

**Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia**

JOHANNA MARCELA VANEGAS MÚNERA BSc

**Escuela de Microbiología**

**Universidad de Antioquia**

**Medellín**

**2014**

**Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia**

JOHANNA MARCELA VANEGAS MÚNERA

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Microbiología con énfasis en epidemiología molecular bacteriana**

**Asesora:**

Judy Natalia Jiménez Quiceno MSc, PhD

**Comité tutorial:**

Gustavo Eduardo Roncancio Villamil MD, Esp. en enfermedades infecciosas MSc (c)

Astrid Vanessa Cienfuegos Gallet MSc

**Escuela de Microbiología**

**Universidad de Antioquia**

**Medellín**

**2014**

## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
1.1. Los microorganismos .....	12
1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	14
1.2. Los carbapenémicos .....	15
1.3. La resistencia a carbapenémicos.....	16
1.3.1. Resistencia a carbapenémicos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
1.3.2. Resistencia a carbapenémicos en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	25
1.4. Epidemiología molecular .....	28
1.4.1. Métodos de tipificación empleados en epidemiología molecular .....	29
1.5. Situación nacional y local de la resistencia a carbapenémicos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	31
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	39
3.1. Objetivo general.....	39
3.2. Objetivos específicos .....	39
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	40
4.1. Tipo de estudio .....	40
4.2. Población de estudio.....	40
4.3. Criterios de inclusión y exclusión .....	41
4.4. Tamaño de la muestra .....	41
4.5 Información clínica y epidemiológica.....	41
4.6. Identificación bacteriana y pruebas de sensibilidad .....	42
4.7. Detección fenotípica de carbapenemasas .....	42
4.8. Extracción de ADN y detección molecular de carbapenemasas .....	43
4.9. Secuenciación .....	45
4.10. Tipificación molecular .....	45
4.10.1. Electroforesis en gel de campo pulsado.....	45
4.10.2. Tipificación de secuencias multilocus.....	46
4.11. Plan de análisis.....	47

4.12. Control de sesgos .....	47
4.13. Impacto ambiental.....	49
4.14. Consideraciones éticas .....	49
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
CAPÍTULO I: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	50
CAPÍTULO II: <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	51
CAPÍTULO III: Otra producción bibliográfica .....	76
<b>6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>79</b>
<b>7. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>85</b>
7.1. Limitaciones .....	85
7.2. Perspectivas .....	86
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>98</b>
<b>DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>114</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>117</b>

## ABREVIATURAS

---

**ABC:** Del inglés *ATP-binding cassette*

**BLAST:** Del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*

**BLEE:**  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (del inglés  *$\beta$ -lactamase extended spectrum*)

**CC:** Del inglés *clonal complex*

**CDC:** Del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*

**CLSI:** Del inglés *Clinical Laboratory Standards Institute*

**Complejo ABC:** Complejo *A. baumannii* – *A. calcoaceticus*

**GERMEN:** Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos en Medellín

**KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

**MATE:** Del inglés *multidrug and toxic compound extrusion*

**MFP:** Del inglés *membrane fusion protein*

**MFS:** Del inglés *major facilitator superfamily*

**MLST:** Del inglés *multilocus sequence typing*

**NCBI:** Del inglés *National Center for Biotechnology Information*

**NDM:** New Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa

**OMF:** Del inglés *outer membrane factor*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBP:** Proteína de unión a penicilina (del inglés *penicillin binding protein*)

**PCR:** Del inglés *polymerase chain reaction*

**PFGE:** Del inglés *pulsed field gel electrophoresis*

**PHRI:** Del inglés *Public Health Research Institute*

**RND:** Del inglés *resistance nodulation cell división*

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SMR:** Del inglés *small multidrug resistance*

**SPM:** Sao Paulo metalo- $\beta$ -lactamasa

**ST:** Del inglés *sequence type*

**UCI:** Unidad de cuidados intensivos

**UPGMA:** Del inglés *Unweighted Pairs Geometric-Matched Analysis*

**VIM:** Verona imipenemasa

## RESUMEN

---

### Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son bacterias de gran importancia en el ambiente hospitalario, donde ocasionan diversidad de cuadros clínicos como bacteriemia, neumonía, infecciones de tracto urinario y de sitio operatorio. Estas bacterias poseen diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos (1-4); además de la resistencia intrínseca a una variedad de antimicrobianos, tienen la capacidad de adquirir mecanismos de resistencia a través de elementos genéticos móviles y mediante el aumento o disminución de la expresión de los mecanismos cromosómicos (1).

Los carbapenémicos se consideran el tratamiento de elección en infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes, sin embargo, estas bacterias desarrollaron resistencia a estos antibióticos, complicando el manejo de dichas infecciones (2).

En Medellín, la resistencia a carbapenémicos es cerca del 30% para *P. aeruginosa* y del 35% para *A. baumannii* y el problema de resistencia continúa en aumento (3, 4). En la ciudad se conoce poco sobre los mecanismos de resistencia a carbapenémicos presentes en estas bacterias, debido a que la detección de estos mecanismos no se realiza de rutina en los laboratorios clínicos por la ausencia de métodos fenotípicos estandarizados para su evaluación y a que la vigilancia epidemiológica de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes solo es realizada con base en porcentajes de resistencia (3, 4). Así mismo a nivel local es

casi inexistente la información relacionada con las características clínicas de los pacientes que sufren de estas infecciones y de los clones que predominan en la ciudad.

Lo anterior hace necesaria la implementación de herramientas adicionales que permitan obtener un conocimiento más detallado sobre el comportamiento de la resistencia a nivel local. La combinación de la epidemiología tradicional apoyada en la biología molecular da origen a una herramienta llamada “epidemiología molecular” que no solo permite la identificación de clones de importancia clínica, sino que permite comprender de una manera más precisa la distribución de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes en tiempo, persona y lugar (5); todo esto orientado a la definición de estrategias de prevención y control más certeras en el manejo de estas infecciones.

### **Objetivo**

Describir las características clínicas y moleculares de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de la ciudad de Medellín, durante el período comprendido entre junio de 2012 y junio de 2014.

### **Materiales y métodos**

Estudio descriptivo transversal realizado durante junio 2012 y junio 2014, en cinco hospitales de alto nivel de complejidad de la ciudad de Medellín. Se incluyeron todos los pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos durante el periodo de estudio. Las características clínicas y

epidemiológicas fueron obtenidas a través de la revisión de la historia clínica de cada paciente. La identificación y sensibilidad bacteriana se realizó utilizando el sistema VITEK 2. La caracterización de los aislamientos incluyó la detección fenotípica y molecular de carbapenemasas y se realizó tipificación molecular mediante la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, del inglés *pulsed field gel electrophoresis*) y la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST, del inglés *multi locus sequence typing*).

## **Resultados**

En el periodo de estudio se incluyeron 235 y 32 pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, respectivamente.

El tipo de infección más frecuente en *P. aeruginosa* fue la de tracto urinario (n=35, 14,9%), mientras que en *A. baumannii* fue la de piel y tejidos blandos (n=7, 21,9%). Como características clínicas de importancia en las infecciones causadas por ambas bacterias, se resalta el uso previo de antibióticos, principalmente carbapenémicos, en más del 45% de los casos y la estancia en salas diferentes a las unidades de cuidados intensivos en la mayoría de los pacientes en el momento del aislamiento.

En *P. aeruginosa* la presencia de carbapenemasas fue encontrada en 25,1% (n=59) de los aislamientos, encontrándose un porcentaje similar de KPC-2 y VIM-2 (11,5% y 13,6%, respectivamente). Para los aislamientos portadores de KPC-2, la PFGE evidenció la presencia de aislamientos genéticamente relacionados circunscritos en cada hospital de la ciudad, siendo algunos de los clones

encontrados el ST362, ST235 y dos nuevos linajes nuevos no reportados previamente por MLST. Para los aislamientos con la carbapenemasas VIM-2, se observó una alta diversidad genética, estando el clon ST111 presente en 4 de los 5 hospitales de estudio. Los aislamientos que no portaban carbapenemasas además de ser diversos, correspondían a diferentes ST, incluyendo nuevos tipos.

En *A. baumannii* se encontraron las carbapenemasas OXA-23 y OXA-51 en todos los aislamientos y se observó una alta diversidad genética en todos ellos mediante PFGE. La presencia de los clones ST229 y ST758 fueron evidenciados por MLST.

En los aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas, los porcentajes de resistencia a los antibióticos fue superior del 80%, excepto para colistina. Sin embargo, los aislamientos de *P. aeruginosa* que no portaban carbapenemasas presentaban solo resistencia a imipenem y/o meropenem, en más del 50% de los casos.

## **Conclusión**

El modelo de epidemiología molecular empleado permitió aportar a la comprensión del comportamiento de las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en nuestra ciudad, con diferencias observadas a lo reportado a nivel mundial y evidenciando la importancia de la información local. En *P. aeruginosa* se observó la diseminación de la carbapenemasa KPC, enzima confinada inicialmente a enterobacterias y cuya vigilancia epidemiológica no se hacía en esta bacteria. Por otra parte, en *A. baumannii* los principales cuadros clínicos encontrados fueron osteomielitis e

infecciones de piel y tejidos blandos, sugiriendo su inclusión en el diagnóstico diferencial de estas entidades.

Para ambas bacterias se encontraron clones exitosos a nivel mundial resistentes a carbapenémicos, tales como el ST111 y ST235 en *P. aeruginosa* y el ST229 en *A. baumannii*. No obstante, se encontró una alta diversidad genética por PFGE para ambas bacterias y nuevos clones por MLST; resultados que sugieren una alta presión antibiótica la cual favorece la selección de aislamientos resistentes y plantean el uso racional de antibióticos como una de las estrategias que ayude a la disminución de estas infecciones en la ciudad.

**Financiación:** Este trabajo fue financiado por el *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias* (proyecto: 111554531404) y por el Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, Universidad de Antioquia (proyecto: CIMB-068-12).

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. Los microorganismos

*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* hacen parte del grupo de bacterias de mayor importancia en el ambiente hospitalario, debido a que causan variedad de cuadros clínicos y presentan gran cantidad de mecanismos de resistencia a los antibióticos, tanto intrínsecos como adquiridos (6, 7).

#### 1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo no fermentador de glucosa, móvil y aerobio, ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en el agua, en el suelo e inclusive colonizando animales y humanos (8). En su genoma, *P. aeruginosa* posee diversidad de genes relacionados con la regulación genética, metabolismo, captación de nutrientes, patogénesis y resistencia antimicrobiana, que favorecen su permanencia en diferentes ambientes y en el hospedero humano (9). Dentro de su género, *P. aeruginosa* es la especie patógena más importante, siendo una bacteria responsable de diferentes infecciones tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario (10).

Las infecciones adquiridas en la comunidad incluyen queratitis ulcerativa asociada al uso de lentes de contacto, otitis externa en pacientes inmunocomprometidos e infecciones en piel y tejidos blandos, como las infecciones de pie diabético (11). En personas sin factores de riesgo, *P. aeruginosa* coloniza la mucosa nasal, orofaringe, oídos, axilas, perineo y tracto gastrointestinal (12).

En el ambiente hospitalario, los pacientes pueden ser fácilmente colonizados, situación que se ve favorecida por su ubicuidad y capacidad de formar biopelícula; características que le permiten además colonizar dispositivos médicos y ambientes húmedos con mínimos requerimientos nutricionales, tales como desinfectantes y jabones (10, 13).

*Pseudomonas aeruginosa* ha sido una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia en infecciones asociadas a la atención en salud, ocasionando neumonía, infecciones en piel y tejidos blandos, infecciones de sitio operatorio, infecciones del tracto urinario y bacteriemia; usualmente en pacientes inmunocomprometidos, con uso previo de antibióticos, sometidos a quimioterapia o cirugías (8, 11, 12). Adicionalmente, *P. aeruginosa* es el principal microorganismo causante de infección pulmonar crónica en pacientes con fibrosis quística, colonizando por largos períodos de tiempo y originando infecciones recurrentes de difícil tratamiento en este grupo de pacientes (11, 12).

El tratamiento de las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* se ha complicado por la resistencia intrínseca que posee la bacteria a múltiples antibióticos tales como penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación; excepto ceftazidima; cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclinas, ácido nalidíxico y ertapenem (14) (15). Esta resistencia está relacionada con la presencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible denominada AmpC, la expresión de diferentes bombas de expulsión y a la escasa permeabilidad de la membrana externa, factores que en combinación confieren resistencia a los antibióticos mencionados (14) (15). Además de la resistencia

intrínseca, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de adquirir y diseminar mecanismos de resistencia a través de elementos genéticos móviles, limitando aún más las opciones de tratamiento (15).

### **1.1.2. *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* es un cocobacilo gram negativo, no fermentador de glucosa, aerobio estricto, catalasa positivo y oxidasa negativo (16). Esta bacteria hace parte del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC) el cual reúne cuatro especies altamente similares que no pueden ser diferenciadas por pruebas fenotípicas: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* (aisladas con mayor frecuencia en infecciones intrahospitalarias) y *A. calcoaceticus*, presente en la naturaleza y haciendo parte de la microbiota del cuerpo humano (17).

Si bien la mayoría de las especies del género *Acinetobacter* son microorganismos que se encuentran en el ambiente (agua, plantas, vegetales, suelo), *A. baumannii* no es un microorganismo ubicuo y no se observa con frecuencia en la naturaleza, ni como colonizador en la comunidad (18). Por el contrario, esta bacteria coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico o con diferentes comorbilidades, siendo una bacteria típica de unidades de cuidado intensivo y unidades de quemados (18).

*A. baumannii* es uno de los agentes más frecuentemente implicados en brotes de infección intrahospitalaria por su capacidad de adherencia y persistencia en equipos biomédicos, teclados, cortinas e incluso teléfonos celulares de los trabajadores de salud, siendo usualmente resistente a desinfectantes (19).

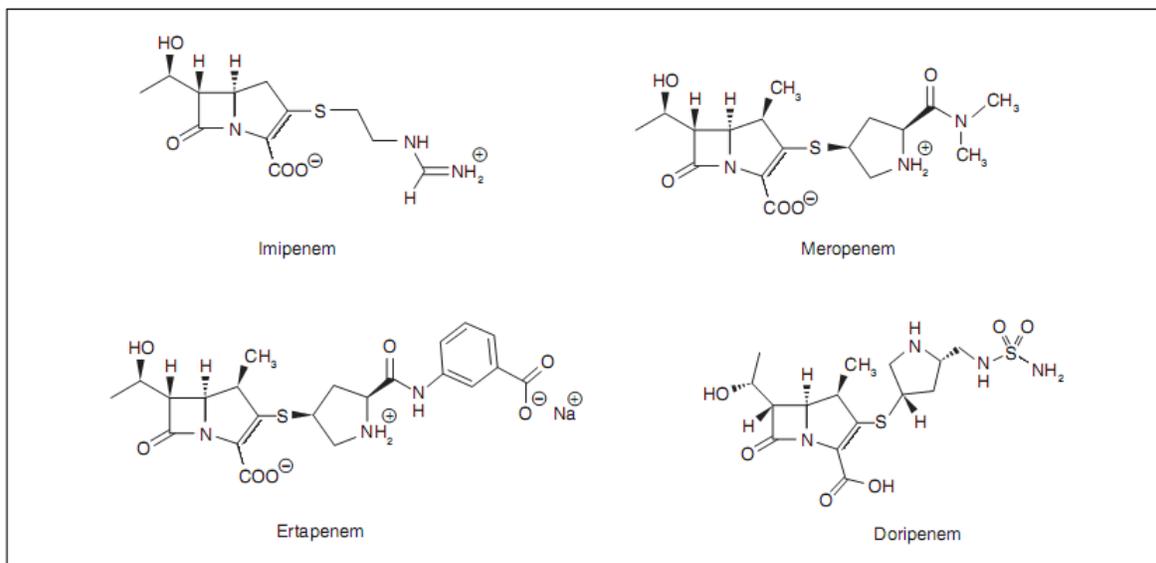
En el medio hospitalario, *A. baumannii* origina diversidad de cuadros clínicos, principalmente neumonía asociada a ventilador y bacteriemia (20). Otras manifestaciones incluyen infecciones de sitio operatorio, infecciones de tracto urinario relacionadas con sondas vesicales e infecciones en piel y tejidos blandos, principalmente en pacientes quemados y en militares heridos en combate (21, 22). Dentro de los factores de riesgo que predisponen a infecciones por *A. baumannii* incluyen el uso previo de antibióticos, cirugías mayores, trauma, quemaduras, inmunosupresión y la presencia de dispositivos médicos invasivos, principalmente la ventilación mecánica (16, 20).

Su resistencia intrínseca incluye resistencia a aztreonam, ertapenem, trimetoprim, cloranfenicol y fosfomicina, dada la baja permeabilidad de su membrana externa (14, 15). Dicha resistencia sumado a su capacidad de permanecer sobre superficies inanimadas, hace de *A. baumannii* un microorganismo causante de infecciones intrahospitalarias con elevadas tasas de mortalidad (16).

## **1.2. Los carbapenémicos**

Los carbapenémicos son antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro con actividad frente a bacterias gram positivas, gram negativas, aerobias y anaerobias (2). Su mecanismo de acción consiste en la unión a las proteínas de unión a la penicilina (PBP), interrumpiendo de esta forma la síntesis del peptidoglicano y por tanto, la síntesis de la pared bacteriana (2). Estos antibióticos tienen una buena actividad bactericida frente a bacterias gram negativas porque se unen fuertemente a las PBP 1A, 1B y 2, siendo estables a  $\beta$ -lactamasas como las AmpC y las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (23); razón por la cual

son el tratamiento de elección en infecciones ocasionadas por *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (1, 24). Los antibióticos que hacen parte de los carbapenémicos son el meropenem, imipenem, doripenem y ertapenem, siendo el ertapenem el de mayor actividad antimicrobiana (2) (Figura 1).



**Figura 1:** Estructura de los carbapenémicos utilizados en la práctica clínica (Tomado de Fresnadillo M, et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010)

### 1.3. La resistencia a carbapenémicos

La resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* está mediada por varios mecanismos, siendo uno de ellos la presencia de enzimas denominadas carbapenemasas, las cuales hidrolizan el antibiótico impidiendo su acción (25).

Las carbapenemasas son un grupo de  $\beta$ -lactamasas, que además de los carbapenémicos, en su mayoría hidrolizan todos los  $\beta$ -lactámicos disponibles (25). Teniendo en cuenta las variaciones de las  $\beta$ -lactamasas en el espectro de hidrólisis y la estructura molecular puede variar entre ellas, se han propuesto dos clasificaciones para agruparlas: (i) la funcional descrita por Bush y Jacoby (26) y (ii) la molecular, descrita por Ambler (27).

La clasificación funcional está basada en la capacidad de hidrólisis de enzima para cada sustrato  $\beta$ -lactámico y los perfiles de inhibición, arrojando diferentes grupos y subgrupos (25).

Por su parte, la clasificación molecular de Ambler está basada en la presencia de moléculas en el sitio activo de la enzima, agrupando las  $\beta$ -lactamasas en dos grandes clases: las serin  $\beta$ -lactamasas, que requieren serina en su sitio activo para su funcionamiento ( $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D) y las metalo- $\beta$ -lactamasas, las cuales requieren un metal como el Zinc (Zn) para poder funcionar ( $\beta$ -lactamasas de clase B). Esta última clasificación ha sido ampliamente utilizada por su facilidad de interpretación y manejo. Las carbapenemasas corresponden a las  $\beta$ -lactamasas de clase A, B y D, en la clasificación de Ambler, variando en su espectro de hidrólisis y perfil de inhibición (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clases de carbapenemasas según la clasificación de Ambler y su perfil de hidrólisis e inhibición (Adaptado de Queenan AM, Bush K. Clin Microbiol Rev. 2007)

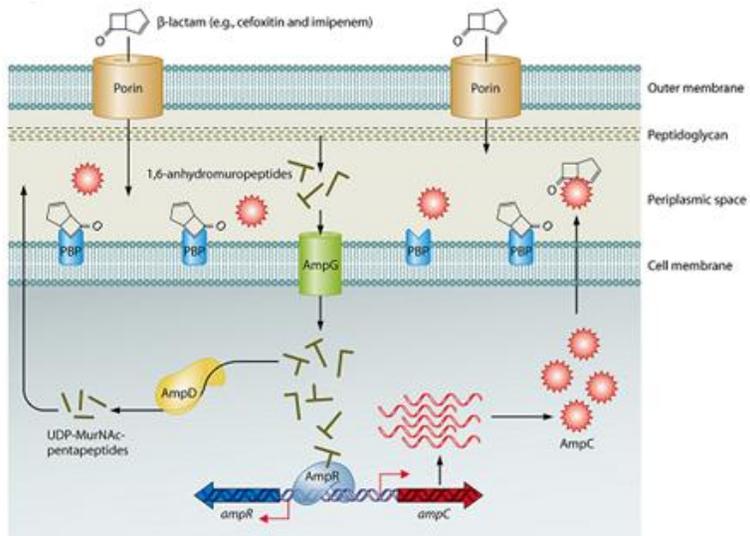
Clase	Enzima	Perfil de hidrólisis					Perfil de inhibición	
		Penicilinas	Cefalosporinas	Cefalosporinas	Aztreonam	Carbapenémicos	EDTA	Ácido clavulánico
			de espectro reducido	de espectro extendido				
A	NMC	+	+	+	+	+	-	+
	IMI	+	+	+	+	+	-	+
	SME	+	+	±	+	+	-	+
	KPC	+	+	+	+	+	-	+
	GES	+	+	+	-	±	-	+
B	IMP	+	+	+	-	+	+	-
	VIM	+	+	+	-	+	+	-
	GIM	+	+	+	-	+	+	-
	SPM	+	+	+	-	+	+	-
	NDM	+	+	+	-	+	+	-
D	OXA	+	+	±	-	±	-	±

### 1.3.1. Resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*

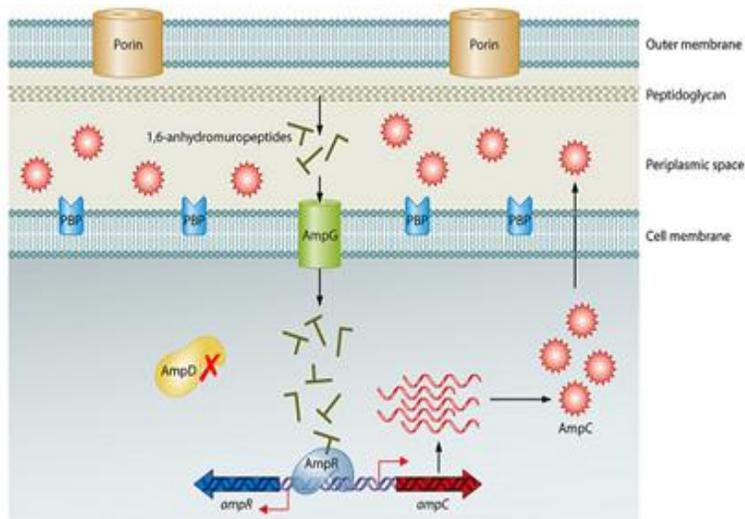
En *P. aeruginosa*, la resistencia a los carbapenémicos está mediada principalmente por la presencia de mecanismos cromosómicos no mediados por carbapenemasas tales como la sobre-expresión de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC o de la bomba de expulsión MexAB-OprM y la pérdida o alteración de la porina OprD (7, 8).

**1.3.1.1. Sobreexpresión de AmpC:** La AmpC es una cefalosporinasa cromosómica similar a la encontrada en enterobacterias (15, 28). La expresión basal de esta enzima confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, excepto ceftazidima. Sin embargo, cuando su expresión aumenta confiere resistencia a todas las cefalosporinas, incluyendo cefepime (a diferencia de la AmpC de las enterobacterias), excepto a los carbapenémicos (8, 15).

Este aumento de expresión puede ser favorecida por inducción o desrepresión. En el caso de hiper-expresión debida a inducción, la presencia de antibióticos como el imipenem y el ceftaxim actúan como moléculas inductoras que, una vez unidas a las proteínas de unión a penicilinas o PBP, originan un incremento de fragmentos de la pared celular (1,6-anhidromuropéptidos), los cuales no alcanzan a ser clivados por la amidasa citosólica AmpD (8). La presencia de anhidromuropéptidos estimulan al factor de transcripción AmpR, que a su vez origina un aumento reversible en la expresión de la AmpC en el espacio periplásmico. Por otra parte, en el proceso de desrepresión, se generan mutaciones irreversibles de la amidasa AmpD que influyen en la capacidad de esta enzima de clivar los anhidromuropéptidos provenientes de la pared celular y como consecuencia se activa el factor de transcripción AmpR que aumenta la expresión de la  $\beta$ -lactamasa AmpC (8). Si bien la sobreexpresión de la AmpC per se no es suficiente para conferir resistencia a carbapenémicos, su combinación con mecanismos como alteración de porinas y bombas de expulsión se ha visto relacionado con la resistencia a este grupo de antibióticos (8) (15) (Figuras 2 y 3).



**Figura 2.** Inducción de la expresión AmpC en *P. aeruginosa*. (Tomado de Lister et al. Clin Microbiol Rev. 2009)

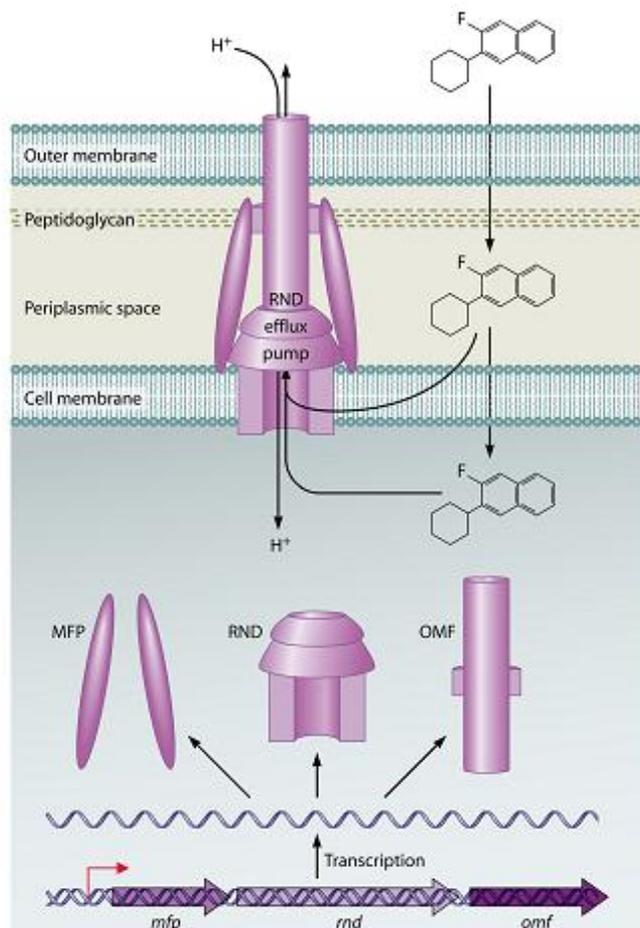


**Figura 3.** Aumento de la expresión AmpC por desrepresión en *P. aeruginosa*. (Tomado de Lister et al. Clin Microbiol Rev. 2009)

**1.3.1.2. Sobreexpresión de la bomba de expulsión MexAB-OprM:** Las bombas de expulsión son un sistema de proteínas que reducen la concentración intracelular de compuestos que puedan ser tóxicos para la bacteria. En *P. aeruginosa* se han reportado cinco familias de bombas de expulsión según la fuente de energía requerida para la eflujo del sustrato y las moléculas que pueden ser expulsadas : 1) SMR (small multidrug resistance), 2) MFS (major facilitator superfamily), 3) RND (resistance nodulation cell división), 4) MATE (multidrug and toxic compound extrusión), 5) ABC (ATP-binding cassette) (29). De éstas, la familia RND es la más frecuente en *P. aeruginosa*, la cual consiste en un sistema compuesto por una proteína de fusión ubicada en el espacio periplásmico (MFP, del inglés *membrane fusión protein*), un factor de membrana externa (OMF, del inglés *outer membrane factor*) y un transportador ubicado en la membrana citoplasmática (RND) (30) (Figura 4). La familia de bombas de expulsión RND poseen una alta variedad de sustratos incluyendo antibióticos y detergentes (Tabla 2).

MexAB-OprM es una bomba de expulsión tipo RND y es la más predominante en *P. aeruginosa*, la cual expulsa una gran variedad de antibióticos tales como fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos (incluyendo carbapenémicos, excepto el imipenem), inhibidores de  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, novobiocina, trimetoprim y sulfonamidas. Además logra expulsar otros componentes como el SDS, el triclosán y el bromuro de etidio (8, 29). La expresión de esta bomba de expulsión es dependiente de la fase de crecimiento de la bacteria, así que a medida que aumenta la densidad celular, la trascrición de la

bomba también incrementa, llegando a su máxima expresión después de la fase logarítmica (8). Además de esto, el gen *OprM*, puede ser expresado de forma independiente al operón *MexAB*, ya que la porina OprM actúa como una proteína de fusión de membrana externa para los componentes de otras bombas de expulsión como MexXY, MexJK y MexMN. Por lo anterior, la expresión independiente de OprM asegura la expresión de otras bombas de expulsión si el promotor de la MexAB-OprM está comprometido (8, 29).



**Figura 4.** Esquema de la bomba de expulsión MexAB-OprM en *P. aeruginosa*. (Tomado de Lister et al. Clin Microbiol Rev. 2009)

**Tabla 2.** Bombas de la familia RND presentes en *Pseudomonas aeruginosa* (Adaptado de Lister et al. Clin Microbiol Rev. 2009 y Schweizer Genet. Mol. 2003)

Bomba de expulsión RND	Sustratos
MexAB-OprM	Fluoroquinolonas, $\beta$ -lactámicos (excepto imipenem), tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, trimetoprim, sulfonamidas, triclosán, SDS, hidrocarburos aromáticos, bromuro de etidio
MexCD-OprJ	Fluoroquinolonas, $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, trimetoprim, novobiocina, triclosán, SDS, hidrocarburos aromáticos
MexEF-OprN	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim, triclosán, hidrocarburos aromáticos
MexXY	Fluoroquinolonas, aminoglicósidos, tetraciclina. eritromicina
MexJK	Tetraciclina, eritromicina, triclosán
MexGHI-OpmD	Vanadio, fluoroquinolonas
MexVW	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina. eritromicina
MexPQ-OpmE	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina. macrólidos
MexMN	Cloranfenicol

**1.3.1.3. Alteración o pérdida de la porina OprD:** La permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* es hasta 90 veces menor en comparación con la de *Escherichia coli*, lo que limita la entrada de ciertos sustratos al interior de la bacteria y contribuye a la presencia de la resistencia intrínseca a ciertos antibióticos (15). La porina OprD es un canal de agua que permite el paso de aminoácidos básicos, péptidos de bajo tamaño y antibióticos como los carbapenémicos, a través de la membrana externa (31). La resistencia a este

grupo de antibióticos puede ser generada cuando disminuye la expresión de la porina OprD o se presentan mutaciones que afectan su funcionalidad, siendo el imipenem el carbapenémico más afectado, dado que meropenem y doripenem puede ingresar a la bacteria a través de vías alternas (31). Sin embargo, la baja expresión de la porina OprD sumada a la presencia de otros mecanismos de resistencia como la sobreexpresión de bombas de eflujo, puede afectar no solo imipenem, sino también los demás carbapenémicos (32).

Se han descrito diferentes factores que afectan la expresión de la porina OprD, tales como alteraciones en el promotor del gen *OprD*, terminación prematura de la transcripción del gen *OprD*, presencia de trazas de metales como el zinc y correulación con bombas de expulsión como la MexEF-OprN (8).

**1.3.1.4. Carbapenemasas:** *P. aeruginosa* tiene capacidad para adquirir y diseminar mecanismos de resistencia como las carbapenemasas a través de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones (33). En esta bacteria se ha descrito la presencia de estas enzimas, tanto de la clase A, como de la B y D, según la clasificación de Ambler, siendo las más frecuentes las de clase B.

