

Artículo original

Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores

Elsa Z. Salazar de Vegas^{a,*}, Beatriz Nieves^b, Joaquín Ruíz^c, Jordi Vila^d

^aDepartamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Venezuela

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

^cCentro de Salud Internacional, IDIBAPS, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, España

^dServei de Microbiologia, Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, España

Recibido 26 de noviembre de 2007; aceptado 17 de julio de 2008

Resumen: Se utilizaron 62 cepas identificadas inicialmente como bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF), aisladas de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial, con el objeto de determinar su género y especie. Cuarenta y cinco cepas fueron identificadas como *Acinetobacter baumannii*, 10 como *Pseudomonas aeruginosa*, 3 como *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 como *Comamonas acidovorans* y 1 como *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, mediante el API 20NE. Con respecto a las cepas de *Acinetobacter*, el ARDRA permitió identificar 20 cepas como *A. baumannii* y 23 como *Acinetobacter* genoespecie 13TU, pero 2 cepas no fueron identificadas por este método. La secuencia de la subunidad 16S del ADN_r de todas las cepas incluidas en este estudio permitió identificar 20 cepas como *A. baumannii*, 23 cepas como *Acinetobacter* RUH1139, 10 como *P. aeruginosa*, 4 como *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (2 de estas cuatro cepas habían sido identificadas como *A. baumannii* mediante API20NE), 3 como *S. maltophilia*, 1 como *C. acidovorans* y 1 como β -*Proteobacterium*. Las discrepancias entre la identificación bioquímica por API 20NE y por ARDRA, para diferenciar las genoespecies de *Acinetobacter*, fue resuelta por la secuenciación de la subunidad 16S del ADN_r, indicando que la identificación de los aislados de *Acinetobacter*, entre otros BGNNF, mediante API 20NE, debe ser confirmada por técnicas genéticas.

Palabras clave: *Acinetobacter*, API 20NE, ARDRA, secuencia 16S de ADN_r

Use of the API 20NE System to identify species of the *Acinetobacter* genus and other non fermenting gram-negative bacilli

Abstract: We used 62 strains initially identified as non fermenting gram-negative bacilli (NFGNB) isolated from patients with a nosocomial infection diagnosis with the purpose of identifying their genus and species. Forty five strains were identified as *Acinetobacter baumannii*, 10 as *Pseudomonas aeruginosa*, 3 as *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 as *Comamonas acidovorans* and 1 as *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* through the API 20NE. Regarding the *Acinetobacter* strains, the ARDRA allowed to identify 20 strains as *A. baumannii* and 23 as *Acinetobacter* genospecies 13TU, but 2 strains were not identified with this method. The ADN_r 16S sequence of all the strains included in this study allowed to identify 20 strains as *A. baumannii*, 23 strains as *Acinetobacter* RUH1139, 10 as *P. aeruginosa*, 4 as *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (2 of these four strains strains had been identified as *A. baumannii* through API20NE), 3 as *S. maltophilia*, and 1 as *C. acidovorans* and 1 as β -*Proteobacterium*. The discrepancies between the biochemical identification by API 20NE and by ARDRA to differentiate the *Acinetobacter* genospecies was resolved by the ADN_r16S sequencing, indicating that the identification of the *Acinetobacter* isolates, among other NFGNB, through API 20NE, should be confirmed through genetic techniques.

Keywords: *Acinetobacter*, API 20NE, ARDRA, ADN_r16S Sequence

* Correspondencia:
E-mail: elsazul2003@cantv.net

Introducción

Los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) son bacterias habitantes de diferentes ambientes que están siendo asociadas, cada vez más, a enfermedades en los

humanos, sobre todo relacionadas con infecciones intra-hospitalarias. Especialmente, *A. baumannii* se ha encontrado causando brotes en diferentes partes del mundo [1]. La identificación correcta de estos microorganismos es objeto de estudio en la actualidad, debido a las limitacio-

