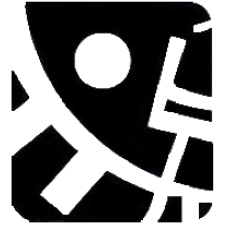




UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



**ESTUDIO DE GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE
Acinetobacter baumannii PROVENIENTES DE DISPOSITIVOS
TIPO CATÉTER**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Ruth Ana Rojas Serrano como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Profa. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA

ABRIL, 2015

Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer a la profesora Guillermina por permitirme formar parte del sótano, además por todo lo que aprendí estando allí, tanto académico como enseñanzas de vida, muchísimas gracias.

A mis padres, Alcira y Simón por todos los sacrificios y por el empeño en hacernos seguir nuestros sueños. Los amo.

A Giovanni e Indira, son excelentes personas, maestros y amigos, les agradezco toda la paciencia y disposición para enseñarme y ayudarme. Los admiro infinito.

A Yusi por la clase magistral de PCR que me ayudó a realizar mi tesis. Gracias infinitas.

A mis hermanos Rafael, Ruben, Rebeca, Rosa y Simón por su compañía, por la sabiduría compartida y por la mejor amistad que cualquiera podría desear. Son mi vida.

A mis amigos y compañeros Daniela, David, Mariana, Emily, Paola, Valery, Mary porque me acompañaron en este camino, lo hicieron no solo llevadero sino sabroso, los adoro.

A mis compañeros del LBP Bea, Douglas, Zule, Joseline y Vicky porque en conjunto hacen del sótano un hogar en el que provoca estar. Los quiero.

A mi amor, compañero, maestro y mejor amigo, Luis Ernesto a ti por todo. Te amo.

Muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Infecciones nosocomiales.....	1
1.2. Catéteres.....	2
1.3. Epidemiología.....	4
1.4. Tipificación.....	4
1.4.1 Taxonomía molecular.....	6
Gen tipo <i>bla</i> _{OXA51}	6
1.4.1. PFGE.....	8
1.4.2. rep-PCR.....	9
1.5. <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Estudios a nivel internacional.....	14
2.2. Estudios a nivel nacional.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. OBJETIVOS.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26

5. PLAN DE TRABAJO.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Aislados.....	28
6.2. Caracterización fenotípica.....	30
Tinción Gram.....	30
Prueba oxidasa.....	30
6.3. Extracción del DNA genómico.....	31
6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
6.4.1. Taxonomía molecular.....	32
6.4.2. Genotipificación bacteriana.....	33
6.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	34
6.5.1. Visualización del gel.....	35
6.5.2. Registro de la imagen.....	35
6.6. Análisis de resultados.....	35
7. RESULTADOS.....	37
7.1. Caracterización fenotípica.....	37
7.2. Relación espacial de los aislados bacterianos.....	38
7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
7.3.1. PCR de la subunidad ribosomal 16s.....	39
7.3.2. Taxonomía molecular.....	40
a. 16S especie específico.....	40
b. Gen <i>bla</i> _{tipoOXA}	41
7.3.3. Genotipificación bacteriana.....	43
a. ERIC PCR.....	44

b. REP PCR.....	45
c. Estudio de las relaciones clonales.....	47
8. DISCUSIÓN.....	54
9. CONCLUSIONES.....	70
10.RECOMENDACIONES.....	71
11.BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Información clínica de los aislados bacterianos evaluados.....	29
Tabla II: Resultados esperados para las pruebas bioquímicas y para <i>A. baumannii</i>	31
Tabla III: Reactivos empleados en la PCR.....	32
Tabla VI: Resultados obtenidos en la caracterización fenotípica de los aislados bacterianos.....	37
Tabla V: Resultados obtenidos en la tipificación de <i>A. baumannii</i>	43
Tabla VI: Grupos obtenidos por ERIC y REP-PCR mediante el análisis visual	48
Tabla VII: Comparación de grupos obtenidos con ERIC y REP- PCR tanto por análisis visual como con el software Phoretix 1D Pro.....	51
Tabla VIII: Grupos obtenidos mediante genotipificación bacteriana.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

1: Fuentes de infección en catéteres.....	3
2: Esquema de PFGE.....	8
3: Principio de la genotipificación basada en la técnica rep- PCR.....	9
4: Genotipificación con REP- PCR.....	10
5: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la subunidad ribosomal 16S.....	39
6: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la subunidad ribosomal 16S para muestras provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de Caracas.....	40
7: Registro fotográfico de corrida electroforética en gel de agarosa de productos de PCR para una sección del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16s en <i>A. baumannii</i>	41
8: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para la amplificación del gen <i>bla</i> _{tipo OXA51}	41
9: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de los productos de ERIC PCR.....	44
10: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de los productos de ERIC PCR para las muestras provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de Caracas.....	46
11: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de los productos	

de REP PCR	46
12: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de REP PCR para muestras provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de Caracas.....	46
13: Dendograma del ERIC-PCR para todos los aislados analizados en este estudio.....	49
14: Dendograma del REP-PCR para todos los aislados analizados.....	50

ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico ribosomal	RNAr
Amikacina	AMK
Amoxicilina- ácido clavulánico	AMC
Cefotaxime	CTX
Ceftazidime	CAZ
Ciprofloxacina	CIP
Desoxi-nucleótidos trifosfato	dNTP's
Electroforesis en gel de campo pulsado	PFGE
Gentamicina	GM
Hospital Universitario de Caracas	HUC
Infecciones de tracto urinario	ITU
Imipenem	IPM
Levofloxacina	LEV
Medio Luria- Bertani	LB
Organización Mundial de la Salud	OMS
Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	RFLP
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencias arbitrarias	AP-PCR
Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencias palindrómicas extragénicas	Rep-PCR
Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de	ERC-PCR

secuencias intragénicas repetitivas de enterobacterias	
Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de	REP-PCR
secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas	
Sulbactam-ampicilina	SAM
Tazpbatan-piperacilina	TZP
Tigeciclina	TGC
Tipificación por secuenciación multilocus	MLST
Tris/Borato/EDTA	TBE
Unidad de Cuidados Intensivos	UCI
Unidad de Terapia de Intensivos	UTI
Vancomicina	VAN

Resumen

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud a nivel mundial. Las más comunes son aquellas asociadas a la irrupción de la integridad del paciente mediante el uso de dispositivos invasivos, tales como catéteres y sondas. Las infecciones asociadas al uso de catéteres pueden ser ocasionadas por la migración de microorganismos hacia el sitio de inserción, contaminación de las conexiones del catéter o contaminación de los fluidos en infusión. *Acinetobacter baumannii* es un microorganismo que ha sido ampliamente descrito como agente causal de infecciones nosocomiales. Esta bacteria presenta resistencia intrínseca a β -lactámicos y ha sido descrito como organismo multirresistente. El estudio epidemiológico de las infecciones nosocomiales debe enfocarse en la identificación del origen de la infección, localizando posibles fuentes así como las vías de transmisión. Por ello es necesario contar con técnicas que permitan tanto la identificación del microorganismo causal como la relación entre diferentes aislados. En este trabajo se planteó el estudio de genotipificación de aislados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de dispositivos invasivos tipo catéter y realizar la comparación con aislados nosocomiales, previamente descritos como *A. baumannii*, provenientes de diversos centros de salud de la ciudad de Caracas. Se aplicaron pruebas bioquímicas y microbiológicas, y técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa utilizando como iniciadores secuencias especie específicas que nos permitan la identificación correcta hasta el nivel de especie, y secuencias palindrómicas extragénicas, rep-PCR, que nos permitan establecer posibles relaciones genéticas entre aislados. Los aislados empleados fueron identificados como *A. baumannii*, tanto por medios fenotípicos como por medios genotípicos. Se estableció la relación clonal entre los aislados nosocomiales, encontrándose que dos aislados de servicios diferentes del HUC son clones indistinguibles, así como dos aislados provenientes de distintos centros de salud de Caracas. Los estudios de genotipificación asociados al estudio epidemiológico de infecciones nosocomiales, resultan de vital importancia para el desarrollo de sistemas de vigilancia y monitoreo de infecciones asociadas al uso de catéteres, generando información que permita el establecimiento de medidas adecuadas de prevención que resulten eficaces.

1. Introducción

1.1. Infecciones nosocomiales

Las infecciones que son adquiridas por el paciente, luego de cuarenta y ocho horas a partir de su ingreso al recinto hospitalario, que no se hallaban previamente en el paciente ni en periodo de incubación, se denominan infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (Limón y Pujol, 2013).

Las infecciones nosocomiales representan un problema de salud a nivel mundial. No sólo desde el punto de vista clínico sino también de salud pública. (Limón y Pujol, 2013).

Tales infecciones afectan a aproximadamente el 9% de los pacientes hospitalarios, según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se ha reportado que principalmente prevalecen en áreas de alta densidad poblacional, tales como Unidad de Terapia Intensiva (UTI), Salas Neonatales, Salas de Medicina, cirugía y pediatría. En las UTI, las infecciones nosocomiales son frecuentes como consecuencia de la severidad de las enfermedades subyacentes que conllevan a la intervención quirúrgica, así como al uso generalizado de los antibióticos de amplio espectro (Padgett y col., 2013; Chíncha y col., 2013).

Las infecciones intrahospitalarias más comunes son las de tracto urinario, las de tracto respiratorio y la infección quirúrgica, todas asociadas a la irrupción de la integridad del paciente mediante el uso de dispositivos invasivos, como catéteres y sondas. Sin embargo, la aparición de la infección nosocomial también está limitada por las condiciones generales del paciente, como por ejemplo la inmunosupresión. Las infecciones nosocomiales pueden ser ocasionadas por una gran variedad de agentes infecciosos que incluyen virus, bacterias y hongos.

1.2. Catéteres

Un catéter es un dispositivo en forma de tubo alargado que puede ser introducido en venas o tejidos, mediante una pequeña incisión. Son empleados para suministrar líquidos y medicamentos.

El uso de catéteres se ha generalizado en la práctica médica debido a que permiten un acceso rápido y seguro al torrente sanguíneo, lo que facilita la administración de fluidos, productos sanguíneos, medicamentos, etc. (García y col., 2003).

Los catéteres pueden ser clasificados de acuerdo a su localización en periféricos o centrales, de acuerdo a su tiempo de permanencia, en temporales o permanentes, y según el material de fabricación pueden ser de silicona, teflón, recubiertos o impregnados (García y col., 2003).

Una de las principales complicaciones del uso de catéteres es la infección relacionada al catéter central, además de ser la primera causa de bacteriemia (Fica, 2003). Las infecciones asociadas a catéteres se manifiestan con síntomas locales inflamatorios en el sitio de inserción cutánea o en el trayecto subcutáneo, o puede pasar desapercibida hasta que el paciente presenta una infección generalizada (Durán y col., 2007). En relación al aumento en el uso de catéteres se ha reportado un incremento en la incidencia de infecciones asociadas a su uso (Ojeda y Megías, 2000).

Las infecciones intrahospitalarias asociadas a catéteres pueden ser ocasionadas por la migración de microorganismos cutáneos hacia el sitio de inserción, la contaminación de las conexiones del catéter, la contaminación de los fluidos en infusión o la contaminación secundaria por bacteriemias (ver figura 1).

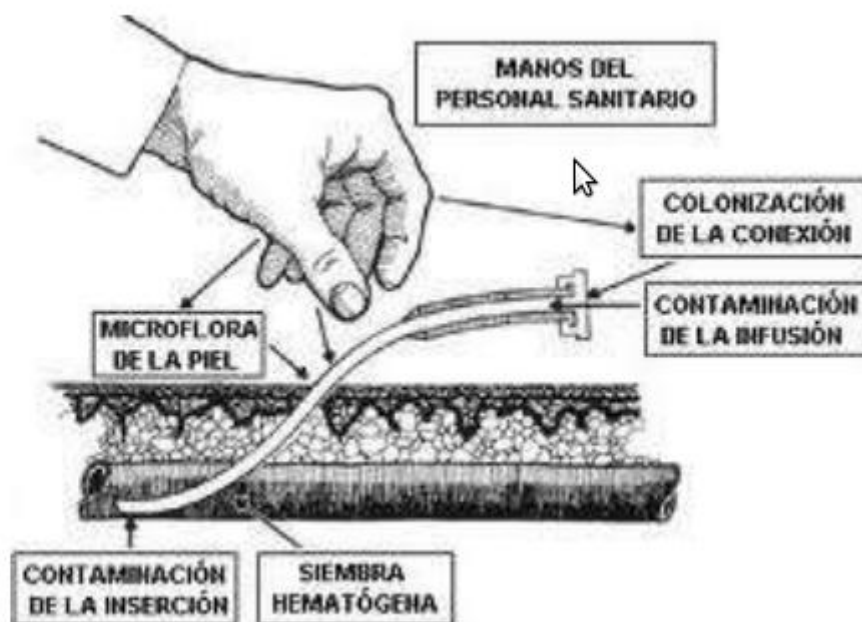


Figura 1: Fuentes de infección en catéteres y su conexión. Tomado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/125654/amdc1de1.pdf?sequence=1>

La colonización de la superficie del catéter por parte de los microorganismos capaces de formar una matriz biológica, puede interferir con la administración de los tratamientos, ya que bajo esas condiciones pueden aumentar considerablemente los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de algunos agentes antimicrobianos para actuar efectivamente sobre dichos organismos.

En catéteres de corta duración, se ha encontrado que, la principal fuente de contaminación es por colonización desde la superficie externa por microorganismos de la piel del sitio de inserción (figura 1), infiriéndose que la contaminación es debida a errores de manipulación del dispositivo (Brenner y col., 2003).

Además de los índices de morbilidad y mortalidad, la importancia del estudio de las infecciones nosocomiales viene dada por los altos costos de los tratamientos que se generan a partir de ellas, distribuidos en el tratamiento

médico, los recursos humanos y el tiempo invertido. También, las infecciones intrahospitalarias se traducen en mayor tiempo de hospitalización para el paciente, lo que disminuye considerablemente su calidad de vida.

1.3. Epidemiología

La epidemiología es una rama de la ciencia que estudia a las enfermedades que afectan a poblaciones humanas específicas, su distribución y su control (Vilchez y Alonso, 2009).

La información generada a partir del estudio epidemiológico de una enfermedad, permitirá proponer y evaluar las estrategias de prevención y control, así como determinar el tratamiento de pacientes que ya han sido infectados.

El estudio epidemiológico de las infecciones nosocomiales causadas por microorganismos multirresistentes debe enfocarse en la búsqueda de las posibles fuentes y focos de transmisión, así como en la identificación de las posibles vías de diseminación. Para lograr estos objetivos se debe contar con técnicas adecuadas que permitan identificar a los microorganismos involucrados.

1.4. Tipificación

La tipificación de un microorganismo corresponde al conjunto de procedimientos que permiten su identificación y caracterización. Esto permite determinar la identidad de los microorganismos causantes de un brote infeccioso, permitiendo establecer la fuente de infección y las vías de diseminación (Vilchez y Alonso, 2009).

Los métodos fenotípicos de identificación microbiológica, que son tradicionalmente aplicados en los estudios epidemiológicos de infecciones

intrahospitalarias, resultan de una utilidad limitada debido a que solo permiten la identificación del microorganismo (o el conjunto de ellos) causante de la infección y sus patrones de sensibilidad ante algunos agentes antimicrobianos, pero no permiten el monitoreo hasta la fuente y la vía de diseminación. Además presentan una reproducibilidad menor a la obtenida por otros métodos (Fernández, 2004).

Los métodos aplicados al diagnóstico microbiológico de enfermedades infecciosas deben garantizar diagnósticos objetivos, rápidos, fiables, seguros y reproducibles. Estos, generalmente se basan en los caracteres fenotípicos de los organismos causantes de la infección (Gobernado y López-Hontangas, 2003). Sin embargo, la expresión de estos caracteres fenotípicos responde a las interacciones del genotipo con el ambiente, en consecuencia podrían resultar sensibles a cambios, cuando se varíen las condiciones ambientales (Fernández, 2004). Los métodos genotípicos se basan en la detección del material genético del microorganismo. En consecuencia, los resultados obtenidos no se ven afectados por la influencia ambiental o por los cambios en el patrón de expresión genética. Por ello ofrecen mayor reproducibilidad y estabilidad (Vilchez y Alonso, 2009).

La tipificación de un microorganismo tiene dos aspectos, la identificación del microorganismo que permita su ubicación taxonómica y la que permite establecer relaciones de filogenia entre diferentes aislados.

La identificación a nivel taxonómico empleando métodos moleculares ha sido definida como taxonomía molecular.

1.4.1. Taxonomía molecular

La taxonomía se refiere al arreglo de organismos en grupos. La clasificación taxonómica tradicionalmente se basa en la evaluación de la presencia o ausencia de proteínas (Höfling y col., 1997).