- Carbapenemasas de clase A: Son poco frecuentes en los aislamientos de *P. aeruginosa*. La presencia de la carbapenemasa KPC fue descrita por primera vez en Colombia y posteriormente en otros países de Latinoamérica, como Trinidad y Tobago, Puerto Rico y Argentina (34) (35-37). Esta carbapenemasa inicialmente estaba limitada a *K. pneumoniae* y otras enterobacterias (38, 39). Otros tipos de

carbapenemasa clase A como las GES también han sido reportadas, pero con menor frecuencia (12).

- Carbapenemasas de clase B: Estas carbapenemasas son las más frecuentes en *P. aeruginosa*, siendo en su mayoría descubiertas por primera vez en esta bacteria (40, 41). Dichas enzimas generalmente están localizadas en integrones, los cuales con frecuencia portan simultáneamente genes de resistencia a otros antibióticos como los aminoglucósidos (8, 12). Dentro de este grupo, las más frecuentes en *P. aeruginosa* son IMP y VIM, reportadas inicialmente en Japón y en Verona, Italia; respectivamente (8, 41, 42). Otras metalo- $\beta$ -lactamasas que han sido descritas en aislamientos de *P. aeruginosa* son la SPM y la GIM, pero raramente han sido encontradas en lugares diferentes en donde fueron reportadas (Brasil y Alemania, respectivamente) (8, 12, 41, 42). La metalo- $\beta$ -lactamasa NDM, solo ha sido reportada en países como Serbia, Italia e India (43-46).

- Carbapenemasas de clase D: Son poco frecuentes en *P. aeruginosa*, algunas como la OXA-198 han sido reportadas en un integrón clase 1, presente en un plásmido de 46 kb, no tipificable (47).

### **1.3.2. Resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii***

En esta bacteria la resistencia a carbapenémicos está mediada principalmente por la presencia de carbapenemasas, sin embargo hay otros mecanismos que también han sido implicados.

### **1.3.2.1. Carbapenemasas:**

- Carbapenemasas de clase D: Son las carbapenemasas más frecuentes en los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Dentro de éstas se han descrito cuatro tipos de mayor importancia: OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24-like y OXA-58-like. Estas enzimas hidrolizan penicilinas y carbapenémicos, no son inhibidas por el ácido clavulánico y han sido descritas en diversas partes del mundo, incluyendo Colombia, en donde se ha descrito la presencia de la OXA-58-like y OXA-23-like (18, 48) (58). Estas oxacilinasas pueden estar codificadas en plásmidos, excepto OXA-51, codificada en el cromosoma bacteriano y con frecuencia usada como marcador de especie (48). Sin embargo, recientemente esta oxacilinasas, junto con la OXA-58, fueron reportadas en enterobacterias, lo que evidencia la capacidad de diseminación a bacterias de otro género (59). Debido a que las oxacilinasas hidrolizan de forma débil los carbapenémicos todas, excepto la OXA-24-like, han sido asociadas con elementos de inserción como el IS*Aba1* originando una hidrólisis mayor del antibiótico (60). La secuencia de inserción IS*Aba1* también ha sido relacionado con genes asociados con la resistencia a cefalosporinas como AmpC y se presume que es un promotor que media la resistencia a sulfonamidas (48).

- Carbapenemasas de clase A: Se cuentan con pocos reportes, siendo la mayoría de ellos descritos en Puerto Rico, país en el que se han detectado los genes KPC-2, KPC-3, KPC-4 y KPC-10 en aislamientos de *A. baumannii* (49, 50).

- Carbapenemasas de clase B: Son también poco frecuentes en esta bacteria (51). Dentro de las reportadas se encuentran IMP, VIM, SIM, SPM y NDM (52-54). Similar a lo que ocurre con *P. aeruginosa*, la mayoría de estas enzimas han sido encontradas en integrones con determinantes de resistencia a aminoglicósidos (18). Estas enzimas se han encontrado simultáneamente en aislamientos de Japón, los cuales contenían además de los genes *bla*<sub>OXA-21</sub> y *bla*<sub>OXA-58</sub>, los genes de las metalo-β-lactamasas *bla*<sub>IMP-11</sub> y *bla*<sub>IMP-19</sub>, asociados a elementos genéticos móviles como IS e integrones clase 1 (55). En *A. baumannii* también se ha detectado el gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, integrado en el cromosoma bacteriano en un transposón con la secuencia de inserción ISAba125, lo que sugiere una fácil diseminación de este gen entre diferentes especies de gram-negativos (56). De manera similar, además de NDM-1, se ha reportado la variante NDM-2 en aislamientos de pacientes incluidos en un centro de rehabilitación en Israel. Esta variante también fue asociada a la presencia del elemento móvil ISAba125 (57).

**1.3.2.2. Otros mecanismos de resistencia:** Si bien el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* es la presencia de carbapenemasas, se ha observado la presencia de mecanismos no enzimáticos que contribuyen con la resistencia a este grupo de antibióticos (61). Dichos mecanismos incluyen la alteración de las proteínas de membrana externa (OMP, del inglés *outer membrane Protein*) que conducen a una disminución de la permeabilidad de la membrana, bombas de expulsión que expulsan el antibiótico y alteración de las proteínas de unión a penicilina o PBP (61).

Con relación a los cambios en las OMP se han descrito alteraciones en proteínas como la CarO asociada con resistencia a meropenem e imipenem (62) y la OmpW, la cual es homóloga a las OmpW encontradas en *E. coli* y *P. aeruginosa*, que disminuye la entrada de colistina y de los  $\beta$ -lactámicos al interior de la bacteria (18, 61). También se ha descrito una OMP de 43 kDa perteneciente a la familia de las OprD (OprD-*like*), relacionada con la resistencia a imipenem.

Dentro de las bombas de expulsión, la más estudiada es el sistema AdeABC, que puede expulsar  $\beta$ -lactámicos (incluyendo carbapenémicos), aminoglicósidos, Macrólidos, cloranfenicol, tigeciclina, tetraciclinas, Fluoroquinolonas y trimetoprim (18).

Finalmente, con relación a las PBP, se ha descrito que la ausencia de la PBP2a podría conferir resistencia a imipenem y/o meropenem. La carencia simultánea de esta proteína y de la PBP2b se ha visto asociada con niveles de resistencia más elevada a estos antibióticos (15).

#### **1.4. Epidemiología molecular**

En los últimos años, los progresos en la biología molecular han revolucionado el diagnóstico microbiológico y han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. La utilización de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y los métodos de tipificación genética, han permitido la detección de genes específicos asociados con la resistencia y establecer la relación clonal de los aislamientos resistentes que están circulando en un lugar determinado (63).

La integración de las técnicas de biología molecular con la epidemiología tradicional ha dado lugar a una rama de la epidemiología denominada “*epidemiología molecular*”, la cual utiliza las ventajas de estas técnicas para definir la distribución de las enfermedades e identificar factores de riesgo en las poblaciones (5). La utilización de epidemiología molecular no solo ha incrementado el entendimiento de la patogénesis, virulencia e interacción hospedero-microorganismo, sino que ha posibilitado establecer estrategias de manejo y control más certeras en el estudio de las enfermedades infecciosas (64). Su campo de aplicación incluye estudios de vigilancia epidemiológica, estudio de brotes y la evaluación del comportamiento y transmisión de los agentes infecciosos, con el fin de identificar la emergencia de genotipos de importancia clínica, contribuir al entendimiento de los microorganismos y conocer de manera más precisa su distribución en tiempo, persona y lugar (5).

#### **1.4.1. Métodos de tipificación empleados en epidemiología molecular**

Entre los métodos de biología molecular aplicados en epidemiología sobresalen la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, del inglés *pulsed field gel electrophoresis*) y la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST, del inglés *multilocus sequence typing*), ambos utilizados para estudios de epidemiología local y global, respectivamente.

**1.4.1.1. Electroforesis en gel de campo pulsado:** Esta técnica fue descrita inicialmente en 1984, como una herramienta para estudiar el ADN cromosómico en organismos eucariotas, sin embargo, en los años posteriores la electroforesis de campo pulsado ha demostrado ser un método de tipificación molecular altamente efectivo para gran cantidad de especies bacterianas evidenciando superioridad con relación a otras técnicas (5). En esta técnica se utiliza una enzima de restricción de baja frecuencia que corta el genoma bacteriano en sitios específicos generando un patrón de bandas. El ADN es embebido en bloques de agarosa con el fin de que los cortes generados sean realmente por la presencia de la enzima y no por daño mecánico durante la manipulación de las muestras. Una vez es utilizada la enzima de restricción, las muestras son ubicadas en un gel de agarosa que es ubicado en un equipo que emite pulsos en diferentes direcciones para favorecer la migración del ADN (65).

Esta técnica continúa siendo el “estándar de oro” para estudios de brotes hospitalarios y también para evaluar la transmisión entre instituciones. Es uno de los métodos de tipificación con mayor poder de discriminación, ya que permite detectar pequeñas variaciones en el genoma, tales como deleciones, inserciones, pérdida o adquisición de plásmidos que se acumulan rápidamente en el tiempo (5). Dentro de sus desventajas se resalta el alto tiempo requerido para el procesamiento de las muestras y su baja reproducibilidad (66-68).

**1.4.1.1. Tipificación de secuencias de múltiples locus:** En esta técnica se analizan las secuencias de siete genes constitutivos, los cuales poseen una baja tasa de variabilidad genética en el tiempo (65). Una vez los genes son secuenciados, cada secuencia se ingresa a bases de datos disponibles en internet con el fin de generar un perfil alélico denominado tipo de secuencia o ST (del inglés, *sequence type*) (69). La relación entre los ST puede ser determinado por algoritmos como el eBURST, el cual permite inferir patrones evolutivos de descendencia a través de un modelo de expansión clonal y diversificación, mediante la asignación de complejos clonales (CC, del inglés *clonal complex*) (69).

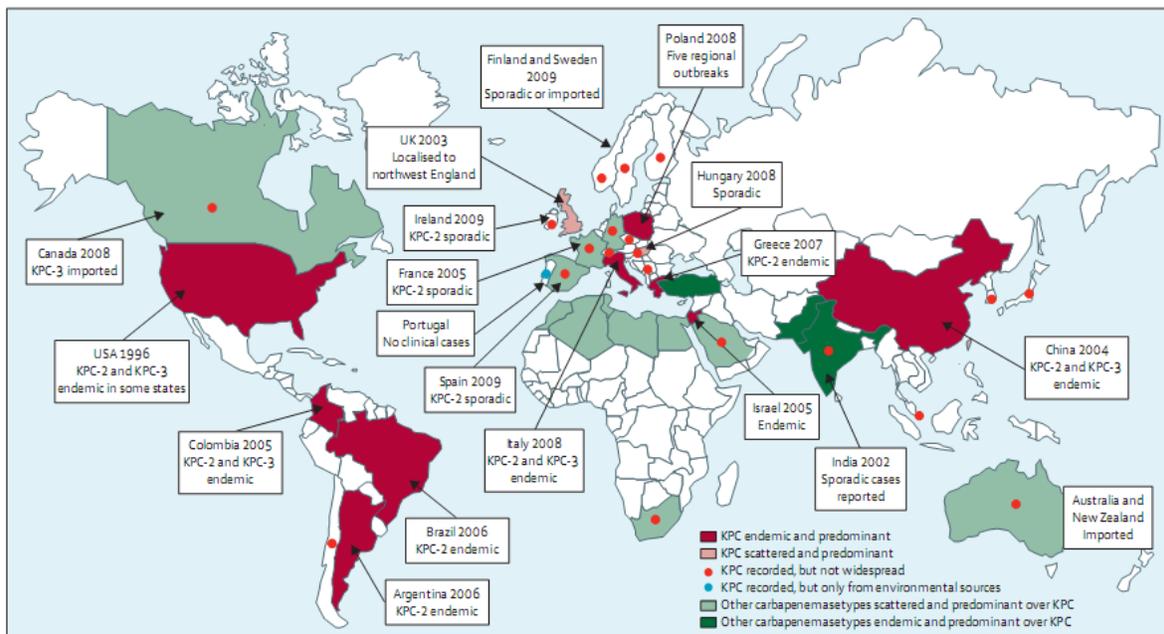
Por la disponibilidad de las bases de datos en internet para el análisis de las secuencias, el MLST ha favorecido el intercambio y la reproducibilidad de la información a lo largo de todo el mundo. Por la baja variabilidad de los genes amplificados, esta técnica es utilizada para estudios de la epidemiología global, con el fin de detectar cambios que se generen en largos periodos de tiempo. Sus desventajas incluyen el alto costo y el tiempo requerido para el procesamiento de cada muestra (65).

## **1.5. Situación nacional y local de la resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii***

El porcentaje de resistencia a los carbapenémicos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en Colombia ha aumentado de forma significativa entre los años 2009-2012 (70). Para *P. aeruginosa* los porcentajes de resistencia a imipenem y meropenem para el año 2012 fueron del 34.5% y 30.5%, mientras que para *A.*

*baumannii* estos porcentajes de resistencia fueron del 37.1% y del 98.8%, respectivamente, en unidades de cuidado intensivo (70).

Sumado a los altos porcentajes de resistencia a los carbapenémicos, Colombia ha sido considerada como un país endémico para la carbapenemasa KPC, al igual que países como Israel y Estados Unidos (71) (Figura 5). En el país se ha reportado esta carbapenemasa no solo en *Klebsiella pneumoniae*, sino que también se realizó el primer reporte mundial de *P. aeruginosa* portando KPC en el año 2007, en un aislamiento de la ciudad de Medellín, seguido de reportes en Trinidad y Tobago, Puerto Rico y Argentina (34-37).



**Figura 5.** Diseminación global de la carbapenemasa KPC (Tomado de Muñoz L.S et al.

Lancet Infect Dis. 2013)

Con relación a la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas, en *P. aeruginosa* han sido reportadas las variantes VIM-2 y VIM-8, la primera de ellas detectada en diferentes instituciones ubicadas en seis ciudades de Colombia, mientras que la segunda solo fue detectada en la ciudad de Cali en un centro de alto nivel de complejidad, durante un brote en el 2003 (72, 73). En el país, también fue realizado el primer reporte mundial de un aislamiento de *P. aeruginosa* portando simultáneamente KPC y VIM en un paciente con una infección intra-abdominal, evidenciando la capacidad de diseminación de estas enzimas (74).

En cuanto a *A. baumannii*, se ha implicado la carbapenemasa OXA-23 como el mecanismo responsable de la resistencia a carbapenémicos en los aislamientos que circulan en el país, mecanismo reportado en otros países latinoamericanos como Argentina y Colombia (58, 75, 76) (Tabla 2). Aunque menos frecuente, se ha informado reporte de casos de la variante OXA-72, perteneciente al grupo OXA-24-like y del grupo OXA-58 (77) (75).

**Tabla 2.** Oxacilinasas reportadas en aislamientos de *A. baumannii* en Suramérica.

Adaptado de Opazo A, et al. J Infect Dev Ctries. 2012)

Grupo	Países	Ubicación genética
OXA-51	Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Venezuela	Cromosómica
OXA-23	Argentina, Colombia, Brasil	Cromosómica, plasmídica
OXA-40	Brasil, Chile	Plasmídica
OXA-58	Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Bolivia, Venezuela	Plasmídica
OXA-143	Brasil	Plasmídica

En Medellín el Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín (GERMEN) reportó para el año 2013 una resistencia a carbapenémicos cercana a 30% para *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, siendo esta frecuencia mayor en aislamientos provenientes de UCI, similar a los reportado a nivel nacional (4). En la ciudad se ha encontrado las carbapenemasas KPC y VIM en *P. aeruginosa*, así como la OXA-23 en *A. baumannii* (38, 58). Sin embargo, el conocimiento de las carbapenemasas que circulan en Medellín es derivado de estudios realizados con muestras provenientes de hospitales de todo el país y por lo tanto solo fueron incluidos algunos aislamientos bacterianos de la ciudad. Dado que la epidemiología varía dependiendo de cada lugar y a la alta frecuencia de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, es de gran relevancia conocer cuál es el comportamiento de estas infecciones en Medellín, a partir de la caracterización molecular de los genes de resistencia, de los perfiles genéticos de los aislamientos que se encuentran circulando en la ciudad, así como la que manera en que varían o influyen estas características en la epidemiología de las infecciones ocasionadas por estas bacterias.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son bacterias oportunistas de gran importancia en el ambiente hospitalario que afectan a pacientes inmunocomprometidos o gravemente enfermos causando una amplia variedad de cuadros clínicos como neumonía, infecciones de tracto urinario, infecciones de sitio operatorio y bacteriemias (1-4). Así mismo, estas bacterias han desarrollado resistencia a diferentes grupos de antibióticos como cefalosporinas, quinolonas, aminoglucósidos y polimixinas complicando el manejo de las infecciones que ocasionan (1).

Los carbapenémicos son el tratamiento de elección en infecciones ocasionadas por cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes (78), pero estos microorganismos han desarrollado resistencia a este grupo de antibióticos y se han diseminado a alrededor del mundo (79-81). La resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos está mediada principalmente por la producción de carbapenemasas que logran hidrolizar el antibiótico disminuyendo su acción (11,12). Sin embargo, en *P. aeruginosa*, hay una diversidad de mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos, que incluyen sobreexpresión de *AmpC*, bombas de eflujo, pérdida de porinas y producción de carbapenemasas (13,14). Lo más preocupante es que muchos de los genes que codifican para las carbapenemasas están asociados a elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones que son fácilmente transmisibles de una bacteria a otra, lo que favorece la diseminación de estos mecanismos de resistencia (82, 83).

La emergencia de la resistencia a carbapenémicos no sólo limita el uso de terapias efectivas (84), sino que la utilización de tratamientos empíricos inapropiados ejerce una presión selectiva que conlleva a la eliminación de bacterias sensibles y favorece el crecimiento y diseminación de patógenos resistentes (79, 85); lo que empeora aún más el problema. Lo anterior conduce a que las infecciones ocasionadas por este tipo de bacterias se asocien con períodos de hospitalización prolongados, mayores costos económicos y altas tasas de mortalidad que las producidas por las no resistentes (79, 85).

Adicionalmente, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* son bacterias fácilmente introducidas al ambiente hospitalario por pacientes colonizados y de allí pueden permanecer por largos períodos de tiempo transmitiéndose a otros pacientes, al personal de la salud e incluso invadiendo superficies inanimadas como cortinas, muebles y equipos médicos (10, 19, 86, 87).

En Colombia, los porcentajes de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* han aumentado de forma significativa, alcanzando hasta el 98.8% de resistencia a meropenem en el caso de *A. baumannii* en unidades de cuidados intensivos (70). En el país se ha reportado la presencia de las carbapenemasas presentes en estas bacterias, tales como las variantes KPC-2 y metalo- $\beta$ -lactamasas tipo VIM en aislamientos de *P. aeruginosa* (34, 88); y la presencia de las carbapenemasas OXA-23, OXA-24, OXA-58 y OXA-51 en *A. baumannii* (58, 89).

Sin embargo, en Medellín a pesar de que los porcentajes de resistencia los carbapenémicos oscilan entre 25% y 35% para ambas bacterias (3, 4), la

vigilancia epidemiológica de la resistencia a los carbapenémicos solo ha sido realizada con base en estos porcentajes y se conoce poco sobre las carbapenemasas presentes en los aislamientos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* y los clones que circulan en los hospitales de la ciudad. Además, no se conoce las características clínicas de los pacientes que sufren de las infecciones ocasionadas por estas bacterias.

Aunque los perfiles de sensibilidad bacteriana aportan información relevante para la vigilancia epidemiológica de las bacterias resistentes, existe un sesgo en la caracterización fenotípica de la resistencia en los aislamientos clínicos, debido a la dificultad para detectar algunos mecanismos como la producción carbapenemasas (90, 91). Lo anterior es debido a (i) la presencia de patrones de resistencia variable, puesto que la producción de estas enzimas por sí sola no confiere resistencia total a  $\beta$ -lactámicos, (ii) la baja sensibilidad de detección por métodos automatizados y (iii) la notable variación en la detección de estas enzimas si el procedimiento no se realiza correctamente (90, 91). Además, no hay métodos fenotípicos estandarizados por el CLSI (del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) que puedan ser usados para confirmar la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Tampoco pueden ser detectados otros mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos como las bombas de expulsión y la pérdida de porinas, por los métodos fenotípicos de rutina (30). Por esto, es de gran relevancia mejorar la detección de la resistencia antimicrobiana a través de la utilización de nuevas herramientas diagnósticas, como las técnicas basadas en biología molecular.

El desarrollo e implementación de metodologías basadas en biología molecular, aportan mayor información a los programas de vigilancia, ya que trascienden el diagnóstico clásico del laboratorio, presentan una mejor sensibilidad y poder discriminatorio frente a las pruebas fenotípicas convencionales y permiten establecer con mayor precisión, las relaciones entre los microorganismos y el grado de similitud genética entre el agente infeccioso y la fuente de infección. La caracterización a nivel molecular permite tener información detallada sobre el comportamiento y la evolución de microorganismos de importancia en salud pública (92).

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo general:

Describir las características clínicas y moleculares de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de la ciudad de Medellín, durante el período comprendido entre junio de 2012 y junio de 2014.

#### 3.2. Objetivos específicos:

1. Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes con infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.
2. Detectar la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* utilizando técnicas fenotípicas y moleculares.
3. Determinar los clones circulantes y el grado de relación genética de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.
4. Explorar la asociación entre la tipificación molecular y las características clínicas evaluadas.

## 4. METODOLOGÍA

---

### 4.1. Tipo de estudio

Descriptivo transversal

### 4.2. Población de estudio

En el diseño del estudio se incluyeron cinco instituciones de alto nivel de complejidad de Medellín:

- IPS Universitaria Clínica León XIII (754 camas).
- Hospital Universitario San Vicente Fundación (HUSVF) (700 camas).
- Clínica El Rosario (300 camas).
- Hospital Pablo Tobón Uribe (HPTU) (286 camas).
- Clínica Cardiovascular, Congregación Mariana (CC) (140 camas).

La población de referencia fue conformada por pacientes adultos y pediátricos hospitalizados con infección por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en los diferentes servicios de las cinco instituciones mencionadas, durante los años 2012-2014. De acuerdo con los criterios de las cinco instituciones participantes en el estudio, los pacientes pediátricos se definieron como: menores de 14 años y los pacientes adultos: iguales o mayores a 14 años.

### **4.3. Criterios de inclusión y exclusión**

En el estudio fueron incluidos los pacientes que presentaran diagnóstico de infección por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con resistencia intermedia o total a carbapenémicos, de acuerdo con los lineamientos de CLSI 2012 (93). De esta forma, se incluyeron los pacientes con infección por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con una concentración inhibitoria mínima  $\geq 8\mu\text{g/mL}$  y  $\geq 4\mu\text{g/mL}$  para imipenem y meropenem, respectivamente.

Fueron excluidos aquellos pacientes cuyas historias clínicas no pudieron ser recuperadas. Solo fue incluido el primer aislamiento de *P. aeruginosa* o *A. baumannii* por cada paciente, con el fin de evitar la presencia de registros repetidos, excepto que correspondieran a infecciones mixtas por estas bacterias.

### **4.4. Tamaño de la muestra**

No se realizó cálculo del tamaño muestral, se seleccionaron todos los pacientes con infección por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos según los criterios de inclusión en cada una de las instituciones hospitalarias durante el período de estudio.

### **4.5 Información clínica y epidemiológica**

La información clínica y epidemiológica fue recolectada por medio de la revisión de historias clínicas de cada paciente a través del diligenciamiento de un formulario diseñado para tal fin (ANEXO 1). La información incluyó datos socio-demográficos, colonización previa, uso de antibióticos, estancia en UCI, tipo de infección, comorbilidades, tratamiento y desenlaces. Las infecciones fueron clasificados en

asociadas a la comunidad o asociadas a la atención en salud de acuerdo con las definiciones epidemiológicas establecidas por el CDC (del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*) (100).

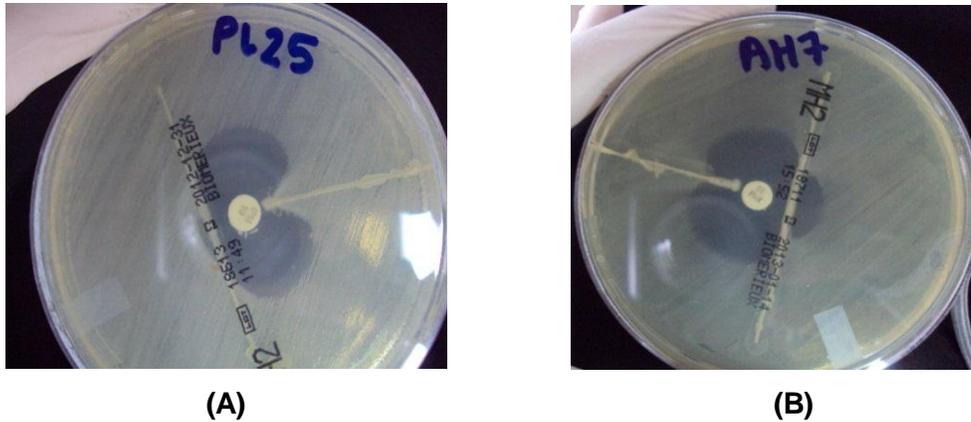
#### **4.6. Identificación bacteriana y pruebas de sensibilidad**

La identificación de los aislamientos bacterianos y las pruebas de sensibilidad fueron realizadas por personal calificado del laboratorio clínico de cada institución participante, de acuerdo con los protocolos para el diagnóstico *P. aeruginosa* y *A. baumannii* establecidos, utilizando el sistema Vitek® (bioMérieux Clinical Diagnostics).

Los aislamientos seleccionados fueron transportados al Laboratorio Central de Investigaciones de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, en un medio de transporte Amies con carbón activado, para la realización de pruebas fenotípicas y moleculares. Cada aislamiento fue conservado por duplicado mediante el método de criopresevación a -70°C en caldo de enriquecimiento BHI con glicerol al 15%.

#### **4.7. Detección fenotípica de carbapenemasas**

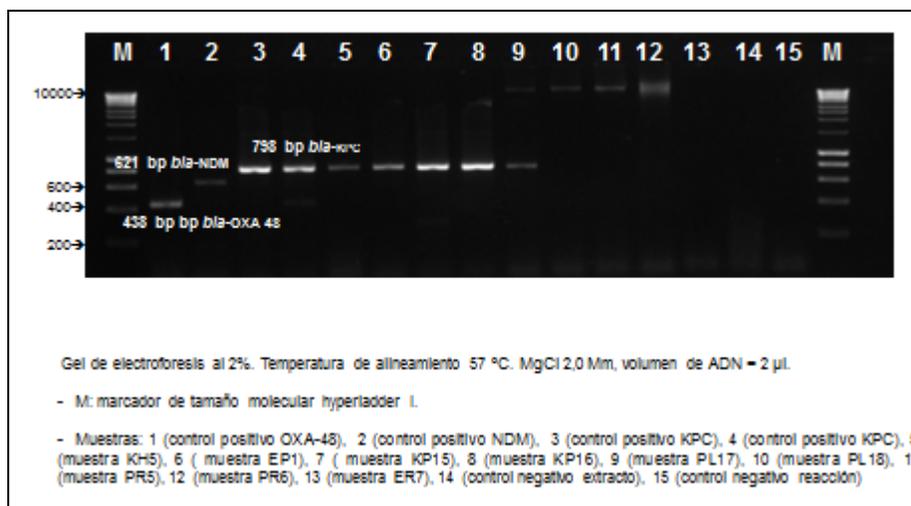
La detección fenotípica de carbapenemasas fue realizada mediante una modificación del test tridimensional en agar (94). En esta técnica se obtuvieron los lisados bacterianos a través de lisis mecánica, realizando un pipeteo continuo de mínimo 60 veces y centrifugando cada muestra a 14.000 rpm, durante 30 minutos (Figura 6).



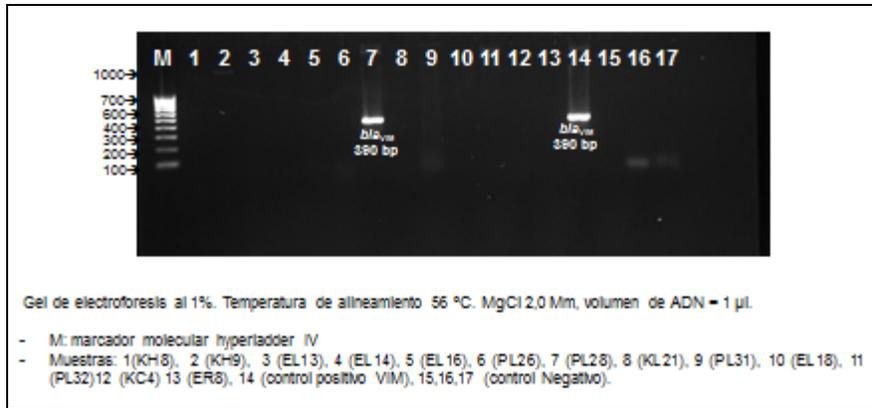
**Figura 6.** Resultado positivo del test tridimensional **A.** *P. aeruginosa*; **B.** *A.baumannii*

#### 4.8. Extracción de ADN y detección molecular de carbapenemasas

La extracción de ADN fue realizada utilizando el kit comercial DNA Wizard Genomic Purification kit (Promega, Madison, WI, USA). La detección de las carbapenemasas se realizó mediante una modificación del protocolo descrito por Poirel et al para la amplificación de los genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub> (95) (Figura 7 y 8).



**Figura 7.** Amplificación por PCR múltiple de los genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>



**Figura 8.** Amplificación por PCR del gen *bla<sub>VIM</sub>*

Por su parte, las carbapenemasas de clase D fueron detectadas mediante el protocolo reportado Woodford et al, el cual permite la detección simultánea de los genes *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-24-like</sub>*, *bla<sub>OXA-51-like</sub>* y *bla<sub>OXA-58-like</sub>* (96). En los aislamientos positivos para la PCR anterior, se realizó la detección de la secuencia de inserción *ISAb<sub>a-1</sub>*, siguiendo el protocolo descrito por Turton et al. (97) (Figura 9).



(A)

(B)

**Figura 9.** Amplificación de oxacilinasas. **A.** Amplificación por PCR múltiple para la detección de los genes *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-24-like</sub>*, *bla<sub>OXA-51-like</sub>* y *bla<sub>OXA-58-like</sub>*. **B.** Amplificación de la secuencia de inserción *ISAb<sub>a1</sub>*

#### **4.9. Secuenciación**

Los productos de amplificación de los aislamientos productores de las carbapenemasas KPC y VIM fueron enviados a la empresa MacroGen USA para su secuenciación (<http://www.macrogenusa.com/>). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron analizadas en sentido “forward” y “reverse” y posteriormente comparadas con las disponibles en el GeneBank, mediante el uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST ) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Adicionalmente, cada secuencia fue comparada con la base de datos Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>), con el fin de establecer la variante a la que corresponden los genes detectados.

#### **4.10. Tipificación molecular**

##### **4.10.1. Electroforesis en gel de campo pulsado**

La preparación de los plugs fue realizada de acuerdo con los protocolos de campo pulsado estandarizados en el laboratorio . Para la restricción se utilizó 30 U y 50 U de las enzimas de restricción *Apal* y *Spel*, para *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, respectivamente (Thermo Scientific, United States). El tiempo de incubación fue de 2 horas a 37°C, para ambas bacterias. Los patrones electroforéticos fueron normalizados utilizando el bacteriófago Lambda ladder PFGE marker (New England Biolabs, UK). Para el corrido electroforético se utilizó el sistema Chef-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), utilizando condiciones de corrido diferentes para cada bacteria (Tabla 3).

El grado de relación de los aislamientos fue analizado mediante el software BioNumerics versión 3.0 (Applied Maths), usando el coeficiente de similitud de Dice, tomando como punto de corte un porcentaje  $\geq 80\%$  para considerar aislamientos genéticamente relacionados. Los dendogramas fueron generados usando el logaritmo UPGMA (del inglés *Unweighted Pairs Geometric-Matched Analysis*), con 1% de tolerancia y 0,5% de optimización.