nes en su identificación mediante pruebas bioquímicas [2,3]. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de identificación y tipificación molecular para diversas bacterias, incluyendo a los BGNNF, que se perfilan como herramientas idóneas para estudios epidemiológicos de cepas genéticamente relacionadas [2,4]. Para la identificación de *Acinetobacter* spp. se utiliza con frecuencia el sistema comercial API 20NE, sin embargo, para la diferenciación entre las especies de este género, así como de otros BGNNF, se requiere de la incorporación de otros métodos de identificación [2,5-11]. La aplicación de métodos genéticos, entre los que se incluye el análisis de restricción de la subunidad 16S del ADN amplificada (ARDRA), ha permitido, en los últimos años, grandes avances en la diferenciación de algunas especies bacterianas y, particularmente, de las especies incluidas en el complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* [2-4,9,10]. En el presente artículo se muestra la experiencia obtenida al identificar especies de *Acinetobacter* y otros BGNNF, aislados de infecciones nosocomiales, mediante métodos bioquímicos y genéticos.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Un total de 62 cepas identificadas inicialmente como BGNNF fueron aisladas de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial, hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCI-A) (15 cepas) y la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) (17 cepas) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, Venezuela, durante el periodo enero 1998 - abril 1999. *Acinetobacter* sp. ocupó el primer y cuarto lugar de aislamiento en la UCI-A y la UARN respectivamente, durante este período. Todas las cepas se mantuvieron conservadas a -70°C en caldo infusión cerebro-corazón con 50% de glicerol hasta su análisis.

Identificación bioquímica

Se probó la viabilidad de cada cepa conservada a -70°C cultivándolas en caldo infusión cerebro-corazón, luego se subcultivaron en agar MacConkey y, posteriormente, en agar nutriente, incubando en cada ocasión durante toda la noche a 35°C . La prueba de oxidasa se practicó a cada cepa y la misma consistió en frotar la tira impregnada con una solución acuosa al 0,5% de clorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina contra la colonia en estudio; la aparición de un color púrpura dentro de los primeros 20 segundos se consideró positiva. La identificación a nivel de género se realizó mediante el método bioquímico convencional [12,13]; la confirmación del género y definición de las especies se realizó mediante el sistema comercial API 20NE (BioMerieux, St Louis, MO, USA), siguiendo las instrucciones de la casa fabricante. Para el control de calidad se utilizaron las cepas de *E. coli* ATCC® 25922 y *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

Identificación molecular

Para la identificación molecular a nivel de especie de las cepas de *Acinetobacter* se utilizó la amplificación de la subunidad 16S del ADN [14]. Dado que la metodología del ARDRA utilizada se diseñó teniendo en cuenta sólo la secuencia del amplicón generado a partir de las diferentes especies de *Acinetobacter*, no se aplicó dicho método a ningún microorganismo que no se hubiese identificado como perteneciente a este género mediante las pruebas bioquímicas previamente realizadas. El amplicón de 1500 pb fue digerido con las enzimas *AluI* (Roche, Mannheim, Germany), *CfoI*, *MboI*, *MspI* (Promega, Madison, USA) y *RsaI* (Promega, Madison, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los fragmentos digeridos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio ($5\mu\text{g/ml}$). Para comparar el tamaño de los fragmentos resultantes, se utilizó un marcador de peso molecular con bandas de concentración definidas de 100pb (Invitrogen, CA, USA). Los patrones resultantes se detectaron por transiluminación con luz ultravioleta (UVP, Inc.), se documentaron fotográficamente (Polaroid Instantánea DS 34) y se compararon con los esquemas de ARDRA para la identificación de especies de *Acinetobacter* publicados por Nemeč y col. [3] y Dijkshoorn y col. [4].

La identificación de la especie de cada cepa de *Acinetobacter*, así como de cada cepa de los otros BGNNF, se verificó mediante la secuenciación del fragmento de la subunidad 16S del ADN, el cual fue previamente amplificado según lo descrito por Vila y col. [15]. El amplicón obtenido fue sometido al protocolo de purificación Wizard® SV Gel Up System (Promega, Madison, USA), de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. El análisis de la secuencia fue desarrollado con un secuenciador automático modelo Abi Prism 377 (Perkin Elmer, CA, USA), utilizando el protocolo del Kit Dye® Terminator V 3.1 Cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster CA, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, con algunas modificaciones. Los oligonucleótidos (Roche, Mannheim, Germany) utilizados fueron:

8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
 806R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3')
 515F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGTAA-3')
 1510R (5'-GGTTACCTTTGTTACGACTT-3').

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de la subunidad 16S del ADN ubicadas en el Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), para encontrar aquellas con homología más cercana a las obtenidas en este estudio.

