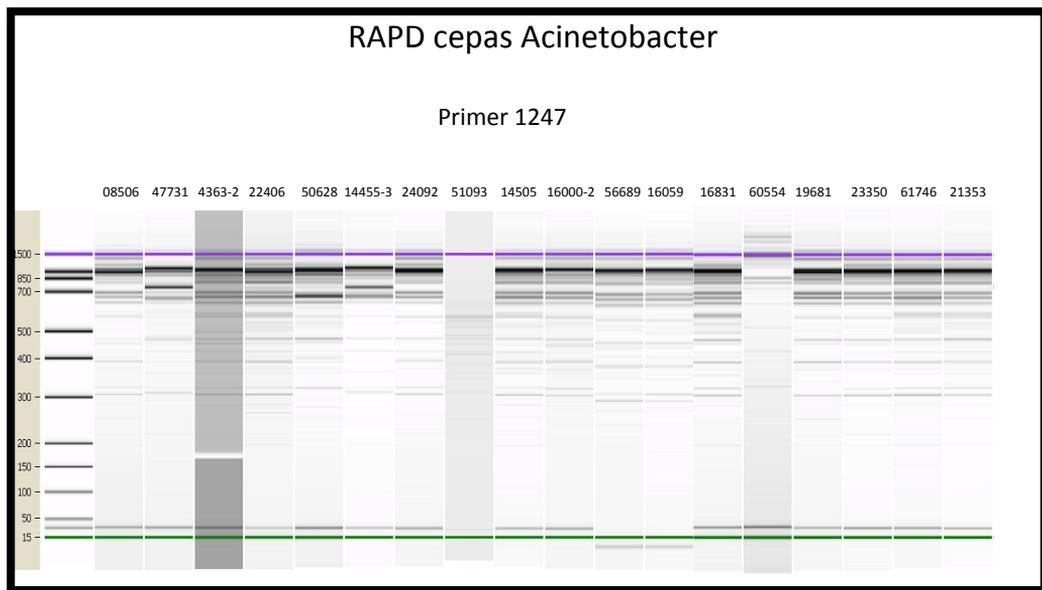


figura 5 b.

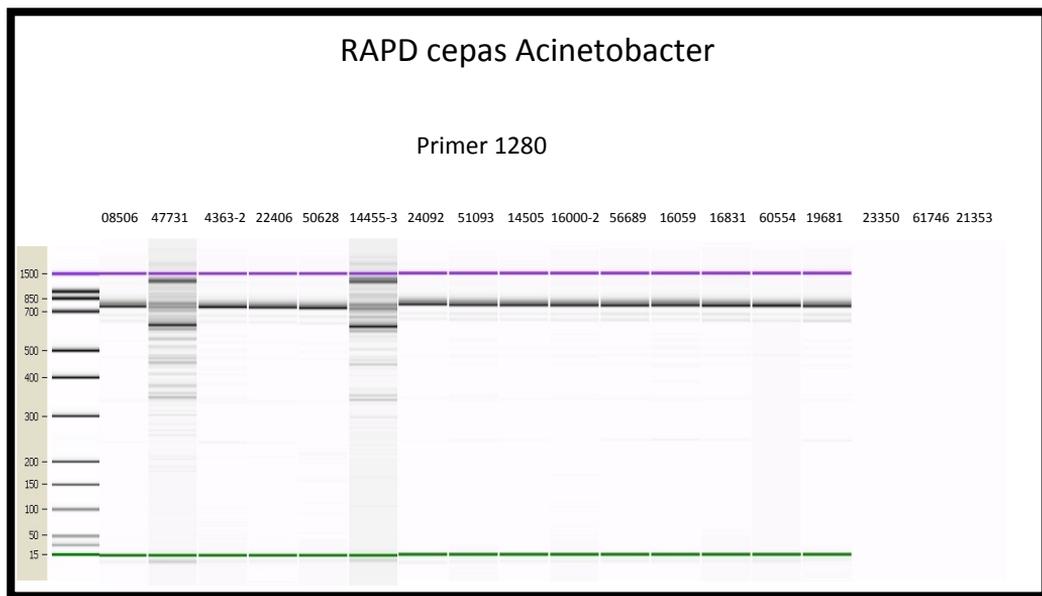


Figura 5 c.