La taxonomía molecular emplea técnicas de biología molecular, lo que permite el estudio de la composición y distribución de nucleótidos en el genoma de una especie de interés. El empleo de métodos que permitan el estudio del genoma bacteriano permite realizar una identificación y clasificación acertada de los organismos estudiados, ya que disminuye la influencia que pueda tener sobre los resultados de un estudio, el efecto de los factores ambientales sobre la expresión de los genes (Höfling y col., 1997).

Actualmente la taxonomía de bacterias se basa en la combinación de características fenotípicas y genotípicas. Emplea métodos como la hibridación DNA- DNA, secuencia del gen 16S DNA cuyo producto es el RNA 16S, similitud de nucleótidos, filogenia, contenido de G+C (Ramasamy y col., 2014).

El estudio del genoma de bacterias, y la clasificación de ellas a partir de éste, permite el desarrollo de métodos de identificación de especies, tales como la amplificación de genes específicos intrínsecos de cada especie.

Gen *bla*_{tipoOXA51}

Los genes *bla*_{tipoOXA51} que codifican para carbapenemasas clase D tipo OXA-51 son intrínsecos para *A. baumannii*, encontrándose codificados en el genoma bacteriano (Evans y col., 2007). Sin embargo, este tipo de genes, sólo se asocian a la resistencia a carbapenémicos cuando se encuentra la secuencia de inserción IS*Aba1* (Turton y col., 2006).

Debido a que la clasificación fenotípica de *A. baumannii* resulta complicada porque varias especies (las que forman el complejo *A. baumannii*- *A. calcoaceticus*) comparten características bioquímicas, resulta recomendable su identificación molecular mediante la amplificación de los genes que codifican para OXA-51, ya que se trata de secuencias propias marcadoras de la especie (Turton y col., 2006).

En ocasiones, al realizar el estudio epidemiológico de una infección es necesario establecer la relación filogenética entre los diferentes aislados. Para ello se parte del principio que todos los microorganismos relacionados filogenéticamente provienen de la expansión clonal de un individuo y epidemiológicamente están clonalmente relacionados (Vilchez y Alonso, 2009). El establecimiento de las relaciones clonales permite reconocer brotes infecciosos, detectar infecciones cruzadas de patógenos nosocomiales y monitorear programas de prevención y control (Olive y Bean, 1999).

Con el fin de realizar el seguimiento epidemiológico de las infecciones nosocomiales resulta recomendable la tipificación de los microorganismos con técnicas moleculares que permitan el estudio de su genoma, a lo que se le denomina genotipificación. Algunas técnicas recomendadas son la aplicación de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando como iniciadores secuencias palindrómicas repetitivas extragénicas (rep-PCR, por sus siglas en inglés) (Marcos, 1995).

1.4.2. PFGE

La técnica de PFGE se ha convertido en un método útil para la tipificación de aislados de distintos orígenes, siendo la técnica Gold Standard y la recomendada para las genotipificaciones. Esta técnica se basa en el uso de enzimas de restricción que cortan el DNA genómico en fragmentos, particularmente grandes. Los fragmentos son separados con una electroforesis en gel de agarosa, en la cual la orientación del campo eléctrico que atraviesa la matriz, cambia periódicamente. La migración de los fragmentos, así como la resolución de la técnica, dependen de la concentración del gel que funciona como matriz porosa. Finalmente, los fragmentos pueden ser visualizados en el gel formando patrones de bandas, que se presumen específicos para cada especie (Figura 2) (Sabat y col., 2013; Boxall, 1999; Cardoso y col., 2013). Además esta técnica permite la diferenciación de subtipos entre cepas clonalmente relacionadas (Fernández, 2004).

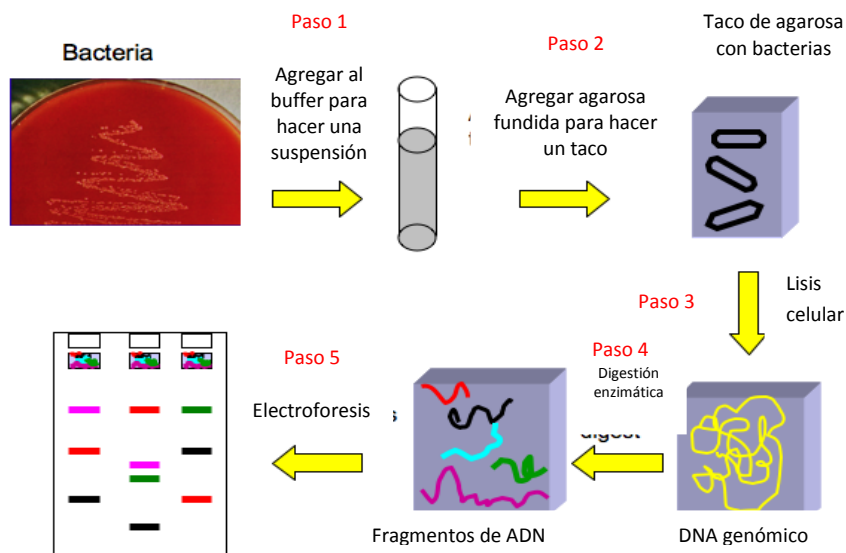
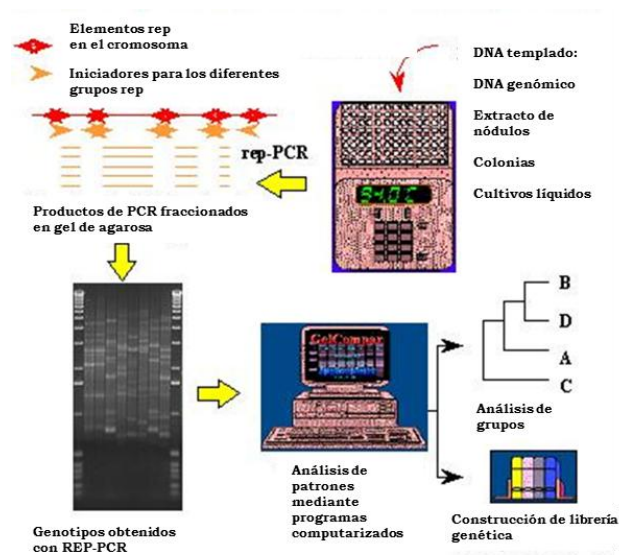


Figura 2: Esquema de PFGE. Tomado y modificado de <http://www.foodsafetynews.com/files/2012/10/PFGE-Figure-1.png>

Tal poder discriminatorio, sumado a su reproducibilidad, hacen de la PFGE la técnica estándar de referencia. Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas, como requerir de un tiempo largo para obtener los resultados por lo que resulta relativamente lenta, es demandante en cuanto a la mano de obra, su poder de discriminación puede disminuir cuando se trata de distinguir entre fragmentos de tamaño muy similar, y además requiere del uso reactivos costosos (Sabat y col., 2013; Martín y col., 2002).

1.4.3. rep-PCR

La rep-PCR (PCR de secuencias repetitivas) es una técnica de tipificación en la que se emplean, como iniciadores, oligonucleótidos que anclan en secuencias repetitivas distribuidas en el genoma de las enterobacterias. Con esta reacción se amplifican las regiones que separan dichas secuencias. El polimorfismo obtenido resulta de la variabilidad en la repetición de las secuencias rep y la separación entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de DNA, producidas por los distanciamientos clonales (Fernández, 2004) (Figura 3)



(Design by P. Vinuesa and J.L.W. Rademaker)

Figura 3: Principio de la genotipificación basada en la técnica de rep-PCR. Tomado y modificado de http://staff-www.uni-marburg.de/~werner/rhizobial_diversity.htm

Las secuencias REP (palindrómicas extragénicas repetitivas, por sus siglas en inglés) y las secuencias ERIC (consenso intragénicas repetitivas de enterobacterias, por sus siglas en inglés) son las más utilizadas en el estudio de la epidemiología molecular de enfermedades infecciosas (Fernández, 2004)

Las secuencias REP son fragmentos de secuencias de nucleótidos altamente conservados, dispersos en el genoma bacteriano. Son secuencias de 38 pb que constan de seis posiciones degeneradas y un bucle variable de 5 pb, ubicados a cada lado de una secuencia palindrómica conservada (Olive y Bean, 1999). Los patrones de bandas generados suelen ser sencillos en organismos como *A. baumannii* (figura 4). Esta técnica ha sido descrita como rápida, reproducible y con alto poder de discriminación, aplicable a estudios epidemiológicos tanto de cepas de *A. baumannii* como de otros microorganismos (Vila y col., 1996).

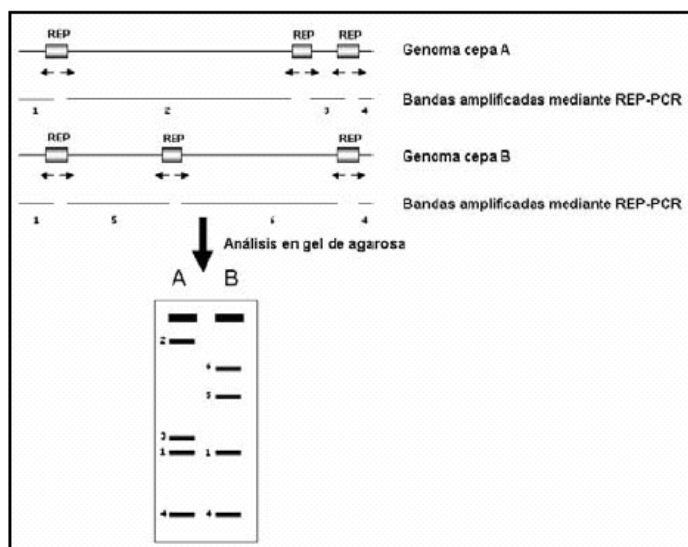


Figura 4: Genotipificación con REP-PCR. Tomado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562009000100003&script=sci_arttext

Las secuencias ERIC son regiones del DNA, no codificantes altamente conservadas, de 126 pb. (Meacham y col., 2003). Contienen una región central

repetida, se encuentran en las regiones extragénicas del genoma bacteriano (Olive y Bean, 1999). Los patrones de bandas generados mediante el uso de esta técnica, suelen ser menos complejos que los obtenidos con REP.

Las técnicas de genotipificación que utilizan los iniciadores para las secuencias tanto REP como ERIC presentan un buen poder de discriminación hasta el nivel de cepas, por lo que la aplicación de ambas pruebas, en conjunto, como método de tipificación aumenta el poder discriminatorio del ensayo (Olive y Bean, 1999).

La rep-PCR presenta algunas ventajas, tales como rapidez del método, ya que sólo requiere de un día, la reproducibilidad en el laboratorio y bajo costo una vez que se cuenta con un termociclador en el laboratorio (Fernández, 2004). Además esta técnica puede ser aplicada a DNA extraído de colonias bacterianas o mediante un método modificado, a células no procesadas (Olive y Bean, 1999). Pero este método presenta algunas desventajas, las cuales incluyen la exigencia de un equipo para PCR, en caso que no se cuente con él, además de las posibilidades de contaminación y falsos resultados (Ross y col., 2005)

1.5. *Acinetobacter baumannii*

Algunos de los microorganismos principalmente asociados a infecciones nosocomiales son *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp.* y *Acinetobacter baumannii*. Entre estos microorganismos, *A. baumannii* resulta de particular interés debido a que presenta una resistencia intrínseca a antibióticos β -lactámicos, además de extender su perfil de resistencia a otros antibióticos de amplio espectro, llevando a su descripción como microorganismo multirresistente. Además presenta una

amplia incidencia en la mayoría de los hospitales que han sido estudiados (Berdinelli y Friedman, 2008).

Las especies del género *Acinetobacter* presentan como principales nichos ecológicos aguas y suelos. Pese a ello se ha descrito a *A. baumannii* como la especie, perteneciente al género *Acinetobacter*, más ampliamente implicada en la infección de pacientes inmunosuprimidos (Salazar de Vegas y Nieves, 2005).

A. baumannii ha sido descrito como cocobacilo Gram negativo, no fermentador, aerobio estricto, inmóvil, catalasa positivos, oxidasa negativo (Marcos, 1995). Sin embargo, tales características fenotípicas no permiten su diferenciación absoluta de otras genoespecies o grupos de hibridación. Por ello ha sido incluido en el complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*. Dicho complejo está formado por las genoespecies 1, 2 y 3 de la clasificación realizada por Bouvet y colaboradores, en el año 1986. Y en el año 1989 Tjernberg y Ursing, adicionaron la genoespecie 13 (Bouvet y col., 1986; Gerner-Smidt, 1992).

Gran cantidad de estudios señalan que, entre las genoespecies que forman el complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*, la especie de mayor importancia clínica es *A. baumannii* (Bergogne- Bèrèzin y Towner, 1996).

Algunas características de *A. baumannii*, tales como sus requerimientos nutricionales y la temperatura óptima de crecimiento, favorecen su permanencia en ambientes hospitalarios, tanto en superficies animadas como inanimadas, por ejemplo dispositivos de ventilación mecánica y pacientes portadores de catéteres asociados a servicios de UTI (González y col., 2002).

La presencia de *A. baumannii* en ambientes hospitalarios ha llevado a su descripción como un microorganismo patógeno oportunista, causante de gran

cantidad de infecciones nosocomiales tales como meningitis, endocarditis bacteriana, afecciones del aparato respiratorio, infecciones urinarias y bacteriemia (Chalbaud y col., 2012; González y col., 2002).

A. baumannii fue reportado como el décimo agente etiológico más común, ocasionando el 1,3 % de las infecciones nosocomiales monomicrobianas de torrente sanguíneo, en Estados Unidos, en un estudio realizado entre 1995 y 2002. Además fue descrito como la causa más común de bacteriemia adquirida en UTI. La tasa de mortalidad para pacientes que adquirieron una infección de torrente sanguíneo, ocasionada por *A. baumannii*, en UTI fue del 34 % al 43 % (Peleg y col., 2008).

Acinetobacter baumannii es también una causa de Infecciones de Tracto Urinario (ITU), siendo reportado como responsable del 1,6 % de ITU nosocomiales. Generalmente se le asocia con infecciones relacionadas al uso de catéteres o por colonización. (Peleg y col., 2008).

A. baumannii es, por mucho, el microorganismo más frecuentemente relacionado con infecciones graves, así como el más resistente a antibióticos, actuando como un organismo resistente a múltiples drogas (Berdinelli y Friedman, 2008). Se ha reportado que las tasas de resistencia a antibióticos como imipenem, meropenem, ciprofloxacina, entre otros, para aislados de *A. baumannii* en latinoamérica, son las más altas a nivel mundial (Peleg y col., 2008). Por tal motivo, el estudio de las infecciones ocasionadas por este microorganismo, resulta de gran interés e importancia clínica.

2. Antecedentes

Existe gran cantidad de información epidemiológica acerca de las infecciones nosocomiales producidas por bacterias, debido al desarrollo de métodos que permiten facilitar y realizar diagnósticos objetivos, claros y de forma rápida y reproducible. Sin embargo, la información relacionada con estas infecciones asociadas a dispositivos tipo catéteres es escasa. Algunos de los métodos de genotipificación más utilizados son PFGE, RFLP y PCR. Los más habituales son aquellos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por su sencillez, rapidez y menores requerimientos económicos

Los estudios epidemiológicos deben realizarse aplicados a poblaciones en lugar de individuos, y aquellos basados en técnicas moleculares son cada vez más comunes, debido a que estos permiten la identificación tanto de la causa de la enfermedad, así como de la fuente del agente infeccioso y las vías de diseminación. Los potenciales resultados se traducen en mayor eficacia en las medidas de prevención y control aplicadas.

A continuación se presenta el resumen de los resultados de algunos trabajos de relevancia, en el área de epidemiología basada en técnicas moleculares de tipificación de microorganismos.

2.1. Estudios a nivel internacional

Debido a la gran importancia de las infecciones nosocomiales y de sus consecuencias sobre los sistemas de salud, se han realizado a nivel mundial, una amplia cantidad de estudios epidemiológicos de infecciones intrahospitalarias ocasionadas por bacterias, basados en técnicas moleculares. Se hace imposible

enumerarlos todos, y se han seleccionado solo algunos relevantes. A partir de los datos obtenidos se han propuesto y desarrollado, en muchos países, programas de seguimiento epidemiológico de infecciones nosocomiales causadas por bacterias. De esa manera se llegan a plantear estrategias de control y prevención adecuadas.