Reproducibilidad de los Métodos

En todos los casos en que hubo alguna discordancia entre las diferentes técnicas de identificación utilizadas, se repitió la identificación por todos y cada uno de los méto-

dos utilizados, para evitar cualquier error posible de manipulación.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de concordancia de los resultados obtenidos entre el sistema de identificación API 20NE y el método de secuenciación de la subunidad 16S del ADNr.

Resultados

Tabla 1.- Identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores según tres métodos diferentes.

Nº de cepas identificadas	Perfil Bioquímico (API 20NE)	Especie identificada (API 20NE)	Perfil ARDRA	Especie identificada (ARDRA)	Secuenciación gen 16S del ADNr
4	0041073	<i>A. baumannii</i>	11121	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
1	0041073	<i>A. baumannii</i>	11121+3	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
3	0041473	<i>A. baumannii</i>	11121	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
3	0041473	<i>A. baumannii</i>	11121+3	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
1	0001073	<i>A. baumannii</i>	11121	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
2	0041073	<i>A. baumannii</i>	11123	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
1	0041473	<i>A. baumannii</i>	11123	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
2	0041053	<i>A. baumannii</i>	11121	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
3	0041073	<i>A. baumannii</i>	11121+3	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
5	0041073	<i>A. baumannii</i>	21113	<i>Acinetobacter</i> 13TU	<i>Acinetobacter</i> sp.*
2	0040453	<i>A. baumannii</i>	**	NI	<i>A. xyl.</i> subsp. <i>Xyl</i> ^f
17	0041073	<i>A. baumannii</i>	21111+3	<i>Acinetobacter</i> 13TU	<i>Acinetobacter</i> sp.*
1	0001073	<i>A. baumannii</i>	21111+3	<i>Acinetobacter</i> 13TU	<i>Acinetobacter</i> sp.*
3	1154775	<i>P. aeruginosa</i>	NA	-	<i>P. aeruginosa</i>
2	1354775	<i>P. aeruginosa</i>	NA	-	<i>P. aeruginosa</i>
3	1472341	<i>S. maltophilia</i>	NA	-	<i>S. maltophilia</i>
1	0004467	<i>C. acidovorans</i>	NA	-	β - <i>Proteobacterium</i>
2	1355775	<i>P. aeruginosa</i>	NA	-	<i>P. aeruginosa</i>
1	1155577	<i>P. aeruginosa</i>	NA	-	<i>P. aeruginosa</i>
1	1354777	<i>P. aeruginosa</i>	NA	-	<i>P. aeruginosa</i>
1	0014477	<i>P. aeruginosa</i>	NA	-	<i>P. aeruginosa</i>
1	1004477	<i>C. acidovorans</i>	NA	-	<i>C. acidovorans</i>
1	1047773	<i>C. acidovorans</i>	NA	-	<i>A. xyl.</i> subsp. <i>Xyl</i> ^f
1	1343577	<i>A. xyl.</i> subsp. <i>Xyl</i> ^f	NA	-	<i>A. xyl.</i> subsp. <i>Xyl</i> ^f

^a*Achromobacter xylosoxidans* subespecie *xylosoxydans*.

**No compatible con los patrones establecidos para *Acinetobacter*.

*Organismo identificado como *Acinetobacter* cepa RUH 1139.

NI: No identificado. NA: no aplicado.

De las 45 cepas identificadas como *A. baumannii* por el API 20 NE, se obtuvieron productos de amplificación de 1500 pb del gen que codifica para la subunidad 16S del ADNr (Figura 1), los cuales fueron sometidos al análisis de restricción (ARDRA). Sólo 20 cepas fueron identificadas como *A. baumannii* y, entre las cepas restantes, 23 fueron clasificadas como *Acinetobacter* genoespecie 13TU (Figura 2) y 2 no pudieron ser identificadas por este método (Tabla 1).

La secuenciación completa del amplicón de 1500 pb de la subunidad 16S del ARNr permitió identificar 20 cepas como *A. baumannii* y 23 como *Acinetobacter* cepa RUH 1139, 10 cepas como *P. aeruginosa*, 4 como *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, 3 como *S. maltophilia*, 1 como *C. acidovorans* y 1 como β -*Proteobacterium* (Tabla 1).