Parámetro de corrido	Bacteria	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Pulso inicial	2.2. segundos	1.0 segundos
Pulso final	63.8 segundos	50.0 segundos
Tiempo de corrido	21 horas	21 horas
Ángulo	120°	120°
Gradiente de voltaje	6 v/cm	6 v/cm
Temperatura	11.3 °C	11.3 °C

**Tabla 3.** Patrones de corrido en la electroforesis en gel de campo pulsado para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* usando el equipo CHEF DRIII

#### 4.10.2. Tipificación de secuencias multilocus

Esta técnica fue aplicada a un grupo de aislamientos representativos para cada bacteria, de acuerdo con los protocolos descritos por Curran et al y Bartual et al, para *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, respectivamente (98, 99). Los tipos de alelos y los tipos de secuencias (ST) fueron asignados usando la base <http://pubmlst.org/>.

#### **4.11. Plan de análisis**

El diligenciamiento de la información obtenida fue realizada en una base de datos en Microsoft Access, en la cual fue consignada tanto las características clínicas de cada paciente, así como los resultados de las pruebas fenotípicas y moleculares. Para el análisis estadístico se utilizó la distribución de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y la prueba de Chi-cuadrado de independencia o la prueba exacta de Fisher para explorar la posible relación entre ellas. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. El software utilizado fue el programa estadístico SPSS v17.0.

#### **4.12. Control de sesgos**

- Controles pruebas fenotípicas y moleculares: Se utilizaron controles positivos y negativos correspondientes a cepas de referencia y cepas productoras de carbapenemasas previamente reportadas, las cuales fueron donadas por el CIDEIM y por el Public Health Research Institute (PHRI), New Jersey, Estados Unidos. Cada prueba fue estandarizada según el protocolo descrito por cada autor utilizando tanto los controles positivos como los negativos (Tabla 4).

Controles	Pruebas de detección de carbapenemasas	
	Test tridimensional	PCR
Positivo		<i>A. baumannii</i> OXA-51 (+) / OXA-23 (+) (CIDEIM)
		<i>A. baumannii</i> ISAba1 (+) (CIDEIM)
	<i>P. aeruginosa</i> VIM (+) (CIDEIM)	<i>K. pneumoniae</i> KPC (+) (PHRI)
	<i>A. baumannii</i> OXA-51 (+) / OXA-23 (+) (CIDEIM)	<i>K. pneumoniae</i> NDM (+) (PHRI)
		<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 (+) (PHRI)
		<i>P. aeruginosa</i> VIM (+) (CIDEIM)
		<i>E. coli</i> NCTC 13476 IMP (+)
Negativo	<i>E. coli</i> ATCC 25922	

**Tabla 4.** Controles positivos utilizados en el test tridimensional y en los protocolos de PCR

- Definición de términos formulario de información clínica y epidemiológica: Con el fin de que la información fuera recolectada de forma estandarizada, se diseñó un formato con la definición de cada una de las variables incluidas en el formulario (ANEXO 2). Este formato fue revisado por el personal médico participante en el proyecto y fue socializado con todo los investigadores del estudio.
- Diligenciamiento de la base de datos en Microsoft Access: La base de datos fue diligenciada por una sola persona entrenada para este propósito, quien realizaba el control de la información semanalmente mediante la comparación de la información diligenciada con el formato diligenciado, con el fin de verificar el diligenciamiento correcto de la información y el conocimiento de los criterios de inclusión por parte de todos los coinvestigadores.

- Prueba piloto: Se realizó una prueba piloto de 15 días de duración, con el fin de solucionar inconvenientes que pudieran presentarse antes del inicio del proyecto, tales como problemas en la recolección, procesamiento de las muestras y en el diligenciamiento del formulario clínico-epidemiológico.

#### **4.13. Impacto ambiental**

La realización de este proyecto no tuvo ningún impacto directo sobre el medio ambiente, ya que no se trabajó con recursos naturales inherentes a él. Los desechos de materiales, reactivos y productos biológicos producto de los experimentos desarrollados durante el proyecto fueron eliminados de acuerdo con protocolos establecidos de desinfección y esterilización en los manuales de bioseguridad y los programas de gestión integral de residuos del laboratorio de investigación y del hospital donde se realizarán todas las pruebas.

#### **4.14. Consideraciones éticas**

En este estudio se contó con el debido consentimiento o asentimiento informado para los adultos y niños, respectivamente (ANEXO 3); conforme a lo reglamentado por la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social. Adicionalmente, se contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia (CBEIH-SIU, aprobación No 11-35-415) y del Comité de Ética de cada hospital participante.

## 5. RESULTADOS

---

### CAPÍTULO I: *Pseudomonas aeruginosa*

**Artículo Original: Aprobado y publicado en Journal of Clinical Microbiology**

Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, Del Corral H, Roncancio G, Sierra P, Echeverri L, Ospina S, Maldonado N, Robledo C, Restrepo A, Jiménez JN. Similar Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* Producing KPC and VIM Carbapenemases in Diverse Genetic Clones at Tertiary - Care Hospitals in Medellín, J Clin Microbiol. 2014; 52(11):3978-86

## Similar Frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing KPC and VIM Carbapenemases in Diverse Genetic Clones at Tertiary-Care Hospitals in Medellín, Colombia

Johanna M. Vanegas, Astrid V. Cienfuegos, Ana M. Ocampo, Lucelly López, Helena del Corral, Gustavo Roncancio, Patricia Sierra, Lina Echeverri-Toro, Sigifredo Ospina, Natalia Maldonado, Carlos Robledo, Andrea Restrepo and J. Natalia Jiménez

*J. Clin. Microbiol.* 2014, 52(11):3978. DOI: 10.1128/JCM.01879-14.

Published Ahead of Print 10 September 2014.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jcm.asm.org/content/52/11/3978>

---

	<i>These include:</i>
<b>REFERENCES</b>	This article cites 38 articles, 18 of which can be accessed free at: <a href="http://jcm.asm.org/content/52/11/3978#ref-list-1">http://jcm.asm.org/content/52/11/3978#ref-list-1</a>
<b>CONTENT ALERTS</b>	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), <a href="#">more»</a>

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

# Similar Frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing KPC and VIM Carbapenemases in Diverse Genetic Clones at Tertiary-Care Hospitals in Medellín, Colombia

Johanna M. Vanegas,<sup>a,b</sup> Astrid V. Cienfuegos,<sup>a,b</sup> Ana M. Ocampo,<sup>a,b</sup> Lucelly López,<sup>b</sup> Helena del Corral,<sup>b</sup> Gustavo Roncancio,<sup>c</sup> Patricia Sierra,<sup>d</sup> Lina Echeverri-Toro,<sup>e</sup> Sigifredo Ospina,<sup>e</sup> Natalia Maldonado,<sup>f</sup> Carlos Robledo,<sup>f</sup> Andrea Restrepo,<sup>g</sup> J. Natalia Jiménez<sup>a,b</sup>

Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana, Grupo de Microbiología Molecular, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia<sup>a</sup>; Grupo de Microbiología Básica y Aplicada, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia<sup>b</sup>; Clínica CardioVID, Medellín, Colombia<sup>c</sup>; IPS Universitaria Clínica León XIII, Medellín, Colombia<sup>d</sup>; Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia<sup>e</sup>; Clínica El Rosario, Medellín, Colombia<sup>f</sup>; Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia<sup>g</sup>

Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* has become a serious health threat worldwide due to the limited options available for its treatment. Understanding its epidemiology contributes to the control of antibiotic resistance. The aim of this study was to describe the clinical and molecular characteristics of infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates in five tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. A cross-sectional study was conducted in five tertiary-care hospitals from June 2012 to March 2014. All hospitalized patients infected by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were included. Clinical information was obtained from medical records. Molecular analyses included PCR for detection of *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, and *bla*<sub>KPC</sub> genes plus pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) for molecular typing. A total of 235 patients were enrolled: 91.1% of them were adults ( $n = 214$ ), 88.1% ( $n = 207$ ) had prior antibiotic use, and 14.9% ( $n = 35$ ) had urinary tract infections. The *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>KPC-2</sub> genes were detected in 13.6% ( $n = 32$ ) and 11.5% ( $n = 27$ ), respectively, of all isolates. Two isolates harbored both genes simultaneously. For KPC-producing isolates, PFGE revealed closely related strains within each hospital, and sequence types (STs) ST362 and ST235 and two new STs were found by MLST. With PFGE, VIM-producing isolates appeared highly diverse, and MLST revealed ST111 in four hospitals and five new STs. These results show that KPC-producing *P. aeruginosa* is currently disseminating rapidly and occurring at a frequency similar to that of VIM-producing *P. aeruginosa* isolates (approximately 1:1 ratio) in Medellín, Colombia. Diverse genetic backgrounds among resistant strains suggest an excessive antibiotic pressure resulting in the selection of resistant strains.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that is responsible for a wide variety of clinical infections, including bacteremia, pneumonia, urinary tract infection, and skin infections (1). This microorganism is intrinsically resistant to a variety of antimicrobials and is capable of developing resistance to almost any available antimicrobial compound (2). Carbapenems have been considered the last option for treating infections due to multidrug-resistant *P. aeruginosa*, because of their broad spectrum of antibacterial activity and their stability against hydrolysis by most  $\beta$ -lactamases. However, the emergence and spread of carbapenem resistance have limited their therapeutic efficacy (3–5). *Pseudomonas aeruginosa* bacteria possess several mechanisms that are involved in carbapenem resistance, such as overexpression of the MexAB-OprM efflux system and chromosomal AmpC, deficient expression of the outer membrane porin OprD, and acquired carbapenemases (6, 7). Ambler class B  $\beta$ -lactamases, such as VIM and IMP, are the most frequent carbapenemases involved in *P. aeruginosa* carbapenem resistance, while Ambler class A carbapenemases, such as KPC, frequently reported in *Enterobacteriaceae*, have started to be detected in *P. aeruginosa* isolates (8). In 2007, the presence of KPC was first reported in *P. aeruginosa* in Colombia, a country where KPC is endemic, and it has been reported subsequently in other countries from the Americas, such as Trinidad and Tobago, Argentina, and the United States, including Puerto Rico (8–12). Recently, an increasing frequency of KPC-producing *P. aeruginosa* isolates has been reported in hospitals from several Colombian cities, including Medellín (13, 14). To contribute to the understanding of the epidemiology of carbap-

enem-resistant *P. aeruginosa*, the aim of this study was to describe the clinical characteristics of patients infected by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and characterize the carbapenemases and the predominant resistant clones circulating in five tertiary-care hospitals within Medellín, Colombia.

## MATERIALS AND METHODS

**Study population.** A cross-sectional study was conducted at five tertiary-care hospitals located in Medellín from June 2012 to March 2014. Hospitals A and B are large university hospitals of 662 and 700 beds, respectively. Hospitals C and D are medium-size tertiary-care centers of 286 and 300 beds, respectively, and hospital E is a 140-bed cardiology hospital. These five institutions are located in Medellín, Colombia's second-largest city. All patients infected by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* during the study period were included, and molecular analyses were performed on the first bacterial isolate recovered during hospitalization. The study protocol was approved by the Bioethics Committee for Human Research at Universidad de Antioquia (CBEIH-SIU) (approval no. 11-35-415), as well

Received 2 July 2014 Returned for modification 11 August 2014

Accepted 1 September 2014

Published ahead of print 10 September 2014

Editor: K. C. Carroll

Address correspondence to J. Natalia Jiménez, nataliajimede@gmail.com.

J.M.V. and A.V.C. contributed equally to the work.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.01879-14

as by the research ethics committees from each of the other participating institutions.

**Clinical and epidemiological data.** Clinical and epidemiological information was obtained from medical records for each patient. The information included sociodemographic characteristics, prior colonization, antimicrobial use, intensive care unit (ICU) stay, type of infection, comorbidities, treatment, and outcomes, including therapeutic failure, cure, and death. Infections were classified as either community or health care associated according to the standard epidemiological definitions established by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (6).

**Bacterial strains and antibiotic susceptibilities.** *Pseudomonas aeruginosa* isolates intermediate or resistant to carbapenems according to CLSI 2012 cutoff points were selected (7). The identification of isolates and determination of their antibiotic susceptibilities were carried out with the automated Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The antibiotics tested for *P. aeruginosa* were piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, and colistin.

**Detection of carbapenemases.** The presence of carbapenemases was evaluated using a phenotypic screening assay that is a variation of the 3-dimensional test (15, 16) and PCR amplification of the *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, and *bla*<sub>OXA-48</sub> genes, using previously described primers and conditions (17, 18). After PCR amplification, forward and reverse sequencing were performed. The sequences were compared with those available at GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) and the Lahey database (<http://www.lahey.org/Studies/>).

A comparison of the clinical characteristics and resistance profiles between carbapenemase- and noncarbapenemase-producing (CP and NCP, respectively) *P. aeruginosa* isolates was performed.

**Molecular typing.** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed using 50 U of SpeI restriction enzyme (Thermo Scientific, United States). DNA fragment patterns were normalized using the bacteriophage lambda ladder PFGE marker (New England BioLabs, United Kingdom). Electrophoresis was performed on a CHEF DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at 11°C for 21 h under the following conditions: initial switch time, 2.2 s; final switch time, 63.8 s; included angle, 120°; and voltage gradient, 6 V/cm. Cluster analysis was performed using the Dice coefficient with BioNumerics software version 6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Dendrograms were generated by the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA), with 1% tolerance and 0.5% optimization settings. A similarity cutoff of ≥80% was used to define genetically related strains.

Multilocus sequence typing (MLST) was performed using the methodology described by Curran et al. (19) on a subset of 41 isolates representing the most frequent PFGE patterns (17.4% of all isolates). Allele numbers and sequence types (STs) were assigned using the database maintained at <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

**Statistical analyses.** Comparisons of clinical, epidemiological, and molecular characteristics were carried out between CP and NCP isolates. Categorical variables were described using absolute and relative frequencies and compared using the chi-square test or Fisher's exact test. *P* values of ≤0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using the SPSS version 20.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

**Clinical and epidemiological characteristics.** A total of 235 patients infected by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in five hospitals that participated in the study were enrolled. The patients' demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1. The majority of patients with carbapenem-resistant *P. aeruginosa* infection were males (66.4%, *n* = 156), and most were adults (91.1%, *n* = 214). At the time of sample collection, 37.0% (*n* = 87) of patients were hospitalized in intensive care units (ICUs)

and were frequently attended by personnel with surgical (26.4%, *n* = 62) and internal medicine (23.4%, *n* = 55) specialties.

Ninety-eight percent of infections were classified as health care associated according to CDC criteria after individual assessment of cases. The most common sites of infections were urinary tract and intra-abdominal (14.9% for each, *n* = 35), followed by skin and soft tissue (13.6%, *n* = 32). The medical histories of patients revealed frequent use of antibiotics within the past 6 months (88.1%, *n* = 207), mainly carbapenems (45.1%, *n* = 106), piperacillin-tazobactam (43.0%, *n* = 101), and glycopeptides (32.8%, *n* = 77). Targeted therapy was mainly fluoroquinolones, followed by colistin and aminoglycosides (30.2, 29.4, and 28.9%, respectively). The main outcomes in the patients studied were cure (46.2%, *n* = 96), and death (27.9%, *n* = 58). Therapeutic failures were reported in only 1.9% (*n* = 4) of cases. When comparing clinical characteristics among CP and NCP *P. aeruginosa* isolates, significant differences were only found in relation to empirical therapy using glycopeptides (*P* = 0.029) and targeted therapy using carbapenems (*P* < 0.001), aminoglycosides (*P* = 0.002), fluoroquinolones (*P* < 0.001), and colistin (*P* < 0.001) (Table 1).

**Phenotypic and genotypic carbapenemase detection.** The 3-dimensional test was positive in 23.8% (*n* = 56) of the *P. aeruginosa* isolates collected; among these, *bla*<sub>KPC</sub> was detected by PCR in 48.2% (*n* = 27) and *bla*<sub>VIM</sub> in 44.6% (*n* = 25) of the isolates. Remarkably, two (3.6%) isolates coharboring *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> were detected in two different hospitals and two isolates were negative for carbapenemase-encoding genes upon evaluation by PCR (3.6%). As for isolates with negative results by the 3-dimensional test (76.2%, *n* = 179), seven (3.9%) harbored *bla*<sub>VIM</sub> and the remaining isolates were negative for the genes evaluated (96.1%, *n* = 172). In general, carbapenemases were detected by PCR in 26.0% (*n* = 61) of total isolates; *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, and *bla*<sub>KPC</sub> plus *bla*<sub>VIM</sub> were detected in 11.5% (*n* = 27), 13.6% (*n* = 32), and 0.8% (*n* = 2), respectively, of total isolates. The *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, and *bla*<sub>IMP</sub> genes were not detected. On the other hand, 74.0% (*n* = 174) of isolates were negative for all carbapenemase-encoding genes evaluated.

**Resistance profiles among carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates.** Of the total isolates, 86.1% (*n* = 192) and 80.3% (*n* = 188) were resistant to imipenem and meropenem, respectively. Almost half of the carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates had resistance to ceftazidime (48.7%, *n* = 114), cefepime (45.5%, *n* = 107), and ciprofloxacin (47.7%, *n* = 112). Additionally, 70.8% (*n* = 114) were resistant to piperacillin-tazobactam, 67.9% (*n* = 53) to aztreonam, 40.1% (*n* = 93) to gentamicin, and 30.2% (*n* = 71) to amikacin. Resistance to colistin was found in 5.7% (*n* = 12) of isolates.

When comparing resistance patterns according to carbapenemases detected by PCR, resistance was higher in CP than in NCP *P. aeruginosa* isolates for all antimicrobials evaluated, with significant differences for most of them (Fig. 1A). Likewise, CP isolates were frequently multiresistant or resistant to three or more antibiotic groups, the most frequent profile being resistance to meropenem, imipenem, cefepime, ceftazidime, gentamicin, amikacin, and ciprofloxacin (53.8%). In contrast, for NCP isolates, the most usual profile was resistance to meropenem and imipenem (25.5%), followed by resistance to imipenem only (13.7%) (Fig. 1B).

Piperacillin-tazobactam, aztreonam, and colistin were excluded from resistance profile analyses due to missing data. However, separate analyses showed that isolates resistant to mero-

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of patients infected by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*

Characteristic	No. (%) of isolates			P value <sup>a</sup>
	Total no.	Noncarbapenemase producing	Carbapenemase producing	
Gender				0.430
Female	79 (33.6)	61 (35.1)	18 (29.5)	
Male	156 (66.4)	113 (64.9)	43 (70.5)	
Age (yrs)				0.116
<15	21 (8.9)	18 (10.3)	3 (4.9)	
15–30	26 (11.1)	18 (10.3)	8 (13.1)	
31–55	71 (30.2)	58 (33.3)	13 (21.3)	
>55	117 (49.8)	80 (46.0)	37 (60.7)	
Patient type				0.201
Adult	214 (91.1)	156 (89.7)	58 (95.1)	
Pediatric	21 (8.9)	18 (10.3)	3 (4.9)	
Hospital stay (days)				0.680
≤7	18 (8.6)	14 (9.1)	4 (7.3)	
>7	191 (91.4)	140 (90.9)	51 (92.7)	
History of surgery in past yr	153 (65.1)	110 (63.2)	43 (70.5)	0.389
History in past 6 mo				
Hospitalization	155 (66.0)	111 (63.8)	44 (72.1)	0.345
Dialysis	35 (15.0)	26 (15.0)	9 (14.8)	0.959
Stay in ICU	101 (43.0)	73 (42.0)	28 (45.9)	0.534
Antimicrobial use in past 6 mo	207 (88.1)	155 (89.1)	52 (85.2)	0.055
Carbapenems	106 (45.1)	80 (46.0)	26 (42.6)	0.651
Piperacillin-tazobactam	101 (43.0)	78 (44.8)	23 (37.7)	0.334
Glycopeptides	77 (32.8)	58 (33.3)	19 (31.1)	0.754
Fluoroquinolones	53 (22.6)	37 (21.3)	16 (26.2)	0.425
Infection type				0.232
Health care associated	231 (98.3)	170 (97.7)	61 (100)	
Community associated	4 (1.7)	4 (2.3)	0	
Hospitalization in ICU at time of isolate	87 (37.0)	62 (35.6)	25 (41.0)	0.456
Specialties				0.418
Surgery	62 (26.4)	46 (26.4)	16 (26.2)	
Internal medicine	55 (23.4)	33 (19.0)	22 (36.1)	
Intensive care	34 (14.5)	29 (16.7)	5 (8.2)	
Orthopedics	30 (12.8)	22 (12.6)	8 (13.1)	
Pediatrics	15 (6.4)	13 (7.5)	2 (3.3)	
Nephrology	11 (4.7)	9 (5.2)	2 (3.3)	
Other <sup>b</sup>	28 (11.9)	22 (12.6)	6 (9.8)	
Comorbidities	221 (94.0)	166 (95.4)	55 (90.2)	0.137
Trauma	46 (19.6)	35 (20.1)	11 (18.0)	0.724
Diabetes mellitus	49 (20.9)	35 (20.1)	14 (23.0)	0.639
Chronic renal disease	45 (19.1)	31 (17.8)	14 (23.0)	0.380
Cardiovascular disease	65 (27.7)	50 (28.7)	15 (24.6)	0.533
Cancer	26 (11.1)	22 (12.6)	4 (6.6)	0.192
Infection site				0.235
UTI <sup>c</sup>	35 (14.9)	25 (14.4)	10 (16.4)	
Catheter-associated UTI	24 (10.2)	14 (8.0)	10 (16.4)	
Intra-abdominal	35 (14.9)	27 (15.5)	8 (13.1)	
Skin and soft tissue	32 (13.6)	24 (13.8)	8 (13.1)	
Bloodstream	12 (5.1)	10 (5.7)	2 (3.3)	
Catheter-related bloodstream	14 (6.0)	10 (5.7)	4 (6.6)	

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

Characteristic	No. (%) of isolates			P value <sup>a</sup>
	Total no.	Noncarbapenemase producing	Carbapenemase producing	
Pneumonia	14 (6.0)	10 (5.7)	4 (6.6)	
Ventilator-associated pneumonia	17 (7.2)	13 (7.5)	4 (6.6)	
Osteomyelitis	15 (6.4)	8 (4.6)	7 (11.5)	
Surgical site	11 (4.7)	11 (6.3)	0	
Empirical therapy				
Piperacilin-tazobactam	52 (22.1)	37 (21.3)	15 (24.6)	0.590
Carbapenem	95 (40.4)	71 (40.8)	24 (39.3)	0.841
Glycopeptides	34 (14.5)	20 (11.5)	14 (23.0)	<b>0.029</b>
1st-generation cephalosporin	4 (1.7)	4 (2.3)	0	0.232
2nd-generation cephalosporin	0	0	0	
3rd-generation cephalosporin	4 (1.7)	4 (2.3)	0	0.232
4th-generation cephalosporin	15 (6.4)	11 (6.3)	4 (6.6)	0.948
Targeted therapy				
Carbapenem	50 (21.3)	27 (15.5)	23 (37.7)	<b>&lt;0.001</b>
4th-generation cephalosporin	37 (15.7)	1 (0.6)	0	0.141
Aminoglycosides	68 (28.9)	60 (34.6)	8 (13.1)	<b>0.002</b>
Fluoroquinolones	71 (30.3)	65 (37.8)	6 (9.8)	<b>&lt;0.001</b>
Colistin	69 (29.4)	34 (19.5)	35 (57.4)	<b>&lt;0.001</b>
Outcome				
Cure	96 (46.2)	71 (46.4)	25 (45.5)	0.851
Death	58 (27.9)	40 (26.1)	18 (32.7)	
Therapeutic failure	4 (1.9)	3 (2.0)	1 (1.8)	

<sup>a</sup> Values showing significantly different results are in boldface.

<sup>b</sup> Urology, transplant, hematology, neurology, pulmonology, vascular surgery, ophthalmology, and hepatobiliary.

<sup>c</sup> UTI, urinary tract infection.

penem plus imipenem and those resistant to imipenem only were frequently susceptible to those antibiotics (data not shown).

**Molecular typing.** The PFGE results revealed the presence of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains with different genetic backgrounds circulating in hospitals from Medellín. Notably, the PFGE results for *bla*<sub>KPC</sub>-harboring *P. aeruginosa* isolates showed a cluster in each hospital that included isolates that were indistinguishable or closely related (similarity index, 82 to 100%). Nevertheless, isolates from different hospitals were found to be unrelated (similarity index, <80%) (Fig. 2). MLST revealed *bla*<sub>KPC</sub>-harboring *P. aeruginosa* isolates belonging to ST235 in hospitals A and B, ST362 in hospital C, and ST870 in hospital E, as well as two new STs, ST1801 in hospitals C and D and ST1803 in hospital C (Fig. 2; Table 2). In contrast, *bla*<sub>VIM</sub>-harboring and NCP isolates showed high genotypic diversity by PFGE (Fig. 3A and B, respectively). The *bla*<sub>VIM</sub>-harboring isolates belonged mainly to the ST111 clone, and the NCP isolates belonged to six different STs, including the novel ST1802 and ST1804 and ST227 that is part of clonal complex (CC) CC235 (Fig. 3; Table 2).

## DISCUSSION

These results provide new evidence supporting the notion that the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is very dynamic and highly context specific. The present study integrated the clinical and molecular data simultaneously in order to improve our understanding of the emergence of carbapenem resistance.

Overall, VIM is the most frequent carbapenemase reported in

*P. aeruginosa* worldwide (20); however, in this study, isolates harboring KPC were similar in frequency to those harboring VIM. In fact, the detection of 27 isolates with *bla*<sub>KPC</sub> in five tertiary-care hospitals within almost 2 years suggests a rapid dissemination of KPC-producing *P. aeruginosa* in Medellín. Previous studies conducted in six Colombian cities, including Medellín, revealed the presence of only 10 KPC-producing isolates circulating throughout the country during 2006 to 2010 (21). Other studies performed in five and seven Colombian cities during 2012 and 2013 showed the emergence of KPC-producing isolates, with frequencies of 5.1% ( $n = 14$ ) and 16.4% ( $n = 9$ ) of KPC-producing *P. aeruginosa* among the isolates in the two studies (13, 14). The latter result suggests an increasing frequency of this carbapenemase, possibly present throughout the country. Additionally, two isolates harboring both KPC-2 and VIM-2 were observed, which had been reported before in our country (14, 22). The presence of *bla*<sub>KPC</sub> in *P. aeruginosa* and the increasing number of isolates harboring this enzyme throughout the country evidenced the capacity of dissemination of this gene outside the *Enterobacteriaceae* family.

Another significant finding was the close genetic relationship of strains within each hospital detected by PFGE in *bla*<sub>KPC</sub>-harboring *P. aeruginosa* isolates. This result suggests mainly intrahospital transmission of these isolates, rather than dissemination from one hospital to another. The dissemination of KPC in *P. aeruginosa* was linked to four clones: two of them were ST235 and ST362, which have been reported previously in other countries, and the other two were novel clones assigned in this study, ST1801

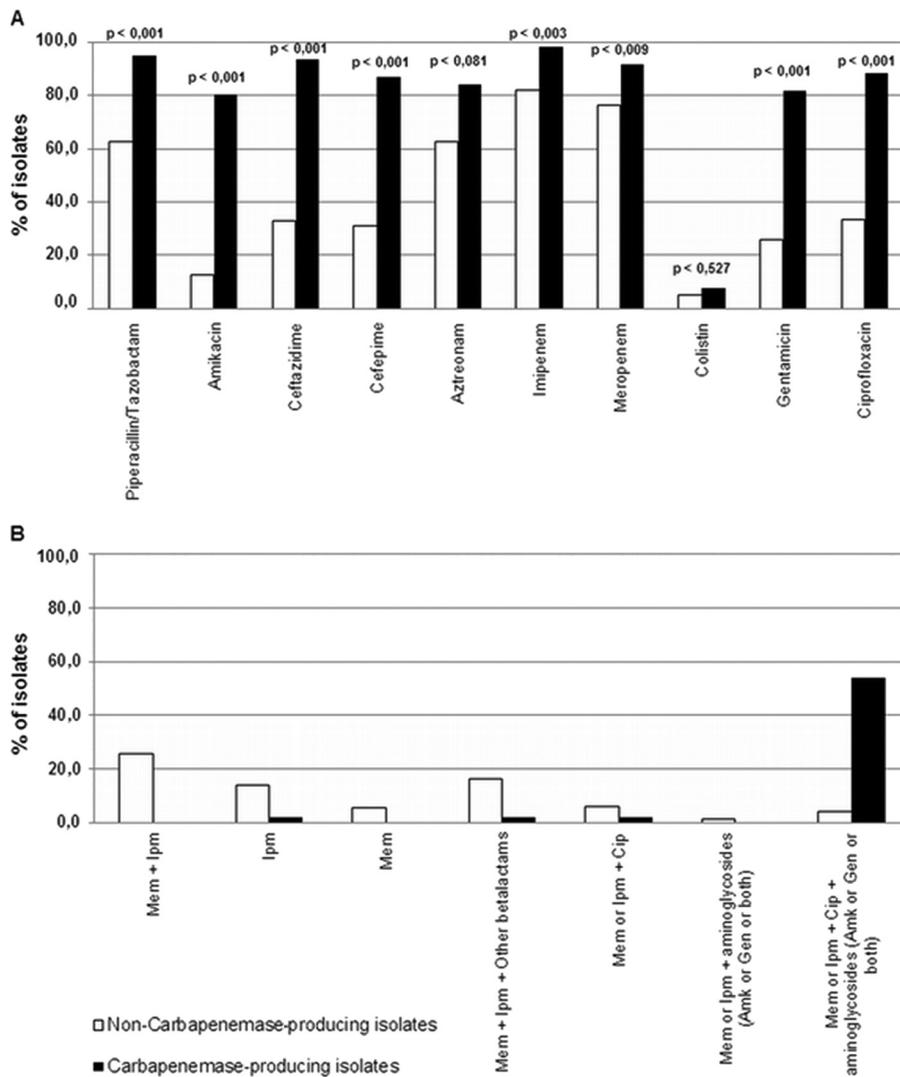


FIG 1 Rates of resistance among noncarbapenemase-producing and carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates. (A) Percentages of isolates resistant to individual antibiotics. (B) Resistance profiles of carbapenem-resistant isolates. Mem, meropenem; Ipm, imipenem; Cip, ciprofloxacin; Amk, amikacin; Gen, gentamicin.

and ST1803. ST235 is a major *P. aeruginosa* multidrug-resistant clone that is involved in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) (such as BEL, GES, and PER) and metallo- $\beta$ -lactamase (such as VIM, IMP, and NDM) dissemination in Europe and Asia (3, 23–25) and has also been involved in KPC-2 dissemination in two cities of Colombia, Cali and Pereira (21). Conversely, there is only one report on the ST362 clone (26). Although KPC-2 harboring *P. aeruginosa* has also been detected in Trinidad and Tobago, the United States, Puerto Rico, Brazil, Argentina, and China, the global spread of epidemic strains has been difficult to assess due to MLST not having been used in the majority of countries (8–12). Contrary to the situation in Colombia, where the emergence of KPC-2 producing isolates has been linked to several clones, mainly of ST235 but also of ST308, ST1006, and ST1060, in Argentina it seems that the spread of KPC-2 in five provinces occurred through the dissemination of one successful clone, ST654 (8, 27).

In addition, high genetic diversity according to PFGE and MLST was found in *bla*<sub>VIM</sub> and noncarbapenemase-producing

isolates. The *bla*<sub>VIM</sub>-harboring isolates belonged mainly to ST111, a successful clone carrying metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes and the major *P. aeruginosa* epidemic strain throughout Europe (28). In Colombia, this ST has also been reported in an isolate harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>VIM-2</sub>, similar to one of the isolates harboring both genes found in this study (22). Previous studies in China and Spain have shown that clones of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* can emerge from diverse genetic backgrounds and that MLST diversity could actually be higher than detected (29, 30). In accordance with this, it appears that the population structure of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates in Colombia is also diverse, with several distinctive clones currently able to harbor KPC and VIM carbapenemases, mainly ST235 and ST111, respectively, but with the parallel emergence of other clones. These results suggest a high antibiotic selection pressure favoring the emergence of multiple clones and point to appropriate antibiotic use as one of the main strategies to halt the emergence of carbapenem resistance in *P. aeruginosa*.