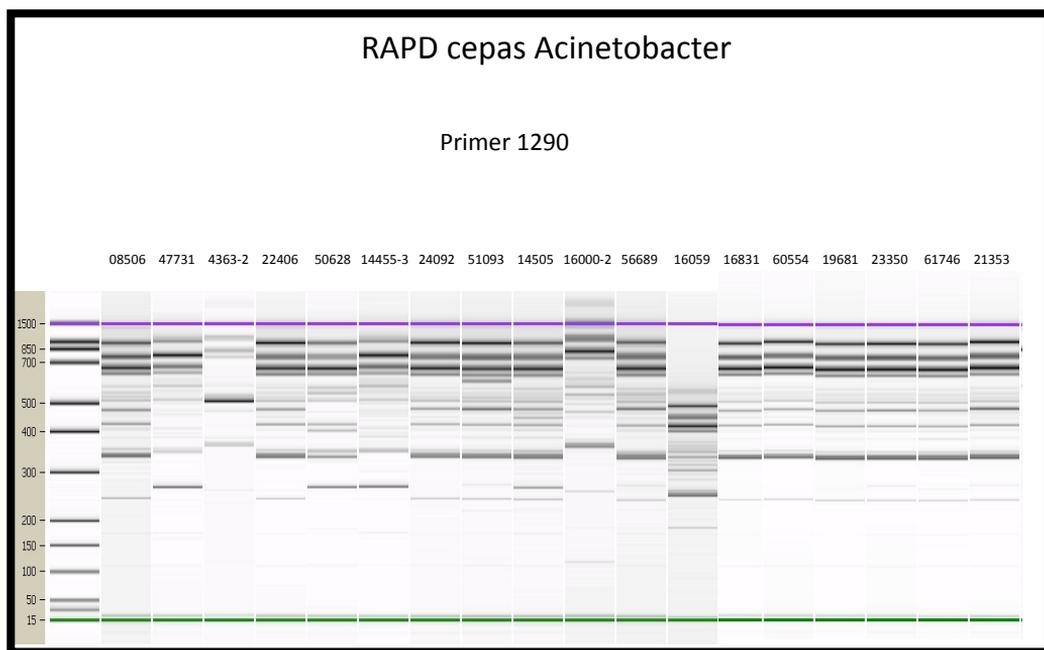
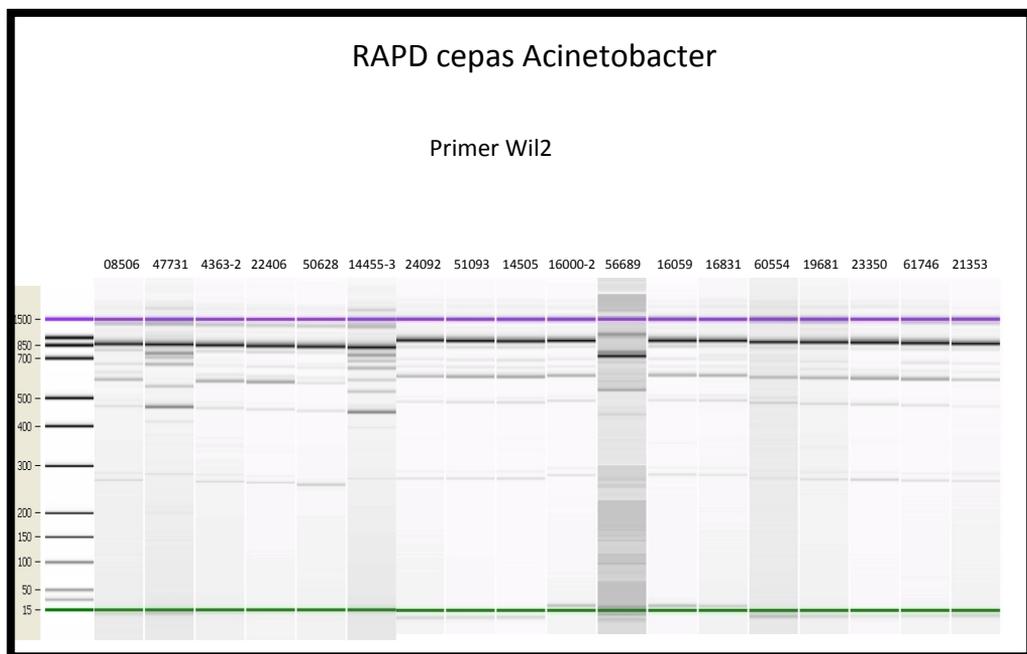