Las cepas identificadas como *A. baumannii* por ARDRA coincidieron con esta genoespecie en el 99% de la

De los 62 aislamientos de BGNNF investigados, 45 fueron identificados como *Acinetobacter baumannii*, 10 como *Pseudomonas aeruginosa*, 3 como *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 como *Comamonas acidovorans*, y 1 como *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, mediante el API 20NE. Se encontraron 5 patrones bioquímicos diferentes de *A. baumannii*. El patrón 0041073 fue el más frecuentemente hallado en estas cepas (71,11 %) (Tabla 1).

secuencia de nucleótidos. En el caso de las cepas identificadas como genoespecie 13TU mediante ARDRA, coincidieron en un 99% con la secuencia de la cepa designada como *Acinetobacter* cepa RUH 1139, ubicada en el banco de genes bajo el número de acceso 13275214 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), pero en un 97% con la secuencia de la genoespecie 13TU (Figura 3).

La diferencia entre la secuencia de nucleótidos de la subunidad 16S del ADNr de las 23 cepas aquí estudiadas, con respecto a *Acinetobacter* cepa RUH 1139, fue de sólo 5 bases, mientras que las secuencias de dichas cepas y las de la genoespecie 13TU, también ubicada en el banco de genes, se diferenciaron en 28 bases.

En la Tabla 2 se muestra la concordancia de identificación entre ambos métodos. Para *A. baumannii* se obtuvo una concordancia del 55,6%.

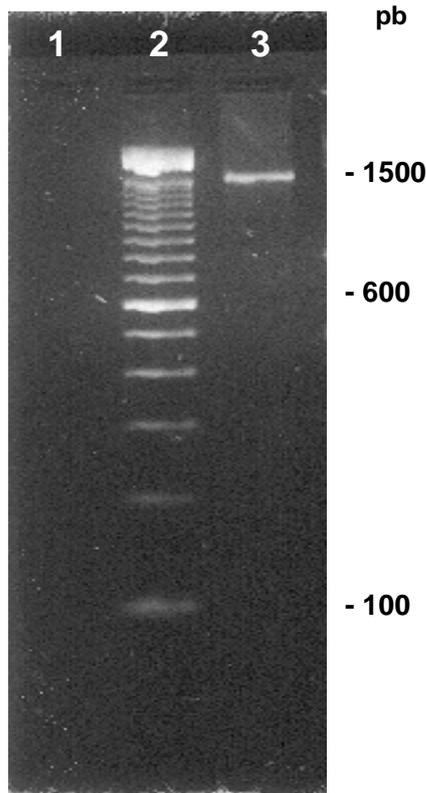


Figura 1. Producto de la amplificación de la subunidad 16S del ADNr. Línea 1: muestra blanco. Línea 2: marcador de peso molecular de 100pb. Línea 3: amplicón de 1500 pb de la subunidad 16S del ADNr de *Acinetobacter* cepa RUH 1139 amplificado.

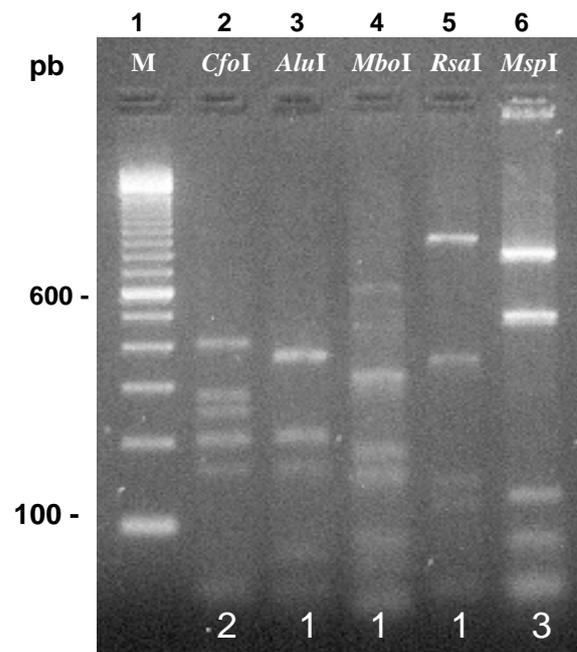


Figura 2. Patrones de restricción obtenidos luego de la digestión del amplicón de 1500 pb de la subunidad 16S del ADNr amplificado. Línea 1: marcador de peso molecular de 100pb. Líneas 2 - 6: digestión con *CfoI*, *AluI*, *MboI*, *RsaI* y *MspI* respectivamente. El análisis de los patrones (21113) corresponde a una cepa de *Acinetobacter* genoespecie 13TU.