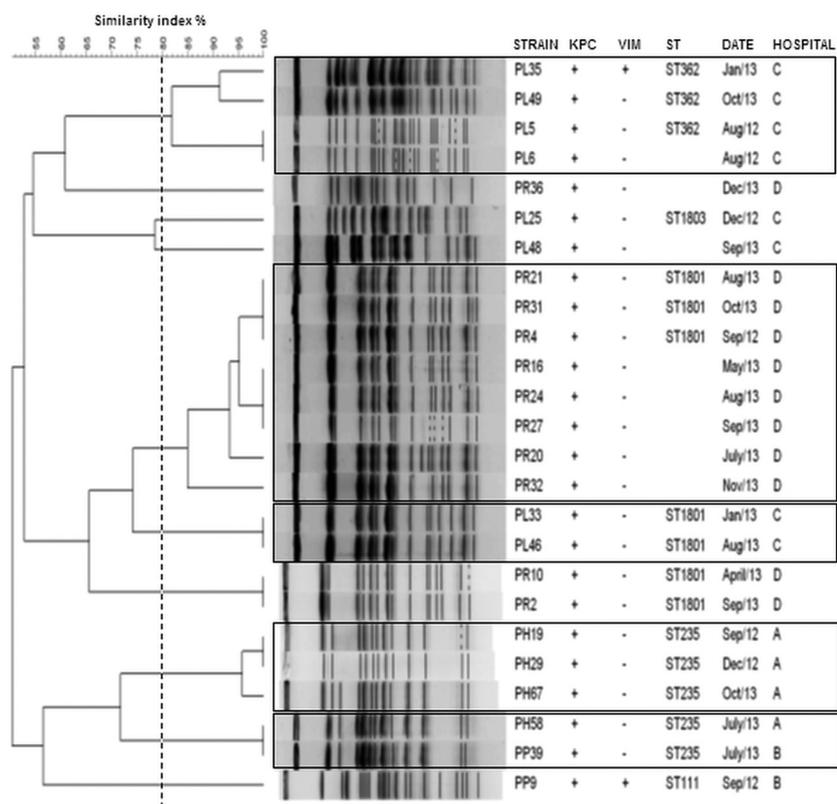


FIG 2 Genetic relatedness of KPC-producing *P. aeruginosa* isolates. The broken line corresponds to the cutoff level (80%) used to define PFGE clones as related. Boxes indicate the main clusters found at each hospital.

Regarding the clinical and epidemiological characteristics of the study population, the patients infected with carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were mostly adults (above 55 years old), with various underlying diseases, long hospital stays, and histories of

prior antibiotic use, which have been reported as risk factors for infection by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in health care settings (31–33). In this study, less than half of the patients were hospitalized in ICUs at the time the isolate was obtained; this highlights the importance of strengthening surveillance and preventive measures in these and other hospital wards. Although a modest percentage of mortality was found, this could not be attributed to carbapenem-resistant *P. aeruginosa* since the patients presented various underlying conditions.

TABLE 2 STs obtained by MLST of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates

Type of isolate	Hospital	ST	No. of isolates
<i>bla</i> <sub>KPC</sub> harboring	A	235	4
	B	235	1
	C	362, 1801, <sup>a</sup> 1803 <sup>a</sup>	2, 2, 1
	D	1801 <sup>a</sup>	6
	E	870	1
<i>bla</i> <sub>VIM</sub> harboring	A	111	3
	B	111, 856	1, 2
	C	111, 1800, <sup>a</sup> 1801 <sup>a</sup>	1, 1, 1
	D	1249, 1799 <sup>a</sup>	1, 1
	E	111	1
<i>bla</i> <sub>VIM</sub> and <i>bla</i> <sub>KPC</sub> harboring	B	111	1
	C	362	1
Noncarbapenemase producing	A	1798, <sup>a</sup> 1212	1, 1
	B	1802, <sup>a</sup> 1804 <sup>a</sup>	1, 1
	C	882, 1724	1, 1
	D	170, 155, 1123	1, 1, 1
	E	267, 260	1, 1

<sup>a</sup> Novel ST.

Interestingly, high percentages of prior antibiotic use, mainly carbapenems, were observed. Previous studies have shown that the use of agents with anti-*Pseudomonas* activity, such as meropenem and imipenem, is an independent risk factor associated with carbapenem- and multidrug-resistant *P. aeruginosa* (31, 34, 35). Meropenem and imipenem are used as empirical therapy for infections due to aerobic Gram-negative bacteria where coverage for *P. aeruginosa* is not necessary, and the lack of de-escalation of empirical therapy could lead to the elimination of susceptible colonizing microbiota, thus favoring the multiplication of carbapenem-resistant strains (36). Another antibiotic frequently used as empirical therapy in suspected *P. aeruginosa* infections is piperacillin-tazobactam; this antibiotic has also been associated with the emergence of carbapenem resistance in this pathogen (37, 38).

The multidrug resistance phenotype observed among carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates may be explained by the presence of several resistance genes in the same genetic elements harboring the carbapenemase genes, which limits the effective antimicrobial options (20). Conversely, resistance only to imipenem

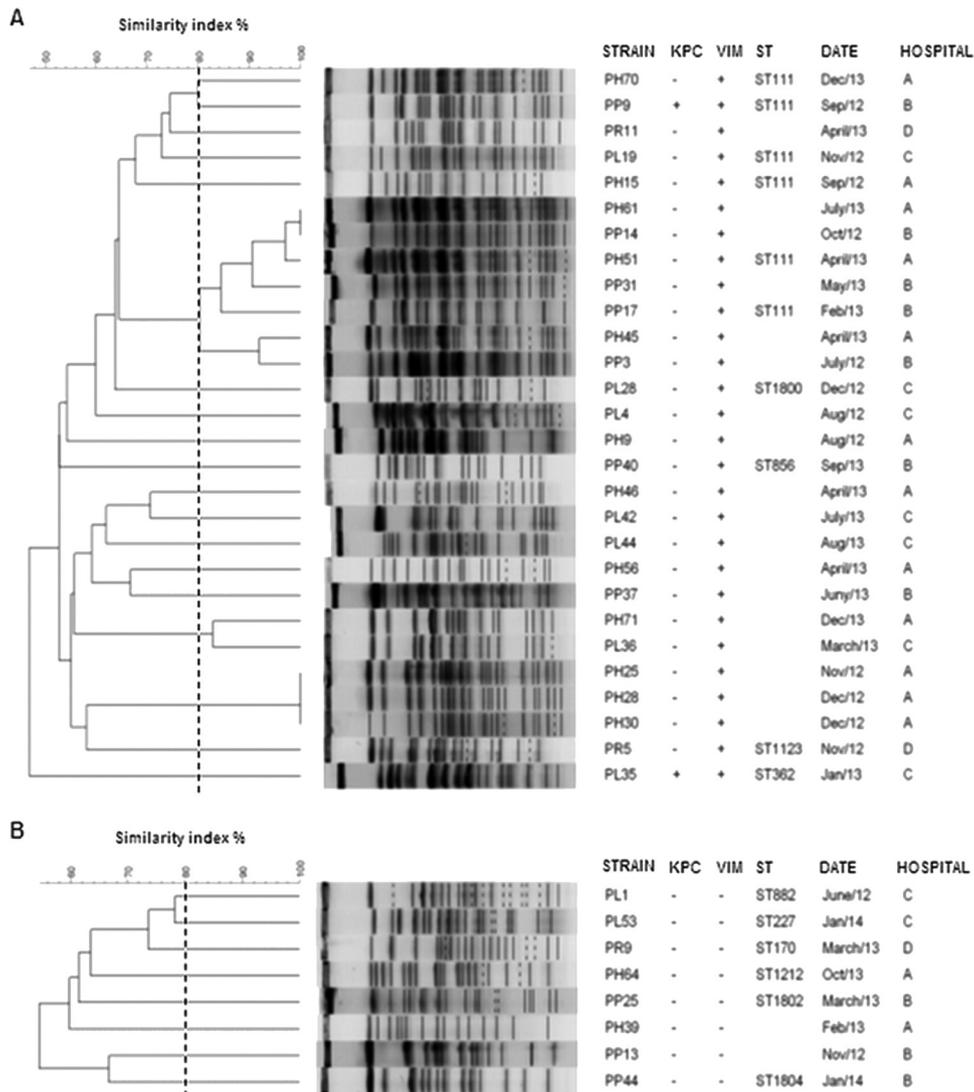


FIG 3 Genetic relatedness of VIM- and noncarbenemase-producing *P. aeruginosa* isolates. The broken line corresponds to the cutoff level (80%) used to define PFGE clones as related. (A) VIM-producing isolates. (B) Noncarbenemase-producing isolates.

or to meropenem plus imipenem occurred mainly in noncarbenemase-producing *P. aeruginosa* isolates, thus opening up the possibility for more therapeutic options; this is in agreement with the differences found in targeted therapy for infections caused by CP and NCP isolates.

The high frequency of isolates negative by the 3-dimensional test and PCR suggests that other mechanisms are responsible for carbenem resistance in this population. Alternative mechanisms could be overexpression of the MexAB-OprM efflux system and chromosomal AmpC or deficient expression of the outer membrane porin OprD, which have been previously reported (39, 40). Further studies comparing the clinical characteristics of patients infected with isolates with susceptible and resistant phenotypes could help to identify the main risk factors associated with carbenem resistance in *P. aeruginosa* in hospital settings in this middle-income country.

In conclusion, the increasing number of isolates harboring KPC found in a much shorter period of time than in previous

reports for the same country shows the importance of evaluating the presence of this carbenemase in *P. aeruginosa* as well as in *Enterobacteriaceae*. In addition, the emergence of several clones of carbenem-resistant *P. aeruginosa* suggests that excessive drug pressure is likely to be giving rise to selection of resistant phenotypes. This underscores the need to design and implement control strategies based on rational antibiotic use.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grant 111554531404 from the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) and grant CIMB-068-12 from the Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI).

**REFERENCES**

1. Thomson JM, Bonomo RA. 2005. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr. Opin. Microbiol.* 8:518–524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.014>.
2. Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C,

- Cantón R, Oliver A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2022–2027. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr232>.
3. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:736–755. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
  4. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, Rijnsburger MC, Savelkoul PH. 2010. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36:114–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.017>.
  5. Jimeno A, Alcalde MM, Blazquez A. 2011. Epidemic outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant producing metallo-beta-lactamase. *Rev. Clin. Esp.* 211:187–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2010.12.006>.
  6. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. 2008. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control* 36:309–332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2008.03.002>.
  7. CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22nd informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  8. Pasteran F, Faccione D, Gomez S, De Bunder S, Spinelli F, Rapoport M, Petroni A, Galas M, Corso A, *Pseudomonas aeruginosa* KPC Group. 2012. Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1291–1293. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks032>.
  9. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre MC, Quinn JP, Villegas MV. 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J. Clin. Microbiol.* 47:2670–2671. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00362-09>.
  10. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. 2011. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2968–2970. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01633-10>.
  11. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. 2010. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3072. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00513-10>.
  12. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1553–1555. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01405-06>.
  13. Pacheco R, Osorio L, Correa AM, Villegas MV. 2014. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en hospitales de Colombia. *Biomedica* 34(Suppl 1):81–90. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1642>.
  14. Saavedra S, Duarte C, González MN, Realpe ME. 2014. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemas en siete departamentos de Colombia. *Biomedica* 34(Suppl 1):217–223. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>.
  15. Correa A, Guzmán AM, Reyes SL, Ospina D, Torres JA, Tafur JD, Quinn JP, Villegas MV. 2008. Evaluation of the three-dimensional (3D) test as a screening tool for the detection of carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and *Acinetobacter baumannii* (Ab), abstr D-290. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC)-Infect. Dis. Soc. Am. (IDSA) 46th Annu. Meet. American Society for Microbiology and Infectious Diseases Society of America, Washington, DC.
  16. Thomson KS, Mejlo ZA, Pearce GN, Regan TJ. 1984. 3-Dimensional susceptibility testing of beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 13:45–54. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/13.1.45>.
  17. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:321–322. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl481>.
  18. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70:119–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>.
  19. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 42:5644–5649. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
  20. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:440–458. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.
  21. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. 2011. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5350–5353. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00297-11>.
  22. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, Ruiz SJ, Recalde M, Rosso F, Quinn JP, Villegas MV. 2012. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate cohabiting KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5422–5423. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00695-12>.
  23. Lee JY, Peck KR, Ko KS. 2013. Selective advantages of two major clones of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates (CC235 and CC641) from Korea: antimicrobial resistance, virulence and biofilm-forming activity. *J. Med. Microbiol.* 62:1015–1024. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.055426-0>.
  24. Cho HH, Kwon KC, Sung JY, Koo SH. 2013. Prevalence and genetic analysis of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a hospital in Korea, 2008–2012. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 43:414–419.
  25. Carattoli A, Fortini D, Galetti R, Garcia-Fernandez A, Nardi G, Orazi D, Capone A, Majolino I, Proia A, Mariani B, Parisi G, Morrone A, Petrosillo N. 2013. Isolation of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type ST235 from a stem cell transplant patient in Italy, May 2013. *Euro Surveill.* 18(46):pii=20633.
  26. Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y. 2014. Genotypic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infection. *J. Infect. Chemother.* 20:407–411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.02.007>.
  27. Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, Gutkind G, Radice M. 2012. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 12:2003–2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.022>.
  28. Witney AA, Gould KA, Pope CF, Bolt F, Stoker NG, Cubbon MD, Bradley CR, Fraise A, Breathnach AS, Butcher PD, Planche TD, Hinds J. 14 January 2014. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12528>.
  29. Ji J, Wang J, Zhou Z, Wang H, Jiang Y, Yu Y. 2013. Multilocus sequence typing reveals genetic diversity of carbapenem- or ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5697–5700. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00970-13>.
  30. Gomila M, Del Carmen Gallegos M, Fernandez-Baca V, Pareja A, Pascual M, Diaz-Antolin P, Garcia-Valdes E, Lalucat J. 2013. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol.* 13:138. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-138>.
  31. Voor IN 't Holt AF, Severin JA, Lesaffre EM, Vos MC. 2014. A systematic review and meta-analyses show that carbapenem use and medical devices are the leading risk factors for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:2626–2637. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01758-13>.
  32. Kim T, Chong YP, Park SY, Jeon MH, Choo EJ, Chung JW, Lee HK, Moon C, Kim DM, Peck KR, Kim YS. 2014. Risk factors for hospital-acquired pneumonia caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in critically ill patients: a multicenter study in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78:457–461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.011>.
  33. Zhang JF, Chen BL, Xin XY, Zhao HB, Wang HY, Song H, Xu ZK. 2009. Carbapenem resistance mechanism and risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a University Hospital in Xi'an, China. *Microb. Drug Resist.* 15:41–45. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2009.0875>.
  34. Nakamura A, Miyake K, Misawa S, Kuno Y, Horii T, Kondo S, Tabe Y, Ohsaka A. 2013. Meropenem as predictive risk factor for isolation of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.* 83:153–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.10.005>.
  35. McDougall DA, Morton AP, Playford EG. 2013. Association of ertapenem and antipseudomonal carbapenem usage and carbapenem resis-

- tance in *Pseudomonas aeruginosa* among 12 hospitals in Queensland, Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:457–460. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks385>.
36. Nicolau DP, Carmeli Y, Crank CW, Goff DA, Graber CJ, Lima AL, Goldstein EJ. 2012. Carbapenem stewardship: does ertapenem affect *Pseudomonas* susceptibility to other carbapenems? A review of the evidence. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:11–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.08.018>.
37. Onguru P, Erbay A, Bodur H, Baran G, Akinci E, Balaban N, Cevik MA. 2008. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for nosocomial infections. *J. Korean Med. Sci.* 23:982–987. <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2008.23.6.982>.
38. Furtado GH, Gales AC, Perdiz LB, Santos AE, Wey SB, Medeiros EA. 2010. Risk factors for hospital-acquired pneumonia caused by imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Anaesth. Intensive Care* 38:994–1001.
39. Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2010. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2219–2224. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00816-09>.
40. Lee JY, Ko KS. 2012. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40:168–172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.004>.

## CAPÍTULO II: *Acinetobacter baumannii*

### Artículo Original: Sometido revista Biomédica

Johanna M. Vanegas, Luis F. Higueta, Carlos Vargas, A. Vanessa Cienfuegos, Erika Rodríguez, Gustavo E. Roncancio, J. Natalia Jiménez. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos causando osteomielitis e infecciones en piel y tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia.

De: "Revista Biomédica" <[editor@revistabiomedica.org](mailto:editor@revistabiomedica.org)>  
Fecha: 9 de octubre de 2014 11:16:18 a.m. GMT-5  
Para: "Judy Natalia Jiménez Quiceno" <[nataliajiudea@gmail.com](mailto:nataliajiudea@gmail.com)>  
Asunto: [biomedica] Envío recibido

Judy Natalia Jiménez Quiceno: Gracias por enviarnos su manuscrito  
"Acinetobacter baumannii RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS CAUSANDO OSTEOMIELITIS E INFECCIONES EN PIEL Y TEJIDOS BLANDOS EN HOSPITALES DE MEDELLÍN, COLOMBIA" a Biomédica. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista: URL del manuscrito: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/author/submission/2572>  
Nombre de usuario/o: judynatalia99 Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo. Revista Biomédica  
Biomédica  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
Avenida Calle 26 No. 51-20  
Apartado aéreo 80334 y 80080  
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.  
Correo: [biomedica@ins.gov.co](mailto:biomedica@ins.gov.co)  
URL: <http://www.revistabiomedica.gov.co>

***Acinetobacter baumannii* RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS CAUSANDO OSTEOMIELITIS E INFECCIONES EN PIEL Y TEJIDOS BLANDOS EN HOSPITALES DE MEDELLÍN, COLOMBIA**

**CARBAPENEM RESISTANT *Acinetobacter baumannii* CAUSING OSTEOMYELITIS AND SKIN AND SOFT TISSUE INFECTIONS IN HOSPITALS IN MEDELLÍN, COLOMBIA**

Johanna Marcela Vanegas<sup>1</sup>, Luis Felipe Higuera<sup>1</sup>, Carlos Vargas<sup>1</sup>, Astrid Vanessa Cienfuegos<sup>1</sup>, Erika Rodríguez<sup>1</sup>, Gustavo Eduardo Roncancio<sup>2</sup>, Judy Natalia Jiménez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Microbiología Molecular, Grupo de Microbiología Básica y Aplicada, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Clínica CardioVid. Medellín, Colombia

**\*Autor para correspondencia:** J. Natalia Jiménez. Correo electrónico: nataliajiudea@gmail.com. Dirección: Calle 67, # 53-108, bloque- 5, Escuela de Microbiología, oficina 5-135. Teléfono: 2195497

**Contribución de los autores:**

- Johanna M Vanegas, Erika Rodríguez, J. Natalia Jiménez, Vanessa Cienfuegos, Gustavo Roncancio: Diseño y realización de experimentos, recolección de datos, análisis de la información y elaboración del manuscrito.

- L. Felipe Higueta, Carlos Vargas: Recolección y análisis de la información y elaboración del manuscrito

## RESUMEN

**Introducción:** *Acinetobacter baumannii* es una bacteria oportunista que infecta a pacientes gravemente enfermos, asociándose principalmente con neumonía asociada a ventilador y bacteriemia. La emergencia de la resistencia a los carbapenémicos ha limitado las opciones terapéuticas para el manejo de las infecciones ocasionadas por esta bacteria.

**Objetivo:** Describir las características clínicas y moleculares de las infecciones ocasionadas por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en hospitales de Medellín.

**Materiales y métodos:** Durante un periodo de 2 años se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en cinco hospitales de Medellín. La información clínica fue obtenida a partir de la historia clínica. La presencia de carbapenemasas fue evaluada mediante test tridimensional y PCR. La tipificación molecular se realizó por medio de PFGE y MLST.

**Resultados:** Se incluyeron 32 pacientes, la mayoría de ellos con infecciones en piel y tejidos blandos (n=7, 21,9%) y osteomielitis (n=6, 18,7%). Los porcentajes de resistencia fueron superiores al 80% para todos los antibióticos evaluados, excepto colistina y tigecilina. Las carbapenemasa OXA-23 y OXA-51, así como la secuencia de inserción IS*Aba1* fueron observadas en todos los aislamientos. La PFGE mostró alta diversidad genética entre los aislamientos, y por MLST se encontraron los clones ST229 y ST258 circulando en la ciudad.

**Conclusión:** Contrario a lo reportado previamente, los resultados del estudio muestran la osteomielitis y las infecciones de piel y tejidos blandos como los principales cuadros clínicos causados por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en instituciones de Medellín y sugieren la importancia de su inclusión en el diagnóstico diferencial de este tipo de infecciones.

## **PALABRAS CLAVE**

*Acinetobacter baumannii*, carbapenémicos, resistencia a carbapenémicos, oxacilinasas, infección en piel y tejidos blandos, osteomielitis

## **ABSTRACT**

**Introduction:** *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic microorganism causing infections in ill patients, mainly ventilator-associated pneumonia and bacteremia. The emergence of carbapenem resistant *A. baumannii* has limited therapeutic options available for treatment of the infections caused by this microorganism.

**Objective:** Describe the clinical and molecular characteristics of patients with infections by carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals of Medellín.

**Materials and methods:** A cross-sectional study was conducted in five tertiary-care hospitals in Medellin during two study years. Clinical information was obtained from medical records. Carbapenemases were detected using three-dimensional test and PCR amplification. Molecular typing included PFGE and MLST.

**Results:** A total of 32 patients were enrolled, the most of them with skin and soft tissue infection (n = 7, 21.9%) and osteomyelitis (n = 6, 18.7%). The isolates showed resistance rates higher than 80% for all antibiotics tested except colistin and tigecycline.

The OXA-23 and OXA-51 carbapenemases and the ISAba1 insertion sequence were observed in all isolates. PFGE revealed high genetic diversity and MLST showed the ST229 and ST258 clones circulating in the city.

**Conclusion:** Carbapenem-resistant *A. baumannii* should be included in the differential diagnosis of skin and soft tissue infections and osteomyelitis, due to the increase in nosocomial infections caused by this microorganism in the last years.

**KEY WORDS:**

*Acinetobacter baumannii*, carbapenem, carbapenem resistance, oxacillinases, skin and soft tissues infection, osteomyelitis

**INTRODUCCIÓN**

*Acinetobacter baumannii* es un patógeno cada vez más frecuente en el ambiente hospitalario causando diversidad de cuadros clínicos, como infecciones de tracto urinario, infecciones intra-abdominales, neumonía y bacteriemia, siendo estas dos últimas las infecciones más comunes (1). Esta bacteria ha sido descrita como un patógeno importante en unidades de cuidado intensivo, donde infecta pacientes con diferentes comorbilidades, inmunocomprometidos o bajo procedimientos invasivos y origina altos porcentajes de mortalidad (1).

El manejo de las infecciones causadas por *A. baumannii* es complejo debido a los diversos mecanismos de resistencia que posee, intrínsecos y adquiridos, como  $\beta$ -lactamasas, baja permeabilidad y bombas de expulsión (2, 3).

Los carbapenémicos han sido el tratamiento de elección para tratar las infecciones ocasionadas por *A. baumannii* multirresistente, sin embargo esta bacteria desarrolló resistencia a dichos antibióticos complicando aún más el tratamiento de las infecciones que ocasiona (4). La resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos está mediada principalmente por enzimas que degradan el antibiótico llamadas carbapenemasas, específicamente por las carbapenemasas de clase D u oxacilinasas, como OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58; algunas de ellas asociadas con elementos de inserción como el IS*Aba1*, que actúan como promotores transcripcionales (5). La emergencia de la resistencia a carbapenémicos no solo reduce las opciones terapéuticas, sino que la utilización de tratamientos empíricos inapropiados ejerce una presión selectiva que conlleva a la eliminación de bacterias sensibles y favorece el crecimiento y diseminación de patógenos resistentes, originando períodos de hospitalización prolongados, tasas de mortalidad altas y mayores costos en la atención hospitalaria (6, 7).

En Colombia, el porcentaje de resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos en UCI ha alcanzado hasta el 37,1% a imipenem y el 98,8% a meropenem para el año 2012, con un aumento significativo desde el año 2009 (8). En ciudades como Medellín, este porcentaje es cerca del 35% (9). A pesar de los altos porcentajes de resistencia y los niveles de mortalidad ocasionados por esta bacteria, el conocimiento sobre las características clínicas de las infecciones que ocasiona aún permanece limitado. El objetivo de este trabajo fue describir las características clínicas y moleculares de las infecciones por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de la ciudad de Medellín, Colombia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Población de estudio:** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en cinco hospitales de alto nivel de complejidad de Medellín, durante el periodo comprendido entre junio de 2012 y junio de 2014. Los hospitales A y B son hospitales universitarios de 662 y 700 camas, respectivamente. Los hospitales C y D son hospitales de un tamaño menor, cada uno con 286 y 300 camas, respectivamente. El hospital E es un hospital especializado en cardiología con 140 camas. Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de infección por *A. baumannii* con resistencia intermedia o total a carbapenémicos, según los puntos de corte establecidos por el CLSI, 2012 (10). Las pruebas fenotípicas y moleculares fueron realizadas al primer aislamiento recuperado de cada paciente durante la hospitalización.

El protocolo de estudio fue avalado por el Comité de Ética e Investigación de cada hospital participante y por el Comité de Bioética de la Universidad de Antioquia (CBEIH-SIU) (aprobación No 11-35-415).

**Información clínica y epidemiológica:** La información clínica y epidemiológica fue obtenida a partir de la revisión de la historia clínica de cada paciente, utilizando un formulario diseñado para tal fin. Las variables incluían características sociodemográficas, uso previo de antibióticos, estancia en unidades de cuidados intensivos en el momento del aislamiento causante de la infección, tipo de infección, comorbilidades y desenlaces. Las infecciones fueron clasificadas como asociadas a la comunidad o a la atención en salud de acuerdo con las definiciones establecidas por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (11).

**Identificación y pruebas de sensibilidad:** La identificación y las pruebas de sensibilidad fueron realizadas utilizando el sistema automatizado VITEK-2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Los antibióticos evaluados fueron ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefotaxime, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicina, amikacina, ciprofloxacina, tigeciclina y colistina.

**Detección fenotípica y molecular de carbapenemasas:** La detección fenotípica de carbapenemasas fue realizada utilizando una variación del test tridimensional (12, 13), mientras que la detección molecular fue realizada mediante la amplificación por PCR de los genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub> y *bla*<sub>OXA-51</sub>, utilizando protocolos previamente descritos (14, 15). Adicionalmente, se detectó la secuencia de inserción *ISAba-1* y su presencia “corriente arriba” de los genes *bla*<sub>OXA-51</sub> y *bla*<sub>OXA-23</sub> (16).

### **Electroforesis en gel de campo pulsado**

Se utilizó la enzima *Apal* (Thermo Scientific, United States), durante un tiempo de restricción de 2 horas a una temperatura de 37°C. Los patrones electroforéticos fueron normalizados utilizando como marcador el Lambda ladder (New England Biolabs, UK). Para el corrido se utilizó el sistema Chef-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), empleando las siguientes condiciones: temperatura 11.3°C, pulso inicial 1 segundo, pulso final 50 segundos, tiempo de corrido 21 horas, ángulo 120° y 6v/cm de gradiente de voltaje. El grado de relación de los aislamientos fue analizado mediante el software BioNumerics versión 3.0 (Applied Maths), usando el coeficiente de similitud de Dice. Se consideró un punto de corte  $\geq 80\%$  para definir aislamientos genéticamente

relacionados. Los dendogramas fueron generados usando el logaritmo UPGMA (del inglés, *Unweighted Pairs Geometric-Matched Analysis*), con 1% de tolerancia y 0,5% de optimización.

### **Tipificación de secuencias de múltiples locus**

La tipificación de secuencias de múltiples locus MLST (del inglés *multilocus sequence typing*) fue realizada en 7 aislamientos correspondientes al 21.9% de la población, según los patrones electroforéticos más predominantes y de acuerdo con el protocolo descrito por Bartual et al (17). Los tipos de alelos y los tipos de secuencias (ST) fueron asignados usando la base <http://pubmlst.org/abaumannii/>.

**Análisis estadístico:** Para el análisis de la información, se utilizaron frecuencias absolutas y relativas utilizando el programa SPSS® v20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## **RESULTADOS**

### **Características clínicas y epidemiológicas**

En el periodo de estudio se incluyeron 32 pacientes con infección por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, provenientes principalmente del hospital B (Figura 1). La mayoría de los pacientes fueron hombres (65,6% n=21), mayores de 55 años (50,0% n=16), todos ellos adultos.

Los antecedentes clínicos más frecuentes fueron hospitalización previa (71,9% n=23) y cirugía (65,6% n=21). El uso de antibióticos en los últimos seis meses fue observado en el 78,1% (n= 25) de los pacientes, siendo piperacilina/tazobactam y los

carbapenémicos los más utilizados (48,0% n=12, cada uno). Los tipos de infecciones más frecuentes fueron infección en piel y tejidos blandos (21,9% n=7), osteomielitis (18,8%, n=6) e infección intrabdominal (18,8% n=6). El 40.6% (n=13) de los pacientes estaban hospitalizados en UCI en el momento del aislamiento.

Si bien no se realizó análisis de mortalidad atribuible a la infección, en este estudio se encontró una mortalidad global del 28,1% (n= 9) (Tabla 1).

### **Porcentajes de resistencia y detección de carbapenemasas**

Los aislamientos evaluados presentaron porcentajes de resistencia superiores al 80% para todos los  $\beta$ -lactámicos evaluados (incluyendo ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, ceftazidima y cefepime) y para otros grupos de antibióticos como ciprofloxacina y gentamicina. En contraste, la resistencia a tigeciclina y colistina fue de 3,6 y 3,2%, respectivamente. El porcentaje de resistencia a meropenem e imipenem fue del 100% (Figura 2).

El test tridimensional fue positivo en 24 aislamientos (75%) y negativo en 8 (25%) casos. Sin embargo, los genes *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub> e IS*Aba1* fueron detectados en todas las cepas, independiente del resultado del test tridimensional. La amplificación de la secuencia de inserción IS*Aba1*, fue detectada “corriente arriba” de los genes *bla*<sub>OXA-23</sub> y *bla*<sub>OXA-51</sub> en el 62,5% (n=20) y 3,1% (n=1) de los casos, respectivamente. La presencia simultánea de esta secuencia “corriente arriba” de ambos genes fue encontrada en el 31,2% (n=10) de los aislamientos.

## Tipificación molecular

La electroforesis en gel de campo pulsado mostró una alta diversidad genética entre los aislamientos evaluados, con porcentajes de similitud inferiores al 80% para la mayoría de ellos (Figura 3). Por su parte, la tipificación de secuencias de locus múltiple evidenció la presencia de clones presentes en las 5 instituciones: (i) el clon ST229, presente en los hospitales A, C, D y E y el clon ST758, presente en los hospitales A y C (Figura 3).

## DISCUSIÓN

A pesar de que *Acinetobacter baumannii* ha sido un patógeno que con frecuencia ha sido encontrado causando infecciones como neumonía asociada a ventilador y bacteriemia (1), los resultados de este estudio resaltan la presencia de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos causando infecciones en piel y tejidos blandos y osteomielitis. En el primer tipo de infección, el papel de *A.baumannii* ha sido controversial debido a la colonización frecuente de la piel por parte de este microorganismo. Sin embargo, algunos autores han reportado la presencia de cuatro características comúnmente encontradas en los pacientes con este cuadro clínico: 1) Pacientes con condiciones subyacentes como diabetes y trauma; 2) Infección acompañada de bacteriemia; 3) Multirresistencia e infección polimicrobiana en la mayoría de los casos; 4) Necesidad de tratamiento quirúrgico y aumento de la mortalidad (18). En este estudio, la mayoría de estas características estuvieron presentes en los pacientes con infecciones en piel y tejidos blandos, lo que indica la presencia de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos como un agente asociado con este tipo de infección (Tabla 2).