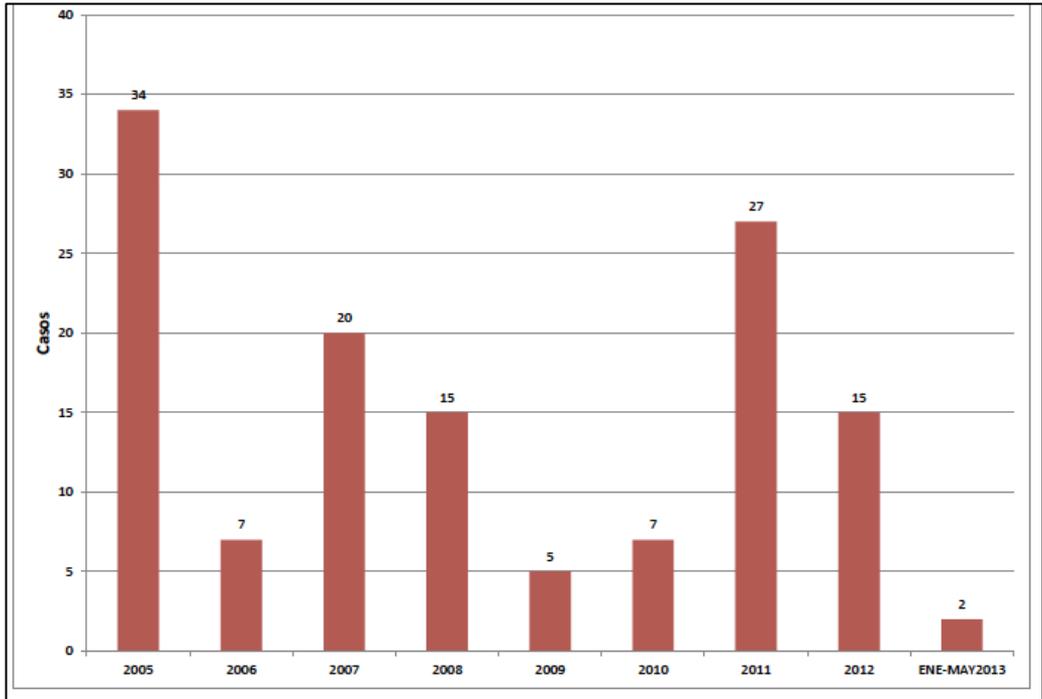