En un estudio realizado en el año 1994 por Reboli y colaboradores, en Italia, se evaluó el poder de discriminación entre cepas esporádicas y cepas epidémicas de *A. baumannii*, mediante la técnica de PCR de elementos repetitivos. Los autores analizaron veinte aislados bacterianos de veinte pacientes diferentes, a los cuales les realizaron antibiogramas, biotipificación, análisis de plásmidos, análisis REP-PCR y ERIC-PCR. Bajo las condiciones experimentales obtuvieron que REP-PCR tiene poder de discriminación entre aislados esporádicos y epidemiológicos, por lo que lo consideran un método adecuado para estudios epidemiológicos de cepas de *Acinetobacter*. Además hallaron e identificaron cuatro grupos (Reboli y col., 1994).

En el año 1996, Vila y colaboradores realizaron un estudio comparativo de diferentes técnicas de DNA fingerprinting, todas basadas en PCR, para tipificar el complejo *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii*. Los autores evaluaron cinco métodos diferentes para tipificar veintiséis aislados clínicos pertenecientes a este complejo, en muestras de España. Hallaron que siete de los aislados pertenecían a un brote previamente definido, mientras que las diecinueve restantes no estaban epidemiológicamente relacionadas. Además que el índice de discriminación para REP-PCR fue del 0.99 y de 0.94 para ERIC-PCR. Lo que les permite concluir que REP-PCR posee un alto poder de discriminación y reproducibilidad comparado con otros métodos basados en PCR, y es un método

simple y rápido de tipificación en estudios epidemiológicos de aislados pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii* (Vila y col., 1996)

Snelling y colaboradores realizaron en el año 1996, un estudio para validar el uso de REP-PCR como método de tipificación de cepas pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii* y su aplicación como método en la investigación de un brote infeccioso en un hospital. Tomaron cinco muestras de pacientes de la UTI para adultos del hospital “Leeds General Infirmary”, Reino Unido. Desarrollaron y optimizaron un método de tipificación de colonias para miembros del complejo *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii*, utilizando REP- PCR. Hallaron que cuatro de los cinco aislados presentaron el mismo patrón REP-PCR. Los resultados fueron evaluados por ribotipificación. Concluyen que REP-PCR tiene un poder discriminatorio ligeramente mayor al de la ribotipificación. Concluyeron que la tipificación con REP-PCR utilizando colonias hervidas, es un método simple, rápido y efectivo para tipificar miembros del complejo *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii* (Snelling y col., 1996)

En el año 2000, Bou y colaboradores publicaron un ensayo de caracterización de un brote nosocomial causado por *A. baumannii* resistentes a imipenem y meropenem, en el Hospital Ramón y Cajal, en Madrid, España, utilizando métodos basados en PCR y PFGE. Los resultados de la tipificación molecular de 29 muestras provenientes de pacientes, demostraron que el brote fue ocasionado por una sola cepa de *A. baumannii* (genotipo 1). Observaron siete diferentes genotipos en las cepas pre, durante y post brote, evaluadas con REP-PCR. Con AP-PCR hallaron que tres de las cuatro cepas obtenidas durante el

brote, tenían perfiles indistinguibles. Sólo se identificaron seis genogrupos con AP-PCR. Los autores proponen a la REP- PCR como una técnica útil para la caracterización de brotes nosocomiales causados por *A. baumannii*, ofreciendo resultados comparables a los obtenidos con PFGE (Bou y col., 2000)

En 2006, Franco de Moura y colaboradores realizaron una evaluación preliminar de la capacidad de adherencia en superficies celulares y abióticas de cinco cepas de *A. baumannii* aisladas de punta de catéteres, de pacientes hospitalizados en Hospital Universitario de la Universidad Estadual de Londrina, en Paraná, Brasil. Los autores evaluaron la adhesión a superficies abióticas en poliestireno, fórmica, látex y vidrio, en cápsulas de Petri, y en células del epitelio bucal. Los aislados fueron identificados mediante métodos bioquímicos. La tipificación molecular de las cepas, se hizo mediante ERIC- PCR. Hallaron que todas las cepas bajo estudio, se adhirieron a los catéteres y a la superficie celular. La adhesión a catéteres se redujo al utilizar meropenem. La tipificación demostró la presencia de tres clones (Franco de Moura y col., 2006).

An-Hua y Dan realizaron, en el año 2008, un estudio en bacilos Gram-negativos aislados tanto de pacientes hospitalizados, como de ambiente y de manos del personal de la UCI del Hospital Central del Sur, en la Universidad de Changsha, China. Evaluaron cincuenta y ocho cepas. Se estudió el perfil plasmídico, perfil de restricción con endonucleasas y ERIC-PCR. Los autores reportan que las bacterias Gram- negativas, resistentes a múltiples drogas, provenían de un origen común y ocasionan un brote infeccioso en la UCI. Recomiendan al personal de la UCI mayor atención en el lavado de manos (An-Hua y Dan, 2008).

En un estudio realizado por Martins y colaboradores en 2014, se propusieron evaluar la diversidad genética y detectar la presencia de marcadores de resistencia en setenta y cuatro cepas multirresistentes de *A. baumannii*, tomadas de cultivos sanguíneos de cinco hospitales de Brasil. El análisis con ERIC-PCR demostró la predominancia de clones únicos en cada hospital analizado. Sin embargo, se observó el mismo patrón de expresión de genes asociados a resistencia microbiana en muestras tomadas de diferentes hospitales. (Martins y col., 2014)

Gulbudak y colaboradores, en 2014, estudiaron la relación clonal entre 75 aislados nosocomiales de *A. baumannii*, mediante el uso de rep-PCR, en Turquía. El análisis demostró la presencia de 8 grupos clonales, incluyendo dos clones principales y seis clones únicos, denominados con letras de la A a la H. Se determinó que A era el predominante, con 7 subtipos, al que perteneció el 72 % de las cepas evaluadas. El clon B, con 3 subtipos, incluyó al 17, 3 % de los aislados. Los clones C y D incluyeron dos cepas cada uno, mientras que E, F, G y H incluyeron cada uno, una única cepa (Gulbudak y col., 2014).

Seo y colaboradores, en 2014, realizaron un estudio comparando los diversos métodos moleculares de tipificación de aislados clínicos provenientes de hospitales universitarios. En el estudio aislaron 53 cepas bacterianas, en cuatro hospitales universitarios en Corea del Sur, e identificaron treinta y cuatro como *A. baumannii*, basados en la secuencia de RNAr 16s y los genes *gpi*. Para subtipificar utilizaron ERIC-PCR y tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés), y posteriormente compararon resultados. Mediante ERIC-PCR hallaron catorce patrones de DNA, mientras que mediante el MLST

detectaron seis tipos de secuencia en los treinta y cuatro aislados clínicos (Seo y col., 2014).

En 2014, Maleki y colaboradores, realizaron un estudio para evaluar las características fenotípicas y genotípicas de cien aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a tetraciclina, causantes de infecciones nosocomiales en hospitales de Teherán. Evaluaron la susceptibilidad antimicrobiana, la presencia de genes asociados a resistencia a tetraciclinas, usando PCR, y la genotipificación fue realizada utilizando REP-PCR. Obtuvieron que todos los aislados fueron sensibles a Tigeciclina. Además, los aislados estaban distribuidos en cinco genogrupos, identificados con letras de la A a la E, con 40 %, 30 %, 10 %, 5 % y 5 % de los aislados respectivamente (Maleki y col., 2014).

Los trabajos anteriores destacan la importancia que se debe dar al estudio de la genotipificación de cepas bacterianas causantes de brotes, utilizando técnicas basadas en la reacción de PCR con secuencias repetidas en el genoma, destacando su versatilidad, rapidez y fácil aplicación para los estudios epidemiológicos. Estos resultados son los que pueden permitir detectar el foco de la infección y los medios de dispersión, para mejorar las medidas de control.

2.2. Estudios a nivel nacional

En nuestro país se han realizado gran cantidad de estudios con aislados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de infecciones nosocomiales, ya que dicho microorganismo ha adquirido importancia como agente causal de infecciones intrahospitalarias. A continuación se presenta un resumen de algunos de los trabajos realizados a nivel nacional en epidemiología molecular a aislados nosocomiales de *A. baumannii* y otros géneros bacterianos.

Un ensayo de genotipificación de cepas de Enterobacterias, realizado en el año 2006 por Rivas y colaboradores, se propuso establecer la relación clonal entre aislados nosocomiales tanto de *Eschecrichia coli* como de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de cuatro centros asistenciales de la ciudad de Caracas. La genotipificación se realizó mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR. La ERIC-PCR permitió relacionar parcialmente las cepas de *E. coli* aisladas, mientras que la REP-PCR permitió discriminar entre los patrones de bandas similares. La mayoría de las cepas aisladas de *K. pneumoniae* no pudieron ser tipificadas mediante el uso de ambas técnicas. Se identificó una relación clonal entre aislados diferentes en dos de los centros existenciales bajo estudio, mientras que en los otros dos no se estableció relación clonal entre aislados (Rivas y col., 2006).

En 2006, Salazar de Vegas y colaboradores, se propusieron investigar un brote infeccioso nosocomial por la cepa del género *Acinetobacter* RUH 1139, en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del Hospital Universitario de Los Andes. Los autores identificaron 28 cepas de *Acinetobacter* mediante métodos bioquímicos. La identificación a nivel de especie la realizaron mediante amplificación y secuenciación del RNAr 16s y digestión con enzimas de restricción. El estudio de la relación epidemiológica entre los aislados, se realizó mediante PFGE, REP-PCR y susceptibilidad antimicrobiana. La aplicación de PFGE, REP-PCR y susceptibilidad microbiana, permitió demostrar la propagación de una cepa epidémica de *Acinetobacter* RUH 1139 en 16 pacientes por un período de tres meses. La misma cepa epidémica fue aislada de 2 de las soluciones de nutrición parenteral que fueron evaluadas. Adicionalmente, cepas de *A. baumannii* así como cepas de *Acinetobacter* RUH 1139 con diferentes patrones en PFGE fueron

aisladas esporádicamente antes y durante el brote infeccioso (Salazar de Vegas y col., 2006).

Moncada y Rahn, en 2007, realizaron la genotipificación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *A. baumannii* procedentes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del HUC, tanto de pacientes como del ambiente del servicio. La relación clonal fue establecida utilizando REP-PCR y ERIC-PCR. No se encontraron clones idénticos entre cepas clínicas y ambientales de *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo los resultados sugieren que 5 pacientes fueron infectados por la misma cepa. Con ambas técnicas se evidenció la relación clonal entre dos cepas clínicas y una ambiental de *A. baumannii* (Moncada y Rahn, 2007).

Sánchez y colaboradores, realizaron un estudio de genotipificación de de *Acinetobacter baumannii* multi-resistente aislado en el Hospital Dr. Domingo Luciani de Caracas, en el año 2008. En el estudio genotipificaron mediante las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR 19 cepas de *A. baumannii* multi-resistente. Además realizaron la confirmación molecular de los aislados mediante la detección de la oxacilinasasa OXA 51 por PCR. Obtuvieron que el 100 % de los aislados fueron positivos a la detección del gen *bla*_{tipo OXA51}. Determinaron la policlonalidad de los aislados, encontrando el predominio de cuatro clones en el área de Hospitalización y la Unidad de Terapia Intensiva de Adultos. Identificaron dos tipos de infecciones, infecciones de origen endógeno e infecciones cruzadas (Sánchez y col., 2008).

En el año 2010, Chalbaud se propuso establecer las posibles fuentes de transmisión de infecciones nosocomiales, caracterizando genéticamente los microorganismos aislados de pacientes y de ambiente de los Servicios de

Neonatología y UTI, del Hospital Universitario de Caracas. *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* fueron los principales causantes de infecciones nosocomiales. La genotipificación de los aislados se realizó mediante REP- PCR y ERIC- PCR. Se identificaron 8 grupos de aislados de *A. baumannii*. En el Servicio de Neonatología, se identificaron dos cepas indistinguibles de esta especie. En la UTI se obtuvo que los aislados pertenecientes a los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 eran clones indistinguibles. Los resultados resaltan la importancia de planes de vigilancia a largo plazo y mejoras en las rutinas de limpieza del recinto hospitalario (Chalbaud, 2010).

En 2012, Chalbaud y colaboradores realizaron un estudio de susceptibilidad a antibióticos y desinfectantes en setenta y cuatro cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales y de ambiente de los Servicios Neonatales y de UTI del Hospital Universitario de Caracas. La genotipificación de las cepas se realizó con REP- PCR y ERIC-PCR. Obtuvieron que 44,6 % de los aislados fueron resistentes a por lo menos 7 antibióticos. 54 % de los aislados mostraron fenotipos de resistencia al desinfectante evaluado. El 73 % de los aislados provenientes de pacientes estaban clonalmente relacionados. El 28,8 % de los aislados ambientales fueron agrupados en siete grupos clonales indistinguibles (Chalbaud y col., 2012).

En el año 2013, Sandoval y colaboradores realizaron un estudio de epidemiología de las infecciones intrahospitalarias por el uso de catéteres venosos centrales. Los autores evaluaron a 31 pacientes portadores de catéter venoso central, del Complejo Hospitalario Universitario Ruiz y Páez, en Ciudad Bolívar. Observaron que el 41,9 % de los pacientes evaluados presentó algún tipo de infección nosocomial, siendo la bacteriemia la infección más frecuente. El

servicio con mayor incidencia de casos fue la UCI. Los factores de riesgo más importantes fueron el tiempo de permanencia del catéter y severidad de la enfermedad base. Los autores recomiendan el uso de técnicas adecuadas de colocación y manejo de catéteres por el personal médico y enfermería (Sandoval y col., 2013).

Los estudios expuestos constituyen apenas una representación de los ensayos, hasta ahora desarrollados sobre genotipificación de aislados bacterianos causantes de infecciones nosocomiales. La amplitud de la información al respecto de estudios epidemiológicos empleando métodos moleculares para tipificación bacteriana, crea la necesidad de conocer cada vez más sobre este tema y promueve a la realización de estudios como el propuesto en este trabajo.

A partir de los trabajos citados se puede inferir que, a nivel nacional, existen muy pocos reportes de estudios asociados a infecciones producidas por el uso de catéteres. Sin embargo, ha sido reportado que el uso de catéteres es una de las principales causas de complicación en pacientes hospitalizados, por lo que se hace necesario profundizar en el estudio epidemiológico de este tipo de infecciones nosocomiales.

3. Justificación

El uso de catéteres se ha extendido en la práctica clínica hasta hacerse habitual, como parte de tratamientos médicos. Estos dispositivos resultan de gran utilidad clínica ya que constituyen una vía de acceso rápido al torrente sanguíneo, permitiendo así la administración de tratamientos y el monitoreo en pacientes críticos. Sin embargo, concomitantemente ha aumentado el número de complicaciones clínicas y mecánicas asociadas a su uso. Una de las principales complicaciones asociadas al uso de catéteres es el desarrollo de bacteriemia en el paciente. Además, el desarrollo de una infección nosocomial relacionada con la colocación de catéteres depende de diversos factores tales como la condición del paciente, las características del catéter, su ubicación, el método de instalación, el tiempo de cateterización, entre otras. Las bacteriemias ocasionadas por el uso de catéteres producen aumento en la morbilidad del paciente, aumento en los costos de atención al paciente y además existe una mortalidad asociada a tales infecciones.

A nivel nacional han sido reportados muy pocos estudios sobre infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres, razón por la cual resulta tanto necesario como novedoso el desarrollo de estudios como el propuesto en este trabajo, que realicen estudios epidemiológicos de infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres.

El estudio epidemiológico de las infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres permite establecer las fuentes de infección, las vías de diseminación así como reconocer los posibles brotes infecciosos. El empleo de las técnicas moleculares en los estudios epidemiológicos de este tipo de infecciones resulta provechoso ya que permite establecer relaciones clonales entre distintos aislados

bacterianos de una misma especie, lo que genera un conocimiento más amplio de la infección y, en consecuencia aumenta la asertividad de las medidas de control y prevención generadas a partir de los datos obtenidos.