De otro lado, la osteomielitis fue la otra infección frecuente en nuestra población de estudio, infección comúnmente atribuida a bacterias gram positivas, pero que en un estudio reciente se observó un aumento de casos ocasionados por bacilos gram negativos, siendo *A. baumannii* la segunda bacteria en frecuencia después de *Enterobacter* sp en este tipo de infección (19). Adicionalmente, tres de los 6 pacientes con osteomielitis tuvieron antecedente de trauma, característica que ha sido escrita en los pacientes con infecciones por bacilos gram negativos, y en dos pacientes la infección no fue mixta siendo *A. baumannii* el único agente causal encontrado (Tabla 2). Los resultados del presente estudio difieren a lo reportado en otras investigaciones, en tanto que las presentaciones clínicas más comunes por *A. baumannii* han sido las neumonías asociadas a ventilador y las bacteriemias (1). En Colombia se ha observado esta misma tendencia, tal y como lo presenta un estudio realizado en unidades de cuidados intensivos del país en el cual la neumonía y la bacteriemia están entre las infecciones más frecuentes, siendo las de piel y tejidos blandos las que se presentaron con menor frecuencia en la población (20). Así mismo, un estudio reciente realizado en la ciudad de Cali reportó el tracto respiratorio como el sitio más común a partir del cual fue aislado *A. baumannii* (21).

No obstante, los resultados del estudio y el aumento en la frecuencia de esta bacteria en los hospitales del país, así como de los porcentajes de resistencia a carbapenémicos resalta la importancia de incluirla en la vigilancia epidemiológica de otro tipo de infecciones.

En el presente trabajo las infecciones por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos presentaron un comportamiento similar a lo descrito en la epidemiología mundial en lo que se refiere al predominio de esta bacteria en pacientes con diferentes

comorbilidades, antecedentes de hospitalización y uso previo de antibióticos (1, 22); siendo el uso previo de carbapenémicos una característica encontrada en casi la mitad de los pacientes (n=12, 48%). Teniendo en cuenta que esta característica ha sido considerada como un factor de riesgo independiente para la infección por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, se evidencia la necesidad de establecer medidas de uso racional de antibióticos para controlar la aparición de cepas resistentes (23).

Aunque la hospitalización en UCI ha sido una característica altamente frecuente en los pacientes con *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (22) (24), en este estudio más de la mitad de los pacientes no estaban hospitalizados en UCI, mostrando la importancia de fortalecer la vigilancia de las infecciones ocasionadas por esta bacteria en otras salas de hospitalización.

Todas las infecciones de estudio fueron ocasionadas por aislamientos con altos porcentajes de resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles, lo que limita sustancialmente las opciones terapéuticas y lleva a la necesidad de terapias combinadas que puedan tener un efecto sinérgico para el control de la infección, las cuales no son exitosas en algunas situaciones llevando a falla terapéutica.

La carbapenemasa OXA-23 fue detectada en todos los tipos de infecciones, incluyendo piel y tejidos blandos y osteomielitis. Esta enzima puede estar codificada en plásmidos fácilmente transmisibles de una bacteria a otra y ha sido implicada en diferentes brotes hospitalarios en todo el mundo (25). En Suramérica, OXA-23 ha sido reportada en países como Brasil y Argentina y ha sido considerada como el mecanismo más importante de resistencia a carbapenémicos en *A.baumannii* en nuestro país (26) (27).

La presencia simultánea de la secuencia de inserción IS*Aba1* actuando como un promotor transcripcional de la OXA-23 y de la carbapenemasa cromosómica OXA-51,

no se había observado antes en el país (n=10, 31.2%) y refleja la versatilidad y alta capacidad de diseminación de estos elementos genéticos, inclusive en bacterias de la familia Enterobacteriaceae (27-29).

La alta diversidad genética evidenciada por electroforesis en gel de campo pulsado, contrasta con lo reportado en estudios previos realizados en Colombia, en los cuales se han observado clusters o grupos predominantes por esta técnica (27, 29). Esta alta diversidad genética puede ser explicada por la presión antibiótica ejercida en el uso de diferentes esquemas de antimicrobianos, que traen como consecuencia la emergencia de diversas cepas resistentes más que una diseminación clonal. Lo anterior resalta la importancia de establecer medidas de uso racional de antibióticos como una de las estrategias para el control de estas infecciones en la ciudad de Medellín. Los resultados del MLST evidenciaron la presencia de dos linajes circulando en la ciudad, independiente del tipo de infección: ST229 y ST758. El primero de ellos corresponde al complejo clonal CC110, clon internacional encontrado en Estados Unidos, Argentina y Korea y que puede portar resistencia inclusive a colistina (22). El linaje ST229 ha emergido como un nuevo linaje de aislamientos resistentes, reportado en un aislamiento de *A. baumannii* OXA-23 con la secuencia de inserción IS*Aba1* en Korea (30). El segundo linaje correspondiente al ST758 ha sido reportado en México en aislamientos de *A. baumannii* portadores de una variante de la OXA-23, llamada OXA-239 (31). Este es uno de los primeros reportes de los linajes de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos que están circulando en ciudades de Colombia.

Entre las principales limitaciones de este trabajo se encuentra los alcances descriptivos más no explicativos o causales de los resultados, al no tener un grupo de comparación.

En conclusión, es necesario incluir *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en el diagnóstico diferencial en infecciones en piel y tejidos blandos y en osteomielitis, dado el aumento de las infecciones intrahospitalarias ocasionadas por esta bacteria durante los últimos años. Por otra parte, las carbapenemasa OXA-23 y OXA-51 y la secuencia de inserción ISAb1a son los mecanismos que están mediando la resistencia a carbapenémicos en los aislamientos de *A. baumannii* en el país.

**Conflicto de intereses:** Los autores no declaramos conflicto de intereses.

#### **Financiación:**

Este trabajo fue financiado por el *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias* (proyecto:111554531404) y por el Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, Universidad de Antioquia (proyecto: CIMB-068-12).

#### **REFERENCIAS**

1. Torres HA, Vázquez EG, Yagüe G, Gómez JG. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. *Rev Esp Quimioter.* 2010;23(1):12-9.
2. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):947-53.

3. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(3):219-26.
4. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(1):1-12.
5. Niranjana DK, Singh NP, Manchanda V, Rai S, Kaur IR. Multiple carbapenem hydrolyzing genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31(3):237-41.
6. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(12):1099-106.
7. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011.
8. Hernández C, Blanco V, Motoa G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 2014;34(Supl. 1):91-100.
9. Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín [acceso 06 de octubre de 2014]. *Acinetobacter baumannii*. Disponible en: <http://www.grupogermen.org/pdf/Acinetoacter.pdf>
10. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

11. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309-32.
12. Correa A, Guzmán AM, Reyes SL, Ospina D, Torres JA, Tafur JD, et al. Evaluation of the Three-Dimensional (3D) Test as a Screening Tool for the Detection of Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and *Acinetobacter baumannii* (Ab) 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy ICAAC October 25 - 28; Washington, DC.: American Society for Microbiology; 2008.
13. Thomson KS, Mejglo ZA, Pearce GN, Regan TJ. 3-Dimensional susceptibility testing of beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1984;13(1):45-54.
14. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):321-2.
15. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-23.
16. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;258(1):72-7.
17. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4382-90.
18. Guerrero DM, Perez F, Conger NG, Solomkin JS, Adams MD, Rather PN, et al. *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections: recognizing a broadening spectrum of disease. *Surg Infect (Larchmt)*. 2010;11(1):49-57.

19. Carvalho VC, Oliveira PR, Dal-Paz K, Paula AP, Felix Cda S, Lima AL. Gram-negative osteomyelitis: clinical and microbiological profile. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(1):63-7.
20. Lemos EV, De la Hoz Restrepo F, Alvis N, Quevedo E, Cañon O, León Y. *Acinetobacter baumannii* - related mortality in intensive care units in Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2011;30(4):287-94.
21. Prado A, Arias NL, Chávez M, Cabrera CE, Gómez RF. Caracterización fenotípica de aislados de *Acinetobacter baumannii* en una institución de alta complejidad de la ciudad de Cali. *Biomédica.* 2014;34(Supl 1).
22. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat.* 2012;15(4):237-47.
23. Aydemir H, Celebi G, Piskin N, Oztoprak N, Keskin AS, Aktas E, et al. Mortality attributable to carbapenem-resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(1):66-71.
24. Alavi-Moghadam M, Miri M, Mokhtari M, Kouchek M, Goharani R, Sistanzad M, et al. Incidence of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a general intensive care unit (ICU). *Caspian J Intern Med.* 2014;5(3):186-7.
25. Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Alvarez-Lerma F, et al. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):5155-7.

26. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(4):311-6.
27. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2001-4.
28. Leski TA, Bangura U, Jimmy DH, Ansumana R, Lizewski SE, Li RW, et al. Identification of blaOXA-51-like, blaOXA-58, blaDIM-1, and blaVIM Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra Leone. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2435-8.
29. Martínez P, Mattar S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal-bla OXA-23,51 and ISAbal-bla ADC-7 genes in Monteria, Colombia. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1274-80.
30. Hong SB, Shin KS, Ha J, Han K. Co-existence of *blaOXA-23* and *armA* in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a hospital in South Korea. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 6):836-44.
31. E. M. TamayoU. Garza-Ramos AS-P, A. Galicia-ParedesJ. Silva-Sanchez. Identification of OXA-23 carbapenemases: novel variant OXA-239 in *Acinetobacter baumannii* ST758 clinical isolates in Mexico. *New Microbe and New Infect.* 2014.

## TABLAS

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes infectados por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos

Característica	No. de pacientes (%)
<b>Género</b>	
Femenino	11 (34,4)
Masculino	21 (65,6)
<b>Tipo de infección</b>	
Adulto	32 (100)
Pediátrico	0
<b>Edad</b>	
<15	0
15 - 30	2 (6,2)
31 - 55	14 (43,7)
>55	16 (50,0)
<b>Estancia hospitalaria</b>	
≤1 semana	3 (9,4)
>1 semana	29 (90,6)
<b>Antecedente quirúrgico en el último año</b>	21 (65,6)
<b>Antecedente en los últimos 6 meses de:</b>	
Hospitalización	23 (71,9)
Estancia en UCI <sup>a</sup>	13 (40,6)

<b>Uso de antibióticos en los últimos 6 meses</b>	25 (78,1)
Carbapenémicos	12 (48,0)
Piperacilina/Tazobactam	12 (48,0)
Glicopéptidos	6 (24,0)
Fluoroquinolonas	8 (32,0)
Aminoglicósidos	4 (16,0)
Oxaxilidinonas	3 (12,0)
Penicilinas	3 (12,0)
Tigecilina	1 (4,0)
Colistina	1 (4,0)
<b>Clasificación de la infección</b>	
Infección asociada a la atención en salud	30 (93,8)
Infección asociada a la comunidad	2 (6,2)
<b>Hospitalización en UCI en el momento del aislamiento</b>	12 (37,5)
<b>Especialidades</b>	
Cirugía	10 (31,2)
Ortopedia	7 (21,9)
Medicina interna	5 (15,6)
Cuidados intensivos	4 (12,5)
Urología	3 (9,4)
Gineco-oncología	1 (3,1)
Neumología	1 (3,1)
Toxicología	1 (3,1)

<b>Comorbilidades</b>	28 (87,5)
Trauma	7 (25,0)
Diabetes mellitus	6 (21,4)
Insuficiencia renal crónica	4 (14,3)
Enfermedad cardiovascular	5 (17,9)
Cáncer	5 (17,9)
EPOC	3 (10,7)
Quemadura	3 (10,7)
<b>Tipo de infección</b>	
Infección de piel y tejidos blandos	7 (21,9)
Osteomielitis	6 (18,8)
Infección intrabdominal	6 (18,8)
Infección de tracto urinario (ITU) <sup>b</sup>	3 (9,4)
Bacteriemia	3 (9,4)
Neumonía	3 (9,4)
ITU asociada a sonda vesical	1 (3,1)
Infección de sitio operatorio	1 (3,1)
Pancreatitis	1 (3,1)
Infección venosa	1 (3,1)
<b>Desenlaces</b>	
Mejoría	10 (31,2)
Curación	13 (40,6)
Muerte	9 (28,1)

---

<sup>a</sup> UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

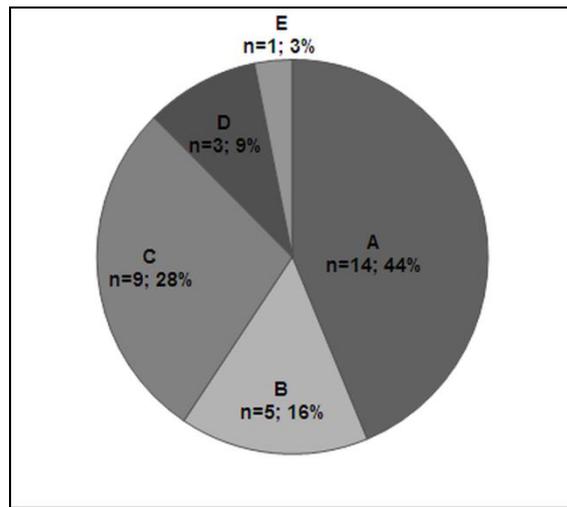
<sup>b</sup> ITU: Infección de tracto urinario

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes con infecciones en piel y tejidos blandos por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos

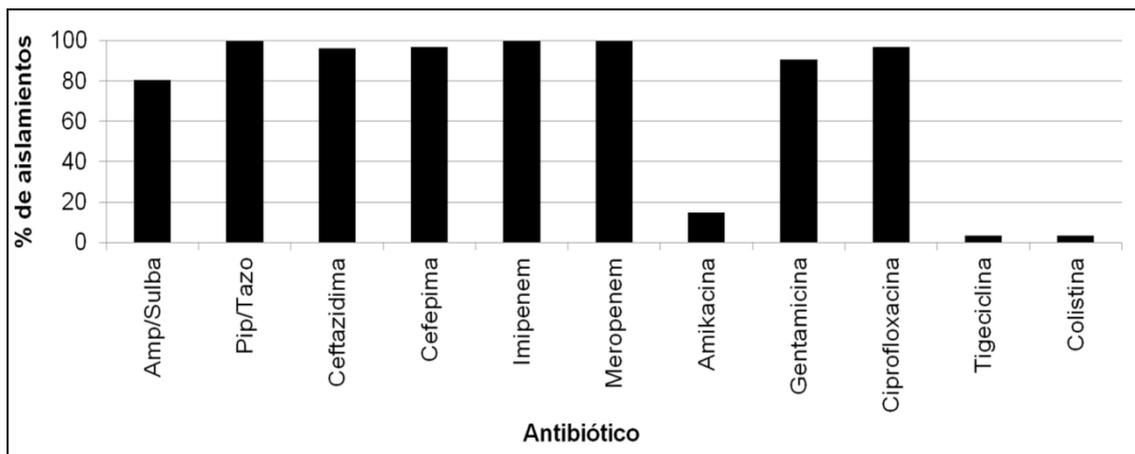
Característica	Infección de piel y tejidos	Osteomielitis
	blandos	
	No. de pacientes (n=7)	No. de pacientes (n=6)
<b>Comorbilidades</b>	7	6
Diabetes	4	1
Trauma	1	3
<b>Multirresistencia</b>	7	6
<b>Bacteriemia secundaria</b>	2	0
<b>Infección solo CRAB<sup>a</sup></b>	3	2
<b>Infección mixta</b>	4	4
Cocos gram positivos	3	2
Bacilos gram negativos	0	4
Hongos	1	0
<b>Implantes óseos</b>	0	1
<b>Tratamiento quirúrgico</b>	4	4
<b>Muerte</b>	2	2

<sup>a</sup> CRAB: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (del inglés, *carbapenem resistant Acinetobacter baumannii*)

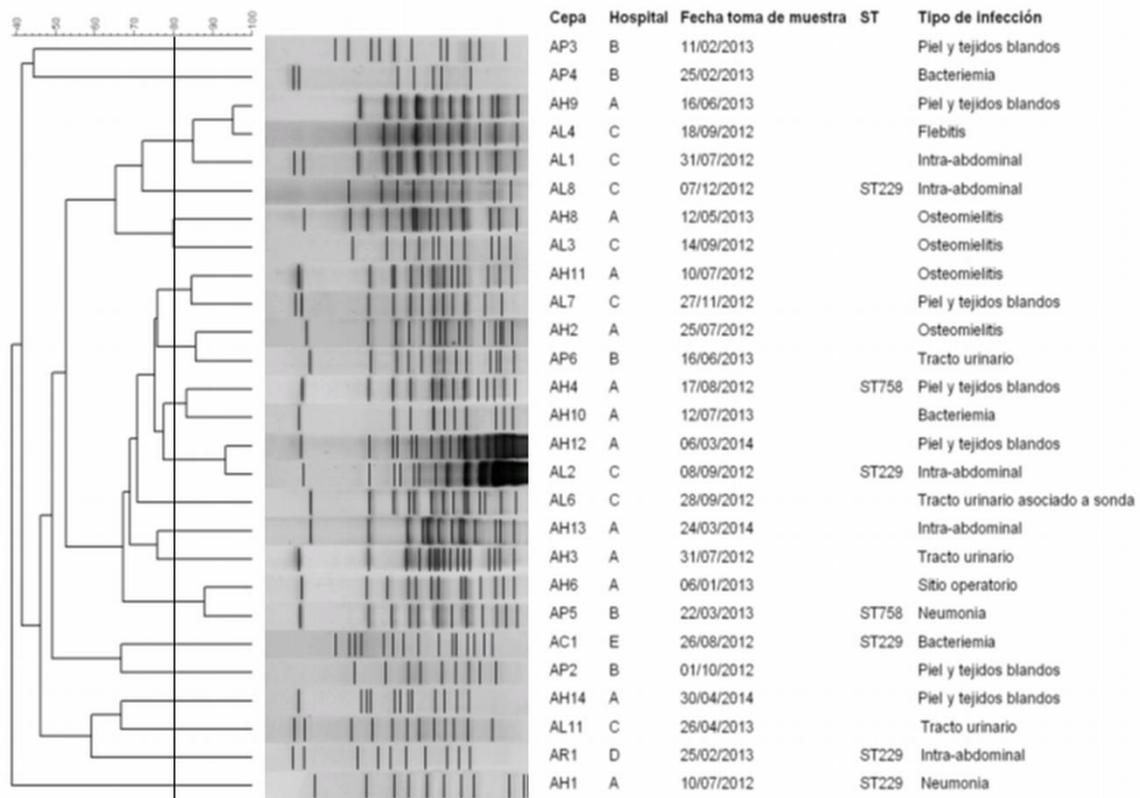
## FIGURAS



**Figura 1.** Distribución relativa y absoluta de los aislamientos de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos obtenidos en cada hospital participante



**Figura 2.** Porcentajes de resistencia en los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos



**Figura 3.** Relación genética de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. La línea vertical corresponde al punto de corte (80%) utilizado para definir los aislamientos genéticamente relacionados.

### **CAPÍTULO III: Otra producción bibliográfica**

#### **Revisión de tema: Aceptado revista Hechos Microbiológicos**

Vanegas J.M, Jiménez J.N. Principales características de la genética bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia. Hechos Microbiol. 2013; 4(2); 98-105.

Se adjuntan las galeras enviadas por el editor de la revista.

# Principales características de la genética bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia

Main features of the bacterial genetics of *Pseudomonas aeruginosa* that contribute to its pathogenesis and resistance

Johanna Marcela Vanegas M.<sup>\*</sup>, Judy Natalia Jiménez Q.<sup>\*†</sup>

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que ha emergido como un patógeno de gran importancia en el ambiente hospitalario debido a la variedad de cuadros clínicos que ocasiona y su habilidad para desarrollar resistencia a diferentes grupos de antibióticos. Los avances en la biología molecular han permitido el conocimiento del genoma de esta bacteria y dilucidar los componentes que contribuyen a su patogenicidad, resistencia y persistencia en el hospedero humano.

### OBJETIVO

Describir las características principales del genoma constitutivo y accesorio de *P. aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y capacidad de resistencia.

### METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica de la literatura.

### DESARROLLO

El genoma de *P. aeruginosa* es un reflejo de su capacidad de adaptación a diferentes hospederos y ambientes en la naturaleza. Mientras que el genoma constitutivo es conservado, el genoma accesorio es altamente variable y está compuesta de elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones que poseen no solo genes de virulencia, sino también genes de resistencia a los antibióticos.

### CONCLUSIONES

La patogénesis y resistencia de *P. aeruginosa* está mediada por una diversidad de genes no solo constitutivos, sino también adquiridos, que favorecen su persistencia en diferentes ambientes y en el hospedero humano.

### PALABRAS CLAVES

Genética bacteriana, genoma accesorio, genoma constitutivo, *Pseudomonas aeruginosa*, patogénesis.

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* has emerged as an important pathogen in the hospital environment due to its role

in the origin of diverse clinical conditions and its development of antibiotic resistance. Advances in molecular biology have enabled genome knowledge of this microorganism and elucidated the components that contribute to its pathogenesis and resistance.

<sup>\*</sup>Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana, Grupo de Microbiología Molecular, Grupo de Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. <sup>†</sup>Contacto: [nataliajin@udea.edu.co](mailto:nataliajin@udea.edu.co)  
Recepción: 02-25-2014. Aceptación: 06-03-2014.

**OBJECTIVE**

Describe the main features of core and accessory genomes of *P. aeruginosa* that promote its pathogenesis and resistance.

**METHODOLOGY**

Narrative review.

**DEVELOPMENT**

Genome of *P. aeruginosa* shows its ability to adapt to different hosts and environments in nature. While the core genome is conserved, the accessory genome is highly variable and is composed of genetic elements as plasmids, transposons and integrons, which do not possess virulence genes only, but also antibiotic resistance genes.

**CONCLUSIONS**

Pathogenesis and resistance of *P. aeruginosa* are mediated by diverse genes both constitutive and acquired that promote its persistence in nature and human hosts.

**KEY WORDS**

Bacteria genetics, accessory genome, core genome, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, pathogenesis.

---

**INTRODUCCIÓN**

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, que coloniza animales y humanos.<sup>1,2</sup> En los últimos años, esta bacteria ha emergido como un patógeno de gran importancia hospitalaria que ocasiona diversidad de cuadros clínicos y ha desarrollado resistencia a diferentes grupos de antibióticos.<sup>1,2</sup> El desarrollo de métodos de secuenciación de genoma completo ha favorecido el conocimiento de los componentes del genoma de *P. aeruginosa* relacionados con su crecimiento, metabolismo, virulencia y resistencia antimicrobiana; reflejando la alta capacidad de adaptación de esta bacteria al medio ambiente y a hospederos animales y humanos.<sup>3</sup> Dicho genoma comprende secuencias de ADN constitutivas interrumpidas por secuencias de ADN exógeno que le confieren una apariencia de “mosaico” y es uno de los más largos de los que han sido descritos para

procariotas, con un tamaño que varía desde 5,5 a 7,0 Mbp. El genoma constitutivo posee una diversidad entre 0,5% a 0,75% y comprende genes de regulación, metabolismo y crecimiento.<sup>3</sup> En contraste, el genoma accesorio está compuesto por plásmidos, integrones, transposones y ADN exógeno que le confieren alto grado de variabilidad.<sup>4-6</sup> Tanto en el genoma constitutivo como en el accesorio, *P. aeruginosa* puede contener genes de resistencia a antibióticos que pueden ser fácilmente diseminados de una cepa a otra. A continuación, se presenta una revisión sobre los componentes más importantes del genoma constitutivo y accesorio de *P. aeruginosa* que contribuyen con su capacidad de adaptación, patogénesis y resistencia, adicionalmente, se hace una breve descripción de alternativas genéticas de tratamiento basadas en fagos.

---

**OBJETIVO**

Describir las características principales del genoma constitutivo y accesorio de *P. aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y capacidad de resistencia.

---

**METODOLOGÍA DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA**

La información fue recolectada de tres bases de datos bibliográficas: PubMed, ScienDirect y SpringerLink. En la búsqueda se seleccionaron artículos en español o inglés que fueron publicados preferiblemente entre los años 2000-2013. Los descriptores utilizados en la búsqueda fueron “*P. aeruginosa*”, “genome”, “core genome”, “accessory genome”, “phagotherapy”, “resistance”, “virulence”, “plasmids”, “phagos”, “transposons”, “integrons”. Los descriptores fueron combinados con el operador booleano “AND” para especificar la búsqueda de la información a la bacteria de interés.

---

**DESARROLLO**
**GENOMA CONSTITUTIVO**

El genoma constitutivo está conformado por genes que se presentan en la mayoría de las cepas independiente

de su origen, ambiental o clínico, y constituye cerca del 90% de todo su genoma.<sup>5</sup>

El primer genoma de *P. aeruginosa* secuenciado fue el de la cepa PAO1 reportado en el año 2000.<sup>7</sup> Esta cepa fue aislada a partir de una herida de un paciente en Australia, en los años 50's y ha sido usada como referencia tanto en pruebas comerciales, como en investigación.<sup>8</sup> En la actualidad, hay alrededor de 15 genomas reportados y más de 30 proyectos de secuenciación en la página del NCBI (del inglés National Center for Biotechnology Information).<sup>9</sup> El genoma de la cepa PAO1 está conformado por 5.570 marcos de lectura, pero sólo ha sido demostrada la función en 372. Entre estos genes con funciones conocidas se encuentran los que codifican para polisacáridos, factores de virulencia, regulación y adhesión.<sup>7</sup> Algunas funciones de los genes que hacen parte del genoma constitutivo de esta bacteria se describen a continuación:

- **Regulación.** Esta función está relacionada con la capacidad de la bacteria para modular la expresión de ciertos genes con el fin de lograr la adaptación a diferentes ambientes. Aproximadamente 8,4% de los genes de la cepa PAO1 están relacionados con regulación, la mayoría de ellos codificando reguladores transcripcionales (que modulan la transcripción de algunos genes) y un alto número de sistemas de dos componentes. Estos últimos son sistemas de señalización en los que participan una proteína denominada histidina quinasa que se autofosforila en la presencia de un estímulo con el fin de transmitir la señal a otra proteína llamada regulador de respuesta con el fin de activar la expresión de ciertos genes. En la base de datos P2CS (del inglés Prokaryotic Two-component Systems) se han reportado 62 histidinas quinasa y 73 reguladores de respuesta.<sup>7,10</sup>
- **Metabolismo oxidativo.** Es un proceso químico en el cual la bacteria produce energía a partir de nutrientes. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, existen cerca de 300 sistemas de transporte en su membrana citoplasmática que le permiten captar y posteriormente metabolizar una amplia variedad de compuestos de carbono. Dentro de los genes relacionados con el metabolismo oxidativo, se encuentran los involucrados con la  $\beta$ -oxidación, principal ruta metabólica de oxidación de los áci-

dos grasos, y en la cual se han descrito alrededor de 25 genes relacionados con las enzimas acil-CoA deshidrogenasas y 16 genes con las enoil-CoA hidratasas. Este alto número de genes no ha sido observado en otros genomas bacterianos, excepto para *Mycobacterium tuberculosis* y evidencia la gran versatilidad metabólica de esta bacteria.<sup>7</sup>

- **Proteínas de membrana externa.** Estas proteínas son de gran importancia en la adhesión y en el transporte de sustancias, factores de virulencia y antibióticos. Se han identificado aproximadamente 150 genes que codifican para proteínas de membrana externa. Dichas proteínas pueden ser clasificadas en tres familias: (i) La familia OprD: incluye un número de porinas que facilitan la difusión de aminoácidos básicos y de algunos antibióticos como el imipenem, antibiótico del grupo de los carbapenémicos, que constituyen el tratamiento de elección en cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes. Algunos aislamientos de *P. aeruginosa* pueden desarrollar resistencia al imipenem por la presencia de mutaciones en los 19 genes que conforman esta familia de porinas.<sup>7,11,12</sup> (ii) La familia TonB, que incluye proteínas involucradas en la captación de hierro y vitaminas como la B12 y (iii) la familia OprM relacionadas con la secreción de sustancias y la cual hace parte de diferentes bombas de expulsión relacionadas con resistencia a antibióticos, como los carbapenémicos y los aminoglicósidos.<sup>7,13</sup>
- **Resistencia intrínseca.** *P. aeruginosa* presenta tres características que le confieren resistencia antimicrobiana intrínseca a un número importante de antibióticos: baja permeabilidad de la membrana externa, una  $\beta$ -lactamasa constitutiva tipo AmpC y bombas de expulsión que expulsan el antibiótico impidiendo su acción. La presencia de estos tres mecanismos genera un perfil de resistencia a ampicilina-sulbactam, cefotaxima, ceftriaxona, eritapenem, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, nitrofurantoína y fosfomicina. Al igual que las demás bacterias Gram negativas no fermentadoras, *P. aeruginosa* es resistente a cefalosporinas de primera y segunda generación, clindamicina, y rifampicina.<sup>14,15</sup> La mayoría de bombas de expulsión presentes en esta bacteria corresponden a la familia "RND" (del inglés Resistance

Nodulation Division), descritas principalmente en bacterias Gram negativas, y responsables de catalizar la salida activa de muchos antibióticos y agentes quimioterapéuticos. Esta familia está formada por proteínas de grandes dominios periplásmicos que forman complejos tripartitas con canales de la membrana externa y proteínas adaptadoras periplásmicas. La presencia de este complejo proteico tripartita sugiere que los antibióticos son exportados directamente al medio externo, más que al periplasma, lo cual se constituye una ventaja para la bacteria ya que el antibiótico tendría que atravesar la membrana externa para entrar de nuevo.<sup>16</sup> Algunos ejemplos en *Pseudomonas* incluyen las bombas de expulsión MexAB-OprM y MexXY-OprM, cuya sobre-expresión conlleva al desarrollo de resistencia a carbapenémicos y aminoglicósidos, respectivamente.<sup>7,17</sup>

- **Secreción de proteínas y quimiotaxis.** *P. aeruginosa* secreta diferentes factores de virulencia como toxinas y proteasas, las cuales favorecen su diseminación y permanencia en el hospedero. Algunas de estas proteínas son la exotoxina A que inhibe la síntesis de proteínas y la proteasa “LasA”, que inactiva algunos de los componentes del sistema inmune como los anticuerpos y las proteínas que hacen parte del complemento. La quimiotaxis es el proceso mediante el cual la bacteria logra dirigir su movimiento para captar nutrientes o alejarse de sustancias que puedan ser tóxicas; *P. aeruginosa* parece tener el sistema más complejo de quimiotaxis de las bacterias secuenciadas, con aproximadamente 26 marcos de lectura involucrados en la captación de aminoácidos, fosfatos inorgánicos y azúcares.<sup>5,7,18</sup>

#### GENOMA ACCESORIO

La mayoría del genoma accesorio de *P. aeruginosa* se caracteriza por el alto contenido de G+C y la presencia de elementos genéticos móviles; la mayoría de ellos degenerados debido a la acumulación de deleciones, lo que dificulta el conocimiento de los mecanismos de transferencia, al presentar baja similitud con los elementos reportados. Muchos de estos elementos genéticos se insertan cerca a los genes que codifican para el tRNA debido a que son sitios altamente conservados, lo cual se ha reportado para otras bacterias.<sup>5,19</sup>

El genoma accesorio de *P. aeruginosa* incluye: Elementos Conjugativos Integrativos o ICE (del inglés: Integrative and Conjugative Elements), islas de reemplazo, transposones, integrones, plásmidos y fagos:

