



Tema 2-2023:

Primer reporte de gen NDM y Detección de OXA-24 en *Acinetobacter baumannii* en Hospital Nacional Regional de Santa Ana.

First report of the NDM gene and Detection of OXA-24 in *Acinetobacter baumannii* at the Hospital Nacional Regional de Santa Ana.

Recibido: 07/05/2022

Aceptado: 04/08/2023

¹ Adan Alexis Acosta Martínez

² Marcos Fabricio Quintana

¹ Licenciado en Laboratorio clínico, Master en control de las infecciones. Departamento de Investigación de la Universidad Autónoma de Santa Ana, Universidad Autónoma de Santa Ana, Santa Ana, El Salvador Correo electrónico: investigador2@unasa.edu.sv

² Doctor en Medicina, Médico internista. Escuela de Medicina de la Universidad Autónoma de Santa Ana, Universidad Autónoma de Santa Ana, Santa Ana, El Salvador Correo electrónico: medicina@unasa.edu.sv

Resumen

Esta investigación se realizó en el Hospital Nacional Regional de Santa Ana en El Salvador, el diseño de la investigación fue de tipo descriptiva con la intención de identificar los genes de resistencia de la bacteria más aislada en muestras clínicas del Hospital basadas en la identificación por método VITEK2 y la detección de Oxacilinas (OXA) -51 por PCR, por el momento se han procesado un total de 82 muestras para diferentes genes de resistencia en donde se incluyeron principalmente betalactámicos, todas las muestras fueron procesadas en el laboratorio de investigación de la Universidad Autónoma de Santa Ana. Dentro de los principales hallazgos se ha determinado la presencia de OXA-24 en todos los aislamientos resistentes a Imipenem, así como cuatro aislamientos mostraron la presencia del gen NDM (Nueva Delhi metalobetalactamasa).

Abstract:

This investigation was carried out at Hospital Nacional Regional de Santa Ana in El Salvador. It was executed with descriptive design with the intention of identifying the resistance genes of the most isolated bacteria in clinical samples from the Hospital based on identification by method VITEK2 and the detection of Oxacillinase (OXA) -51 by PCR, for the moment a total of 82 samples have been processed for different resistance genes where mainly beta-lactams were included, all the samples were processed in the research laboratory of the University Autónoma de Santa Ana. Among the main findings, the presence of OXA-24 has been determined in all isolates resistant to Imipenem, as well as four isolates showing the presence of the NDM gene (New Delhi metallo-beta-lactamase).

Palabras Clave:

Acinetobacter baumannii; Atención a la salud; Control de infecciones;

Key Words:

Acinetobacter baumannii; attention to health; Infection control; Genes MDR

Introducción:

El aislamiento de *Acinetobacter baumannii* multidrogorresistente (MDR) ha tenido un considerable aumento en el Hospital Nacional Regional San Juan de Dios de Santa Ana (HNSJDSA), siendo una bacteria de prevalencia establecida; esta bacteria ha sido relacionada con altos porcentajes de mortalidad y posee una alta capacidad para diseminarse en el ambiente hospitalario, lo que la vuelve difícil de contener. Sin embargo, estas cepas multirresistentes tienden a generar brotes epidémicos con el predominio de una o dos cepas por lo que se vuelve importante discernir entre las características de las bacterias en los ambientes hospitalarios.

Los medicamentos carbapenémicos han sido el tratamiento de elección para las infecciones ocasionadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente; sin embargo, la bacteria ha desarrollado resistencia a dichos antibióticos en los últimos años, lo que complica aún más el tratamiento. La resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos es ocasionada principalmente por las enzimas que degradan el antibiótico, específicamente las carbapenemasas llamadas oxacilinasas, como OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 y OXA-143. El estudio buscó describir la presencia de estas enzimas las cuales han mostrado diferente distribución en diferentes regiones del mundo, así como genes metabelactámicos en los que se incluyó el NDM.

Métodología

Esta investigación es de tipo descriptiva debido a que se encargó de describir el estado genético de *Acinetobacter baumannii*, así como es transversal ya que solo se midió la variable en sola ocasión, se realizó la evaluación de los genes de resistencia de *Acinetobacter baumannii* provenientes del área clínica entre julio a octubre del 2019 provenientes de pacientes ingresados en el Hospital Nacional Regional San Juan de Dios, la descripción de los perfiles de resistencia se realizó para genes betalactámicos y metabetalactámicos reportados alrededor del mundo.

En total se procesaron 82 cepas los criterios de selección de la muestra fueron los siguientes: muestras clínicas resistentes a Imipenem detectadas por VITEK de aislamientos de pacientes con más de 24 horas de ingreso, la cual fue también realizada por disco difusión dentro de los laboratorios de la Universidad Autónoma de Santa Ana, posteriormente se les realizó la prueba de Hodge modificada con Triton, todas las cepas con prueba positiva fueron válidas para ser incluidas para el estudio.

Se utilizó la búsqueda de OXA-51 para determinar la identificación de la especie *Acinetobacter*, la búsqueda de los genes se realizó con la técnica de PCR previamente descrita, como se puede apreciar en la tabla 1.