4. Objetivos

Objetivo general

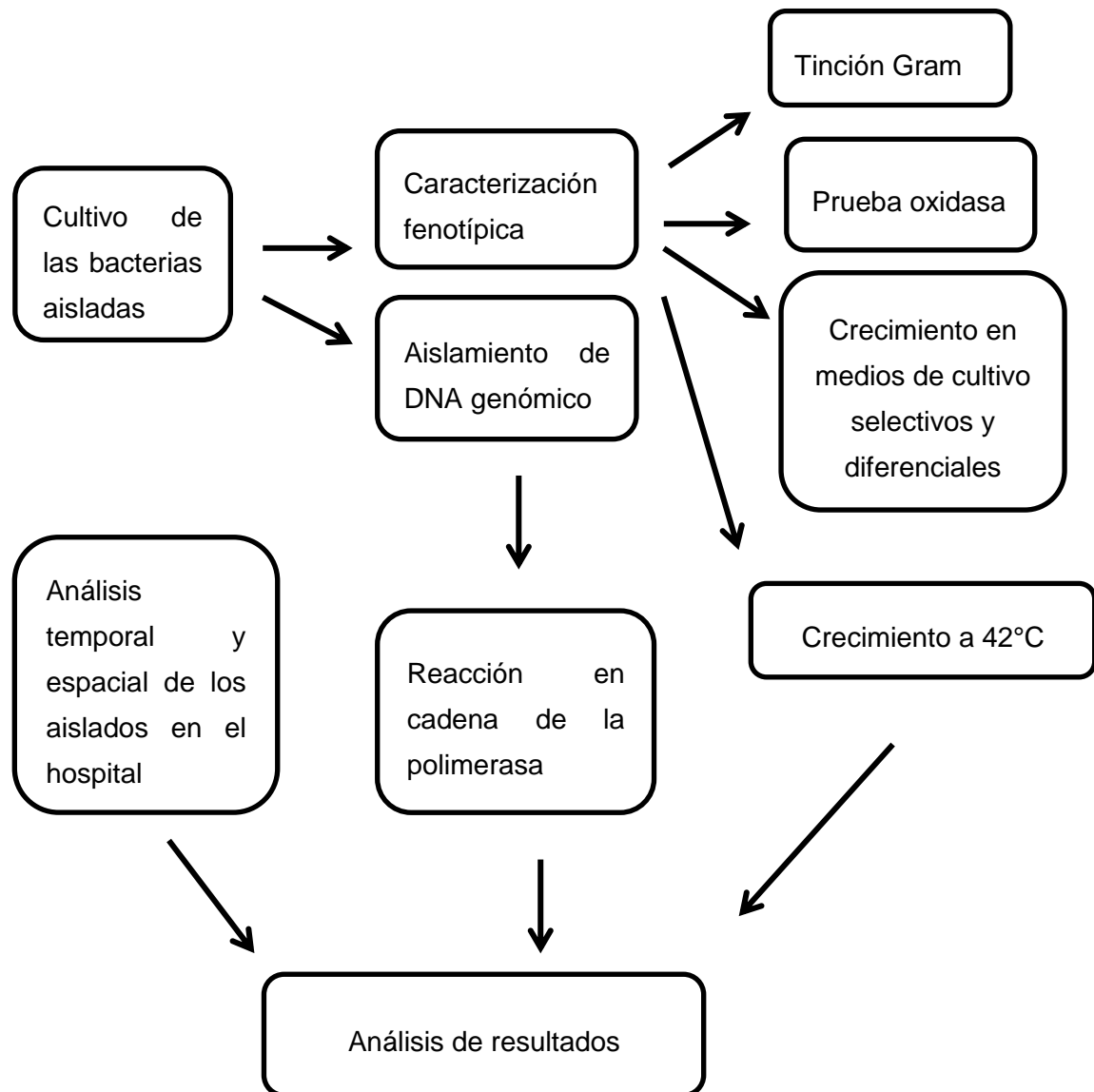
Genotipificar aislados de *A. baumannii* provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres

Objetivos específicos

Tipificación fenotípica de los aislados nosocomiales de *A. baumannii* mediante el uso de métodos microbiológicos convencionales

Tipificación molecular de los aislados bacterianos mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR

5. Plan de Trabajo



6. Materiales y métodos

6.1. Aislados

Los aislados bacterianos que se evaluaron, fueron gentilmente donados tanto por el personal del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario de Caracas, así como por el profesor Luis Torres, de la escuela de bioanálisis de la Facultad de Medicina de la UCV. Estos aislados fueron obtenidos tanto de muestras de pacientes portadores de catéteres, que presentaron un cuadro infeccioso y se determinó a *A. baumannii* como agente infeccioso, como de pacientes que presentaron algún tipo de infección nosocomial asociada a *A. baumannii*. Se empleó un total de 14 aislados, para el desarrollo de este estudio. La información relacionada a las muestras empleadas, se presenta en la tabla I.

Tabla I: Información clínica de los aislados bacterianos evaluados

Aislado	Hospital	Servicio	Sexo del Paciente	Fecha de toma de muestra	Perfil de Resistencia
1166	HUC	UTI	Masculino	Mayo 2012	CAZ, GM, AMC, FEP
1169	HUC	UTI	Masculino	Mayo 2012	CAZ, AMK, SAM, IPM, GV, FEP
1520	HUC	UCI	Masculino	Mayo 2007	GE, AK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM
1172	HUC	UTI	Femenino	Mayo 2012	TZP, CAZ, IPM, NOR, GM
1115	HUC	Cardiología	Femenino	Mayo 2012	CAZ, FEP, AMK, IPM, CIP
1127	HUC	UTI	Femenino	Mayo 2012	TGC, CIP, AMK, IPM, FEP, CAZ
1159	HUC	UTI	Femenino	Mayo 2012	IPM, CIP, FEP, CAZ
2868	HUC	M1	Femenino	Septiembre 2012	LEV, AMK, TZP, IPM, CAZ
3547	HUC	UTI	Masculino	Septiembre 2012	CIP, NOR, IPM, CAZ
1521	HUC	NI	NI	NI	NI
0207	Instituto Médico La Floresta	UCI	Masculino	Marzo 2007	GE, AK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM, SAM
0507	Policlínica Metropolitana	UCI	Masculino	Mayo 2007	GE, AK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM, SAM
0607	Policlínica Metropolitana	UCI	Femenino	Junio 2007	GE, AK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM
1007	Instituto Médico La Floresta	UCI	Masculino	Febrero 2007	GE, AK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, UTI: Unidad de Terapia Intensiva, HUC: Hospital Universitario de Caracas, M1: Sala de Medicina 1, TZP: tazpbatan- piperacilina, IPM: imipenem, CAZ: ceftazidime, GM: gentamicina, AMC: amoxicilina- ácido clavulánico, SAM: sulbactam-ampicilina, AMK: amikacina, NOR: norfloxacin, CIP: ciprofloxacina, TGC: tigeciclina, VAN: vancomicina, CTX: cefotaxime, LEV: Levofloxacina. NI: No se posee ningún tipo de información clínica

Para la realización de este estudio, las muestras obtenidas de pacientes con infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres ingresados en el HUC, fueron tomadas en un período de 4 meses (meses de mayo a septiembre de 2012), con el fin de tipificar y evaluar las relaciones clonales entre aislados. Para comparar patrones, se emplearon 5 muestras provenientes de distintos centros de salud del área de Caracas que ya habían sido evaluadas y que pertenecen a la especie *A. baumannii*. Estos 5 aislados pertenecen a tomas de muestras realizadas en el año 2007, desde febrero hasta junio.

6.2. Caracterización fenotípica

Con el fin de corroborar que los aislados recibidos eran pertenecientes a la especie *A. baumannii*, así como aislar definitivamente la especie de interés, se realizaron varias pruebas microbiológicas y bioquímicas para la caracterización fenotípica de los aislados.

Tinción Gram. Se fijó una colonia aislada a un portaobjetos, se agregó cristal violeta y se esperó 1 minuto. Se enjuagó con abundante agua corriente y se agregó Lugol, se dejó actuar durante 1 minuto. Se realizó un lavado con alcohol: acetona (1:3) y se enjuagó nuevamente con abundante agua. Se agregó Safranina y se dejó actuar por 1 minuto. Se enjuagó nuevamente con abundante agua. Se visualizó el resultado en microscopio óptico con un aumento de 100X, usando aceite de inmersión.

Prueba oxidasa. Se utilizó un papel de filtro Whatman N° 5, se impregnó con una gota de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil- *p*-fenilendiamina. Se tomó una colonia fresca con un palillo de madera y se colocó sobre el papel de filtro impregnado. La presencia de color permitió indicar si la muestra posee el sistema citocromooxidasa.

Además se evaluó el crecimiento en diversos medios de cultivo, como Agar McConkey, medio Kligler, medio S. I. M., medio Citrato Simmons. Además se corroboró el crecimiento a 42° C.

Tabla II: Resultados esperados para las pruebas bioquímicas y para *Acinetobacter baumannii*

Prueba	Evalúa	Resultado esperado para <i>A. baumannii</i>
Tinción Gram	Morfología celular y clasificación Gram	Bacterias en forma de cocos, dispuestas en pareja, tinción roja
Prueba Oxidasa	Presencia de citocromo oxidasa	Negativo
Agar McConkey	Medio selectivo para bacterias Gram negativas, diferencial para fermentadoras	Colonias redondas de bordes lisos, traslúcidas, pequeñas. Medio ligeramente amarillo
Medio Kligler	Cambio de pH	K/K
	Producción de gas	Negativo
	Producción de sulfuro	Negativo
Agar Citrato Simmons	Uso de citrato como fuente de carbono	Negativo
Medio SIM	Producción de sulfuro	Negativo
	Producción de Indol	Negativo
	Motilidad	Negativo

K: alcalino.

6.3. Extracción del DNA genómico

La lisis celular y la extracción del DNA genómico se hicieron mediante el método de ebullición. Se inoculó 2 mL de caldo LB con una colonia del aislado bacteriano a estudiar. Se incubó durante la noche a 37° C. Se tomó 200 µl del cultivo y se transfirieron a un tubo eppendorf, se agregó 800 µl de agua MiliQ. Se llevó a ebullición durante 10 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 12000xg. Se tomó el sobrenadante, y se almacenó a -20° C (Guzmán y Alonso, 2008)

6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

a. Se realizó la amplificación del gen que codifica para un fragmento de la secuencia conservada del RNAr 16s. Esto permitió evaluar la calidad del lisado que contiene el DNA genómico. Se empleó la secuencia de iniciadores U1: 5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG- 3', secuencia que corresponde a los

nucleótidos 518 a 537 del gen 16S RNAr. U2: 5'ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC 3'; que corresponde a los nucleótidos 1513 a 1491 del gen 16S RNAr (Jang y col., 2000).

La amplificación se hizo bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94° C durante ocho minutos, seguido de treinta y tres ciclos de desnaturalización a 94° C durante un minuto, hibridación a 50°C por un minuto, extensión a 72° C durante dos minutos, con una extensión final a 72° C durante diez minutos.

El volumen final de la PCR fue 25 µL de los cuales 1µL es de la muestra de DNA y 24 µL de la mezcla de reactivos (tabla II). Como control negativo se preparó una reacción con todos los reactivos menos el DNA molde. Como control positivo se empleó DNA de *E. coli* K J62- 2

Tabla III: Reactivos empleados en la PCR

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10 X	1X
MgCl ₂	50 mM	3 mM
dNTP	10 mM	200 µM
Taq polimerasa	5 U/µl	1 U/µl
Iniciador F	10 mM	1 µM
Iniciador R	10 mM	1 µM
DNA	-	-
Agua	-	-

6.4.1. Taxonomía molecular

a. Con el fin de corroborar que los aislados evaluados pertenecen a la especie *A. baumannii*, se realizó la amplificación de la secuencia correspondiente a la subunidad ribosomal 16S específica para dicha especie. Para ello se

emplearon los iniciadores 16SF, 5'-GACGTACTCGCAGAATAAGC-3', y 16SR, cuya secuencia es 5'-TTAGTCTTGGCGACCGTACTC-3' (Lin y col., 2009). Las condiciones de la amplificación son: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto, extensión 72 °C durante 1 minuto, y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

b. Para corroborar que todas las muestras se clasifican correctamente como especie *A. baumannii* se realizó la detección de carbapenemasas tipo *bla*_{OXA51}. Utilizando los iniciadores F 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' y R 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3' (Woodford y col., 2006). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, hibridación a 57 °C durante 45 segundos, extensión a 72 °C por un minuto, con una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

6.4.2. Genotipificación bacteriana

a. Se aplicó rep-PCR a las muestras. Para ello se utilizaron iniciadores ERIC y REP. Los iniciadores ERIC empleados son ERIC 1: 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA 3' y ERIC 2: 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3' (Versalovic y col., 1991). La amplificación se hizo siguiendo los siguientes pasos: una desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización, a 94° C por 1 minuto, hibridación, a 36 °C durante 1 minuto, extensión, a 72° C por 10 minutos, seguidos de una extensión final a 72° C durante 15 minutos.

b. Para la tipificación basada en secuencias REP, se empleó el iniciador REP 1, cuya secuencia es 5´GCGCCGICATGCGGCATT 3´ (Horcajada y col., 2002). La amplificación se llevó a cabo por los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 50° C por 1 minuto, extensión a 72° C durante 8 minutos, seguido de una extensión final a 72° C por 15 minutos.

Las PCR se realizaron en un termociclador modelo Mastercycler Personal, de la casa comercial Eppendorf. Al finalizar la PCR, las muestras fueron almacenadas a -20° C.

Se empleó la cepa *E. coli* K J62-2 como control positivo, en las pruebas de genotipificación bacteriana así como en el análisis de la calidad del material genético mediante PCR con iniciadores universales para bacterias.

Así mismo, se empleó al aislado AB3 como control positivo en los ensayos de taxonomía molecular. Este aislado había sido previamente evaluado y descrito como *Acinetobacter baumannii*.

A todas las reacciones de PCR se les realizó un control de reactivos, éste consiste en una mezcla de reacción sin ningún contenido de DNA. De esta manera se evaluó la calidad de los reactivos empleados y se eliminan los falsos positivos en las pruebas.

6.5. Electroforesis en geles de agarosa

Para la preparación del gel se pesó la agarosa de acuerdo a la concentración y cantidad necesarias y se disolvió en Buffer TBE 1X (Tris-HCl 0,089M, ácido bórico 0,089M, EDTA 0,002M, pH 8,0).

Una vez polimerizado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se le agregó el buffer de corrida (TBE 1X). Las muestras se mezclaron con un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25% y glicerol 50%). Se cargó el marcador de tamaño 100pb. Se inició la corrida electroforética. Al terminar se procedió a la visualización del gel.

6.5.1. Visualización del gel

Para visualizar el patrón de bandas generado por la corrida electroforética, se trató el gel con bromuro de etidio, sumergiéndolo en una suspensión durante 15 minutos, posteriormente se lavó en agua destilada para retirar el exceso.

6.5.2. Registro de la imagen

Luego del tratamiento el gel se observó en un equipo de fotodocumentación. Gel Doc XR⁺, de la casa comercial BioRad. La imagen obtenida fue analizada y registrada mediante el programa Image Lab 3.0

6.6. Análisis de los resultados

El criterio para determinar la relación entre los aislados fue el reportado por Tenover y colaboradores, en 1995. Según el cual los aislados indistinguibles, son aquellos que no presentan variaciones, muy relacionados son los que presentan diferencias de 2 a 3 bandas, los posiblemente relacionados son los que presentan de 4 a 6 bandas de diferencia, y los no relacionados son los que presentan de 7 bandas o más, de diferencia.

El análisis *in silico* se realizó empleando el programa Phoretix 1D Pro v.13.0 (Totallab, Newcastle, Reino Unido), partiendo de cada registro fotográfico se normalizan los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis, de acuerdo al factor de retardo (R_f , por sus siglas en inglés) y se comparan las imágenes. Fue

utilizado el coeficiente de correlación de Pearson para la matriz de distancia, y el algoritmo UPGMA para la creación de los dendogramas.

7. Resultados

7.1. Caracterización fenotípica

Para la realización de este estudio se analizó un total de 14 muestras bacterianas, de las cuales 9 fueron tomadas en diferentes servicios del HUC en un período 2 meses (mayo- junio de 2012). Las 5 muestras restantes son provenientes de varios centros hospitalarios de la ciudad de Caracas. Con el fin de determinar si las muestras se trataban de la misma especie, se les realizó un conjunto de pruebas bioquímicas y microbiológicas (tabla IV), que permitirían determinar fenotípicamente, la especie de los microorganismos a estudiar.

Tabla IV: Resultados obtenidos en la caracterización fenotípica de los aislados bacterianos

Aislado	Agar citrato Simmons	Agar hierro Kligler			Medio SIM			Oxidasa
		Cambio de pH	Gas	Sulfuro	Motilidad	Sulfuro	Indol	
1169	+	K/K	-	-	-	-	-	-
1159	+	A/A	-	-	-	-	-	-
3547	+	K/K	-	-	-	-	-	-
1115	+	A/K	-	-	-	-	-	-
1521	-	A/A	-	-	-	-	-	-
2868	-	K/K	-	-	-	-	-	-
1172	-	A/K	-	-	-	-	-	-
1166	-	A/A	-	-	-	-	-	-
1127	-	K/K	-	-	-	-	-	-
1520	-	K/K	-	-	-	-	-	ND
0507	-	K/K	-	-	-	-	-	ND
1007	+	K/K	-	-	-	-	-	ND
0207	+	K/K	-	-	-	-	-	ND
0607	+	A/A	-	-	-	-	-	ND

(+) Los aislados dieron positivo a la prueba, (-) Los aislados dieron negativo a la prueba, A=ácido, K=alcalino ND= No determinado

Todos los aislados evaluados resultaron ser Gram negativos. Además se obtuvo que el 71% de las muestras evaluadas no fueron capaces de acidificar el tubo de medio del Agar Hierro Kligler, lo que indica que no son capaces de fermentar lactosa. De igual manera el 42,8% de las muestras fueron capaces de acidificar el medio a partir del uso de glucosa, lo que se evidencia como un cambio de coloración en la parte inclinada del medio Agar Hierro Kligler, producto de su acidificación.