- **Elementos Conjugativos Integrativos (ICE).** Son elementos que pueden integrarse al cromosoma bacteriano mediante recombinación en los sitios *attP* y *attB* y ser replicados. Su tamaño varía entre 81 a 108 kb y tienen un papel importante en metabolismo y virulencia. La mayoría de los ICE pueden ser agrupados en dos familias: “pKLC102” y “*clc*-like”. La familia “pKLC102” posee una alta capacidad de movilización espontánea (10%) y contiene genes que codifican para enzimas como las ácido graso sintetasas, fosfolipasas, proteínas de adaptación al frío, reguladores de transcripción y la  $\beta$ -(1,2) glucano sintasa; proteína que hace parte del espacio periplásmico y media interacciones entre la bacteria y el hospedero.<sup>4,5</sup> La familia “*clc*-like” está relacionada con el transporte de metales pesados y con el metabolismo y degradación de compuestos químicos como el 3-clorobenzoato. Algunos elementos que conforman esta familia son *clc*, PAG1-2, PAGI-3 y LESGI-3.<sup>4,5</sup>
- **Islas de reemplazo.** Son elementos similares a las islas genómicas y pueden estar compuestas por cuatro grupos de genes que intervienen en procesos como la captación de hierro, la adhesión, la movilidad y la evasión al sistema inmune: (i) RGP9 que contiene genes relacionados con la glicosilación de la flagelina, (ii) RGP31, cuyos genes están involucrados en la síntesis del antígeno O del lipopolisacárido, (iii) RGP60, con genes asociados con la síntesis de la pioverdina, que actúa como un sideróforo en ambientes con escasez de hierro y (iv) RGP60, que contiene genes relacionados con la síntesis de la pilina, proteína que conforma el pili y es de importancia para la adherencia bacteriana.<sup>4,5</sup> Estos elementos pueden ser adquiridos de forma horizontal y a pesar de que pueden variar de una cepa a otra, ocupan el mismo lugar en el genoma.
- **Transposones.** Son elementos que se insertan en sitios inespecíficos de un plásmido o de un cromosoma bacteriano. La mayoría de transposones pueden ser insertados en diferentes sitios de

una molécula de DNA, pero algunos se insertan en secuencias ricas en A-T y en genes conservados.<sup>5</sup> Existen dos tipos de transposones: los simples llamados también secuencias de inserción (IS), los cuales están solo conformados por genes necesarios para la transposición, y los compuestos los cuales contienen genes adicionales que codifican para diferentes proteínas y se encuentran flanqueados por secuencias de inserción. Estos elementos son asociados con alta frecuencia con genes de resistencia a antibióticos, lo que es de gran importancia ya que estos pueden ser fácilmente diseminados de una bacteria a otra.<sup>5</sup> La familia de transposones Tn3 es una de las más frecuentes en *P. aeruginosa* y ha sido relacionado con la presencia del gen que codifica para la carbapenemasa de clase A, denominada KPC, que hidroliza no solo los carbapenémicos, sino los demás antibióticos  $\beta$ -lactámicos.<sup>20</sup> Una variante de esta enzima, la KPC-2, fue hallada en nuestro país en una cepa de *P. aeruginosa* en el Tn4401, que hace parte de la familia Tn3.<sup>21</sup> Esta carbapenemasa inicialmente fue descrita en el 2001 en cepas de *Klebsiella pneumoniae*,<sup>22</sup> pero en la actualidad se ha diseminado no solo a otras enterobacterias como *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* y *Serratia marcescens*, sino también a bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.<sup>23</sup> Otra carbapenemasa de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasa denominada VIM-1, que hidroliza todos los  $\beta$ -lactámicos excepto el aztreonam, también ha sido reportada en el transposón Tn402.<sup>24</sup> Algunos transposones pueden también modular la expresión de genes de resistencia adyacentes como es el caso de la secuencia de inserción IS1999, un tipo de transposón simple, que incrementa la expresión de la betalactamasas de espectro extendido (BLEE), como la VEB-1 en *P. aeruginosa*, la cual confiere resistencia a cefalosporinas.<sup>25</sup> En contraste, otros transposones pueden incrementar la sensibilidad a antibióticos como la ciprofloxacina y tetraciclina al insertarse en genes que codifican para algunas proteínas de membrana externa, conservando la estabilidad en la expresión de estas porinas, ya que una baja expresión de las mismas impediría el ingreso del antibiótico al interior de la bacteria.<sup>26</sup>

- **Integrones.** Son elementos genéticos que no pueden movilizarse por sí mismos por lo que generalmente se encuentran contenidos en plásmidos conjugativos y transposones y se caracterizan por la capacidad de incorporar diferentes genes de resistencia. Estos elementos son clasificados según la secuencia de su integrasa, proteína que le permite integrarse en un plásmido o en cromosoma bacteriano. Aunque se han descrito más de 90 variantes para esta proteína, los de clase 1, 2 y 3 son los que contienen genes de resistencia y poseen mayor importancia. Los integrones de clase 1 son uno de los principales mecanismos de diseminación de determinantes de resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* y han sido relacionados con la presencia de carbapenemasas de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas, como NDM y VIM.<sup>27-29</sup> Además de contener genes que codifican para carbapenemasas, estos integrones con frecuencia contienen enzimas modificadoras de aminoglicósidos, que confieren resistencia a este grupo de antibióticos.<sup>30</sup> Adicionalmente, cuando se presenta un daño del ADN que genera una respuesta de reparación tipo SOS, se pueden generar rearrreglos en dichos integrones que podrían modular la expresión de integrasas favoreciendo la inserción de BLEE's y confiriendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación.<sup>31</sup> Algunos integrones de clase 1 han sido encontradas en cepas de *P. aeruginosa* provenientes de ambientes acuáticos, lo que sugiere que estas cepas pueden ser reservorios potenciales de genes de resistencia.<sup>32</sup>
- **Plásmidos.** Son secuencias de ADN extracromosómico circular o lineal que tienen la capacidad de realizar su propia replicación y transcripción. Se han descrito con alta frecuencia y diversidad no solo en cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico, sino ambiental.<sup>33</sup> Muchos de ellos se caracterizan por contener genes de resistencia y en ocasiones se asocian con integrones y transposones. Como ejemplo de ello, son los plásmidos IncP-6 e IncU que han sido asociados con la presencia del transposón Tn4401 que puede contener el gen que codifica para la carbapenemasa KPC-2.<sup>34,35</sup> Estos plásmidos pueden replicarse tanto en *P. aeruginosa* como en enterobacterias facilitando la transmisión de mecanismos de resistencia hacia diferentes tipos de bacterias.<sup>35</sup>

- **Fagos y profagos.** Son virus que pueden desencadenar dos tipos de ciclos al infectar la bacteria: el ciclo lítico, que resulta en una lisis rápida de la bacteria infectada en un período corto de tiempo, con una liberación de numerosas partículas virales infecciosas; y el ciclo lisogénico, en el que el fago invade la célula hospedera y se integra en el cromosoma, transmitiéndose de forma vertical en cada generación de células hijas.<sup>41</sup> En la actualidad se han descrito cerca de 60 fagos con capacidad de permanecer de forma lisogénica en *P. aeruginosa*. La mayoría de ellos son de doble cadena de ADN y son divididos en tres familias basadas en la morfología de la cola: *Siphoviridae* (cola larga y flexible, no contráctil), *Myoviridae* (cola larga, rígida y contráctil) y *Podoviridae* (cola corta, no contráctil); siendo la primera la más frecuente de todas.<sup>36</sup> Además de su indudable papel en la diversidad genética, los fagos pueden contener genes de virulencia que pueden conceder ventajas adaptativas a la bacteria. Algunos ejemplos son el profago ØCTX de familia *Myoviridae* que contiene el gen *ctx* que codifica para una toxina formadora de poro y el fago D3 de la familia *Siphoviridae* que puede alterar el LPS de *P. aeruginosa*, originando cambios en el antígeno O que pueden facilitar la evasión de la respuesta inmune durante la infección.<sup>37</sup> El fago FIZ15, con propiedades similares a D3, ha sido asociado con resistencia a la fagocitosis por macrófagos en ratón y con incrementar la resistencia al sistema inmune.<sup>38</sup> El fago filamentosos Pf4 media la aparición de variantes de colonias pequeñas, un tipo de colonias asociado con disminución de la función del pulmón en pacientes con fibrosis quística y con resistencia bacteriana.<sup>39</sup> Algunas bacteriocinas formadoras de poros conocidas como piocinas tipo R y F, son profagos defectuosos que contienen genes de la cola, pero carecen de genes necesarios para la formación de la cabeza, replicación e integración.<sup>40</sup> En general, las bacteriocinas son proteínas que inhiben el crecimiento de bacterias de la misma especie o especies cercanas. El uso de fagos como agentes antibacterianos ha sido documentado en la literatura. Sin embargo, solamente los fagos líticos son aptos para este uso terapéutico, ya que éstos originan una lisis rápida de la bacteria hospedera, se liberan en altas cantidades y tienen poca

probabilidad de ser transmitidos a otra bacteria a través del proceso de transducción.<sup>41-43</sup>

## CONCLUSIÓN

El conocimiento del genoma de *P. aeruginosa* permite dilucidar no solo la presencia de una gran variedad de genes relacionados con la regulación genética, metabolismo, captación de nutrientes, patogénesis y resistencia antimicrobiana presentes en el genoma constitutivo, sino también la alta capacidad de diseminación de genes de virulencia y resistencia adicionales que favorecen la permanencia de esta bacteria en diferentes ambientes y en el hospedero humano.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la publicación de este manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P.** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(11): 4783-8.
2. **Jimeno A, Alcalde MM, Blazquez A.** [Epidemic outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant producing metallo-beta-lactamase]. *Rev Clin Esp.* 2011; 211(4): 187-91.
3. **Spencer FA, Allegrone J, Goldberg RJ, Gore JM, Fox KA, Granger CB, et al.** Association of statin therapy with outcomes of acute coronary syndromes: the GRACE study. *Ann Intern Med.* 2004; 140(11): 857-66.
4. **Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B.** *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol.* 2011; 2:150.
5. **Kung VL, Ozer EA, Hauser AR.** The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(4): 621-41.
6. **Bezuidt OK, Klockgether J, Elsen S, Attree I, Davenport CF, Tümmler B.** Intracolonial genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC Genomics.* 2013; 14:416.
7. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000; 406(6799): 959-64.

8. **HOLLOWAY BW.** Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.* 1955; 13(3): 572-81.
9. **NCBI (National Center for Biotechnology Information).** Genome *Pseudomonas aeruginosa*. [Acceso: 10 de octubre de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=pseudomonas+aeruginosa>
10. **P2CS (Prokaryotic 2-Component Systems).** *Pseudomonas aeruginosa*. [Acceso: 10 de octubre 2013]. Disponible en: <http://www.p2cs.org/>.
11. **Lee JY, Ko KS.** OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40(2): 168-72.
12. **Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM.** Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol.* 2012; 302(2): 63-8.
13. **Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, et al.** Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(5): 2219-24.
14. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. January 2013.
15. **Vila J, Marco F.** [Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(10): 726-36.
16. **Nikaido H, Takatsuka Y.** Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794(5): 769-81.
17. **Schweizer HP.** Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003; 2(1): 48-62.
18. **Moulton RC, Montie TC.** Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1979; 137(1): 274-80.
19. **Kiewitz C, Tümmler B.** Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 2000; 182(11): 3125-35.
20. **Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, et al.** *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(9): 2022-7.
21. **Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P.** Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11): 5350-3.
22. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4): 1151-61.
23. **Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J.* 2011; 104(1): 40-5.
24. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 320-7.
25. **Aubert D, Naas T, Nordmann P.** IS1999 increases expression of the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2003; 185(17): 5314-9.
26. **Shen L, Gao X, Wei J, Chen L, Zhao X, Li B, et al.** PA2800 plays an important role in both antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol.* 2012; 65(5): 601-9.
27. **Martinez E, Marquez C, Ingold A, Merlino J, Djordjevic SP, Stokes HW, et al.** Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4): 2169-72.
28. **Janvier F, Jeannot K, Tessé S, Robert-Nicoud M, Delacour H, Rapp C, et al.** Molecular characterization of blaNDM-1 in a ST235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013.
29. **Ingold AJ, Castro M, Nabón A, Borthagaray G, Márquez C.** [VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gen detection in a class 1 integron associated to bla(CTX-M-2) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Uruguay: first communication]. *Rev Argent Microbiol.* 2011; 43(3): 198-202.
30. **Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M.** Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 38(5): 398-402.
31. **Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, et al.** Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 2012; 8(6): e1002778.
32. **Zanetti MO, Martins VV, Pitondo-Silva A, Stehling EG.** Antimicrobial resistance, plasmids and class 1 and 2 integrons occurring in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian aquatic environments. *Water Sci Technol.* 2013; 67(5): 1144-9.
33. **Ranjbar R, Owlia P, Sadari H, Bameri Z, Izadi M, Jonaidi N, et al.** Isolation of clinical strains of

- Pseudomonas aeruginosa* harboring different plasmids. Pak J Biol Sci. 2007; 10(17): 3020-2.
34. **Stokes HW, Martinez E, Roy Chowdhury P, Djordjevic S.** Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms? J Antimicrob Chemother. 2012; 67(7): 1799-800.
  35. **Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P.** Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2013.
  36. **Sepúlveda-Robles O, Kameyama L, Guarneros G.** High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(12): 4510-5.
  37. **James CE, Fothergill JL, Kalwij H, Hall AJ, Cottell J, Brockhurst MA, et al.** Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol. 2012; 12:216.
  38. **Vaca-Pacheco S, Paniagua-Contreras GL, García-González O, de la Garza M.** The clinically isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Curr Microbiol. 1999; 38(4): 239-43.
  39. **Webb JS, Lau M, Kjelleberg S.** Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J Bacteriol. 2004; 186(23): 8066-73.
  40. **Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, et al.** The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. Mol Microbiol. 2000; 38(2): 213-31.
  41. **Harper DR, Enright MC.** Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Appl Microbiol. 2011; 111(1): 1-7.
  42. **Krylov V, Shaburova O, Krylov S, Pleteneva E.** A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections. Viruses. 2013; 5(1): 15-53.
  43. **Soothill J.** Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 11(9): 909-15.

**Revisión de tema: Aceptado revista CES medicina**

Vanegas J.M, Roncancio G.E, Jiménez J.N. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. 2014; 28 (2).

Se adjuntan las galeras enviadas por el editor de la revista.

# BORRADOR

## *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico

*Acinetobacter baumannii*: Clinical importance, resistance mechanisms and diagnosis

■  
JOHANNA MARCELA VANEGAS-MÚNERA<sup>1</sup>, GUSTAVO RONCANCIO-VILLAMIL<sup>2</sup>, JUDY NATALIA JIMÉNEZ-QUICENO<sup>3</sup>

Forma de citar: Vanegas-Múnera JM, Roncancio-Villamil G, Jiménez-Quiceno JN.

*Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. Rev CES Med 2014; 28(2): ??? - ???

### RESUMEN

**A** *cinetobacter baumannii* ha emergido como una bacteria de gran importancia clínica. Esta bacteria ha sido relacionada con altos porcentajes de mortalidad y posee una alta capacidad para diseminarse en el ambiente hospitalario. Con el paso del tiempo, *Acinetobacter baumannii* ha adquirido diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos y en la actualidad se reporta resistencia a carbapenémicos, aminoglicósidos, quinolonas y polimixinas, lo que ha complicado el manejo de las infecciones ocasionadas por esta bacteria. El problema se agrava aún más con las limitaciones en el diagnóstico y la carencia de métodos fenotípicos estandarizados que permitan detectar los mecanismos de resistencia específicos. En Colombia se han descrito altos porcentajes de resistencia a los carbapenémicos, lo que ha limitado las opciones terapéuticas y hace necesario el conocimiento de la epidemiología local para establecer medidas de control más certeras.

---

<sup>1</sup> Microbióloga y Bioanalista. MSc (e). Grupo de Microbiología Molecular. Grupo de Microbiología Básica y Aplicada. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

<sup>2</sup> Médico infectólogo, Clínica Cardio VID.

<sup>3</sup> Bacterióloga, MSc, PhD. Grupo de Microbiología Molecular. Grupo de Microbiología Básica y Aplicada. Docente, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. nataliajudea@gmail.com

**Recibido en:** febrero 6 de 2014. **Revisado en:** junio 25 de 2014. **Aceptado en:** julio 18 de 2014.

## **PALABRAS CLAVE**

*Acinetobacter baumannii*  
Resistencia antimicrobiana  
 $\beta$ -lactamasas  
Pruebas de sensibilidad bacteriana  
Virulencia

## **ABSTRACT**

Currently *Acinetobacter baumannii* has become in a microorganisms of great clinical importance. It has an extraordinary capacity to spread in the hospital environment and it has been associated with high mortality rates. *Acinetobacter baumannii* has acquired different resistance mechanisms to antibiotics with reports resistance to carbapenems, aminoglycosides, quinolones and polymyxins; which has complicated the therapy of the infections caused for this pathogen. The problem is further due to the limitations in the diagnosis and the lack of standardized phenotypic methods to detect specific resistance mechanisms. In Colombia has reported high percentages of resistance to carbapenems, which has reduced therapeutic options. The knowledge of local epidemiology is necessary for establish more assertive control measures.

## **KEY WORDS**

*Acinetobacter baumannii*  
Antimicrobial resistance  
 $\beta$ -lactamases  
Susceptibility tests  
Virulence

## **INTRODUCCIÓN**

*A. baumannii* es una bacteria oportunista de importancia en el ambiente hospitalario (1). Este microorganismo produce amplia variedad de cuadros clínicos y ha desarrollado resistencia a diferentes grupos de antibióticos complicando el manejo de estas infecciones (2). Si bien en la década de los setenta las cepas de *A. baumannii* eran sensibles a la mayoría de antibióticos disponibles, incluyendo los  $\beta$ -lactámicos, en los últimos años la multiresistencia es un fenómeno cada vez más frecuente (3).

La emergencia de resistencia no solo limita el uso de terapias efectivas, sino que también favorece el crecimiento y diseminación de patógenos resistentes, derivados de la presión selectiva que ejercen antimicrobianos empíricos inapropiados que eliminan las poblaciones susceptibles. Por lo anterior, la resistencia antimicrobiana se asocia con hospitalización prolongada, aumento de los costos en salud y mayores tasas de mortalidad (4).

El propósito de esta revisión de tema es describir la importancia clínica y los diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana de *A. baumannii*, así como los diferentes métodos empleados para su diagnóstico, dada las implicaciones de las infecciones ocasionadas por esta bacteria en el ambiente hospitalario y los altos porcentajes de resistencia que presenta.

## **RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN**

La información fue recolectada de tres bases de datos bibliográficas *PubMed*, *Science Direct* y *SpringerLink*. En la búsqueda se seleccionaron artículos en castellano o inglés que fueron publicados preferiblemente entre los años 2003-2013. Los descriptores utilizados en la búsqueda fueron "*A. baumannii*", "resistance", "virulence",

"hospital", " $\beta$ -lactamasas", "Vitek", "Colombia", "Medellín", "Latin America", solos o combinados con el operador booleano "AND" para especificar la búsqueda de la información.

## EL MICRORGANISMO E IMPORTANCIA CLÍNICA

El género *Acinetobacter* comprende un grupo de cobicilos gram negativos, no fermentadores, aerobios estrictos, catalasa positivo y oxidasa negativo (5). En la actualidad se aceptan 33 genespecies que han sido definidas por hibridación ADN-ADN. Entre las que se han relacionado con enfermedad en el humano están: *Acinetobacter calcoaceticus*, (genespecie 1), *Acinetobacter baumannii* (genespecie 2), genespecies 3 y 13 (cuyos nombres propuestos han sido *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis*, respectivamente), *Acinetobacter haemolyticus* (genespecie 4), *Acinetobacter junii* (genespecie 5), *Acinetobacter lwoffii* (genespecie 8), *Acinetobacter johnsonii* y *Acinetobacter ursingii* (6, 7).

El complejo *Acinetobacter baumannii*-*calcoaceticus* (ABC) reúne cuatro especies altamente similares que no pueden ser diferenciadas por pruebas fenotípicas: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* (aisladas con mayor frecuencia en infecciones intrahospitalarias) y *A. calcoaceticus*, presente en la naturaleza y haciendo parte de la microbiota del cuerpo humano (8).

La mayoría de las especies del género *Acinetobacter* son microorganismos que se encuentran en el ambiente (agua, plantas, vegetales, suelo) e incluso en la microbiota normal de la piel humana. Sin embargo, *A. baumannii* no es un microorganismo ubicuo y no se observa con frecuencia en la naturaleza, ni como colonizador en la comunidad (9). Por el contrario, esta bacteria coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico o francamente debilitados por sus comorbilidades, siendo una bacteria típica

de unidades de cuidado intensivo y unidades de quemados.

*A. baumannii* es uno de los agentes más frecuentemente implicados en brotes de infección intrahospitalaria por su capacidad de adherencia y persistencia en equipos biomédicos, teclados, cortinas e incluso teléfonos celulares de los trabajadores de salud, siendo usualmente resistente a desinfectantes de nivel bajo o intermedio (10).

Lo anterior, aunado a su alta capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos, hace de esta genespecie un agente causal de diversas infecciones intrahospitalarias y elevadas tasas de mortalidad (5).

Un estudio realizado en unidades de cuidado intensivo reveló que después de 199 interacciones entre personal de la salud y pacientes colonizados o infectados con *A. baumannii* multiresistente, 38,7 % de los guantes o batas del personal de la salud resultaron contaminados y 4,5 % ellos presentaron contaminación en sus manos después de la remoción de los guantes desechables (10). Estos porcentajes son elevados si se comparan con otros microorganismos de importancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa* que solo se presentó en el 8,2 % de las batas y guantes del personal de salud.

Otro estudio, realizado durante un brote, encontró que *A. baumannii* podía ser recuperado de la cama de pacientes infectados hasta nueve días después del alta hospitalaria, lo que demuestra la habilidad de esta bacteria para sobrevivir por largo tiempo en superficies inanimadas (11). En el medio hospitalario *A. baumannii* origina diversidad de cuadros clínicos, principalmente neumonía asociada a ventilador y bacteremia (12). Otras manifestaciones incluyen infecciones quirúrgicas, infecciones de tracto urinario relacionadas con sondas vesicales, meningitis relacionadas con derivaciones ventriculares externas e infecciones en piel y tejidos blandos en

pacientes quemados y militares heridos en combate (13,14).

En muchas ocasiones los aislamientos de *A. baumannii* obtenidos a partir de muestras respiratorias o de orina, pueden corresponder a una colonización más que a una infección, por lo que la presentación de signos y síntomas cumplen un papel especial para orientar al clínico en la definición del proceso infeccioso (15). Los factores de riesgo que predisponen a infecciones por *A. baumannii* incluyen el uso previo de antibióticos, cirugías mayores, trauma, quemaduras, inmunosupresión y la presencia de dispositivos médicos invasivos, principalmente la ventilación mecánica (5,12).

La mortalidad atribuible a las infecciones por *A. baumannii* es difícil de determinar ya que la bacteria infecta a pacientes con enfermedades graves y diferentes comorbilidades (15). En algunos estudios se ha encontrado que la mortalidad atribuible a la bacteria oscila entre 7,8 y 23 % en salas diferentes a unidades de cuidados intensivos y del 10 al 43 % en dichas unidades (16, 17).

En Colombia, en un estudio realizado en 165 pacientes adultos con infecciones por *A. baumannii*, no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad a 30 días en las infecciones ocasionadas por cepas resistentes a carbapenémicos en comparación a las sensibles; pero dicha resistencia sí fue asociada estadísticamente con mayores costos de hospitalización (18).

Aunque la variedad en los porcentajes de mortalidad está dada por las diferencias en la población y la metodología utilizada, se ha observado que hay ciertos factores que favorecen su aumento en los pacientes infectados con *A. baumannii*. Entre estos se encuentran la estancia en unidades de cuidados intensivos, la administración inadecuada del tratamiento y la resistencia a carbapenémicos (16,19). Se ha reportado que la mortalidad puede ser hasta del 80 % cu-

ando existe infección por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (20).

## MECANISMOS DE RESISTENCIA

*A. baumannii* ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia, entre los cuales se incluyen:  $\beta$ -lactamasas, sobreexpresión de bombas de expulsión, pérdida de porinas y modificación del blanco de acción de los antibióticos.

### Mecanismos de resistencia intrínsecos

*A. baumannii* posee una cefalosporinasa tipo AmpC no inducible denominada ADC (del inglés: *Acinetobacter-derived cephalosporinase*), siendo este el mecanismo de resistencia más frecuente de esta bacteria a los  $\beta$ -lactámicos (6). La sobreexpresión de ADC está mediada por la presencia de secuencias de inserción que contienen promotores que favorecen la transcripción del gen, como la ISAbal e ISAbal25 (21).

Se estima que aproximadamente 50 % de las cepas de *A. baumannii* tienen hiperproducción de ADC (9). Cuando esta enzima se expresa en bajo nivel confiere resistencia a ampicilina; sin embargo, cuando está sobre expresada produce resistencia a cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, sin afectar carbapenémicos, ni cefepime (21). Algunas de estas enzimas (ADC-33 y ADC-56) han sido consideradas como AmpC de espectro extendido o ESAC (del inglés: *extended-spectrum AMPc*), por lo que pueden hidrolizar también cefepime (22).

Otro mecanismo de resistencia intrínseco en *A. baumannii* es la presencia de las oxacilinasas OXA-51, cuya expresión basal hidroliza débilmente penicilinas y carbapenémicos; su sobreexpresión también es mediada por la secuencia de inserción ISAbal en un mecanismo similar a la AmpC cromosómica (23).

## Mecanismos de resistencia adquiridos

$\beta$ -lactámicos: Es poco frecuente encontrar cepas de *A. baumannii* sensibles a todos los  $\beta$ -lactámicos y en especial a las penicilinas y cefalosporinas. Los mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos comprenden mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

Los mecanismos enzimáticos consisten en la degradación del  $\beta$ -lactámico mediada por diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas, dentro de las cuales se encuentran las  $\beta$ -lactamasas de clase A, B o D, de acuerdo con la clasificación de Ambler (24) (cuadro 1). Muchas de estas  $\beta$ -lactamasas pueden estar en elementos genéticos móviles como integrones, plásmidos y transposones, por lo que el uso repetitivo de un antibiótico puede llevar a la expresión de múltiples mecanismos de resistencia que pueden fácilmente diseminarse hacia otras bacterias (9).

Dentro de las  $\beta$ -lactamasas de clase A, se encuentran las de amplio espectro relacionadas con resistencia a penicilinas (TEM-1, TEM-2 y la carbenicilinas CARB-5), las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como VEB-1, PER-1, TEM-92 y CTX-M-2 y las de tipo KPC. (6). Esta última  $\beta$ -lactamasa fue reportada inicialmente en el 2001 en cepas de *Klebsiella pneumoniae* (25), pero en la actualidad se ha diseminado no solo a otras enterobacterias como *Enterobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella entérica* y *Serratia marcescens*, sino también a bacilos gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (26).

Las  $\beta$ -lactamasas de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas comprenden un grupo de enzimas que no son inhibidas por el ácido clavulánico ni por el tazobactam, pero son sensibles a la inhibición por agentes quelantes como el EDTA. De los seis grupos descritos hasta la fecha, cinco han sido identificados en *A. baumannii* incluyendo IMP, VIM, SIM, SPM y NDM (27,28,29). La mayoría de estas enzimas han sido encontradas

en integrones con determinantes de resistencia a aminoglicósidos (9).

Las  $\beta$ -lactamasas de clase D u oxacilinasas son las que se describen con mayor frecuencia en cepas de *A. baumannii*, siendo las principales OXA-24, OXA-23, OXA-51 y OXA-58, estas tres últimas asociadas con el elemento de inserción *ISAba1* que aumenta su expresión. Estas enzimas pueden estar codificadas en plásmidos, excepto OXA-51, codificada en el cromosoma bacteriano y con frecuencia usada como marcador de especie (23). Sin embargo, recientemente esta oxacilinasas, junto con la OXA-58, fueron reportadas en enterobacterias, lo que evidencia la capacidad de diseminación a bacterias de otro género (30).

Los mecanismos no enzimáticos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos incluyen la alteración de las proteínas de membrana externa denominadas OMPs (del inglés: *outer membrane proteins*), que conducen a una disminución de la permeabilidad de la membrana, bombas de expulsión que expulsan el antibiótico y alteración de las proteínas de unión a penicilina o PBPs (del inglés: *penicillin binding protein*), cuando son blanco del medicamento (31).

Con relación a los cambios en las OMPs se han descrito alteraciones en proteínas como la CarO asociada con resistencia a meropenem e imipenem (32) y la OmpW, la cual es homóloga a las OmpW encontradas en *E. coli* y *P. aeruginosa*, que disminuye la entrada de colistina y de los  $\beta$ -lactámicos al interior de la bacteria (9,31). También se ha descrito una OMP de 43 kDa perteneciente a la familia de las OprD (*OprD-like*), relacionada con cierre de porinas para imipenem.

Dentro de las bombas de expulsión, la más estudiada es el sistema AdeABC, que puede expulsar  $\beta$ -lactámicos (incluyendo carbapenémicos), aminoglicósidos, macrólidos, cloranfenicol, tigeciclina, tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim (9).

**Cuadro 1.** Mecanismos enzimáticos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *A. baumannii*

$\beta$ -lactamasa	Variantes	Perfil de resistencia
Clase A	De amplio espectro: TEM-1, TEM-2, BLEE: CARB-5, VEB-1, PER-1, PER-2, TEM-92, TEM-116. SHV-5, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-43 KPC	Penicilinas Cefalosporinas de espectro extendido, aztreonam  Carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.
Clase B	IMP, VIM, SPM, SIM y NDM	Carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas, no hidrolizan el aztreonam
Clase D	OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-51	Carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas

Finalmente, con relación a las proteínas de unión a penicilina, se ha descrito que la ausencia de la PBP2a podría conferir resistencia a imipenem y/o meropenem. La carencia simultánea de esta proteína y de la PBP2b se asocia con niveles de resistencia más elevada a estos antibióticos (6).

**Aminoglicósidos:** existen diferentes enzimas modificantes de aminoglicósidos y bombas de expulsión que confieren resistencia a este grupo de antibióticos (33). Las enzimas modificantes (acetiltransferasas -AAC-, nucleotiltransferasas -ANT- y fosfotransferasas -APH-) producen diferentes fenotipos de resistencia selectiva en los aminoglicósidos (34).

Sin embargo, cuando estas enzimas se combinan con bombas de expulsión como la AdeABC pueden conferir resistencia a todos los aminoglicósidos (6). La metilación de la subunidad 16S del rRNA mediada por el gen *armA* también ha sido descrita en *A. baumannii* y al actuar sobre el blanco de acción de los aminoglicósidos también confiere resistencia a todos ellos (34). La gentamicina y la kanamicina también son sustratos para la bomba AbeM (9) (cuadro 2).

**Quinolonas:** la resistencia a quinolonas está mediada por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican para las subunidades A de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, respectiva-

mente (33). Las quinolonas son sustratos de las bombas AdeABC y la AbeM (9) (cuadro 2).

**Tetraciclinas y glicilciclinas:** la resistencia de *A. baumannii* a este grupo de antibióticos está mediada por bombas de expulsión y proteínas de protección ribosomal. Las bombas de expulsión incluyen TetA y TetB, codificadas por los genes *tet(A)* y *tet(B)*; la primera confiere resistencia solo a tetraciclina, mientras que la segunda expulsa tetraciclina y minociclina (35). La codificación de las proteínas de protección ribosomal está mediada por el gen *tet(M)*, en un mecanismo idéntico al descrito en *Staphylococcus aureus*, pero que se encuentra poco en *A. baumannii* (9). La bomba expulsión AdeABC también puede expulsar tetraciclinas y la tigeciclina (cuadro 2).

**Colistina:** la resistencia a colistina ha sido asociada con el gen *pmrA* y *pmrB* que origina cambios en genes relacionados con la modificación del lípido A, con la pérdida o deficiencia de la producción de lipopolisacárido y con la modificación de la porina OmpW (36) (37) (cuadro 2).