Figura 5 d.



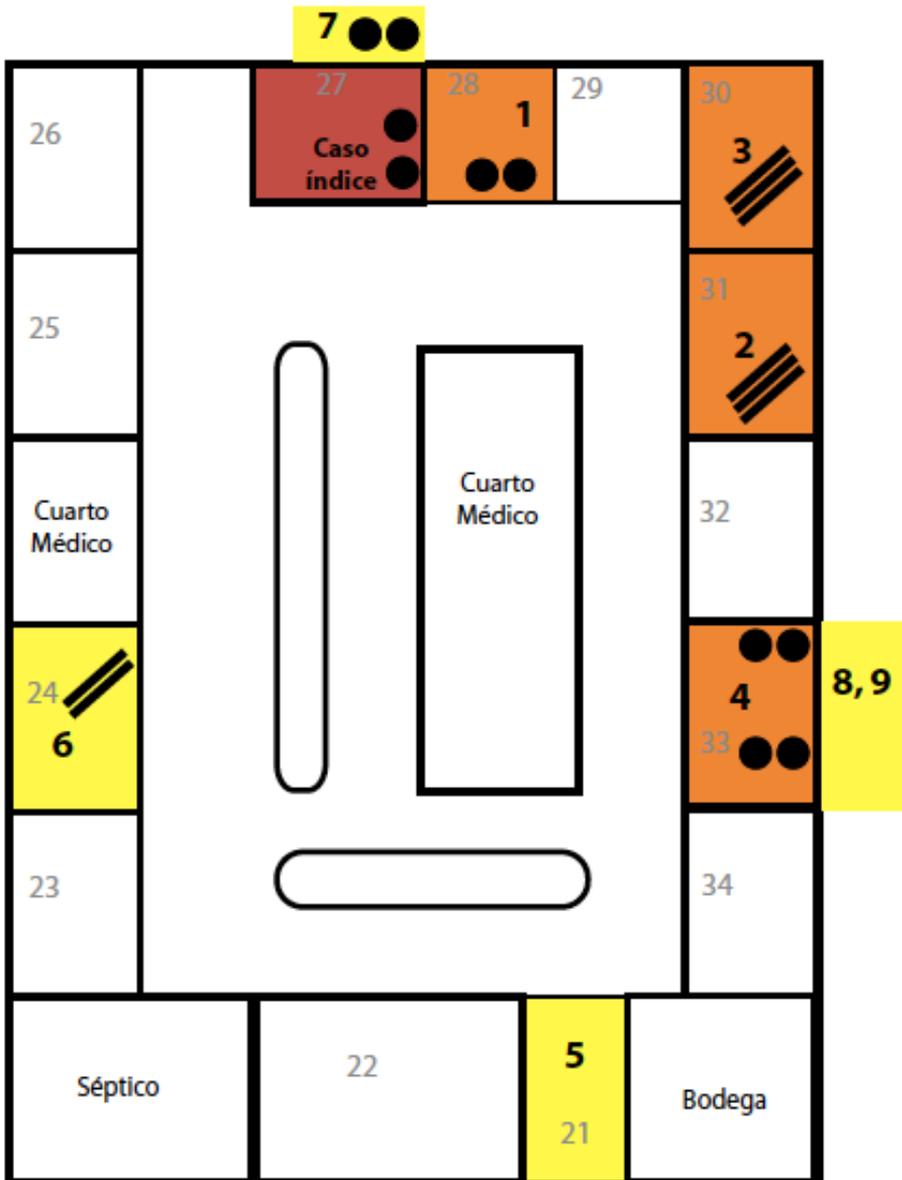
**Figura 6.**

Casos de infección nosocomial por *Acinetobacter baumannii* en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán de 2005 a mayo de 2013.



**Figura. 7**

Descripción del brote de *Acinetobacter baumannii* en la terapia intensiva medico-Quirúrgica, 2012.



## Bibliografía

1. Lenie Dijkshoorn, Alexandr Nemeč and Harald Seifert, An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *nature reviews microbiology* volume 5 december 2007
2. Seifert, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* species Seifert, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2819–2825 (1997).
3. Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H. & Pitt, T. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 179–183 (1999).
4. Garcia-Garmendia, J. L. et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 33,939–946 (2001).
5. Wisplinghoff, H., Perbix, W. & Seifert, H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clin. Infect. Dis.* 28, 59–66 (1999).
6. Davis, K. A., Moran, K. A., McAllister, C. K. & Gray, P. J. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1218–1224 (2005).
7. Perez, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3471–3484 (2007).
8. Hujer, K. M., N. S. Hamza, A. M. Hujer, F. Perez, M. S. Helfand, C. R. Bethel, J. M. Thomson, V. E. Anderson, M. Barlow, L. B. Rice, F. C. Tenover, and R. A. Bonomo. 2005. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7  $\beta$ -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2941–2948.
9. Bou, G., G. Cervero, M. A. Dominguez, C. Quereda, and J. Martinez- Beltran. 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 38:3299–3305.
10. Fernandez-Cuenca, F., L. Martinez-Martinez, M. C. Conejo, J. A. Ayala, E. J. Perea, and A. Pascual. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles

susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1615–1620.

11. Magnet, S., P. Courvalin, and T. Lambert. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3375–3380.
12. Guardabassi, L., L. Dijkshoorn, J. M. Collard, J. E. Olsen, and A. Dalsgaard. 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* 49:929–936
13. Huys, G., M. Cnockaert, M. Vaneechoutte, N. Woodford, A. Nemeč, L. Dijkshoorn, and J. Swings. 2005. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res. Microbiol.* 156: 348–355
14. Ruzin, A., D. Keeney, and P. A. Bradford. 2007. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:1001–1004.
15. Reis, A. O., D. A. Luz, M. C. Tognim, H. S. Sader, and A. C. Gales. 2003. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg. Infect. Dis.* 9:1025–1027.
16. Urban, C., N. Mariano, J. J. Rahal, E. Tay, C. Ponio, T. Koprivnjak, and J. Weiss. 2001. Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI and cecropin P1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:994–995.
17. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl 2):49–56
18. Lisa L. Maragakis and Trish M. Perl, *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options, *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:1254–63
19. Thomas D Gootz, Andrea Marra, *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6(3), 309–325 (2008)
20. Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis LL, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:97–103.
21. Kwon KT, Oh WS, Song JH, et al. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:525–30.