Tabla 2.- Concordancia entre el sistema API 20 NE y la secuenciación de la subunidad 16S del ADNr para la identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores.

Secuenciación	Sistema API 20 NE				
	<i>A. baumannii</i> Nº (%)	<i>P. aeruginosa</i> Nº (%)	<i>S. maltophilia</i> Nº (%)	<i>C. acidovorans</i> Nº (%)	<i>A. xylosoxidans</i> Nº (%)
<i>A. baumannii</i>	5 (55,6)	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> cepa RUH 1139	2 (22,2)	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	7 (100)	-	-	-
<i>S. maltophilia</i>	-	-	3 (100)	-	-
<i>β-Propionibacterium</i>	-	-	-	1 (33,3)	-
<i>C. acidovorans</i>	-	-	-	1 (33,3)	-
<i>A. xylosoxidans</i>	2 (22,2)	-	-	1 (33,3)	1 (100)
Total	9 (100)	7 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (100)

La concordancia de identificación para *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* fue de 100%, sin embargo, para *C. acidovorans* y *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, fue de 33,3% y 25% respectivamente.

En el caso específico de la identificación de especies del género *Acinetobacter*, se observó una correlación del 100% entre las técnicas de ARDRA y la secuenciación en lo concerniente a las cepas de *A. baumannii*. Sin embargo, aquellas cepas que mediante técnica de ARDRA fueron

identificadas como *Acinetobacter* 13TU, por secuenciación se demostró que pertenecían a *Acinetobacter* cepa RUH1139 (Tabla 2).

La reproducibilidad de los métodos en todos los casos fue del 100%.

13TU	-----								
RUH1139	-----								
13TU	-	----cTagc	ggcggacggg	tgagtaatgc	ttaggaatct	gcctattagt		45	
RUH1139-		----cCagc	ggcggacggg	tgagtaatgc	ttaggaatct	gcctattagt		100	
		*							
13TU	-	acgggaggca	gcagtgggga	atattggaca	atgggGgGaa	Ccctgatcca		296	
RUH1139-		acgggaggca	gcagtgggga	atattggaca	atgggCgCaa	Gcctgatcca		350	
					* * *				
13TU	-	gaggaggagg	ctactCtagT	taatacctag	Ggatagtgga	cgttactcgc		405	
RUH1139-		gaggaggagg	ctactTtagA	taatacctag	Agatagtgga	cgttactcgc		450	
			* *		*				
13TU	-	tgcGagcgtt	aatcggattt	actgggcgta	aagcgTgcgt	aggcggctTa		496	
RUH1139-		tgcAagcgtt	aatcggattt	actgggcgta	aagcgCgcgt	aggcggctAa		550	
		*			*	*			
13TU	-	ttaagtcGAa	tgtgaaatcc	ccgagcttaa	cttggaatt	gcattcgata		545	
RUH1139-		ttaagtcAGa	tgtgaaatcc	ccgagcttaa	cttggaatt	gcattcgata		600	
		**							
13TU	-	ctgggGagct	agagtAtggg	agaggatggt	agaattccag	gtgtagcggg		595	
RUH1139-		ctgggTagct	agagtGtggg	agaggatggt	agaattccag	gtgtagcggg		650	
		*	*						
13TU	-	cctaaTactg	acgctgaggt	Acgaaagcat	ggggagcaaa	caggattaga		695	
RUH1139-		cctaaCactg	acgctgaggt	Gcgaagcat	ggggagcaaa	caggattaga		750	
		*		*					
13TU	-	gacataCtaG	Aaactttcca	gagatggatt	ggtgccttcg	ggaaTCtaGa		945	
RUH1139-		gacataGtaA	Gaactttcca	gagatggatt	ggtgccttcg	ggaaCTtaCa		1000	
		* * *				** *			
13TU	-	agtcccgcaa	cgagcgcaac	ccttttcctt	acttgccagc	aTtTCGgATg		1046	
RUH1139-		agtcccgcaa	cgagcgcaac	ccttttcctt	atttgccagc	aGtAATgTCg		1102	
						* * * *			
13TU	-----								
RUH119	-----								

Figura 3. Comparación de las secuencias de *Acinetobacter* genoespecie 13TU y *Acinetobacter* cepa RUH 1139.