**Trimetoprim, sulfonamidas y cloranfenicol:** la resistencia a sulfonamida está mediada por el gen *sul* que se encuentran en la región 3' de un integron (9). El gen *dhfr* confiere resistencia a trimetoprim, mientras que la bomba de expul-

sión CraA (del inglés: *chloramphenicol resistance Acinetobacter*) confiere resistencia a cloranfenicol. La bomba AdeABC también confiere resistencia a estos dos últimos antibióticos (9,35) (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Mecanismos de resistencia de *A. baumannii* a antibióticos diferentes de los β-lactámicos

Grupo de antibióticos	Mecanismo de resistencia	Variantes	Perfil de resistencia
Aminoglicósidos	Enzimas modificadoras de aminoglicósidos	AAC, ANT, APH	Variable
	Metilación 16S RNA	<i>armA</i>	Todos los aminoglicósidos
	Bombas de expulsión	AdeABC	Todos los aminoglicósidos.
Quinolonas	Bombas de expulsión	AdeM	Gentamicina, kanamicina
		<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	Variable
	Mutación genética	AdeABC	Todas las quinolonas
Tetraciclinas, glicilciclinas	Bombas de expulsión	AdeM	Variable
		Tet (A)	Tetraciclina, pero no minociclina
		Tet (B)	Tetraciclina, minociclina
	Protección ribosomal	AdeABC	Tetracilinas, glicilciclinas
Polimixinas	Modificación lípido A	<i>tet(M)</i>	Tetraciclinas
		<i>pmrA</i> , <i>pmrB</i>	Colistina
Trimetoprim, sulfonamidas, Cloranfenicol	Modificación porinas	OmpW	Colistina
		Alteración del blanco	<i>sul</i>
	Bombas de expulsión	<i>dnfr</i>	Trimetoprim
		CraA	Cloranfenicol
		AdeABC	Trimetoprim, cloranfenicol

## DIAGNÓSTICO Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

*A. baumannii* es un cocobacilo que tiende a retener el cristal violeta, por lo que puede ser identificado erróneamente como una bacteria gram positiva (38). Sumado a esto, las pruebas de identificación convencionales y comerciales tienen limitaciones en la diferenciación de las especies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis* que pertenecen al complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, por lo que algunas cepas pueden ser identificadas como *A. baumannii* sin realmente serlo (39).

Esto ha ocurrido con métodos como el API 20NE (40) y con los sistemas automatizados Vitek 2, Phoenix y MicroScan WalkAway; en los cuales los sustratos no son específicos para la diferenciación de las especies que componen dicho complejo y las bases de datos carecen de información para su identificación (9). Por lo anterior, la diferenciación de estas especies solo es posible por pruebas moleculares basadas en patrones de restricciones de genes que codifican para el rRNA o la proteína RecA (12).

Con respecto a las pruebas de sensibilidad, el E-test ha presentado falencias en la detección de la resistencia a tigeciclina, uno de los antibióticos usados para el tratamiento de cepas resistentes a carbapenémicos (41).



Sin embargo, el CHROMagar *Acinetobacter* es un método comercial que ha sido utilizado para la identificación de *A. baumannii* multirresistente y ha demostrado ser selectivo para esta bacteria y para aquellas cepas resistentes a carbapenémicos (42). Los métodos automatizados también tienen falencias en la detección de resistencia antimicrobiana, tal y como lo demuestra un estudio realizado para evaluar la sensibilidad a carbapenémicos en cepas del complejo *A. baumannii* - *A. calcoaceticus*, utilizando tres métodos manuales (E-test, difusión en disco y microdilución) y tres automatizados (MicroScan, Phoenix y Vitek 2) (43). En este estudio los métodos manuales tuvieron un mejor desempeño frente a los métodos automatizados, al ser comparados con el método de referencia (microdilución).

A la fecha no se cuenta con métodos fenotípicos estandarizados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para la detección de  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, algunas técnicas han tenido un buen desempeño en la detección de metalo- $\beta$ -lactamasas como la prueba de sinergismo con EDTA. Esta técnica se basa en la capacidad de los quelantes como el EDTA para interactuar con el zinc que está en el sitio activo de estas enzimas. Para esto se colocan dos discos de imipenem y dos de meropenem de 10  $\mu$ g en un agar Mueller Hinton y a un disco de cada antibiótico se le adiciona EDTA (44). Un resultado positivo está dado por la presencia de una zona de agrandamiento del halo en el disco que tiene el quelante. Algunos quelantes como en MPA (3  $\mu$ l) y SMA (3 mg) en combinación con el EDTA han demostrado ser mejores para la detección de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Acinetobacter* (45).

En el *Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas* -CIDEIM- se modificó el test tridimensional, usado previamente para la detección de AmpC, para la detección de carbapenemasas incluyendo KPC, oxacilinasas y metalo- $\beta$ -lactamasas.

Esta prueba ha sido utilizada por varias instituciones hospitalarias y grupos de investigación

como el nuestro, con resultados satisfactorios no solo para *A. baumannii*, sino también para otras bacterias como *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. En esta prueba se agrega un extracto bacteriano, obtenido por lisis mecánica, en un hendidura ubicada a 5 mm de un disco de imipenem en un agar Muller Hinton sembrado con una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Un resultado positivo está dado por una deformidad del halo de inhibición después de una incubación a 37 °C durante 18-24 horas (46).

La carencia de técnicas fenotípicas estandarizadas para la detección de mecanismos de resistencia en *A. baumannii*, ha llevado a que las técnicas basadas en biología molecular constituyan una excelente alternativa. Así, mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa pueden ser detectadas no solo las oxacilinasas OXA-51, OXA-58, OXA-23 y OXA-24, también las carbapenemasas NDM y KPC y la secuencia de inserción ISAba1 (47, 48).

La epidemiología molecular, que combina los métodos de biología molecular con la epidemiología tradicional, ha sido un buen instrumento para el estudio de la diseminación de esta bacteria en el ambiente hospitalario. El uso de electroforesis en gel de campo pulsado, la tipificación de secuencias de múltiples locus y la tipificación por amplificación de secuencias repetidas, han permitido conocer el comportamiento y diseminación clonal de las cepas de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario (49-51).

## SITUACIÓN EN SURAMÉRICA Y EN COLOMBIA

Los porcentajes de resistencia en bacterias gram negativas, incluyendo *A. baumannii*, son más altos en Suramérica en comparación con los de Europa y Estados Unidos (52). En un estudio realizado por el *Programa de Vigilancia* SENTRY en el

que se evaluaron los porcentajes de resistencia de bacilos gram negativos recolectados en Argentina, Brasil y Chile, se encontró que los porcentajes de resistencia a imipenem en *A. baumannii* aumentaron de 6,4 % , 12,6 % y 0,0 % en el 2008 a 84,9 % , 71,4 % y 50,0 % en el 2010 en Argentina, Brasil y Chile, respectivamente (53).

En estas cepas se encontraron diferentes oxacilinasas: Argentina OXA-23 y OXA-24, Brasil OXA-23, Chile OXA-58 y México OXA-24. La OXA-58 también se ha descrito en Bolivia y Venezuela (54,55). La metalo- $\beta$ -lactamasa IMP ha sido descrita en Brasil y Puerto Rico fue el primer país en reportar KPC en esta bacteria (56)

En Colombia, diferentes estudios han sido realizados por el CIDEIM, que reportó para 2005 una resistencia a carbapenémicos cercana al 38 % en *A. baumannii*, y que aumentó a 41 % para el 2008 y 45,5 % para el año 2009 (57,58).

En un estudio realizado en seis ciudades del país donde se recolectaron 66 aislamientos de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, OXA-51 fue detectada en todas las muestras y OXA-23 en 65 de los 66 aislamientos (52). En estas cepas la secuencia de inserción ISAba1 se encontró asociada con la OXA-23. Aunque en el país solo se había reportado la diseminación de OXA-23 (52), en el 2010 se reportó la presencia de OXA-72 (perteneciente al grupo de OXA-24) en un aislamiento de *A. baumannii* en un hospital de tercer nivel de complejidad en Bogotá (59).

La presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en cepas de *A. baumannii* ha sido reportada en el país usando la prueba de sinergismos con imipenem y EDTA, encontrándose en una frecuencia de 17,7 % de 45 aislamientos resistentes a carbapenémicos (60). En febrero del 2013, se reportó en Cali el primer caso de *A. baumannii* productor de la metalo- $\beta$ -lactamasa NDM, a partir de una muestra de secreción abdominal, confirmado por biología molecular (61).

Con relación a la resistencia a quinolonas, en Montería se reportó la presencia de mutaciones

del gen *gyrA* en aislamientos de *A. baumannii* resistentes a quinolonas, mientras que los genes *parC* y *adeB* no fueron encontrados (62). En la caracterización de un brote de *A. baumannii* en una unidad de cuidados intensivos de Bogotá, se encontró que los aislamientos estaban relacionados genéticamente, basados en electroforesis en gel de campo pulsado y se pudo determinar que la nutrición parenteral y el tiempo de exposición antibióticos estuvieron asociados con la infección (63).

En Medellín, el Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín (GERMEN), que recoge la información de los perfiles de sensibilidad bacteriana de 25 hospitales y nueve laboratorios clínicos del Valle de Aburrá, reportó para 2013 una sensibilidad de 56,2 % y 60,9 % a meropenem e imipenem, respectivamente, en aislamientos provenientes de unidades de cuidados intensivos, y de 73,9 % y 72,4 % a meropenem e imipenem, respectivamente, en aislamientos obtenidos en servicios de hospitalización diferentes a unidades de cuidados intensivos (64). En esta ciudad, solo se ha reportado la presencia de OXA-23, la cual ha sido relacionado con la alta resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos en el país (52).

## CONCLUSIÓN

*A. baumannii* es una bacteria que con el paso el tiempo ha ganado una alta importancia clínica y hace parte de los microorganismos que causan infecciones intrahospitalarias y mayor mortalidad. Esta revisión describe la capacidad que tiene la bacteria de desarrollar resistencia a los antimicrobianos y la habilidad de diseminarse a pacientes y al ambiente hospitalario. Diferentes estudios han demostrado que el uso de una terapia inadecuada puede originar la expresión de mecanismos de resistencia y aumentar los porcentajes de mortalidad; de ahí que la terapia empírica sea determinante para la evolución del paciente y más aún con las limitaciones de

los métodos comerciales para la identificación y sensibilidad de la bacteria.

A pesar de que en nuestra región se conocen los porcentajes de resistencia a carbapenémicos, se conoce poco sobre la epidemiología de estas infecciones y los mecanismos moleculares que median dicha resistencia, una información relevante para el establecimiento de medidas de prevención y control más certeras.

### **Financiación**

Este trabajo fue realizado en el marco de un proyecto financiado por el *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias* (proyecto: 418-2011) y por el Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, Universidad de Antioquia (proyecto: CIMB-068-12).

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Memish ZA, Shibl AM, Kambal AM, Ohaly YA, Ishaq A, Livermore DM. Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1701-5.
2. Gaynes R, Edwards JR, System NNIS. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):848-54.
3. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(12):939-51.
4. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):736-55.
5. Torres HA, Vázquez EG, Yagüe G, Gómez JG. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. *Rev Esp Quimioter.* 2010;23(1):12-9.
6. Vila J, Marco F. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(10):726-36.
7. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.* 2011;162(4):393-404.
8. Kamolvit W, Higgins PG, Paterson DL, Seifert H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2013.
9. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538-82.
10. Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK, Harris AD, Furuno JP, et al. Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31(7):716-21.
11. Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, Di Martino A, Maimone SM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *J Hosp Infect.* 1999;42(1):27-35.
12. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(11):868-73.
13. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infec-

- tion associated with war trauma. *Clin Infect Dis*. 2008;47(4):444-9.
14. Barbut F, Yezli S, Mimoun M, Pham J, Chaouat M, Otter JA. Reducing the spread of *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burns unit through the intervention of an infection control bundle. *Burns*. 2012.
  15. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(2):105-14.
  16. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care*. 2006;10(2):R48.
  17. Kim YJ, Kim SI, Hong KW, Kim YR, Park YJ, Kang MW. Risk factors for mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: impact of appropriate antimicrobial therapy. *J Korean Med Sci*. 2012;27(5):471-5.
  18. Lemos EV, De la Hoz Restrepo F, Alvis N, Quevedo E, Cañon O, León Y. *Acinetobacter baumannii* - related mortality in intensive care units in Colombia. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(4):287-94.
  19. Prata-Rocha ML, Gontijo-Filho PP, Melo GB. Factors influencing survival in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(3):237-41.
  20. Kim SY, Jung JY, Kang YA, Lim JE, Kim EY, Lee SK, et al. Risk factors for occurrence and 30-day mortality for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in an intensive care unit. *J Korean Med Sci*. 2012;27(8):939-47.
  21. Lopes BS, Amyes SG. Role of ISAbal and ISAbal25 in governing the expression of blaADC in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 8):1103-8.
  22. Tian GB, Adams-Haduch JM, Taracila M, Bonomo RA, Wang HN, Doi Y. Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4922-5.
  23. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(3):219-26.
  24. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-31.
  25. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151-61.
  26. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J*. 2011;104(1):40-5.
  27. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo- $\beta$ -lactamase and carbapenemase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J Microbiol*. 2011;3(2):68-74.
  28. Niranjana DK, Singh NP, Manchanda V, Rai S, Kaur IR. Multiple carbapenem hydrolyzing genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31(3):237-41.



29. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2253-4.
30. Leski TA, Bangura U, Jimmy DH, Ansumana R, Lizewski SE, Li RW, et al. Identification of blaOXA-51-like, blaOXA-58, blaDIM-1, and blaVIM Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra Leone. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2435-8.
31. Tiwari V, Vashist J, Kapil A, Moganty RR. Comparative proteomics of inner membrane fraction from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with a reference strain. *PLoS One.* 2012;7(6):e39451.
32. Mussii MA, Relling VM, Limansky AS, Viale AM. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for ornithine uptake. *FEBS Letters.* 2007; 581(29):5573-8
33. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J.* 2011;52(6):879-91.
34. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1132-8.
35. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):947-53.
36. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971-7.
37. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3628-34.
38. Allen D, Hartman B. *Acinetobacter* species. En: Mandell G, Bernet J, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2005. Pp. 2634-2636.
39. Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, et al. Antimicrobial susceptibility testing in clinically relevant non-fermenting gram-negative bacilli: recommendations from the Antimicrobial Agents Subcommittee of the Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43(2):136-53.
40. Bernards AT, van der Toorn J, van Boven CP, Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15(4):303-8.
41. Akin FE, Bayram A, Balci I. Comparison of disc diffusion, E-test, and broth microdilution methods for the determination of resistance to colistin, polymyxin B, and tigecycline in multi-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):203-10.
42. Wareham DW, Gordon NC. Modifications to CHROMagar *Acinetobacter* for improved selective growth of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Pathol.* 2011;64(2):164-7.
43. Markelz AE, Mende K, Murray CK, Yu X, Zera WC, Hospenthal DR, et al. Carbapenem susceptibility testing errors using three automated systems, disk diffusion, Etest, and broth

- microdilution and carbapenem resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4707-11.
44. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá GREBO. Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100-S20. 2010: 29.
  45. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4623-9.
  46. Correa A. Evaluación del test tridimensional como tamizaje inicial para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. VI Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas 2008.
  47. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;258(1):72-7.
  48. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- $\beta$ -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1419-21.
  49. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62(5):372-7.
  50. Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Testore GP, Leonardis F, et al. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. *BMC Infect Dis.* 2008;8:79.
  51. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4382-90.
  52. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2001-4.
  53. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):354-60.
  54. Sevillano E, Fernández E, Bustamante Z, Zabalaga S, Rosales I, Umanan A, et al. Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolivia. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 1):80-4.
  55. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(4):311-6.
  56. Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45(1):77-9.
  57. Miranda MC, Perez F, Zuluaga T, Olivera Mdel R, Correa A, Reyes SL, et al. Antimicrobial resistance in gram negative bacteria isolated from intensive care units of Colombian hospitals, WHONET 2003, 2004 and 2005. *Biomedica.* 2006;26(3):424-33.



58. Briceño DF, Correa A, Valencia C, Torres JA, Pacheco R, Montealegre MC, et al. Antimicrobial resistance of Gram negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia. *Biomedica*. 2010;30(3):371-81.
59. Saavedra SY, Castillo JS, LEAL AL, Saavedra C. First report of OXA-72 carbapenemase in clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Colombia. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 - 13 April 2010
60. Pedro M, Máximo M, Salim M. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productores de meyalo-B-lactamasas en el principal hospital de Córdoba. *Infectio*; 2005. p. 6.
61. Vigilancia epidemiológica comunitaria en las entidades territoriales departamentales y distritales, Colombia, 2012, *Inf Quinc Epidem Nac* 2013; 18 (10): 111-120.
62. Pedro M, Salim M. Mutación en el gen *gyrA* de aislamientos hospitalarios de *Acinetobacter baumannii* en Montería, Colombia. *Infectio*; 2010. p. 97-104.
63. Nancy Y, Cristina SI, Paula H, Hernando G, Hernando A, Milciades I, et al. Caracterización de un brote de infección por *Acinetobacter baumannii* en una unidad de cuidado crítico, Bogotá, Colombia. *Infectio*; 2008.
64. Grupo para el Estudio de la Resistencia a antibióticos de Medellín [acceso 10 de octubre de 2013]. *Acinetobacter baumannii*. Disponible en: <http://www.grupogermen.org/pdf/Acinetobacter.pdf>

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

---

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en una preocupación global y constituye un grave problema de salud pública, dado que las infecciones causadas por microorganismos resistentes originan largos períodos de hospitalización, mayores costos hospitalarios y alta mortalidad (101, 102). La organización Mundial de la Salud ha definido la resistencia antimicrobiana como uno de los principales problemas que afecta la salud de la población y propone como una de las estrategias de control el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica por parte de los laboratorios (101).

La emergencia de la resistencia a carbapenémicos ha limitado sustancialmente las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones ocasionadas por los bacilos gram negativos de importancia clínica, tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*; infecciones cada vez más frecuentes en el medio hospitalario (103).

En este estudio, la utilización de técnicas moleculares como un complemento al estudio epidemiológico las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos permitieron obtener información más precisa sobre el comportamiento de estas infecciones a nivel local a través de: (i) el conocimiento de las condiciones propias de cada institución en torno a la resistencia en los microorganismos estudiados como base para enfrentar el problema, (ii) la identificación de patrones de resistencia de acuerdo con el mecanismo implicado, (iii) la identificación de los clones que circulan en la ciudad,

(iv) la diseminación de clones exitosos y (v) el aporte de información importante para el control de estas infecciones.

- Conocimiento de las condiciones propias en torno a la resistencia: Se concluyó que la epidemiología de la resistencia a carbapenémicos varía dependiendo de cada región, inclusive dentro de cada hospital. Tal es el caso de la diseminación de la carbapenemasa KPC en *P. aeruginosa* en una frecuencia similar a la metalo- $\beta$ -lactamasa VIM, considerada la carbapenemasa de mayor frecuencia en esta bacteria (10, 33) (104). La sospecha y búsqueda de esta carbapenemasa generalmente se ha centrado en enterobacterias, principalmente en *Klebsiella pneumoniae*, donde fue descrita por primera vez (39). Estos resultados evidencian la importancia de sospechar y fortalecer la vigilancia epidemiológica de la resistencia a carbapenémicos mediada por esta enzima, no solo en enterobacterias, sino también en bacilos no fermentadoras como *P. aeruginosa*. Más aún cuando Colombia es un país endémico para la carbapenemasa KPC y *P. aeruginosa* podría ser un reservorio para la diseminación de esta enzima hacia otras bacterias (71) (105). Adicionalmente, se resalta la importancia de esta bacteria fuera de UCI y causando principalmente infecciones de tracto urinario.

Por otra parte, la presencia de *A. baumannii* en infecciones de piel y tejidos blandos y en osteomielitis, resalta la presencia de esta bacteria fuera de UCI y en infecciones diferentes a bacteriemia y neumonía, con las cuales se asocia frecuentemente (106-108). Aunque algunos estudios documentan la presencia de *A. baumannii* en infecciones en piel y tejidos blandos y en osteomielitis en militares heridos en combate (109, 110), esta característica no fue observada en nuestra

población de estudio y sugiere la importancia de incluir esta bacteria en el diagnóstico diferencial de estas infecciones y de mejorar su búsqueda en pacientes hospitalizados en salas diferentes a UCI.

- Identificación de patrones de resistencia de acuerdo con el mecanismo implicado: En este estudio se encontró que los aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas presentaron porcentajes de resistencia superiores al 80% para la mayoría de antibióticos evaluados, incluyendo  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas, lo que sugiere la presencia simultánea de diferentes mecanismos de resistencia diseminados a través de elementos genéticos móviles (25). En el caso de *P. aeruginosa*, el fenotipo de multirresistencia puede llevar a sospechar desde el antibiograma la presencia de un aislamiento productor de carbapenemasas. Este hecho podría orientar al clínico a la selección de la terapia adecuada para estas infecciones, dado que el principal mecanismo de resistencia de esta bacteria a los carbapenémicos no está mediado por carbapenemasas y muchas de las infecciones podrían ser tratadas inclusive con otros  $\beta$ -lactámicos, sin necesidad de recurrir a tratamientos tóxicos como colistina.

- Identificación de los clones que circulan en la ciudad: Es conocido que existen ciertas cepas bacterianas con la capacidad de soportar el costo biológico que implica la presencia de mecanismos de resistencia (111, 112). En este estudio se logró identificar la presencia de clones exitosos a nivel mundial por portar mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos como el ST235 y el ST111 en aislamientos de *P. aeruginosa* productora de KPC y VIM, respectivamente y el

clon ST229 en *A. baumannii* (113). La presencia de estos clones en Medellín sugiere su importación desde otros países a la ciudad. No obstante, los siete nuevos ST encontrado en *P. aeruginosa* y la alta diversidad genética encontrada por PFGE para ambas bacterias evidencia una alta presión de antibióticos que favorece la emergencia de diversas cepas resistentes. Esto resalta la importancia del uso racional de antibióticos, como una estrategia para el control de estas infecciones en los hospitales de la ciudad.

- Conocimiento sobre la diseminación de clones exitosos: La presencia de la carbapenemasa KPC en *P. aeruginosa* podría llevar a pensar sobre la diseminación de un mismo clon exitoso en los cinco hospitales de estudio. Sin embargo, los clusters o grupos de aislamientos relacionados genéticamente en cada institución es sugestivo de una transmisión intrahospitalaria de estos aislamientos más que interhospitalaria, que podría presentarse según con las condiciones propias de cada institución (114). Tal es el caso del nuevo clon reportado ST1801, el cual portaba KPC y se encontraba encontrado predominando en el hospital D y del ST235, presente en los hospitales A y B.

- Aporte de información que contribuya al control de estas infecciones: Los resultados del estudio muestran que el uso previo de carbapenémicos fue una característica presente en casi la mitad de los pacientes infectados con *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a los carbapenémicos, lo que sugiere el uso racional de este tipo de antibióticos como una estrategia importante para el control de estas infecciones. Lo anterior es soportado por diferentes estudios en los que se ha reportado el uso previo de carbapenémicos como un factor de riesgo

independiente asociado con la resistencia a este mismo grupo de antibióticos (115, 116). Adicionalmente, es importante de-escalar una vez se conozca el resultado del antibiograma, ya que el uso persistente e innecesario de estos antibióticos puede favorecer la emergencia de nuevas cepas resistentes.

Teniendo en cuenta que entre las características clínicas más frecuentes en la población de estudio se encontraron tener una edad mayor a 55 años, la presencia de comorbilidades y el uso previo de antibióticos, estas variables deben ser valoradas dentro de la población vulnerable de sufrir estas infecciones. Adicionalmente, es importante continuar con el fortalecimiento de medidas de contacto como el lavado de manos y el aislamiento de pacientes, que eviten la transmisión de una misma cepa bacteriana. Lo anterior sumado al uso racional de antibióticos y al control ambiental de estos microorganismos, teniendo en cuenta que *P. aeruginosa* y *A. baumannii* son bacterias ambientales que pueden estar durante largos períodos de tiempo sobre superficies inanimadas.

Finalmente, el test tridimensional es una prueba fenotípica que puede ser utilizada como tamizaje en los laboratorios de Microbiología para la búsqueda de carbapenemasas en bacterias como *P. aeruginosa*, en las que el test de Hodge modificado no ha mostrado un buen desempeño. Esto fue evidenciado por la concordancia entre esta prueba fenotípica y la amplificación de genes por PCR y la detección de carbapenemasas tanto de clase A como de clase B.

En conclusión, este estudio evidencia la importancia del conocimiento de la epidemiología de la resistencia a carbapenémicos en cada región, así como las ventajas que se derivan del uso de pruebas moleculares que apoyen la vigilancia estas infecciones en la ciudad (114). Este estudio permitió un mayor acercamiento al problema de la resistencia a carbapenémicos en la ciudad de Medellín y constituye el primer paso para el diseño de estudios epidemiológicos analíticos posteriores que logren la detección de factores de riesgo asociados con estas infecciones y su impacto en el medio hospitalario.

## 7. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

---

### 7.1. Limitaciones

Si bien el estudio permitió conocer el comportamiento de las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos, las limitaciones presentadas fueron las siguientes:

- No se realizó la cuantificación de la expresión génica de los otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, tales como la AmpC, la bomba de expulsión MexAB-OprM y la porina OprD.
- No se realizó la tipificación de los elementos genéticos móviles que contenían las carbapenemasas, tales como plásmidos, integrones y transposones, lo que permitiría el conocimiento sobre la transmisión y diseminación de una bacteria a otra de estos mecanismos de resistencia.
- No se pudo acceder a la tipificación molecular de todos los aislamientos por MLST, dado el alto costo de la técnica.

## 7.2. Perspectivas

Derivado del proyecto de investigación se espera la generación de conocimientos a través de nuevas propuestas de investigación y aplicación práctica de los resultados obtenidos:

### Propuestas de investigación:

- Detección de mecanismos de resistencia a carbapenémicos no mediados por carbapenemasas en *P. aeruginosa*: En este sentido se propone realizar la cuantificación genética de la  $\beta$ -lactamasa AmpC, la bomba de expulsión MexAB-OprM y la porina OprD y relacionarlo con el perfil de resistencia del antibiograma, con el fin de detectar posibles patrones de resistencia asociados con estos mecanismos de resistencia y la presencia de carbapenemasas.
- Tipificación de los elementos genéticos móviles que contienen las diferentes clases de carbapenemasas: Lo anterior para conocer los mecanismos de transmisión de estos genes de resistencia de una bacteria otra, ya que la presencia de carbapenemasas como la KPC en *P. aeruginosa*, descrita inicialmente en enterobacterias, podría sugerir la transmisión de esta enzima de esta grupo de bacterias hacia bacterias no fermentadoras.

- Evaluación del test de Hodge modificado en agar MacConkey para la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos no fermentadores: Debido a que el acceso a las técnicas de biología molecular no es posible para todos los laboratorios clínicos, se espera la evaluación de métodos fenotípicos que puedan ser aplicados de forma rutinaria y que puedan detectar la presencia de carbapenemasas con altos porcentajes de sensibilidad y especificidad. Esto debido a la carencia de métodos fenotípicos aprobados para la detección de estas enzimas en bacilos gram negativos no fermentadores como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.
  
- Impacto de los esquemas terapéuticos sobre el desenlace del paciente: Dado que el uso racional de antibióticos se propone como una de las principales estrategias para el control de las infecciones por bacterias resistentes, se realizará un análisis sobre los diferentes esquemas terapéuticos utilizados como tratamiento dirigido en los pacientes estudiados y su asociación con los desenlaces en términos de muerte, curación, mejoría o falla terapéutica; lo cual sería de gran ayuda para el quehacer clínico.
  
- De los trabajos mencionados se espera la formación de estudiantes de pregrado que logren contribuir al problema de la resistencia en ciudad.

### **Aplicación práctica de los resultados obtenidos:**

- En cada institución participante del estudio se espera continuar realizando reuniones periódicas informando sobre los resultados obtenidos y sus implicaciones, con el fin de aportar al establecimiento de medidas de prevención y control de las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, de acuerdo a las condiciones particulares presentadas cada centro hospitalario.
- Derivado de los resultados de macroproyecto se amplió el portafolio de servicios que pone a disposición todas las técnicas fenotípicas y moleculares estandarizadas en el proyecto, con el objetivo de realizar una vigilancia epidemiológica más precisa de las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en la ciudad de Medellín.

## 8. REFERENCIAS

1. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(5):518-24.
2. Martínez MJ, García MI, Sánchez EG, Sánchez JE. Available carbapenems: Properties and differences. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Suppl 2:53-64.
3. GERMEN. Perfiles de sensibilidad a antibióticos. *Pseudomonas aeruginosa*. [Fecha de acceso: 12 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://www.grupogermen.org/>.
4. GERMEN. Perfiles de sensibilidad a antibióticos. *Acinetobacter baumannii* [Fecha de acceso: 12 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://www.grupogermen.org/>.
5. Field N, Cohen T, Struelens MJ, Palm D, Cookson B, Glynn JR, et al. Strengthening the Reporting of Molecular Epidemiology for Infectious Diseases (STROME-ID): an extension of the STROBE statement. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(4):341-52.
6. Briceño DF, Correa A, Valencia C, Torres JA, Pacheco R, Montealegre MC, et al. [Antimicrobial resistance of Gram negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia]. *Biomedica*. 2010;30(3):371-81.
7. Briceño DF, Correa A, Valencia C, Torres JA, R. P, Montealegre MC, et al. Actualización de la resistencia a antimicrobianos de bacilos Gram negativos aislados en hospitales de nivel III de Colombia: años 2006, 2007 y 2008. *Biomédica*. 2010;30:371-81.
8. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610.
9. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*. 2011;2:150.
10. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):338-44.
11. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007;67(3):351-68.
12. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010;28(Supplement 1):19-28.
13. Pier G, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2. Seventh ed. New York: Elsevier; 2010. p. 2835-59.
14. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. January 2013.
15. Vila J, Marco F. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(10):726-36.

16. Torres HA, Vázquez EG, Yagüe G, Gómez JG. [Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights]. *Rev Esp Quimioter*. 2010;23(1):12-9.
17. Kamolvit W, Higgins PG, Paterson DL, Seifert H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2013.
18. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538-82.
19. Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK, Harris AD, Furuno JP, et al. Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(7):716-21.
20. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(11):868-73.
21. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis*. 2008;47(4):444-9.
22. Barbut F, Yezli S, Mimoun M, Pham J, Chaouat M, Otter JA. Reducing the spread of *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burns unit through the intervention of an infection control bundle. *Burns*. 2012.
23. Chan-Tompkins NH. Multidrug-resistant gram-negative infections. *Crit Care Nurs Q*. 2011;34(2):87-100.
24. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41(6):848-54.
25. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-58, table of contents.
26. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
27. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):1050-1.
28. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;254(2):217-25.
29. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*. 2011;6.
30. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*. 2003;2(1):48-62.
31. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(2):63-8.

32. Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, et al. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):2219-24.
33. Juan Nicolau C, Oliver A. [Carbapenemases in *Pseudomonas* spp]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28 Suppl 1:19-28.
34. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1553-5.
35. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino EE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1660-4.
36. Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, et al. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. *Infect Genet Evol.* 2012;12(8):2003-5.
37. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2670-1.
38. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5350-3.
39. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-61.
40. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(4):367-71.
41. Sacha P, Wiczorek P, Hauschild T, Zorawski M, Olszanska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(2):137-42.
42. Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36(3):245-58.
43. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3929-31.
44. Jovčić B, Lepšanović Z, Begović J, Filipić B, Kojić M. Two copies of blaNDM-1 gene are present in NDM-1 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Serbia. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014;105(3):613-8.

45. Carattoli A, Fortini D, Galetti R, Garcia-Fernandez A, Nardi G, Orazi D, et al. Isolation of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type ST235 from a stem cell transplant patient in Italy, May 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(46).
46. Khajuria A, Prahraj AK, Kumar M, Grover N. Emergence of NDM - 1 in the Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(7):1328-31.
47. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4828-33.
48. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(3):219-26.
49. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2968-70.
50. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1354-7.
51. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(9):826-36.
52. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo- $\beta$ -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J Microbiol.* 2011;3(2):68-74.
53. Niranjana DK, Singh NP, Manchanda V, Rai S, Kaur IR. Multiple carbapenem hydrolyzing genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol.* 2013;31(3):237-41.
54. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2253-4.
55. Yamamoto M, Nagao M, Matsumura Y, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, et al. Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying blaIMP-19 among *Acinetobacter* species in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2011.
56. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, et al. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):1998-2001.
57. Espinal P, Fugazza G, López Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, et al. Dissemination of the NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011.
58. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2001-4.