Se obtuvo que el 50% de las muestras evaluadas fueron capaces de emplear el citrato como única fuente de carbono. Además que ninguno de los aislados produjo gas, precipitados de sulfuro o fueron móviles.

Todos estos resultados en conjunto nos permiten sugerir que estamos en presencia de aislados bacterianos que pueden ser clasificados como *A. baumannii*.

7.2. Relación espacial de los aislados bacterianos

Al realizar la comparación entre los aislados bacterianos empleados en el presente estudio, podemos comparar, su distribución en el HUC (las muestras que fueron tomadas allí), y el período de toma de muestras. Al analizar los datos de todos los aislados (tabla I) podemos destacar que las muestras provenientes del Instituto Médico La Floresta y la Policlínica Metropolitana fueron tomadas en el año 2007, en un período de 4 meses (de Febrero a Junio). Las muestras tomadas en el HUC, fueron tomadas en el año 2012 en los meses de Mayo y Septiembre, con una excepción en mayo de 2007 (muestra 1520). Además podemos destacar que, a excepción de la muestra 1115 (tomada en cardiología), todas las muestras tomadas en Mayo de 2012 provienen de la UTI. Mientras que de las muestras

tomadas en Septiembre de 2012, una proviene de la UTI y otra de la sala de medicina M1.

7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el fin de caracterizar adecuadamente a los aislados empleados como muestra de este estudio, se les aplicó un conjunto de pruebas moleculares basadas en la PCR. A todos los aislados se les realizó la extracción del DNA genómico mediante el método de ebullición.

7.3.1. PCR de la subunidad ribosomal 16S

. Con el fin de corroborar la integridad y calidad del material genético obtenido se realizó la amplificación de la subunidad ribosomal 16S (ver figuras 5 y 6)

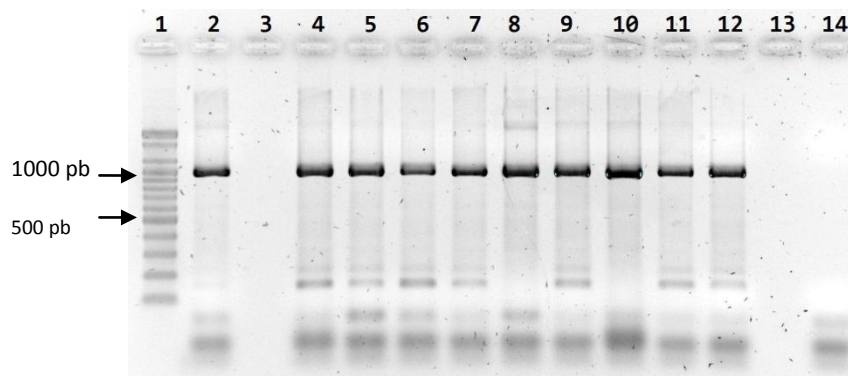


Figura 5: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la subunidad ribosomal 16S. 1=Marcador 100pb; 2=*E. coli* K12 J62-2; 3 y 13= Vacíos; 4= 1115; 5=1127; 6=1159; 7=1166; 8=1169; 9=1172; 10=1521; 11=2868; 12=3547; 14=Control de reactivos.

Al realizar la amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S, empleando iniciadores universales, se obtuvo (con todos los aislados) una banda de 996 pb y las bandas inespecíficas de 150 y 100 pb. La obtención de la banda de 996 pb, nos indica que el material genético está apto para ser empleado en la amplificación de genes específicos.

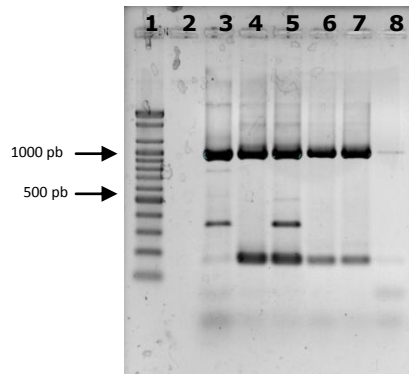


Figura 6: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la subunidad 16S para muestras provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de Caracas. Carriles 1=Marcador 100 pb; 2=Vacío; 3=0607; 4=1520; 5=0507; 6=1007; 7=0207; 8= Control de reactivos.

En la figura 6 se observa el resultado de la amplificación de la subunidad ribosomal 16S. Se obtuvo la banda de 996 pb, esperada. Además se obtuvo una banda adicional de aproximadamente 350 pb para los aislados 0607 y 0507.

7.3.2. Taxonomía molecular

Para verificar los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas, que identificaban a los aislados como *Acinetobacter*, se realizó la amplificación de genes especie específicos para *A. baumannii*.

a. 16S especie específico

Se realizó la amplificación de una región del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S. Esta amplificación permitiría corroborar la identificación de los aislados como pertenecientes a la especie *A. baumannii*, debido a que se utilizan iniciadores de secuencia específica para la especie. Los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (figura 7).

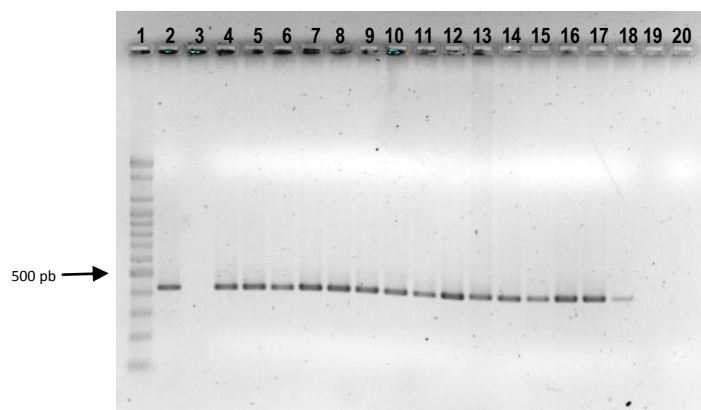


Figura 7: Registro fotográfico de corrida electroforética en gel de agarosa de productos de PCR para una sección del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S en *A. baumannii*. Carril 1=Marcador 100 pb; 2= AB3 (Control positivo); 3 y 20=vacíos; 4=0207; 5=0507; 6=0607; 7=1007; 8=1115; 9=1127; 10=1159; 11=1166; 12=1169; 13=1172; 14=1520; 15=1521; 16=2868; 17= 3547, 18=*E. coli* J62-2

En la reacción de amplificación (para todos los aislados) se obtuvo una banda específica de 426 pb. La obtención de dicha banda indica que los aislados empleados para este estudio son *A. baumannii*.

b. Gen *bla*_{OXA51}

Como parte de las pruebas de taxonomía molecular y para verificar que todas las muestras empleadas para este estudio son *A. baumannii*, se realizó la amplificación del gen tipo *bla*_{OXA51}. Los amplicones obtenidos fueron separados con una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (figura 8)

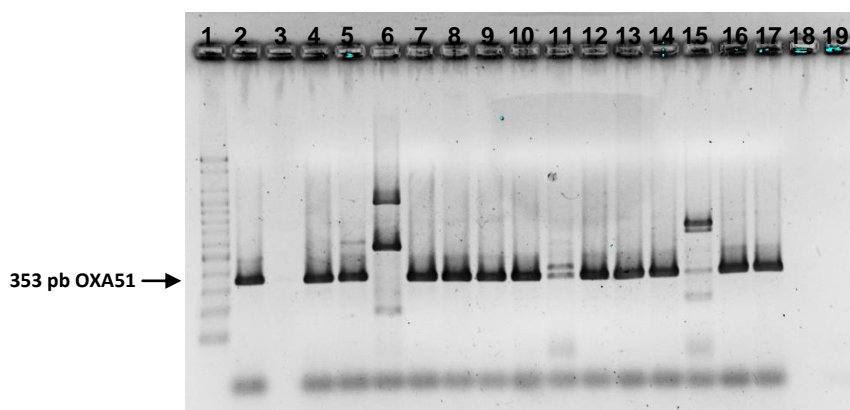


Figura 8: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para la amplificación del gen *bla*_{tipo OXA51}. Carril 1=Marcador; 2=AB3 (Control positivo); 3y 18=Vacíos; 4=0207; 5=0507; 6=0607; 7=1007; 8=1115; 9=1127; 10=1159; 11=1166; 12=1169; 13=1172; 14=1520; 15=1521; 16=2868; 17= 3547; 19=Control de reactivos.

Al amplificar empleando iniciadores específicos para el gen *bla* tipo OXA51 se obtuvo, con el 92,8 % de los aislados empleados, la banda esperada de 353 pb. Lo que indica que los aislados pertenecen a la especie *A. baumannii*. Cabe destacar que se obtuvo un patrón de bandas diferente para las muestras 0607, 1166 y 1521. Aunque con las muestras 1166 y 1521, sí se obtuvo la banda de 353 pb, aunque tenue. La obtención de un patrón de bandas diferente, implica un patrón positivo modificado. Turton y colaboradores, en 2010, reportaron que los microorganismos distintos de *A. baumannii*, no generan ningún tipo de amplicon, al realizar la detección del gen tipo *bla*_{OXA51}.

Tabla V: Resultados obtenidos para la tipificación de *A. baumannii*

Aislado	Agar citrato Simmons	Agar hierro Kligler			Medio SIM			Oxidasa	OXA-51
		Cambio de pH	Gas	Sulfuro	Motilidad	Sulfuro	Indol		
1169	+	K/K	-	-	-	-	-	-	+
1159	+	A/A	-	-	-	-	-	-	+
3547	+	K/K	-	-	-	-	-	-	+
1115	+	A/K	-	-	-	-	-	-	+
1521	-	A/A	-	-	-	-	-	-	*
2868	-	K/K	-	-	-	-	-	-	+
1172	-	A/K	-	-	-	-	-	-	+
1166	-	A/A	-	-	-	-	-	-	*
1127	-	K/K	-	-	-	-	-	-	+
1520	-	K/K	-	-	-	-	-	ND	+
0507	-	K/K	-	-	-	-	-	ND	+
1007	+	K/K	-	-	-	-	-	ND	+
0207	+	K/K	-	-	-	-	-	ND	+
0607	+	A/A	-	-	-	-	-	ND	*

+ = Positivo a la prueba, - = Negativo a la prueba, A = Ácido, K = Alcalino, ND = No determinado, * = Patrón positivo modificado

En la tabla V se resumen todos los resultados obtenidos para la tipificación de las muestras empleadas. Lo que nos permite afirmar que las muestras empleadas son *A. baumannii*.

7.3.3. Genotipificación bacteriana

Para realizar la tipificación de todos los aislados empleados en este estudio, se realizaron dos tipos de pruebas basadas en la PCR. Una vez obtenidos los registros fotográficos de todas las pruebas de genotipificación, se analizaron con el programa Phoretix 1D (TotalLab, Newcastle, Reino Unido), este software

permite normalizar los patrones de bandas entre sí, compararlos y agruparlos de acuerdo a su similitud.

a. ERIC PCR

Como método de genotipificación se realizó la amplificación de los fragmentos ubicados entre los elementos repetitivos ERIC, en todos los aislados provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéter. Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y los registros fotográficos se muestran en las figura 9.

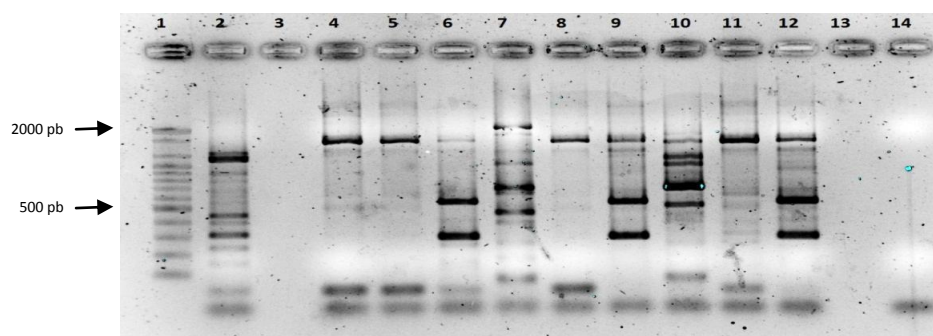


Figura 9: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de los productos de ERIC PCR. Carriles 1=Marcador; 2= *E. coli* J62-2; 3y 13=vacios; 4=1115; 5=1127; 6=1159; 7=1166; 8=1169; 9=1172; 10=1521; 11=2868; 12=3547; 14=Control de reactivos

Se puede observar que obtuvimos algunos patrones de bandas similares. Sin embargo se distinguen claramente los patrones de bandas obtenidos con 1166 y 1521, que son muy diferentes de los patrones obtenidos para el resto de los aislados.

Para realizar la comparación de los patrones de bandas obtenidos con el uso de iniciadores ERIC, se realizó el ensayo a 5 muestras previamente evaluadas e identificadas como *A. baumannii* (figura 10).

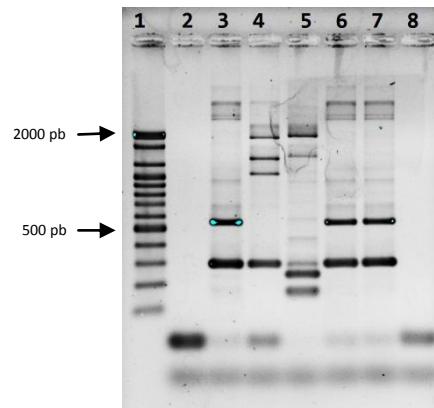


Figura 10: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de los productos de ERIC-PCR para las muestras provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de Caracas. Carriles 1=Marcador; 2=*E. coli* J62-2; 3=0207; 4=0507; 5=0607; 6=1007; 7=1520; 8=Control de reactivos.

Al comparar Los patrones de bandas obtenidos, se aprecia que los patrones obtenidos para las muestras 0207, 1007 y 1520 son muy similares entre sí. Mientras que los patrones obtenidos con las muestras 0507 y 0607 son diferentes entre sí, y además diferentes de los patrones obtenidos con las otras muestras.

b. REP PCR

Se realizó la amplificación de los fragmentos que se ubican entre los elementos REP distribuidos en el genoma bacteriano, como segundo método de genotipificación. Se aplicó la PCR a todas los aislados provenientes de pacientes con infecciones asociadas al uso de catéter. Para visualizar los fragmentos se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5 % (figura 11).

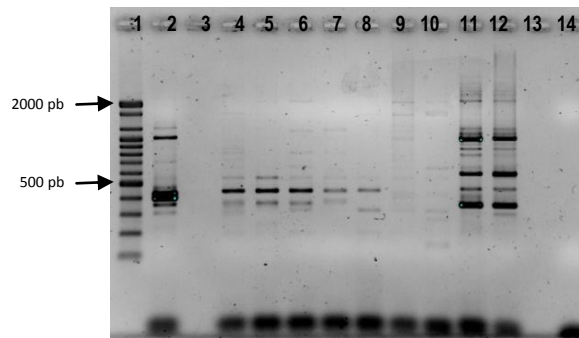


Figura 11: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de los productos de REP PCR. Carriles 1= Marcador; 2= *E. coli* J62-2; 3 y 13=vacíos; 4=1115; 5=1127; 6=1169; 7=2868; 8=1159; 9= 1172; 10=3547; 11= 1166; 12=1521; 14= Control de reactivos.

En la figura 11 se observa que los patrones obtenidos con las muestras 1115, 1127, 1169, 2868 y 1159 son muy similares entre sí. Mientras que los patrones obtenidos con las muestras 1172, 3547, 166 y 1521, son muy diferentes. Los patrones obtenidos con 1166 y 1521 presentan algunas bandas en común.

Con el fin de comparar los patrones de bandas obtenidos para las muestras provenientes de pacientes, se realizó la amplificación empleando el iniciador REP a 5 muestras que habían sido previamente evaluadas e identificadas como *A. baumannii* (ver figura 12).