22. Falagas ME, Kopterides P, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. *Clin Infect Dis* 2006; 43:389–90
23. Abbo A, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Siegman-Igra Y, Schwaber MJ. Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:793–800.
24. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006; 42:692–9.
25. Albrecht MA, Griffith ME, Murray CK, et al. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg* 2006; 203:546–50
26. Blot S, Vandewoude K, Colardyn F. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive Care Med* 2003; 29:471–5.
27. Albrecht MA, Griffith ME, Murray CK, et al. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg* 2006; 203:546–50.
28. Chen HP, Chen TL, Lai CH, et al. Predictors of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38: 127–36.
29. D. C. Lye, A. Earnest et al, The impact of multidrug resistance in healthcare-associated and nosocomial Gram-negative bacteraemia on mortality and length of stay: cohort study, *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 502–508
30. The cost of antibiotic resistance: effect of resistance among *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* on length of hospital stay. The Brooklyn Antibiotic Resistance task force *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23:106–8.
31. Nicola C. Gordona, David W. Wareham, Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance, *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (2010) 219–226
32. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case–control studies. *Crit Care* 2006;10:R48.
33. Wang-Huei Sheng A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *International Journal of Infectious Diseases* 14 (2010) e764–e769
34. Playford, E. G., J. C. Craig, and J. R. Iredell. 2007. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J. Hosp. Infect.* 65:204–211.
35. Mi Kyong Joung , Ki Tae Kwon, Impact of inappropriate antimicrobial therapy on outcome in patients with hospital-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Journal of Infection* (2010) 61, 212e218

36. Nan-Yao Lee, MD; Hsin-Chun Lee, Clinical and Economic Impact of Multidrug Resistance in Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Bacteremia, *infection control and hospital epidemiology* June 2007, vol. 28, no. 6
37. John S. Esterly, Impact of Carbapenem Resistance and Receipt of Active Antimicrobial Therapy on Clinical Outcomes of *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Infections, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Oct. 2011, p. 4844–4849
38. Abbo & Y. Carmeli & S. Navon-Venezia & Y. Siegman-Igra & M. J. Schwaber, Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2007) 26:793–800
39. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR, Rhomberg PR. Carbapenem susceptibility discords among *Acinetobacter* isolates. *Clin Infect Dis* 2006; 42:158.
40. Jones RN, Deshpande L, Fritsche TR, Sader HS. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999–2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:211–6.
41. Ikonomidis A, Pournaras S, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:376–7.
42. Brauers J, Frank U, Kresken M, Rodloff AC, Seifert H. Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:24–30.
43. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1586–92.
44. Seifert H, Stefanik D, Wisplinghoff H. Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically defined multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:1099–100.
45. Pachon-Ibanez ME, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachon J. Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4479–81.
46. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:128–31
47. Levin AS, Barone AA, Penco J, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1008–11.
48. Kallel H, Bahloul M, Hergafi L, et al. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *Int J*

- Antimicrob Agents 2006; 28:366–9
49. Kallel H, Bahloul M, Hergafi L, et al. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:366–9.
  50. Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:473–7.
  51. L. Silvia Munoz-Price,., Robert A. Weinstein, *Acinetobacter* Infection, *N Engl J Med* 2008;358:1271-81.
  52. Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaïou DK, Karageorgopoulos DE, et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:194–9.
  53. Ioannis K. Neonakis, Demetrios A. Spandidos, Efthimia Petinaki,., Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review, *International Journal of Antimicrobial Agents* 37 (2011) 102–109
  54. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1018–29.
  55. Garrison MW, Mutters R, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparator agents against a global collection of Gram-negative and Gram-positive organisms: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004 to 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:288–99.
  56. Draghi DC, Tench S, Dowzicky MJ, Sahm DF. Baseline in vitro activity of tigecycline among key bacterial pathogens exhibiting multidrug resistance. *Chemotherapy* 2008;54:91–100.
  
  57. Vasilev K, Reshedko G, Orasan R, Sanchez M, Teras J, Babinchak T, et al. A Phase 3, open-label, non-comparative study of tigecycline in the treatment of patients with selected serious infections due to resistant Gram-negative organisms including *Enterobacter* species, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(Suppl. 1):i29–40.
  58. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:775–80.
  