Discusión

En los últimos años se han incrementado las infecciones nosocomiales causadas por BGNF, afectando principalmente a pacientes debilitados, lo cual se ha relacionado al incremento de procedimientos diagnósticos invasivos y terapéuticos usados en las unidades de cuidados intensivos en los últimos 20 años [1,11,16-18]. Particularmente, algunas especies de *Acinetobacter* se han encontrado mayormente involucradas en brotes nosocomiales en unidades de cuidados intensivos [1,19-24]. Cuatro genoespecies se han agrupado en el complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, debido a que fenotípicamente, dichas genoespecies, no pueden ser diferenciadas [25]. Estos datos hacen que sea relevante una correcta y rápida identificación de este tipo de patógenos, para prevenir colonizaciones hospitalarias causadas por estos germen y tomar las medidas preventivas y terapéuticas adecuadas.

De las 62 cepas de BGNF estudiadas, 45 fueron identificadas por API 20NE y pruebas fisiológicas como *A. baumannii*, siendo el patrón bioquímico 0041073 el más frecuentemente hallado entre las cepas. Estos resultados fueron discordantes con los hallados mediante el ARDRA, el cual permitió reconocer sólo a 20 cepas como *A. baumannii*, 23 como *Acinetobacter* genoespecie 13TU (18 de

estas pertenecieron a un mismo clón) [26] y 2 cepas no pudieron ser identificadas por este método. Las discrepancias entre estos resultados fueron resueltas mediante la secuenciación de la subunidad 16S del ADNr. Así, las 20 cepas identificadas mediante ARDRA como *A. baumannii* se confirmaron mediante esta técnica, mientras que las 23 identificadas mediante ARDRA como *Acinetobacter* genoespecie 13TU, resultaron ser *Acinetobacter* RUH1139. Por último, las 2 cepas con un patrón no identificable por ARDRA, fueron identificadas como *A. xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans*. Cabe resaltar que, 10 de las cepas identificadas como *A. baumannii* (31,2%) y 22 como *Acinetobacter* cepa RUH1139 (68,7%) tuvieron el mismo patrón bioquímico según el API 20NE (0041073), el cual indicaba una identificación excelente para *A. baumannii*. Las cepas identificadas como *A. baumannii* tanto por API20NE como por ARDRA, coincidieron en el 99% de la secuencia de la cepa correspondiente a esta genoespecie, ubicada en el banco de genes. Las secuencias de las cepas identificadas como *A. baumannii* mediante el API 20NE y como *Acinetobacter* genoespecie 13TU por ARDRA, coincidieron en un 99% con la secuencia de la cepa designada como *Acinetobacter* cepa RUH1139 y en un 97% con la cepa correspondiente a la genoespecie 13TU, ubicadas en el banco de genes, respectivamente. La diferencia entre

la secuencia de nucleótidos de la cepa de *Acinetobacter* RUH1139, depositada en el banco de genes, con respecto a las aquí estudiadas, fue menor al ser comparada con la secuencia de la cepa de *Acinetobacter* genoespecie 13TU, también ubicada en el banco de genes. Dijkshoorn y col. (2003), describen una cepa de *Acinetobacter* RUH 1139 aislada de faringe, ubicada dentro de los perfiles ARDRA para cepas de *Acinetobacter* como no clasificable como especie por hibridación ADN-ADN. El patrón de ARDRA de esta cepa no coincide con los descritos en la presente investigación, los cuales resultaron similares a los descritos por dichos investigadores para la genoespecie 13TU. Recientemente, se han publicado modificaciones en la base de datos que recopila los resultados de ARDRA para identificar cepas de *Acinetobacter*, entre ellos, la cepa de *Acinetobacter* RUH 1139 que se relaciona con la genoespecie 13TU y el *Acinetobacter* fenotipo 6 [4].

Seleccionando un aislado de cada clón, tanto para las cepas correspondientes a *Acinetobacter baumannii* como para *Acinetobacter* cepa RUH 1139 [26], se encontró una concordancia de identificación, entre ambos métodos, del 55,6%, es decir, el API 20NE no pudo identificar estas cepas en un 44,4%. Este hallazgo pone en evidencia la estrecha relación genética existente entre algunas genoespecies de *Acinetobacter*, incluyendo las del complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* [6,25], la cuales, hasta ahora, no pueden ser diferenciadas mediante pruebas bioquímicas, incluyendo el sistema API 20NE; además, el hecho que actualmente se aislen otras cepas de *Acinetobacter*, a partir de muestras clínicas, no incluidas aún dentro de las genoespecies, hasta ahora descritas pero similares bioquímicamente a *A. baumannii* [4], hace que varios investigadores hayan incluido métodos genéticos, sumados a dicho sistema, para la identificación precisa de la especie de este microorganismo [3,6,27,28].