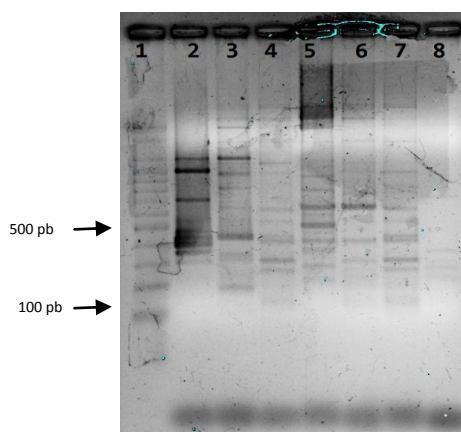


Figura 12: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa de productos de REP-PCR para muestras de diferentes hospitales de la ciudad de Caracas. 1: Marcador 100pb; 2: *E. coli* K J62-2; 3: 0207; 4: 0507; 5: 0607; 6: 1007; 7: 1520; 8: Control de reactivos.

Los patrones de bandas obtenidos por REP-PCR con las muestras provenientes de distintos centros de salud de la ciudad de Caracas, son muy diferentes entre sí, a simple vista no se observan bandas en común o patrones repetidos.

En todas las pruebas de genotipificación se empleó *E. coli* K J62-2 como control positivo de la reacción. Ha sido descrito que las secuencias rep se encuentran en enterobacterias, por lo que *E. coli* actúa de forma adecuada como un control positivo a la reacción, ya que es posible la amplificación de los fragmentos flanqueados por los elementos ERIC o REP generándose así un patrón de bandas (Versalovic y col., 1991). Cabe destacar que en todas las pruebas realizadas, *E. coli* generó un patrón de bandas claramente distinguible del generado por las muestras objeto de estudio en el presente trabajo.

c. Estudio de las relaciones clonales

Se tipificó a las muestras empleadas en este estudio por dos métodos basados en la PCR (ERIC y REP-PCR). Los registros fotográficos obtenidos fueron analizados tanto de forma visual, como empleando una prueba gratuita del software Phoretix 1D (Totalab), lo que permite la normalización de los patrones de bandas obtenidos, su comparación y agrupamiento de acuerdo a su similitud. Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, como medida estadística de similitud y el algoritmo UPGMA como medida estadística para la creación de los dendogramas.

El análisis visual de los patrones de bandas obtenidos con REP y ERIC nos permitió distinguir tres posibles grupos. Las muestras que resultaron pertenecientes a un grupo, mediante ERIC-PCR, también resultaron agrupadas

con REP-PCR (tabla VI). A excepción de la muestra 1159 que fue agrupada de forma diferente en ambas pruebas.

Tabla VI: Grupos obtenidos por ERIC y REP- PCR mediante el análisis visual

Aislados	Grupos ERIC	Grupos REP
1115	I	1
1127	I	1
1169	I	1
2868	I	1
1159	II	1
1172	II	2
3547	II	3
1166	III	4
1521	IV	4
0207	V	5
0507	VI	6
0607	VII	7
1007	V	8
1520	V	8

En la tabla VI se muestra que se obtuvo por lo menos tres grupos principales, mediante el uso de ambas pruebas, según el análisis visual de los registros fotográficos de los patrones de bandas obtenidos. Se observa que existe correlación entre los resultados obtenidos con ambas pruebas.

En la figura 13 se puede observar el resultado de la genotipificación de todos los aislados por el método ERIC-PCR, organizados en forma de dendograma. En la figura se denota con colores diferentes cada posible grupo.

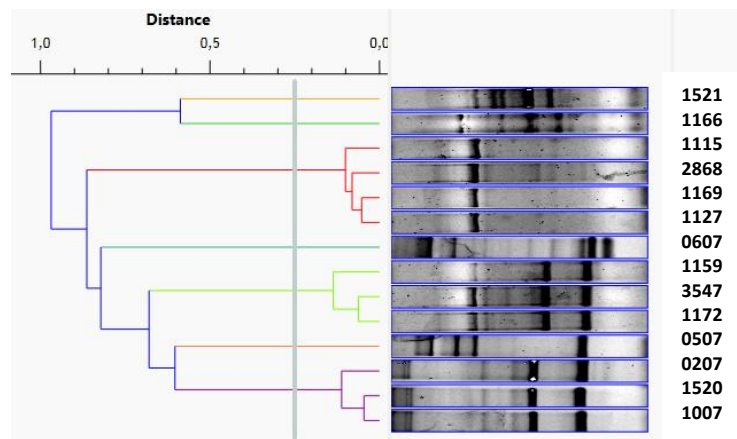


Figura 13: Dendrograma obtenido a partir de los patrones de ERIC-PCR para los aislados analizados en este estudio. En el lado izquierdo de la figura se observa el diagrama en forma de árbol que representa el porcentaje de similitud entre aislados o grupos de aislados (de 0 a 1). Las líneas verticales representan la similitud entre los aislados, entendiéndose que mientras más cercana se encuentre al 0 del eje superior, mayor es la similitud entre aislados. La línea gris representa el corte de 85 % de similitud. Los grupos están definidos por las líneas de color naranja, verde oscuro, rojo, azul claro, verde claro, rosa y violeta. Al lado derecho se muestran los patrones de bandas obtenidos (figuras 9 y 10). En el extremo derecho se encuentra la identificación de cada patrón de bandas de acuerdo al aislado con el que se obtuvo.

El dendrograma realizado a partir de los patrones de bandas obtenidos mediante ERIC-PCR nos permite sugerir la policlonalidad de los aislados empleados en este estudio. Se observa del lado izquierdo de la figura 13 un eje superior que representa la distancia entre aislados, en valores que van de 1 a 0. La similitud entre aislados, está representada en el diagrama mediante las líneas verticales. Lo que implica que las líneas del diagrama que se encuentren más cercanas al 0 del eje superior, representan una mayor similitud entre los aislados. La línea de color gris representa el 85 % de similitud entre aislados.

En el diagrama se advierte la presencia de tres grupos clonales y cuatro clones únicos. Definiremos los grupos de aislados relacionados como A, B, y C. El grupo A es el denotado con el recuadro en color rojo. El grupo B, denotado en color verde y el grupo C en color violeta.

En la figura 14 se aprecia el resultado de la genotipificación de todos los aislados, por el método REP-PCR, en forma de dendograma. Los posibles grupos clonales están identificados por colores.

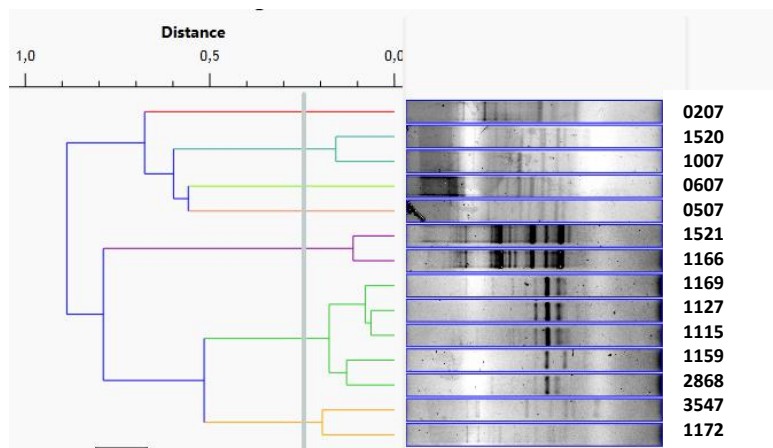


Figura 14: Dendograma obtenido a partir de los patrones de REP-PCR para los aislados analizados. En el lado izquierdo de la figura se observa el diagrama en forma de árbol que representa el porcentaje de similitud entre aislados o grupos de aislados (de 0 a 1). Donde las líneas verticales representan la similitud entre los aislados. Las líneas más cercanas al 0 del eje superior representan mayor similitud entre aislados. La línea gris representa el corte de 85 % de similitud. Los grupos están definidos por las líneas de color rojo, azul claro, verde, rosa, violeta, verde oscuro y naranja. A la derecha se observan los patrones de bandas obtenidos (figuras 11 y 12). En el extremo derecho se encuentra la identificación de cada patrón de bandas de acuerdo al aislado con el que se obtuvo.

El diagrama en forma de árbol, realizado a partir de los patrones de banda obtenidos con REP-PCR, nos permite afirmar la policlonalidad de los aislados evaluados. En el lado izquierdo de la figura 14 se observa un eje superior que indica, en valores del 1 al 0, la similitud entre aislados. Considerando que las líneas verticales del diagrama en forma de árbol corresponden a la similitud entre los aislados, mientras dichas líneas se encuentren más cercanas al cero, implican que mayor es la similitud entre los aislados. La línea gris representa el corte de 85 % de similitud entre aislados. El factor de 85 % de similitud nos permite distinguir entre clones o aislados relacionados o muy relacionados.

En el dendograma podemos advertir la presencia de cuatro grupos de aislados relacionados o muy relacionados, y tres clones únicos. El grupo A',

denotado en color verde. El grupo B', en color naranja. El grupo C', en color azul. Grupo D', en color violeta.

Al analizar los resultados obtenidos con ERIC y REP-PCR para todos los aislados evaluados observamos que con ERIC-PCR se agrupó a todos los aislados en 3 grupos, formado por 10 de los aislados (71 %). Mientras que con REP-PCR se obtuvo una organización en 4 grupos, formados por 11 de los aislados (78 %).

Tabla VII: Comparación de grupos obtenidos con ERIC y REP-PCR tanto por análisis visual como con el software Phoretix 1D Pro

Aislados	ERIC A	REP A	ERIC B	REP B	Comparación
1115	I	1	A	A'	1
1127	I	1	A	A'	1
1169	I	1	A	A'	1
2868	I	1	A	A'	1
1159	II	1	B	A'	2
1172	II	2	B	B'	3
3547	II	3	B	B'	3
1166	III	4	C	D'	4
1521	IV	4	D	D'	4
0207	V	5	E	D'	5
0507	VI	6	F	E'	6
0607	VII	7	G	F'	7
1007	V	8	E	C'	8
1520	V	9	E	C'	8

ERIC A y REP A= resultados del análisis visual, ERIC B y REP B= resultados del análisis empleando el software de análisis de geles.

Al comparar los resultados obtenidos por el análisis visual de los geles, con los obtenidos mediante el uso de un software de análisis de geles, se observa que

obtuvimos en total 9 grupos, denominados mediante números arábigos del 1 al 8. El grupo 1 está constituido por 4 aislados, las muestras 1115, 1127, 1169 y 2868. El 2 corresponde a un clon único, la muestra 1159. El grupo 3, lo forman las muestras 1172 y 3547. El grupo 4 lo conforman las muestras 1166 y 1521. Los grupos 5, 6 y 7 son clones únicos, correspondientes a las muestras 0207, 0507 y 0607 respectivamente. Mientras que el grupo 8 lo forman los aislados 1007 y 1520.

Al evaluar la relación establecida mediante las diversas pruebas realizadas, a todos los aislados, obtuvimos cuatro (28,57 %) clones únicos. Éstos son los aislados 1159, 0207, 0507 y 0607. Entre los 14 aislados evaluados se encontraron dos pares (28, 57 %) de clones indistinguibles. Los clones indistinguibles son los pares de aislados 1520 y 1007; y 1115 y 1169. Además se halló que 4 aislados (28, 57 %) están muy relacionados.

En la tabla VIII se presenta un resumen de los grupos obtenidos mediante la genotificación bacteriana, además se ubican los datos de procedencia y fecha de las tomas de muestras de los aislados empleados en el presente trabajo.

Tabla VIII: Grupos obtenidos mediante la genotificación bacteriana de los aislados

Aislado	Grupo	Hospital/Servicio	Fecha
1115	1	HUC/ Cardiología	Mayo 2012
2868		HUC/M1	Septiembre 2012
1169		HUC/UTI	Mayo 2012
1127		HUC/UTI	Mayo 2012
1159	2	HUC/UTI	Mayo 2012
3547	3	HUC/UTI	Septiembre 2012
1172		HUC/UTI	Mayo 2012
0207	5	IMLF/UCI	Marzo 2007
1520	8	HUC/UCI	Mayo 2007
1007		IMLF/UCI	Febrero 2007
1521	9	NI	NI
1166	4	HUC/UTI	Mayo 2012
0507	6	PM/UCI	Mayo 2007
0607	7	PM/UCI	Junio 2007

8. Discusión

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, debido a que pueden ocasionar un aumento en la morbilidad del paciente y presentan una mortalidad asociada (Padgett y col., 2013). Además de generar mayores gastos de tratamiento médico y de personal especializado. Este tipo de infecciones están directamente relacionadas a los procedimientos de diagnóstico o tratamiento aplicados en el recinto hospitalario (Ramírez- Sandoval y col., 2013).

El estudio de las infecciones nosocomiales permite reconocer las fuentes de infección, los factores de riesgo para el paciente, las vías de diseminación y los posibles reservorios de microorganismos causantes de la infección. La información recabada permite plantear mecanismos de prevención, control y vigilancia epidemiológica. Lo que finalmente conlleva al establecimiento de medidas de prevención y control adecuadas, ocasionando una disminución en el número de infecciones nosocomiales reportadas, por lo que se garantiza mejor calidad de vida al paciente hospitalizado y menores costos en salud (Padgett y col., 2013).

Los principales factores de riesgo asociados a la infección nosocomial son los procedimientos de diagnóstico y tratamiento, procedimientos quirúrgicos, la estructura de la unidad hospitalaria, la condición inherente al paciente, así como sus conductas en cuanto al tratamiento oportuno de infecciones. Además un factor de riesgo sumamente importante es el personal que permanece en contacto con el paciente, tal como enfermeras, médicos y personal auxiliar (Ramírez- Sandoval y col., 2013).

Este tipo de infecciones son ocasionadas, generalmente por microorganismos que han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia como consecuencia de un proceso selectivo, ocasionado por el uso y abuso de antibióticos y agentes antimicrobianos, con usos terapéuticos y profilácticos dentro de los centros de salud. En consecuencia, un aspecto importante del estudio epidemiológico de estas infecciones, es comprender como se diseminan las cepas bacterianas dentro de un hospital, o entre hospitales de un área determinada. (Rivas y col., 2008)

Entre los microorganismos frecuentemente asociados a la infección nosocomial a nivel mundial, se encuentra *Acinetobacter* spp. Dentro del género *Acinetobacter*, la especie *A. baumannii* es comúnmente aislada de ambientes hospitalarios, asociándose tanto a superficies inanimadas como a pacientes ingresados en los Centros de Salud.

Acinetobacter baumannii es un microorganismo de interés epidemiológico debido a la presencia y mantenimiento de la capacidad de resistencia a una amplia variedad de antibióticos. Dicha resistencia se debe a la combinación de factores como la mutación de genes endógenos y la adquisición de material genético externo (Rumbo y col., 2014).

Al realizar el estudio de infecciones ocasionadas por microorganismos, el punto de partida debe ser la caracterización e identificación del mismo. *A. baumannii* ha sido descrito como cocobacilo inmóvil, Gram negativo, aerobio estricto, no fermentador, oxidasa negativo (González, 2005). Esta descripción basada en las características fenotípicas de *A. baumannii*, concuerda con los resultados de la caracterización microbiológica de los microorganismos obtenidos en este estudio (sección 7.1 de Resultados). Estos resultados nos permiten una

primera aproximación a la identificación, a nivel de género del microorganismo empleado como muestra para este trabajo.

Sin embargo, la clasificación taxonómica de las especies correspondientes al género *Acinetobacter*, basada en características fenotípicas, aún no se ha completado hasta el nivel de especies. Por lo que Bouvet y Grimont, en el año 1986, realizaron estudios de hibridación DNA-DNA, obteniendo 12 grupos o genoespecies. De los cuales 4 (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* genoespecie 3 y *Acinetobacter* genoespecie 13T) resultaron muy relacionados, por lo que se hace imposible distinguirlos mediante métodos fenotípicos, en consecuencia fueron agrupados como el complejo *Acinetobacter baumannii*- *Acinetobacter calcoaceticus* (Peleg y col., 2008; Bergogne-Bérézin y Towner, 1996).

Debido a la dificultad para distinguir mediante métodos fenotípicos a los aislados pertenecientes al complejo *Acinetobacter baumannii*- *Acinetobacter calcoaceticus*, resulta conveniente desarrollar estudios más completos, empleando métodos que permitan tanto la identificación definitiva del microorganismo de interés, como la consideración de los factores de riesgo asociados a la infección. Entre los métodos que han adquirido mayor importancia en los últimos años, se cuentan principalmente los métodos moleculares, lo que ha llevado al desarrollo de la epidemiología molecular (Chalbaud, 2012).

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la identificación y clasificación bacteriana, de modo que se alcance la descripción de grupos taxonómicos naturales y el estudio de sus relaciones (Martínez y col., 2004). Dicho proceso ha llevado al desarrollo de la taxonomía molecular.