  59. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:45–55
  
  60. Poulakou G, Kontopidou FV, Paramythiotou E, Kompoti M, Katsiari M, Mainas E, et al. Tigecycline in the treatment of infections from multi-drug resistant Gram-negative pathogens. *J Infect* 2009;58:273–84

61. Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant Gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis* 2008;46:567–70.
62. Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, et al. Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:267–71
63. Yang SC, Chang WJ, Chang YH, Tsai YS, Yang TP, Juan CW, et al. Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:601–4.
64. Tong W, Wang R, Chai D, Li Z, Pei F. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:454–6.
65. Kiffer CR, Sampaio JL, Sinto S, Oplustil CP, Koga PC, Arruda AC, et al. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;52:317–22.
66. Bishburg E, Bishburg K. Minocycline—an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:395–401.
67. Griffith ME, Yun HC, Horvath LL, Murray CK. Minocycline therapy for traumatic wound infections caused by the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*–*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Infect Dis Clin Pract* 2008;16:16–19.
68. A.-P. Magiorakos et al, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281
69. Falagas ME, Koletsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1619–1629.
70. CDC. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs – Worldwide, 2000–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55: 301–305.
71. CDC. Notice to readers: revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55: 1176.
72. Teresa C. Horan, MPH, Mary Andrus, RN, BA, CIC, and Margaret A. Dudeck, CDC/NHSN surveillance definition of health care associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting, *Am J Infect Control* 2008;36:309-32.
73. Andrew F. Shorr, Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2009 Vol. 37, No. 4
75. Feil, Edward J. SMALL CHANGE: KEEPING PACE WITH MICROEVOLUTION,

76. Marcos Pérez-Losada et al, Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology, *Infection, Genetics and Evolution*, 31 January 2013
77. Harbottle, H., et al, Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44, 2449–2457.
78. Pourcel, C., et al, Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 4, 22. 2004.
79. Torpdahl, et al Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J. Microbiol. Methods* 63, 173–184, 2005.
80. Katherine M.E. et al, The secret life of the multilocus sequence type, *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 (2007) 129–135
81. Urwin Rachel et al, Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology, *TRENDS in Microbiology* Vol.11 No.10 October 2003
82. Bartual Sergio G. Et al, Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Sept. 2005, p. 4382–4390
83. Villalon, Pilar et al, Clonal Diversity of Nosocomial Epidemic *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated in Spain, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Mar. 2011, p. 875–882
84. Diancourt Laure, et al, The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool, *PLoS ONE* | April 2010 | Volume 5 | Issue 4 | e10034
85. Adams-Haduch Jennifer M. et al, Molecular Epidemiology of Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Nov. 2011, p. 3849–3854
86. Nabil Karah, Arnfinn Sundsfjord, Kevin Towner, Ørjan Samuelsen, Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*, [Drug Resistance Updates](#) 15 (2012) 237–247
87. Filipe Pereira, João Carneiro and António Amorim, Identification of Species

- with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges; Recent Patents on DNA & Gene Sequences 2008, 2, 187-200
88. Wenjun Li, Didier Raoult & Pierre-Edouard Fournier; Bacterial strain typing in the genomic era; *FEMS Microbiol Rev* 33 (2009) 892–916
  89. Paul G. Higgins, Andrea M. Hujer, Kristine M. Hujer, Robert A. Bonomo and Harald Seifert; Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates; *Journal of Medical Microbiology* (2012), 61, 137–141
  90. Mimi Healy, Joe Huong, Traci Bittner, Maricel Lising, Stacie Frye, Sabeen Raza, Robert Schrock, Janet Manry, Alex Renwick, Robert Nieto, Charles Woods James Versalovic, and James R. Lupski; Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Jan. 2005, p. 199–207
  91. ALEXANDRO C. T. CARVALHO,<sup>1†</sup> GUILLERMO M. RUIZ-PALACIOS,<sup>1\*</sup> PILAR RAMOS-CERVANTES,<sup>1</sup> LUZ-ELENA CERVANTES,<sup>1</sup> XI JIANG,<sup>2</sup> AND LARRY K. PICKERING<sup>2</sup> Molecular Characterization of Invasive and Noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.
  92. Harald Seifert, Lucilla Dolzani, Raffaella Bressan et al; Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Sept. 2005, p. 4328–4335
  93. J. A. Carrico,\* F. R. Pinto,<sup>1</sup> C. Simas,<sup>2</sup> S. Nunes,<sup>2</sup> N. G. Sousa,<sup>2</sup> N. Frazaõ,<sup>2</sup> H. de Lencastre,<sup>2</sup> and J. S. Almeida; Assessment of Band-Based Similarity Coefficients for Automatic Type and Subtype Classification of Microbial Isolates Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Nov. 2005, p. 5483–5490
  94. Carlo La Forgia, John Franke, Donna M. Hacek, Richard B. Thomson, Ari Robicsek, Lance R. Peterson, Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: A 38-month report, *Am J Infect Control* 2010;38:259-63