Por otro lado, la secuencia de la subunidad 16S del ADN de las otras cepas de BGNNF incluidas en este estudio, permitió corroborar la identificación de las 10 cepas de *P. aeruginosa*, 3 como *S. maltophilia*, 1 como *C. acidovorans* y 1 como β -*Proteobacterium*. La secuencia de estas bacterias coincidió entre el 97 y 99% con las secuencias de cada especie identificada ubicadas en el banco de genes. Además, mediante la secuenciación 4 cepas se identificaron como *A. xylooxidans* subsp. *xylooxidans*, con un 97% de similitud entre las secuencias, 1 de las cuales fue identificada previamente, mediante el API 20NE, como *C. acidovorans*, y otras 2, como ya se ha citado previamente, como *A. baumannii*, mostrando una de ellas bajo perfil bioquímico de identificación.

En la bibliografía consultada, se encontraron diversos trabajos que también utilizaron métodos genéticos sumados al sistema API 20NE para la identificación de estos microorganismos [2,3,23,26-28]. Otras publicaciones evalúan la eficacia de dicho método, y todos afirman que el poder de discriminación del sistema API 20NE es insuficiente para la identificación exacta de este tipo de microorganismos [2,6,8,29]. Estas limitaciones pudieran ser atribuibles a la poca utilización de bacterias ambientales en

el desarrollo de los esquemas comerciales de identificación. En resumen, el 43,5% de las cepas incluidas en este estudio fueron identificadas erróneamente mediante el sistema API 20NE. El 44,4% de las cepas identificadas como *A. baumannii* por este método, no se correspondieron con dicha genoespecie y 22,2% de las cepas fueron identificadas como microorganismos diferentes. El hecho que la reproducibilidad de los métodos fuese del 100% en todos los casos muestra que las discrepancias entre los métodos son inherentes a los mismos y no atribuibles a errores de manipulación.

La metodología de secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr es sin duda la mejor y más confiable de las metodologías, no obstante requiere de infraestructuras muy costosas que la hacen inasumible como técnica de rutina, quedando relegada a casos de interés especial o a estudios de índole epidemiológica.

El sistema de identificación API 20NE demostró ser relativamente inexacto, debiendo sus resultados ser tomados con precaución. No obstante, en el presente estudio si bien se han identificado como *Acinetobacter baumannii* microorganismos que no lo eran, no se ha dejado de identificar ninguno que lo fuese. Así, una posibilidad, a tener en especial consideración en casos de brotes intrahospitalarios, sería realizar una identificación adicional mediante la técnica de ARDRA, que aunque necesita equipos (Termociclador) y reactivos (Taq polimerasa, cebadores, enzimas de restricción) costosos, posiblemente se pueda implementar, aunque el laboratorio no sea un centro de referencia. En caso de identificaciones discrepantes entre ambas metodologías, podría recurrirse a la secuenciación de los amplicones correspondientes a un grupo significativo de aislados.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que, idealmente, los resultados obtenidos por el API 20NE, para la identificación de especies dentro del género *Acinetobacter*, deberían de confirmarse mediante la técnica de ARDRA como requerimiento mínimo. Así mismo, la diferenciación de otras bacterias incluidas en el grupo de BGNNF puede ser errónea mediante técnicas bioquímicas, por lo tanto, es importante seguir avanzando en el diseño de metodologías como la del ARDRA para la identificación correcta de los géneros y especies más representativos.

Fuente de financiamiento

Este trabajo fue financiado por los Proyectos S1 2001001159 y F: 2000001633 de FONACIT. Joaquim Ruiz goza de un contrato para incorporación de investigadores al SNS del Fondo de Investigaciones Sanitarias - España (Proyecto CP05/0130).