La taxonomía se refiere al arreglo de organismos en grupos, al emplear técnicas de biología molecular, dicho arreglo se puede realizar a partir del estudio del genoma del microorganismo, logrando así una clasificación certera. En el caso de estudiar, identificar y clasificar microorganismos asociados a infecciones, resulta provechoso el estudio basado en genes codificados en su genoma.

Se ha descrito que *A. baumannii* presenta cromosomalmente una isla de resistencia. En dicha isla genómica se encuentran genes que han sido asociados a la resistencia a metales pesados, antisépticos y antibióticos. Además de exhibir gran cantidad de genes foráneos obtenidos por transferencia horizontal, también asociados a la resistencia a antimicrobianos, así como secuencias asociadas a transposones e integrones.

Entre los mecanismos de resistencia a antibióticos, que han sido descritos para *A. baumannii*, se cuentan dos mecanismos intrínsecos asociados a la resistencia a β -lactámicos: una AmpC β -lactamasa y una serina tipo oxalinasas OXA-51. La enzima OXA-51, debido a que se encuentra codificada en el genoma de la bacteria, ha sido ampliamente utilizada para la identificación de aislamientos asociados a brotes epidémicos.

Debido al amplio uso que se le ha dado al gen *bla*_{tipoOXA51} como método para la identificación de cepas de *A. baumannii* asociadas a brotes epidémicos, nos propusimos amplificar dicho gen para la identificación definitiva de los aislados empleados como muestra. Obtuvimos la amplificación de la banda esperada de 353 pb en el 92,8 % de los aislados bajo estudio. Lo que nos indica que se tratan de bacterias pertenecientes a la especie *A. baumannii*.

Se ha reportado que las especies de *Acinetobacter*, distintas a *A. baumannii*, no producen ningún tipo de amplicón, cuando se amplifica *bla*_{tipo OXA51} (Turton y

col., 2010). Lo que nos permite afirmar que, pese a no haber obtenido la banda esperada de 353 pb, en todas las muestras evaluadas en el presente estudio (carriles 6, 11 y 15 de la figura 8), todas produjeron algún tipo de amplicón permitiendo sugerir que todas las muestras pueden ser clasificadas como *A. baumannii*.

Desde un punto de vista epidemiológico, es importante identificar con precisión a *Acinetobacter* spp. y estudiar la distribución de las especies para determinar el tratamiento antimicrobiano adecuado. Un método molecular ampliamente utilizado, para la identificación de especies bacterianas es el estudio de la sub unidad ribosomal 16S del DNA o la del conjunto de pb que separan la sub unidad 16S de la sub unidad 23S en el genoma bacteriano, los espaciadores internos transcritos (ITS por sus siglas en inglés).

En el presente estudio, nos planteamos el objetivo de identificar las muestras empleadas, en consecuencia aplicamos un conjunto de pruebas que nos permitieran corroborar que efectivamente todos los aislados eran *A. baumannii*. Debido a la gran cantidad de reportes del uso de secuenciación del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S del DNA, aplicamos una prueba para una región de 426 pb del gen, específica para *A. baumannii*.

Al emplear los iniciadores descritos por Lin y colaboradores en 2009, específicos para *A. baumannii*, se obtuvo la banda esperada de 426 pb, para todas las muestras empleadas (figura 7). La obtención del amplicón se traduce como un resultado positivo a esta prueba.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo, en todas las pruebas empleadas para la identificación de los aislados, nos permiten afirmar que todas las muestras evaluadas son *A. baumannii*.

Acinetobacter baumannii presenta una amplia variedad de mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos, tanto de uso terapéutico, como de uso profiláctico en los hospitales. Además la plasticidad de su genoma permite la incorporación de material genético externo, lo que conlleva al desarrollo de cepas multirresistentes. Considerando tales características propias de la especie, no resulta trivial la identificación con exactitud de los microorganismos aislados, asociados a la infección nosocomial. Ya que una buena identificación de un microorganismo asociado a una infección nosocomial, se traduce en la aplicación de tratamientos médicos adecuados y más eficaces.

Una parte importante del estudio epidemiológico de infecciones nosocomiales ocasionadas por microorganismos, consiste en el estudio e identificación de las relaciones genéticas entre distintos aislados, bien sea dentro de un mismo hospital como entre hospitales de un área determinada. Esta información permite determinar el origen del microorganismo, las vías y patrón de diseminación, así como determinar el número de clones circulantes. La información obtenida permite la implementación de medidas adecuadas de prevención y control de brotes infecciosos.

Los estudios de genotipificación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales, tanto intrahospitalarias como interhospitalarias y comunitarias, permite detectar infecciones cruzadas entre pacientes. Este tipo de estudios también ha permitido determinar la fuente de infección en casos de bacteriemia (Martín- Lozano y col., 2002)

En el presente trabajo nos propusimos estudiar las posibles relaciones clonales entre microorganismos asociados a infecciones nosocomiales, relacionadas al uso de catéteres, en pacientes del HUC. Para tal fin, empleamos

dos métodos basados en la PCR. Una vez obtenidos los patrones de bandas, comparamos con patrones generados por microorganismos, de la misma especie, también asociados a infecciones nosocomiales pero en diferentes centros de salud de la ciudad de Caracas (Ver tabla I).

Nueve de los aislados empleados para este estudio, fueron tomados en el HUC, en los meses de mayo a septiembre de 2012. De estos aislados, 7 provienen de pacientes de la UTI. Uno proviene del Servicio de Cardiología (aislado 1115) y el otro (aislado 2868) proviene de la sala de medicina M1 (tabla 1). El estudio de genotipificación de los aislados nos permitió detectar tres grupos de aislados relacionados entre sí (Tabla 7).

Sin embargo dentro de cada grupo, el nivel de relación entre aislados puede variar de acuerdo a la cantidad de bandas que compartan, como consecuencia de eventos mutacionales independientes.

En el grupo 1, por ejemplo, podemos encontrar dos aislados muy relacionados que a la vez están posiblemente relacionados a los otros aislados pertenecientes al mismo grupo. Los patrones de bandas obtenidos, en conjunto con el tratamiento estadístico realizado para la elaboración del dendograma, para las muestras 1127 y 1159, nos llevan a afirmar que se trata de aislados muy relacionados. Dos aislados muy relacionados son aquellos cuyos patrones de bandas difieren en 1 a 3 bandas. Este tipo de diferencias se deben a un único evento mutacional y son observadas en ocasiones de cultivos sucesivos del aislado o en casos de varias tomas de muestras del mismo paciente (Tenover y col., 1995)

Los patrones de bandas obtenidos para las muestras 1115 y 1169 (provenientes de cardiología y UTI, respectivamente) resultaron muy similares

entre sí, lo que nos permite agruparlos como posiblemente relacionados. De acuerdo a los criterios demarcados por Tenover y colaboradores, en el año 1995, dos aislados posiblemente relacionados podrían distinguirse debido al hecho de dos eventos mutacionales independientes. Esto bien podría deberse a que no tengan relación epidemiológica o como consecuencia de aislados tomados en largos períodos de tiempo (Tenover y col., 1995).

Llama la atención que ambas muestras fueron tomadas en mayo de 2012, lo que nos permite descartar que las diferencias en los patrones se deban a una separación temporal entre las tomas de muestras. Sin embargo, se trata de muestras provenientes de servicios diferentes dentro del Hospital. El hecho de que exista relación entre muestras microbiológicas provenientes de ambientes separados, que se diferencien por dos posibles eventos mutacionales, nos da indicios de que quizá proceden de un ancestro común, que permanece en diferentes áreas del hospital.

Sin embargo, la hipótesis de separación temporal es aplicable a otro aislado, perteneciente al mismo grupo y que, por lo tanto se encuentra relacionado a los aislados hasta ahora mencionados. La muestra 2868, tomada en septiembre de 2012, se encuentra muy relacionada a la muestra 1169, tomada en mayo de 2012. El hecho que una muestra tomada en mayo presente un patrón de bandas similar a uno tomado en septiembre, también hace referencia a la proveniencia de un ancestro común. Además estos aislados también presentan una separación espacial ya que la muestra 2868 proviene de la sala de medicina M1.

La relación entre aislados puede ser debido a la procedencia de un brote infeccioso previo. Ha sido ampliamente reportado el aislamiento de cepas relacionadas, en muestreos realizados luego de brotes infecciosos definidos. En

un estudio realizado por Huber y colaboradores, en el año 2014, en un hospital docente de Kenia, reportan que entre 25 aislados tomados de pacientes, encontraron secuencias genéticas y patrones de resistencia correspondientes a muestras reportadas durante un brote infeccioso previo al estudio. El cual había sido erradicado tras la aplicación de rigurosas medidas de control.

En el estudio realizado en el año 2006 por Salazar de Vegas y colaboradores, se reporta que cepas de *A. baumannii* relacionadas, fueron aisladas esporádicamente antes y durante un brote infeccioso.

Por lo que podemos afirmar que no se trata de una excepción, el hecho de encontrar muestras relacionadas aún cuando exista una separación temporal entre tomas. El poder determinar estas relaciones, como las dos mencionadas, con este tipo de estudio, permite conocer una probable vía de dispersión del organismo y aplicar medidas dirigidas específicamente a esta vía de dispersión.

Los aislados pertenecientes al grupo 3 (muestras 1172 y 3547) quedan definidos como muy relacionados, ya que sus patrones de bandas difieren en 3 bandas. Ambas muestras provienen de la UTI, sin embargo la muestra 1172 fue tomada en mayo de 2012, mientras que la muestra 3547 fue tomada en septiembre de 2012. Ambas muestras provienen de pacientes diferentes, la muestra 1172 fue tomada de un paciente femenino, y la muestra 3547 de un paciente masculino. Pese a que estas muestras están muy relacionadas entre sí, no comparten un patrón similar a los obtenidos por las muestras pertenecientes a los grupos 1 y 4. En el caso de las muestras pertenecientes al grupo 3, quizá la infección se deba a una contaminación cruzada, aunque no se conoce el tiempo de permanencia de ambos pacientes, o si coinciden temporalmente. Otra explicación es la existencia de algún reservorio asociado al servicio del cual

fueron tomadas. Para afirmar la procedencia de la relación entre ambos aislados, sería necesario realizar un seguimiento, en el tiempo, del historial médico del paciente. Esto es, si el paciente había sido previamente hospitalizado, tanto en el HUC como en otro centro de salud, si los pacientes que presentaron la infección, de la cual deriva la toma de muestra, coincidieron en su estadía en el servicio de UTI. Además es necesaria la relación con posibles focos ambientales, que no se incluyen en el presente trabajo. Esto es motivado a que ha sido ampliamente reportado la determinación de infecciones ocasionadas en pacientes, por bacterias recuperadas de ambientes hospitalarios.

Chalbaud y colaboradores reportan que realizaron un estudio de caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales en el HUC. En el estudio tomaron muestras tanto de ambiente de diferentes servicios del hospital como de pacientes. Encontraron que dos aislados ambientales estaban posiblemente relacionados a dos aislados de pacientes (Chalbaud y col., 2012)

Otros dos aislados muy relacionados son los que constituyen el grupo 4. Los aislados 1521 y 1166 presentan patrones de bandas que difieren, a lo sumo, en 3 bandas. Lo que nos lleva a alegar que se trata de aislados muy relacionados. Este conjunto de los aislados 1521 y 1166 presenta posible relación entre sí, pero ninguna relación con los aislados agrupados en 1 o en 4.

En el caso de este grupo de aislados no podemos afirmar que se trate de una contaminación proveniente del ambiente, o una infección cruzada de paciente a paciente, debido a que no poseemos ningún tipo de información clínica de la muestra 1521. Lo que imposibilita plantear hipótesis acerca de la relación entre

aislados. Pero sin lugar a dudas constituyen un grupo clonal diferente del resto, que podría estar siendo desplazado o podría estar comenzando a invadir.

Con base en el conjunto de pruebas de genotipificación de los aislados provenientes de pacientes con infecciones asociadas al uso de catéter, tomadas en distintos servicios del HUC, podemos afirmar que las muestras 1115 y 1169 son clones indistinguibles. Estas muestras fueron agrupadas en el grupo clonal 1 y son provenientes de distintos servicios del HUC, aunque fueron tomadas en mayo de 2012. Pueden ser consideradas como parte de una contaminación que está generando infecciones a pacientes ingresados en el HUC.

Un aspecto relevante de los aislados empleados en el presente trabajo, tomados en el HUC en los meses de mayo a septiembre de 2012, es que provienen de pacientes con infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres.

Los catéteres proporcionan acceso directo al torrente sanguíneo, facilitando así la administración de tratamientos médicos, alimentación parenteral o productos sanguíneos (García y col., 2003). La principal complicación de su uso es el desarrollo de infecciones, siendo la bacteriemia la principal infección asociada al catéter y la cuarta infección nosocomial más frecuente (Seisdedos y col., 2012).

Las fuentes de la infección asociada a catéter son la colonización de microorganismos desde la piel del paciente o del personal médico- asistencial, la contaminación de las conexiones del catéter, la contaminación proveniente de la punta del catéter o por contaminación de los fluidos en infusión (Seisdedos y col., 2012; Brenner y col., 2003).

Se ha reportado que la bacteriemia derivada de la conexión del catéter es de origen extraluminal, es decir consecuencia de la colonización de microorganismos de la flora cutánea del paciente o del personal, mientras que la bacteriemia de origen intraluminal se relaciona a malas prácticas asépticas cuando se manipula el catéter, las agujas, los conectores o provenientes del fluido en infusión (Mermel, 2011).

El estudio de las infecciones asociadas al uso de catéter, complementado con técnicas moleculares permite determinar las fuentes de la infección, de esta manera se establecen las medidas de control y prevención adecuadas (Mermel, 2011).

En el presente trabajo se realizó la genotipificación de aislados asociados a infecciones relacionadas al uso de catéter, por ello llama la atención la determinación de relaciones filogenéticas entre aislados provenientes de distintos servicios del HUC o de tomas de muestras de períodos de tiempo diferentes.

Considerando que el desarrollo de la infección nosocomial puede ser considerado como medida de la calidad de la atención sanitaria prestada, y que las manos del personal médico- asistencial podrían servir de reservorio a diversos microorganismos que luego podrían infectar a los pacientes ingresados que se encuentren inmunosuprimidos. Resulta fundamental el desarrollo de estudios que permitan hacer seguimiento de los posibles focos y vías de infección mediante métodos moleculares, cuyos resultados en conjunto con el reforzamiento de las buenas prácticas asépticas en el personal médico- asistencial, garantizan una disminución en la incidencia de infecciones nosocomiales asociadas a catéter.

Al realizar estudios de tipificación, tanto para la identificación correcta de un género o especie, como para establecer la relación genética entre

microorganismos involucrados en un posible brote, resulta conveniente la comparación con microorganismos de la misma especie que permitan verificar los resultados (Fontana y col., 2013)

En este caso la comparación se realizó entre los 9 aislados provenientes del HUC, tomados en mayo y septiembre de 2012, con 5 aislados provenientes de varios centros de salud de la ciudad de Caracas (Ver tabla I). Los aislados 0207, 0507, 0607, 1007 y 1520, habían sido previamente evaluados e identificados como *A. baumannii* (Cuaical y col., 2012)

Las pruebas de genotipificación se aplicaron a los aislados 0207, 0507, 0607, 1007 y 1520. Al obtener los perfiles de bandas, se compararon con los patrones de bandas generados por las mismas pruebas al aplicarlas a los aislados provenientes del HUC. De dichas pruebas, la REP-PCR demostró una gran variabilidad genética entre aislados provenientes de diferentes centros de salud (figura 12). Con ERIC- PCR obtuvimos patrones de bandas que se asemejan, entre todos los aislados evaluados, sin que llegase a establecerse relación entre todos (figuras 9 y 10)

Los aislados provenientes de distintos centros de salud de Caracas no mostraron relación con los aislados provenientes del HUC. Sin embargo, se encontró relación entre dos aislados provenientes del Instituto Médico La Floresta (0207 y 1007) y uno del HUC (1520). Este último corresponde a una toma realizada en mayo de 2007. Entre estos 3 aislados se encontró diferencias de 3 bandas, lo que los define como aislados muy relacionados entre sí.

Los resultados obtenidos en las pruebas de genotipificación de aislados nosocomiales provenientes de distintos centros de salud de la ciudad de Caracas,

nos permiten afirmar que las muestras 1520 y 1007 son clones indistinguibles. Estas muestras fueron agrupadas en el grupo clonal 8 (tabla VI).