59. Leski TA, Bangura U, Jimmy DH, Ansumana R, Lizewski SE, Li RW, et al. Identification of blaOXA-51-like, blaOXA-58, blaDIM-1, and blaVIM Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra Leone. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2435-8.
60. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):233-8.
61. Tiwari V, Vashist J, Kapil A, Moganty RR. Comparative proteomics of inner membrane fraction from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with a reference strain. *PLoS One*. 2012;7(6):e39451.
62. A MM, M RV, S LA, M VA. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for -ornithine uptake. *FEBS Letters*; 2007.
63. Fernandez-Cuenca F. [Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(6):355-60.
64. Traub RJ, Monis PT, Robertson ID. Molecular epidemiology: a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *Int J Parasitol*. 2005;35(11-12):1295-307.
65. Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiol*. 2014;37(1):1-15.
66. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc*. 2007;2(3):677-84.
67. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.
68. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(5):372-7.
69. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2013;16:38-53.
70. Hernández-Gómez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Vallejo M, Villegas MV, et al. [Evolution of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli from intensive care units in Colombia]. *Biomedica*. 2014;34 Suppl 1:91-100.
71. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(9):785-96.
72. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5094-101.

73. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, et al. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):226-9.
74. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, et al. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 56. United States 2012. p. 5422-3.
75. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, González-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(4):311-6.
76. Martínez P, Mattar S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAba1-bla OXA-23,51 and ISAba1-bla ADC-7 genes in Monteria, Colombia. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1274-80.
77. Saavedra SY, Cayô R, Gales AC, Leal AL, Saavedra CH. Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. *Braz J Infect Dis.* 2014.
78. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(12):939-51.
79. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011.
80. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, et al. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(2):114-8.
81. Jimeno A, Alcalde MM, Blazquez A. [Epidemic outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant producing metallo-beta-lactamase.]. *Rev Clin Esp.* 2011.
82. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):112-22.
83. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):102-11.
84. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
85. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(12):1099-106.
86. Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, Di Martino A, Maimone SM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *J Hosp Infect.* 1999;42(1):27-35.

87. Kikuchi T, Nagashima G, Taguchi K, Kuraishi H, Nemoto H, Yamanaka M, et al. Contaminated oral intubation equipment associated with an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas* in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2007;65(1):54-7.
88. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2880-2.
89. First report of OXA-72 carbapenemase in clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Colombia. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 - 13 April 2010
90. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(4):228-36.
91. Quale J. Global Spread of Carbapenemase - Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microbe.* 2008;3(11):516-20.
92. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO). Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100 - S20. 2010.
93. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement.* CLSI document M100-S22. January 2012.
94. Correa A, Guzmán AM, Reyes SL, Ospina D, Torres JA, Tafur JD, et al. Evaluation of the Three-Dimensional (3D) Test as a Screening Tool for the Detection of Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and *Acinetobacter baumannii* (Ab). 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy ICAAC October 25 - 28; Washington, DC.: American Society for Microbiology; 2008.
95. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119-23.
96. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(4):351-3.
97. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3623-7.
98. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5644-9.
99. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4382-90.

100. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36(5):309-32.
101. World Health Organization. Policy Package to Combat Antimicrobial Resistance 2011. Available from: <http://bit.ly/hl6rFO>.
102. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):736-55.
103. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. [Multiresistant Gram-negative bacterial infections: Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(6):402-9.
104. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2014:1-17.
105. Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13:43.
106. Alavi-Moghadam M, Miri M, Mokhtari M, Kouchek M, Goharani R, Sistanzad M, et al. Incidence of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a general intensive care unit (ICU). *Caspian J Intern Med.* 2014;5(3):186-7.
107. Tsakiridou E, Makris D, Daniil Z, Manoulakas E, Chatzipantazi V, Vlachos O, et al. *Acinetobacter baumannii* infection in prior ICU bed occupants is an independent risk factor for subsequent cases of ventilator-associated pneumonia. *Biomed Res Int.* 2014;2014:193516.
108. Nhu NT, Lan NP, Campbell JI, Parry CM, Thompson C, Tuyen HT, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* as the major cause of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients at an infectious disease hospital in southern Vietnam. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 10):1386-94.
109. Murphy RA, Ronat JB, Fakhri RM, Herard P, Blackwell N, Abgrall S, et al. Multidrug-resistant chronic osteomyelitis complicating war injury in Iraqi civilians. *J Trauma.* 2011;71(1):252-4.
110. Akalin E, Bromberg JS, Sehgal V, Ames S, Murphy B. Decreased incidence of cytomegalovirus infection in thymoglobulin-treated transplant patients with 6 months of valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant.* 2004;4(1):148-9.
111. Deleo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(13):4988-93.
112. Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, Burack S, Ulacia-Hernando A, Kodiyanplakkal RP, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J Infect Dis.* 2014;210(5):803-13.

113. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012;27(2):128-42.
114. Livermore DM, Pearson A. Antibiotic resistance: location, location, location. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13 Suppl 2:7-16.
115. Mózes J, Ebrahimi F, Gorácz O, Miszti C, Kardos G. Effect of carbapenem consumption patterns on the molecular epidemiology and carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol.* 2014.
116. McDougall DA, Morton AP, Playford EG. Association of ertapenem and antipseudomonal carbapenem usage and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* among 12 hospitals in Queensland, Australia. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):457-60.

# ANEXOS



Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de Medellín. 2012-2014

FORMULARIO

I. INFORMACIÓN SOCIODEMOGRÁFICA	
Código formulario:	
Nombres:	Apellidos:
Padre o adulto responsable:	
Identificación:	Edad: _____ <input type="checkbox"/> Años <input type="checkbox"/> Meses Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>
Nombre de la EPS del paciente:	
Municipio (Fuera de Medellín):	Comuna (Medellín):
Barrio (Medellín):	Teléfono:
Dirección:	

II. INFORMACIÓN GENERAL DE LA HOSPITALIZACIÓN	
1. institución:	El paciente viene remitido de otra institución: <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
En caso de sí, especifique:	
Nombre del hospital: _____	
Municipio: _____	
Tiempo de permanencia en la institución de donde viene remitido: _____ días <input type="checkbox"/> No dato	
2.	Fecha de Ingreso al hospital: DD ____/MM____/AAAA_____
3.	Fecha de diagnóstico clínico de la infección bacteriana: DD ____/MM____/AAAA_____
4.	Fecha toma de muestra para aislamiento microbiológico: DD ____/MM____/AAAA_____

5. Días de estancia hospitalaria hasta la fecha de toma de muestra:

6. Lugar de hospitalización:  UCI   
 No UCI

En caso de estar en UCI, responda: Días de estancia

Tipo de UCI: Médica  Quirúrgica  Pediátrica  Neonatal   
 Mixta

7. Especialidad tratante al momento del aislamiento microbiológico:

Médico  Quirúrgico  Médico- Quirúrgico  ¿Cuál?  
 \_\_\_\_\_

Tipo de paciente: Adulto  Pediátrico

8. Presencia de dispositivos médicos invasores a la fecha de toma de muestra o en las últimas 48 horas previas a la toma de muestra: Sí  NO

En caso de sí, elija:

Sonda vesical  Catéter de diálisis vascular  
 Nutrición parenteral  Ventilación mecánica invasiva  
 Nutrición enteral (en caso de sí, especifique el tipo de sonda):  
 Sonda nasogástrica  Sonda orogástrica  
 Gastrostomía percutánea  Gastrostomía quirúrgica

Catéter venoso central  
 Otro dispositivo Cuál: \_\_\_\_\_

9. En caso de tener catéter venoso central o ventilación mecánica, especifique el número de días hasta la fecha de toma de muestra: Catéter venoso central  Ventilación mecánica invasiva  No aplica

III. ANTECEDENTES			
10. Cirugía (en el último año): SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> En caso de sí, especifique cuál:			
En los últimos 6 meses antes de la fecha del aislamiento:			
11. Hospitalización:		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
12. Estancia en Unidad de Cuidados Intensivos:		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
13. Estancia en ancianatos:		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> No aplica <input type="checkbox"/>
14. Servicios de medicina domiciliaria:		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
15. Diálisis:		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
En caso de sí, responda: Peritoneal <input type="checkbox"/> Hemodiálisis <input type="checkbox"/>			
16. Condiciones o terapias inmunosupresoras: SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			
En caso de sí, elija:			
Neutropenia febril <input type="checkbox"/>		Quimioterapia <input type="checkbox"/>	Otra <input type="checkbox"/> (cuál):
_____			

17. Uso de antibióticos		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
En caso de sí, elija el grupo de antibióticos utilizado:			
<input type="checkbox"/> Penicilinas	<input type="checkbox"/> Aminoglicósidos		
<input type="checkbox"/> Monobactámicos	<input type="checkbox"/> Macrólidos		
<input type="checkbox"/> Piperacilina / tazobactam	<input type="checkbox"/> Lincosamidas		
<input type="checkbox"/> Otros $\beta$ -lactámicos más inhibidores	<input type="checkbox"/> Fluoroquinolonas		
<input type="checkbox"/> Carbapenémicos	<input type="checkbox"/> Rifamicinas		
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (1ra generación)	<input type="checkbox"/> TMP/SMX		
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (2da generación)	<input type="checkbox"/> Tetraciclinas		
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (3ra generación)	<input type="checkbox"/> Glicilglicinas		
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (4ta generación)	<input type="checkbox"/> Colistina		
<input type="checkbox"/> Glicopéptidos	<input type="checkbox"/> Polimixina B		
<input type="checkbox"/> Lipopéptidos	<input type="checkbox"/> Otro (cuál):		
<input type="checkbox"/> Oxazolidinonas	<input type="checkbox"/> No recuerda		
18. Colonización por el microorganismo causante de la infección:		SÍ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> No dato <input type="checkbox"/>
Sitio de colonización: <input type="checkbox"/> Rectal <input type="checkbox"/> Traqueal			

#### IV. ENFERMEDAD SUBYACENTE

19. El paciente tiene una enfermedad de base: SÍ  NO

En caso de sí, elija la condición que presenta el paciente:

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Trauma              | <input type="checkbox"/> Enfermedad autoinmune  |
| <input type="checkbox"/> Cáncer              | <input type="checkbox"/> Enfermedad cardíaca    |
| <input type="checkbox"/> Leucemia            | <input type="checkbox"/> Enfermedad pulmonar    |
| <input type="checkbox"/> EPOC                | <input type="checkbox"/> Enfermedad neurológica |
| <input type="checkbox"/> Fibrosis quística   | <input type="checkbox"/> Trasplante             |
| <input type="checkbox"/> Infección por VIH   | <input type="checkbox"/> Quemadura              |
| <input type="checkbox"/> Diabetes            | <input type="checkbox"/> Otra (cuál):           |
| <input type="checkbox"/> Insuficiencia renal |   |

#### V. TRATAMIENTO

20. Tratamiento empírico: SÍ  NO

En caso de sí, elija el grupo de antibióticos utilizado:

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Penicilinas                               | <input type="checkbox"/> Aminoglicósidos  |
| <input type="checkbox"/> Monobactámicos                            | <input type="checkbox"/> Macrólidos       |
| <input type="checkbox"/> Piperacilina / tazobactam                 | <input type="checkbox"/> Lincosamidas     |
| <input type="checkbox"/> Otros $\beta$ -lactámicos más inhibidores | <input type="checkbox"/> Fluoroquinolonas |
| <input type="checkbox"/> Carbapenémicos                            | <input type="checkbox"/> Rifamicinas      |
| <input type="checkbox"/> Cefalosporinas (1ra generación)           | <input type="checkbox"/> TMP/SMX          |
| <input type="checkbox"/> Cefalosporinas (2da generación)           | <input type="checkbox"/> Tetraciclinas    |
| <input type="checkbox"/> Cefalosporinas (3ra generación)           | <input type="checkbox"/> Glicilglicinas   |
| <input type="checkbox"/> Cefalosporinas (4ta generación)           | <input type="checkbox"/> Colistina        |
| <input type="checkbox"/> Glicopéptidos                             | <input type="checkbox"/> Polimixina B     |
| <input type="checkbox"/> Lipopéptidos                              | <input type="checkbox"/> Otro (cuál):     |
| <input type="checkbox"/> Oxazolidinonas                            | <input type="checkbox"/> No recuerda      |

Fecha de inicio del tratamiento empírico: DD \_\_\_\_/MM \_\_\_\_/AAAA \_\_\_\_

Fecha de finalización del tratamiento empírico: DD \_\_\_\_/MM \_\_\_\_/AAAA \_\_\_\_

21. Tratamiento dirigido: SÍ  NO

En caso de sí, elija el grupo de antibióticos utilizado:

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Penicilinas | <input type="checkbox"/> Aminoglicósidos |
|--------------------------------------|--|

<input type="checkbox"/> Monobactámicos	<input type="checkbox"/> Macrólidos
<input type="checkbox"/> Piperacilina / tazobactam	<input type="checkbox"/> Lincosamidas
<input type="checkbox"/> Otros $\beta$ -lactámicos más inhibidores	<input type="checkbox"/> Fluoroquinolonas
<input type="checkbox"/> Carbapenémicos	<input type="checkbox"/> Rifamicinas
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (1ra generación)	<input type="checkbox"/> TMP/SMX
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (2da generación)	<input type="checkbox"/> Tetraciclinas
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (3ra generación)	<input type="checkbox"/> Glicilglicinas
<input type="checkbox"/> Cefalosporinas (4ta generación)	<input type="checkbox"/> Colistina
<input type="checkbox"/> Glicopéptidos	<input type="checkbox"/> Polimixina B
<input type="checkbox"/> Lipopéptidos	<input type="checkbox"/> Otro (cuál):
<input type="checkbox"/> Oxazolidinonas	<input type="checkbox"/> No recuerda
Fecha de inicio del tratamiento dirigido:	DD____/MM____/AAAA_____
Fecha de finalización del tratamiento dirigido:	DD____/MM____/AAAA_____
22. Tratamiento quirúrgico:	SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

VI. EVOLUCIÓN AL MOMENTO DEL ALTA	
23. Seleccione el desenlace:	
<input type="checkbox"/> Curación	<input type="checkbox"/> Mejoría
<input type="checkbox"/> Muerte	<input type="checkbox"/> Falla terapéutica
<input type="checkbox"/> Alta voluntaria	
24. Fecha de alta: DD ____/MM____/AAAA_____	
25. Total estancia hospitalaria (en días): <input type="text"/>	

VII. INFORMACIÓN SOBRE EL DILIGENCIAMIENTO DEL FORMULARIO	
NOMBRE DE LA PERSONA QUE LLENA EL FORMULARIO:	
FECHA DE DILIGENCIAMIENTO: DD ____/MM____/AAAA_____	

## ANEXO 2

### DEFINICIÓN DE TÉRMINOS FORMULARIO CLÍNICO – EPIDEMIOLOGICO

#### I. INFORMACIÓN SOCIODEMOGRÁFICA:

**Código formulario:** Es un código que consta de dos letra y el consecutivo del aislamiento así:

<b>Código Institución</b>
<b>L:</b> IPS Universitaria Clínica León XIII
<b>H:</b> Hospital San Vicente Fundación
<b>P:</b> Hospital Pablo Tobón Uribe
<b>R:</b> Clínica El Rosario
<b>C:</b> Clínica Cardiovascular

**Ejemplo:** Si se tiene un aislamiento de *A. baumannii* de la Clínica Rosario, el código que se debe colocar en el formulario será: **AR1** (el último número corresponderá al consecutivo de los aislamientos incluidos en el estudio).

**Nombres y Apellidos:** Diligenciar estos datos de la manera más completa posible. En caso de menores de edad poner el nombre de alguno de los padres o del adulto responsable del menor.

**Identificación:** Procurar que este dato este correcto, ya que permite la revisión posterior de la historia clínica del paciente.

**Edad:** La edad se dará en años cumplidos en adultos, para menores de un año la edad se dará en meses cumplidos.

**Lugar de residencia:** Si el paciente reside en un municipio fuera de Medellín se diligencia el nombre de dicho municipio. Cuando el paciente resida en el municipio de Medellín se debe diligenciar el barrio y la comuna. Para acceder a la información de la comuna se puede remitir al apéndice de barrios y comunas que se adjunta a esta guía. En caso de dudas con respecto a este ítem, la comuna se deja en blanco para su posterior diligenciamiento. Así mismo, Si el paciente no

sabe el nombre del barrio en el que vive, anotar la dirección en el espacio correspondiente.

**Teléfono:** Es importante verificar que los números telefónicos estén completos (que contengan siete dígitos si son números fijos o diez si son números de celular).

## II. INFORMACIÓN GENERAL DE LA HOSPITALIZACIÓN:

**El paciente viene remitido de otra institución:** Indicar si el paciente inició o no su hospitalización en una institución diferente a la que se encuentra actualmente. En caso de ser afirmativa la respuesta, por favor indique el nombre del hospital y el municipio donde está ubicado, así como el tiempo que permaneció el paciente en dicha institución. Si estos últimos datos no están disponibles en la historia clínica, por favor marcar la casilla de NO DATO.

**Fecha de Ingreso al hospital:** Fecha en la cual el paciente ingresó al hospital en el proceso de infección actual.

**Diagnóstico de ingreso:** Motivo por el cual el paciente fue hospitalizado según el criterio del médico tratante.

**Fecha de diagnóstico Clínico de la Infección:** Fecha en la cual el médico hace la presunción diagnóstica del proceso infeccioso actual.

**Fecha toma de muestra del aislamiento microbiológico:** Fecha en la cual se le tomó la muestra al paciente para la realización del cultivo.

**Días de estancia hospitalaria hasta la fecha de toma de muestra:** Número de días que pasaron entre la fecha de ingreso y la fecha de la toma de muestra para el cultivo.

**Lugar de hospitalización:** Indicar si el paciente se encontraba en unidad de cuidados intensivos (UCI) o no en el momento del proceso infeccioso.

**En caso de UCI:** Escribir el número de días que el paciente estuvo en UCI, y el tipo de UCI.

**Especialidad tratante:** Es aquella especialidad médica que estaba tratando al paciente al momento de la infección. Se debe señalar el tipo de paciente si es médico, quirúrgico, o médico-quirúrgico, y si es pediátrico o adulto (tener en

cuenta tanto el numeral a. como el b.). Así mismo se debe escribir la especialidad. Para cualquier inquietud se puede consultar la guía de especialidades médicas y quirúrgicas que se encuentra dentro de los anexos a esta guía de diligenciamiento.

### III. ENFERMEDAD SUBYACENTE

**El paciente tiene una enfermedad de base:** Señalar si el paciente padece o no de alguna de las enfermedades crónicas o de inmunosupresión señaladas en el listado, durante el proceso infeccioso actual. Para cualquier inquietud por favor diríjase a la lista de enfermedades subyacentes que se adjunta a este instructivo. En éste encontrará las enfermedades autoinmunes, las enfermedades pulmonares crónicas, enfermedades cardiacas y neurológicas más comunes, así como las enfermedades que no se incluyen.

### IV. INFORMACIÓN SOBRE LA INFECCIÓN

**Tipo de infección de acuerdo al comité de Infecciones:** Indicar si la infección del paciente fue considerada como una infección intra-hospitalaria o comunitaria por el comité de Infecciones de la institución hospitalaria.

**Bacteria aislada:** Señalar cuál de las bacterias de la lista es la que está causando el proceso infeccioso actual de acuerdo con la muestra y el antibiograma.

**Infección Mixta:** Señalar si la infección fue causada por varios agentes (mixta). En caso de ser afirmativa la respuesta, escriba el nombre de la bacteria.

**Muestra a partir de la cual se obtuvo el aislamiento:** Sitio donde se toma la muestra para el aislamiento o cultivo.

**Tipo de infección inicial:** Entre las opciones dadas señalar la primera infección o primer sitio de donde se aisló *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en el proceso de infección actual.

**Colonización por el microorganismo causante de la infección:** Aislamiento previo de la bacteria causante del proceso infeccioso actual, de aspirados traqueales, hisopados rectales u otro sitio anatómico en ausencia de enfermedad, en los últimos seis meses antes de la toma de muestra para el cultivo. Si no está disponible esta información por favor señalar “No Dato”.

## V. TRATAMIENTO

**Tratamiento empírico:** es aquel tratamiento que se administra al paciente antes de conocer cuál es la bacteria causante del proceso infeccioso y su perfil de sensibilidad a los antibióticos. Señalar si al paciente se le dio o no tratamiento empírico. En caso de ser afirmativa la respuesta señalar cuál o cuáles familias de antibióticos de la lista le fueron administrados al paciente. Para inquietudes con respecto a los nombres de los antibióticos o para saber a qué familia pertenecen remítase a la lista de antibióticos que se adjunta a este formulario

**Tratamiento dirigido:** aquel tratamiento indicado al paciente luego de conocer la etiología y sensibilidad del microorganismo causante de la infección. Indicar si se dio o no tratamiento dirigido. En caso de ser afirmativa la respuesta señalar cuál o cuáles familias de antibióticos de la lista le fueron administrados al paciente. Para inquietudes con respecto a los nombres de los antibióticos o para saber a qué familia pertenecen remítase a la lista de antibióticos que se adjunta a este formulario.

**Tratamiento quirúrgico:** Indicar si el paciente requirió o no de cirugía o algún procedimiento quirúrgico para el control de la infección como desbridamientos, amputaciones, y drenajes quirúrgicos entre otros.

## ANEXO 3

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

A usted se le está invitando a participar en el proyecto de investigación titulado “Epidemiología molecular de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad, Medellín, Colombia”. Este proyecto está siendo realizado por profesionales de las siguientes instituciones: Universidad de Antioquia, IPS Universitaria Clínica León XIII, Hospital San Vicente Fundación, Hospital Pablo Tobón Uribe, Clínica Cardiovascular y Clínica El Rosario.

Antes de decidir si quiere participar en esta investigación, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas sobre esta investigación. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son bacterias muy comunes en los hospitales. Las dos primeras se encuentran normalmente en el intestino de los humanos y se pueden encontrar en la materia fecal, mientras que las dos últimas viven normalmente en el ambiente, en el suelo o el agua sin causar enfermedad. Sin embargo estas bacterias pueden causar infecciones graves especialmente en personas enfermas y con el sistema de defensa debilitado. En estas situaciones estas bacterias pueden causar enfermedades infecciosas como neumonía, infecciones urinarias, infecciones en órganos internos, en la sangre, en heridas y en quemaduras. Una situación muy preocupante es que estas bacterias

frecuentemente pueden sobrevivir o resistir a muchos de los antibióticos que se usan para el tratamiento de las infecciones, es decir, que estos antibióticos no pueden curar la infección. Esto puede llevar a que las personas infectadas se agraven y tengan que permanecer hospitalizadas por un mayor tiempo, generando a la vez mayor riesgo de contagiar o de diseminar la infección a otros pacientes del hospital.

Por todo esto, un grupo de investigadores de la Universidad de Antioquia y de la institución donde se encuentra hospitalizado(a), están trabajando en el estudio de estas bacterias, para tratar de encontrar información que sea útil para controlar más oportunamente su diseminación y transmisión.

Con el presente estudio se busca conocer qué tanto se presentan las bacterias mencionadas en cada institución, y si existen algunos factores que puedan favorecer la transmisión de las infecciones causadas por estas bacterias.

Este estudio es financiado por dineros de instituciones públicas y privadas.

**PROCEDIMIENTOS:** Usted, o el paciente a su cargo, ha sido seleccionado para participar en el estudio porque cumple con los criterios de estar hospitalizado y tener una infección por *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistente a carbapenémicos.

Si decide que usted o el paciente a cargo puede participar, se le solicitará información sobre sus datos personales: identificación, edad, lugar de residencia, y antecedentes de enfermedades, entre otros datos. Adicionalmente nos autorizará a tomar algunos datos de la historia clínica y a utilizar la muestra que le fue tomada por el laboratorio para el estudio de *P. aeruginosa*, y *A. baumannii*.

**RIESGOS Y BENEFICIOS:** Si decide que usted o el paciente a su cargo puede participar, deberá tener presente la siguiente información:

Los riesgos para la realización de la investigación son mínimos debido a que se empleará la misma muestra que se le tomó en el laboratorio para hacer el diagnóstico de la infección bacteriana y no se requiere ningún procedimiento adicional.

Su participación en la investigación no le generará gastos adicionales y su manejo dentro de la institución hospitalaria seguirá el proceso normal.

Usted no recibirá ningún beneficio económico por participar en este estudio. Su participación es una contribución para conocer el comportamiento de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en la institución hospitalaria.

Este estudio no tiene ningún interés económico por parte de la institución hospitalaria, ni de la Universidad de Antioquia, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material genético.

**DERECHOS:** Los registros que lo puedan identificar o al menor a su cargo serán mantenidos confidencialmente hasta donde lo permitan las leyes colombianas y las normas de Buenas Prácticas Clínicas en investigación. Estos registros pueden ser examinados por monitores, auditores y/o autoridades de salud o reguladoras. Su nombre no aparecerá en ningún reporte de este estudio.

Su participación o la del paciente a su cargo en esta investigación es completamente voluntaria. Usted puede elegir si desea participar o no en el estudio, en caso de aceptar usted puede retirarse en cualquier momento del estudio sin que esto le represente alguna dificultad con el grupo de investigadores de la Universidad de Antioquia y de la institución donde se encuentre hospitalizado.

Su participación o la del menor a su cargo en el proceso de selección le concede el derecho de conocer el resultado del estudio.

Usted tiene derecho a poseer una copia del presente documento y a que se le respondan satisfactoriamente todas las preguntas respecto al estudio, que se le ocurran ahora o durante el mismo.

Si usted tiene preguntas adicionales sobre este estudio, puede contactar a los investigadores responsables de este trabajo, Dra. Judy Natalia Jiménez, teléfonos: 219-5497 de Medellín, o co-investigador en cada institución:

Clínica Cardiovascular: Dr. Gustavo Roncancio, teléfono: 445 4390

Clínica El Rosario: Dr. Carlos Robledo, teléfono: 295 9000

Hospital Pablo Tobón Uribe: Dra. Andrea Restrepo Gouzy, teléfono: 445 9000

IPS Universitaria Clínica León XIII: Dra. Patricia Sierra Viana, teléfono: 516 7300 ext 7372

San Vicente Fundación: Dr. Sigifredo Ospina, teléfono: 444 1333

Si considera que alguno de sus derechos o los del paciente a su cargo está siendo vulnerado, puede contactar al comité de Bioética de la Universidad de Antioquia, teléfono 263-5555.

Con su firma certifica que ha leído o le han leído el presente formato de consentimiento informado, que le han sido resueltas sus preguntas a satisfacción y que acepta de manera voluntaria participar en el presente estudio.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído y escuchado satisfactoriamente las explicaciones sobre este estudio y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Estoy enterado(a) de las incomodidades, riesgos y beneficios potenciales de mi participación o la del menor a mi cargo en este estudio y sé que puedo retirarme del estudio en cualquier momento. Autorizo el uso de mis registros médicos y de la muestra de laboratorio para los propósitos de esta y otras investigaciones.

Comprendo que al firmar este documento de consentimiento, no estoy renunciando a ninguno de los derechos legales, que yo tendría como sujeto en un estudio de investigación.

### Aceptación

Por favor, pregunte si tiene cualquier duda acerca del estudio o de este formato. Su firma abajo indica que usted decidió participar o que su niño participara en este estudio.

Firme (o coloque su huella digital) si usted libremente decidió hacer parte de este estudio.

	Nombre (en letra clara)	No. Identificación	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Participante, (Padre o responsable legal del menor)				
Médico o su delegado				

### Asentimiento para niños

Su firma abajo indica que usted está de acuerdo con participar en este estudio.

Firme (o coloque su huella digital) si usted libremente decidió hacer parte de este estudio.

	Nombre (en letra clara)	No. Identificación	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Participante				

### Testigo

Observé el proceso de consentimiento. El potencial participante, o su padre o acudiente, leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para ingresar al estudio.

Firme (o coloque su huella digital):

	Nombre (en letra clara)	No. Identificación	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Testigo				
Testigo				

## DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

---

### Eventos locales:

- **VII Jornadas de Investigación y Extensión de la Escuela de Microbiología “Conociendo la Investigación y la Extensión hecha en casa”. Enero 2013**  
Johanna M. Vanegas, Astrid Vanessa Cienfuegos G, Gustavo Roncancio V, Judy Natalia Jiménez. Epidemiología molecular de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad, Medellín, Colombia. Hechos Microbiol. 2014; 5 (Suppl 1)

### Eventos nacionales:

- **XXIII Congreso Colombiano de Medicina Interna. Cartagena, agosto 2014**  
Johanna M. Vanegas, Astrid Vanessa Cienfuegos G, Gustavo Roncancio V, Judy Natalia Jiménez. Caracterización clínica y molecular de las infecciones por *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en hospitales de Medellín, Colombia. Acta Médica Colombiana. 2014; 39 (2) (Suppl 1)

- **IX Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas.  
Barranquilla, agosto 2014**

- ✓ Johanna M. Vanegas, Luis Felipe Higueta-Gutiérrez, Érika Rodríguez, Vanessa Cienfuegos, Gustavo Roncancio, Judy Natalia Jiménez. Caracterización clínica y molecular de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad, Medellín. Infectio. 2014. 18 (Suppl 1).
- ✓ Johanna M. Vanegas, Vanessa Cienfuegos, Gustavo Roncancio, Patricia Sierra, Sigifredo Ospina, Lina M. Echeverri, Natalia Maldonado, Carlos Robledo, Olga Molina, Andrea Restrepo, Maria Isabel Múnera, J. Natalia Jiménez. Perfiles de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores y no productores de carbapenemasas en hospitales de alto nivel de complejidad, Medellín 2012-2014. Infectio. 2014. 18 (Suppl 1).

- **XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2014 y IV Congreso Colombiano de Microbiología - 4CCM 2014. Cartagena, noviembre 2014**

Johanna Vanegas, Vanessa Cienfuegos, Ana María Ocampo, Erika Rodríguez, Lucelly López, Helena del Corral, Natalia Jiménez. Predominio de la carbapenemasa KPC en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en hospitales de alto nivel de complejidad de la ciudad de Medellín. Hechos Microbiol. 2014; 5 (Suppl 2)

## Eventos internacionales

- **54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C, septiembre 2014.**

J.M. Vanegas, V. Cienfuegos, L López, H del Corral, JN. Jiménez. Similar Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* Producing KPC and VIM Carbapenemases in Tertiary Care Hospitals in Medellín, Colombia. Póster C-083

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi asesora Natalia Jiménez por ser un angelito que se me apareció en el camino para contribuir con mi formación como profesional y como persona. Por sus consejos, regaños constructivos, su escucha y compañía en todo este proceso. Por retarme a ser cada día mejor.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Vanessa Cienfuegos y Dr. Gustavo Roncancio por brindarme su inteligencia y conocimiento, por sus enseñanzas y valiosos aportes.

A mi compañera de combate Ana María Ocampo, por luchar a mi lado y acompañarme durante este proceso de formación.

A Erika Rodríguez, Carlos Vargas y Felipe Higueta, por su valiosa ayuda en la realización de diferentes fases del proyecto.

A los hospitales IPS Universitaria Clínica León XIII, Pablo Tobón Uribe, San Vicente Fundación, clínica CardioVid y clínica El Rosario y a todo el equipo de co-investigadores que contribuyeron con el diseño y ejecución del proyecto

A mis profesores Helena del Corral, Lucelly López por sus aportes en mi formación como magister.

A los grupos de investigación Micromol y Microbiología Básica y Aplicada por abrirme sus puertas y dejarme apasionar por la investigación.

A la Universidad de Antioquia y en especial a la Escuela de Microbiología, por ser mi segundo hogar y ser testigo de caídas y éxitos desde que empecé siendo una estudiante de pregrado.

A mi hija Isabella, porque a ella le debo mi alegría de ser madre y mi esfuerzo por darle el mejor ejemplo. Por perdonarme los momentos que no pude estar con ella.

A mi esposo por su apoyo incondicional y por ser mi cómplice en cada paso de mi vida.

A mis padres por su excelente educación y esfuerzo por hacerme una mujer íntegra tanto personal como profesionalmente. A mis hermanas por ver en mí un buen ejemplo para ellas.

A Dios, por guiarme siempre por el mejor camino y llenarme día a día de grandes bendiciones.

A todos los que me acompañaron en este sueño motivado por la curiosidad de conocer un mundo invisible a nuestros ojos y que hoy está cerca de hacerse realidad...