Referencias

1. Salazar de Vegas EZ, Nieves B. *Acinetobacter* sp. aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Rev Soc Ven Microbiol. 2005; 25: 64-71.
2. Leff LG, Kernan RM, McArthur JV, Shimkets LJ. Identification of aquatic *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* by

- hybridization with species-specific rRNA gene probes. Appl Environ Microbiol. 1995; 61: 1634-6.
3. Nemeč A., Dijkshoorn L, Jezek P. Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3937-41.
 4. Dijkshoorn L, Nemeč A, Vanechoutte M, and ENEMTI group. Identification of *Acinetobacter* genomic species by means of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA). 2003. Disponible en: <http://allserv.rug.ac.be/~mvanech/ARDRA/Acinetobacter.html>. Acceso: marzo 2007.
 5. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic test for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 1991; 29: 277-82.
 6. Bernards AT, Dijkshoorn L, Van der Toorn J, Bochner BR, Van Boven CPA. Phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridization groups by means of the biology system. J Med Microbiol. 1995; 42: 113-9.
 7. Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, De Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol. 1995; 33: 11-5.
 8. Bernards AT, Van der Toorn J, Van Boven CPA, Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of the API 20NE system to identify *Acinetobacter* genomic species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996; 15: 303-8.
 9. Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJM, et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2414-20.
 10. Ibrahim A, Gerner-Smidt P, Sjøstedt P. Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2894-6.
 11. Martínez-Pellús A, Ruíz J, Jaime F, Simarro E, Fernández A. Incidencia de colonización e infección por *Acinetobacter baumannii* en una UCI con situación de epidemia. Análisis de factores de riesgo mediante un estudio de vigilancia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; 20: 194-9.
 12. Bouvet P, Grimont P. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 1986; 36: 228-40.
 13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, editores. Diagnóstico Microbiológico. 5^{ta} Ed. Buenos Aires, Argentina; Editorial Médica Panamericana S.A. 1999.
 14. Vila J, Marcos A, Jiménez de Anta T. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii* complex. J Med Microbiol. 1996; 44: 482-9.
 15. Vila J, Marcos A, Llovet T, Coll P, Jiménez de Anta T. A comparative study of ribotyping and arbitrarily primed polymerase chain reaction for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii* infection. J Med Microbiol. 1994; 4: 244-9.
 16. Leturia A, Cobos J, Díaz-Pierna L. Estudio de las resistencias a antibióticos de *Acinetobacter* en infecciones urinarias en una unidad de enfermos con lesión medular. Rev Esp Quimioterap. 1997; 10: 236-9.
 17. Núñez M, Martínez M, Bru M, Simarro E, Segovia M, Ruíz J. Appearance of resistance to meropenem during the treatment of a patient with meningitis by *Acinetobacter*. Scand J Dis. 1998; 30: 421-3.
 18. Fernández F. Actividad de inhibidores de betalactamasas frente a *Acinetobacter baumannii*. Rev Esp Quimioterap. 2000; 3: 31-6.
 19. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, Serruys E, Quint WG. Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR fingerprinting. J Hosp Infect. 1993; 25: 15-32.
 20. Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2677-81.
 21. Bou G, Cerveró G, Domínguez A, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamasas. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3299-305.
 22. Stone JW, Das BC. Investigation of an outbreak of infection with *Acinetobacter calcoaceticus* in a special baby care unit. J Hosp Infect. 1985; 6: 42-8.
 23. Horrevorts A, Bergman K, Koelée L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genospecies 3 in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1567-72.
 24. Rivera A, Fernández-Cuenca F, Beceiro A, Bou G, Martínez-Martínez L, Pascual A, et al. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and β -lactam antibiotics in *Acinetobacter* genospecies 3. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 48: 1430-2.
 25. Gerner-Smidt P, Tjernberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex. APMIS. 1993; 101: 826-32.
 26. Salazar de Vegas EZ, Nieves B, Araque M, Velasco E, Ruíz J, Vila J. Outbreak caused by *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit. Infect Cont Hosp Epidemiol. 2006; 27: 397-403.
 27. Vanechoutte M, Devriese I, Dijkshoorn L, Benedicte L, Deprez P, Verschraegen G, et al. *Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. J Clin Microbiol. 2000; 38: 4280-1.
 28. Kou L, Teng L, Yu C, Ho S, Hsueh P. Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a university hospital in Taiwan. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1759-63.
 29. Wauter G, Boel A, Voorn GP, Verhaegen J, Meunier F, Janssens M, et al. Evaluation of a new identification system, Crystal Enteric/Non-Fermenter, for gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 1995; 33: 845-9.