No se puede asegurar que la relación entre los aislados provenientes de diferentes centros de salud se deba clones circulantes. Para ello se requieren estudios más exhaustivos, que incluyan tanto la toma de muestras de ambientes de ambos centros de salud y del personal que pudiera laborar en ambos centros, así como la evaluación de la historia clínica de los pacientes hospitalizados en los servicios de ambos hospitales, esto es verificar si han sido hospitalizados en uno de los centros de salud incluidos en este estudio y luego trasladados a otro.

En el estudio realizado por Huber y colaboradores, reportan que en todos los casos, el primer aislamiento de cada tipo de secuencia, que deseaban identificar, fue tomado de pacientes provenientes de otros hospitales (Huber y col., 2014). Lo que indica la introducción y propagación de cepas adaptadas a ambientes hospitalarios. En el caso de las muestras analizadas en el presente trabajo, no podemos afirmar que este sea el caso, ya que no conocemos el historial de los pacientes en los que se detectó la infección por *A. baumannii*.

Otro posible vehículo en la propagación de microorganismos entre diferentes centros de salud de un área determinada, puede ser el personal de salud, en caso que el personal labore en más de una centro asistencial. El estudio realizado en el año 2005 por Pancholi y colaboradores, plantea la caracterización molecular de 69 aislados provenientes de manos y de ambiente de cuidadores, en Manhattan. Los autores, encontraron cepas de *A. baumannii* tomadas de manos, las cuales resultaron indistinguibles de algunas provenientes de ambiente (Pancholi y col., 2005). Afirman que si bien, las cepas ambientales resultan susceptibles a los agentes antimicrobianos, en el ambiente hospitalario pueden convertirse en

patógenos potenciales. Este estudio da indicios que las cepas de *A. baumannii* podrían encontrar algún reservorio en la comunidad que sirva como fuente de infección nosocomial.

Por lo expuesto podemos sugerir que existe la posibilidad de dispersión de aislados nosocomiales de un hospital a otro, dentro de un área geográfica determinada. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio, resultan limitados para explicar la relación entre aislados provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Caracas.

Cabe destacar que es fundamental el desarrollo de estudios epidemiológicos que empleen técnicas moleculares para la determinación de las relaciones filogenéticas entre aislados nosocomiales asociados a pacientes cateterizados. Motivado a que este tipo de estudios no son susceptibles a los cambios que ejerzan sobre el microorganismo los factores ambientales. De esta manera se establece de forma certera la fuente de la infección bacteriana, los focos de contaminación, así como las vías de diseminación. Los resultados obtenidos permiten determinar posibles brotes infecciosos pero a su vez facilitan el desarrollo de medidas prevención y control específicas y en consecuencia efectivas.

Una pieza clave en la prevención de la infección nosocomial asociada al catéter es la aplicación de sistemas de vigilancia epidemiológica que empleen la genotipificación bacteriana de los aislados nosocomiales. Permitiendo el monitoreo de los clones circulantes y determinando si estos se mantienen en el recinto hospitalario ocasionando infecciones. La información recabada, al ser comunicada al personal que labora en el centro de salud, facilitaría el

establecimiento de medidas que conlleven a la disminución en la incidencia de infecciones asociadas a dispositivos tipo catéter.

9. Conclusiones

Se identificaron los aislados como *A. baumannii*, tanto por métodos fenotípicos como por métodos genotípicos. Se realizó la genotipificación de todos los aislados mediante rep-PCR

Entre los aislados provenientes de infecciones de pacientes internos en el HUC, tomados en los meses de Mayo a Septiembre de 2012, se establecieron 3 grupos clonales.

Se identificaron dos pares de clones indistinguibles. Un par proveniente del HUC, de los servicios de UTI y Cardiología. Y un par proveniente del HUC y del Instituto Médico La Floresta.

Al realizar la comparación de perfiles de patrones de rep-PCR obtenidos con los aislados asociados a infecciones relacionadas al uso de catéter con aislados de otros Centros de Salud, se obtuvieron patrones de bandas similares

ERIC y REP generan patrones de bandas sencillos, de fácil interpretación para la genotipificación de aislados nosocomiales de *A. baumannii*

El desarrollo de estudios de genotipificación bacteriana de aislados nosocomiales resulta fundamental para el estudio epidemiológico de infecciones asociadas al uso de catéteres, permitiendo el establecimiento de medidas de prevención y control de infecciones eficaces.

10. Recomendaciones

Reforzar las recomendaciones al personal médico- asistencial y de servicio de centros de salud, sobre la importancia de la higiene de las manos.

Reforzar la implementación de planes de monitoreo, vigilancia y prevención de posibles brotes infecciosos en áreas de alta población en hospital, además de en aquellas en las que se encuentra la población más susceptible a padecer este tipo de infecciones. Estos planes deben incluir técnicas de epidemiología molecular

Se recomienda realizar tomas de muestras asociadas a infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres, con toda la información posible, de manera que se permita realizar estudios que conlleven a la determinación de las fuentes de infección, las vías de diseminación y posibles focos. De esta manera se pueden establecer medidas efectivas de prevención y control de infecciones nosocomiales.

Se recomienda complementar las medidas de prevención y control de infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres, empleadas en los hospitales, con técnicas moleculares, permitiendo hacer seguimiento y control de calidad de las medidas implementadas.

11. Bibliografía

Beregogne-Bérézin, E., Towner, J., 1996. *Acinetobacter* spp. As nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 148- 165

Berdinelli, M., Friedman, H., 2008. *Acinetobacter* biology and pathogenesis. Springer. Nueva York. E. U. A.

Brenner, P., Buggedo, G., Calleja, D., Del Valle, G., Fica, A., Gómez, M. E., y col., 2003. Prevención de infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Rev Chil Infect* **20**: 51-69

Bou, G., Cerveró, G., Domínguez, M., Quereda, C., Martínez- Beltrán, J. 2000. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 635-643

Boxall, N., 1999. Pulsed-field gel electrophoresis: a tool for molecular epidemiology . Tesis de maestría. Universidad Massey. Nueva Zelanda

Brenner, P., Buggedo, G., Calleja, D., Del Valle, G., Fica, A., Gómez, M., Jofré, L., y col. 2003. Prevención de infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Rev. Chil. Infect.* ;**20**: 51-69

Cardoso, A., Ramón, L., Putou, R., Carrascal, A., Zambrano, D., 2013. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ. Sci.* **18**: 203- 222

Chalbaud, A. 2010. Caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales. Tesis Doctoral. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

Chalbaud, A., Ramos, Y., Alonso, G. 2012 Antibiotic and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii* genotyped isolates from the Caracas university hospital. *Microbes in applied research: current advances and challenges*. World Scientific Publishing Co. 481-485

Chalbaud, A., Redondo, C., Fernandez, S., Pino, Z., Alonso G. 2012. Genotipificación bacteriana y epidemiología molecular de las infecciones bacterianas. *Memorias IBE*. **6**: 41- 44

Chincha O, Cornelio E, Valverde V, Acevedo M. 2013. Infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en unidades de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.; **30**:616-20.

Cuaical, N., Delgado, Y., Anzola, Y., Marcano, D., Torres, L. 2012. Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. **32**: 95- 100

Durán, D., Pérez, L., Florín, J., Marchena, J., Levi, O., Valmaña, C., 2007. Infecciones asociadas a catéteres en niños tratados con hemodiálisis. *Rev. Cubana Pediatr*. **79**

Evans, B., Brown, S., Hamouda, A., Findlay, J., Amyes, S. 2007. Eleven novel OXA-51- like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. I*. **13**: 1137- 1139

Fica, A., 2003. Consenso nacional sobre infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Rev. Chil. Infectol*. **20**: 39-40

Fontana, C., Stefani, S., Pan, A., Pieretti, B., Rossolini, GM., Varaldo, P., y col., 2013. From phenotyping to the study of clonal relationship of microbial isolates. *Microbiol. Med.* **28**: 118- 131

Franco de Moura, G., Bronharo, T., Cardoso, C., Carrara-Marrone, F., Botelho, L., 2006. Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from catheter tips. *Braz. J. Infect. Dis.* **10**: 346- 351

García, P., Payá, E., Olivares, R., Cotera, A., Rodríguez, J., Sanz, M. 2003. Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares. *Rev. Chil. Infect.* **20**: 41- 50

Gobernado, M., López-Hontangas, J. 2003. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**: 54- 60

Gonzalez, M., Izquierdo, A., Luque, M., Sánchez, A., Díaz, M., Torres, M. 2002. Infecciones urológicas por *Acinetobacter*. Estudio de casos y aplicación del protocolo de actuación de enfermería. *Asoc. Esp. Enf. Uro.* **82**: 28- 32

Gulbudak, H., Aslan, G., Tezcan, S., Esroz, G., Ulger, M., Otaq, F., Kuyucu, N., Emekdas, G., 2014. Investigation of the clonal relationship between nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates by rep-PCR. *Mikrobiyol. Bul.* **48**: 316- 324

Guzmán M., Alonso G. 2008. Integrone clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **28**:105-109.

Höfling, J., Rosa, E., Baptista, M., Spolidório, D., 1997. New strategies on molecular biology applied to microbial systematics. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.*

39

Horcajada, J. P., Vila, J., Moreno- Martínez, A., Ruiz, J., Martínez, J. A., Sanchez, M., Soriano, E., y col., 2002. Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinilones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis. *J. Antimicrob Chemother.* **49**: 55-59

Huber , C., Sartor, A., McOdimba, F., Shah, R., Shivachi, P., Sidjabat, H., y col., 2014. Outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in Kenyan teaching hospital. *J. G. Antimicrob. Res.* In press.

Jang, L., Perng C., Lee, S., Wan, C. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2076–2080.

Limón, E., Pujol, M. 2013. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enf. infecc. Microbiol. Clín.* **31**: 108- 113

Lin, L., Ling, B., Li, X., 2009. Distribution of multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE*, and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial- resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int. J. Microb. Agents.* **33**: 27- 32

Maleki, M., Sekawi, Z., Soroush, S., Azizi- Jalilian, F., Asadollahi, K., Sattar, M., Emaneini, M., y colaboradores. 2014. Phenotypic and genotypic characteristics of tetracycline resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from nosocomial infections at Tehran hospitals. *Iran. J. Bas. Med. Sci.* **17**: 21- 26

Martín, D., Cisneros, J., Becerril, B., Cuberos, L., Prados, T., Ortíz, C., Cañas, E., y col. 2002. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for

determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4571- 4575

Martínez, J., Martínez, L., Rosenblueth, M., Silva, J., Martínez-Romero, E. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int. Microbiol.* **7**: 261- 268

Martins, H., Bomfim, M., França, R., Farias, L., Carvalho, M., Serufo, J., Santos, S. 2014. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **11**: 1465- 1478

Meacham, K., Zhang, L., Foxman, B., Bauer, R., Marrs, C., 2003 Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus- PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5224- 5226

Moncada, L., Rahn, K., 2007. Genotipificación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* procedentes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Caracas. Tesis de pregrado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Olive, M., Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1661- 1669

Padgett, D., Luque, M., Rivera, D., Zepeda, L., Hernández, A., 2013. Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia en hospital de especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, 2006- 2012. *Rev Med Hondur.* **81**: 68- 72

Pancholi, P. Healy, M., Bittner, T., Webb, R. Wu, Fan, Aiello, A., y col. 2005. Molecular Characterization of Hand Flora and Environmental Isolates in a Community Settings, *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5202- 5207

Peleg, A., Seifert, H., Patherson, D. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 538- 582

Ramasamy, D., Mishra, A., Lagier, J.C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., y col. 2014. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *I.J. System. Evol. Microbiol.* **64**: 384- 391

Ramírez- Sandoval, M., Aranza-Aguilar, J., Varela, M., García- González, A., Vélez-Castro, G., Salcedo- Romero y col. 2013. Brote de infección nosocomial de infecciones respiratorias bajas por *Acinetobacter baumannii* en un servicio de medicina interna de un hospital general de la Ciudad de México. *Med. Int. Mex.* **29**: 250- 256

Reboli, A., Houston, E., Monteforte, J., Wood, C., Hamill, R., 1994. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR- mediated DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2635- 2640

Rivas, J., Redondo, C., Alonso, G., 2006. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Act. Cient. Soc. Venez. Bioanal. Espec.* **9**: 3- 7

Ross, T., Merz, W., Farkosh, M., Carrol, K., 2005. Comparison of automated repetitive sequence- based PCR microbial typing system to pulse- field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicilina resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **43**: 5642–5647

Rumbo, C., Bou, G., Fuentes, I., Tomas, M., 2014. Análisis molecular de factores asociados al éxito del patógeno nosocomial "*Acinetobacter baumannii*":

resistencia, transferencia génica y virulencia. Tesis doctoral. Universidade da Coruña

Sabat, A., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leao, R., van Dijk, J., Laurent, F., Grundmann, H., y colaboradores. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*. **18**

Salazar de Vegas, E., Nieves, B. 2005. *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Rev.Soc. Ven. Microbiol.* **25**: 64- 71

Salazar de Vegas, E., Nieves, B., Araque, M., Velasco, E., Ruíz, J., Vila, J. 2006. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit. *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.* **27**: 397- 403

Sandoval, M., Guevara, A., Torres, K., Vilorio, V, 2013. Epidemiología de infecciones intrahospitalarias por el uso de catéteres venosos centrales. *Kasmera*.**41**

Sánchez, B., Montilla, N., Redondo, C., Torres, L. 2008. Genotipificación de *Acinetobacter baumannii* multi- resistente aislado en el hospital Dr. Domingo Luciani de Caracas. *Act. Cient. Soc. Venez. Bioanal. Espec.* **11**: 49- 56

Seisdedos, R., Conde, M. C., Castellanos, J., García- Manzanares, A., Valenzuela, J. C., Fraga, M. D. 2012. Infecciones relacionadas con el catéter venoso central en pacientes con nutrición parenteral total *Nutr. Hosp.* **27**

Snelling, A., Gerner-Smidt, P., Hawkey, P., Heritage, J., Parnell, P., Porter, C., Bodenham, A., y col. 1996. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1193- 1202

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. 1995 Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233- 2239

Turton, J., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufman, M., Pitt, T., 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.***44**:2974- 2976

Turton, J., Shah, j., Ozongwu, C., Pike, R., 2010 Incidence of Acinetobacter Species Other than A. baumannii among Clinical Isolates of Acinetobacter: Evidence for Emerging Species. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 1445- 1449

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acids. Res.* **19**: 6823- 6831

Vila, J., Marcos, M., Jimenez de Anta, M., 1996. A comparative study of different PCR- based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiol.* **44**: 482- 489

Woodford, N., Ellington, M., Coelho, J., Turton J., Ward, M. E., Brown, S., y col. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**: 351- 353

Referencias en línea:

An- Hua, W., Dan, L., 2008. Homology study of resistant Gram- negative bacilli isolating from hospitalized patients, hospital environment and hands in Intensive Care Unit. *Chin. J. Nosoc.* **7**. (Consultado: 18/07/ 2014)

Capel, M. 2013. Prevención de la bacteriemia relacionada con catéter. Influencia del diseño del conector desinfectable. Universitat Autònoma de

Barcelona.

Disponible:

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/125654/amdc1de1.pdf?sequence=1>

(Consultado: 18/09/2014)

Fernández, F. 2004 Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**: 355-360 <http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t13.pdf>

(Consultado 08/06/2014)

Genetic testing. Food safety news. 2009. Disponible:

<http://www.foodsafetynews.com/2009/08/genetic-testing-1/#.VCTaSfl5Png>

(Consultado: 21/07/2014)

González, J. 2005. Infección nosocomial por *Acinetobacter baumannii* multirresistente en Unidades de Cuidados Críticos. *Enfermería Integral*. Disponible: <http://enfervalencia.org/ei/72/articulos-cientificos/03.-INFECCION.pdf>

(Consultado 11/03/2015)

Marcos, MA. 1995. *Acinetobacter baumannii*. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. www.seimc.org. (Consultado 08/06/2014)

Ojeda, E., Megias, G. 2000 Infecciones asociadas a catéteres.

<http://www.uninet.edu/cin2000/conferences/ojeda/ojeda.html> (Consultado:

21/06/2014)

Seo, I., Lee, J., Son, S., Han, K. 2014. Comparative study of different molecular methods for typing of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from university hospitals. *Genes Genom.*

<http://link.springer.com/article/10.1007/s13258-014-0183-z> (Consultado:

24/06/2014)

Vilchez, G., Alonso, G., 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **29:** 6- 12 Disponible: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562009000100003&script=sci_arttext Consultado: 20/07/2014

Vinuesa, P. 2011. Genotypic characterization of rhizobia associated with tropical and temperate legumes of ecological and agronomic interest. Phillipps-Universität Marburg. Disponible: http://staff-www.uni-marburg.de/~werner/rhizobial_diversity.htm (Consultado: 18/09/2014)