■ **Tabla 1** Genes para betalactamasas tipo OXA:

OXA	Cebadores	Tamaño esperado
OXA-51	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353 pb
OXA-23	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501 pb
OXA-24	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246 pb
OXA-58	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599 pb
OXA-143	TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC	149 pb

Genes de resistencia Metalobetalactámicos

blaIMP	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	
	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	
	GAT GGT GTT TGG TCG CAT	
	CGA ATG CGC AGC ACC AG	
	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA	
	AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	
	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG	
	ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	
	TAC AAG GGA TTC GGC ATC	
	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	
	CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	
	GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	

Fuente: Descripción de los cebadores utilizados dentro de la investigación. Adaptado de varios autores. 1, 2, 3, 4

La amplificación de ADN se realizó en un Termociclador de Gradiente “Multigene Optimax”.

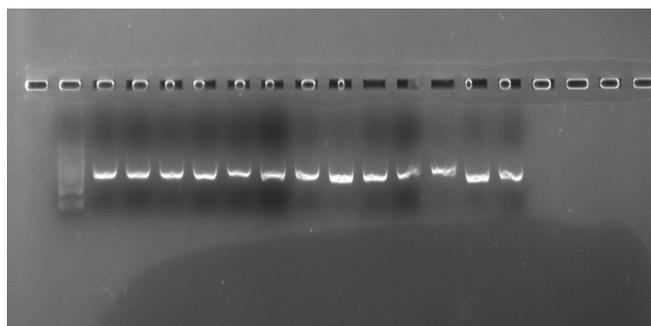
Para la lectura de los resultados se permitió su migración a 95 voltios hasta que el colorante azul de bromofenol del buffer de carga tuvo un recorrido de 3 cm en la agarosa, se utilizó en la mayoría de los casos el colorante de ácidos nucleicos RedGel marca Biotium, finalmente se visualizó en un equipo ENDURO GDS transiluminator la cual se realizó a 302nm a 420 nm UV.

Resultados

Se procesaron aislamientos procedentes de muestras clínicas de un brote prolongado de *Acinetobacter baumannii* resistente a Imipenem y Meropenem dentro del Hospital Nacional San Juan de Dios. Entre los principales hallazgos se detectó presencia en todos los aislamientos de OXA-24, la detección del OXA 51 es intrínseca de *Acinetobacter baumannii* y se utilizó como confirmación de especie.

Todas las bacterias mostraron presencia de OXA-51 como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Resultados de la corrida para determinar presencia de Oxa51. Detección positiva de Oxa51 que comprueba de integridad de la cepa como *Acinetobacter baumannii* producto esperado 353 pb.

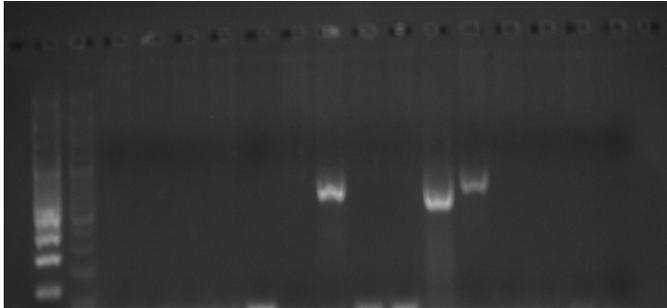


Fuente: Elaboración propia

La OXA-24 β-lactamasa que hidrolizó la mayoría de los antibióticos, pero careció de actividad contra doxiciclina (92%), 4 aislamientos fueron resistentes a la doxiciclina, los cuales mostraron también amplificación del gen NDM.

Se detectó la presencia del integron clase 1 en 5 de los aislamientos como se aprecia en la figura 2.

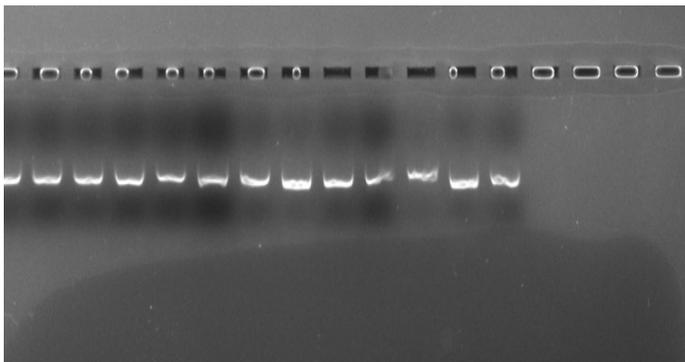
Figura 2. Gen de resistencia NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase). Resultados de NDM producto esperado 621 pb.



Fuente: Elaboración propia

Se detectaron 4 aislamientos positivos al gen de resistencia NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) nunca reportado antes en *Acinetobacter baumannii* en El Salvador, figura 3.

Figura 3. Detección de genes Oxa24 y Oxa51. Resultados moleculares. Carril uno marcado de peso molecular, dos negativos *Echerichia coli* ATCCC 25922, tres positivo a Oxa24 producto esperado 246pb, carril cuatro positivo a Oxa51 producto esperado 353pb (control positivo a *Acinetobacter*), carril seis y siete positivos a la presencia de Oxa24.



Fuente: Elaboración propia

Discusión

Entre los principales hallazgos se detectó el gen de resistencia OXA-24, β -lactamasa que hidrolizó la mayoría de los antibióticos que se incluyeron a la investigación, el patrón de resistencia múltiple de estas cepas incluyó también resistencia a ceftriaxona cefepima, gentamicina, amikacina, levofloxacina, ciprofloxacina, Piperacillin/tazobactam, algunas cepas

también fueron resistentes a este antibiótico.

La resistencia de las cepas de *Acinetobacter baumannii* a los carbapenémicos es un problema en los entornos hospitalarios, el principal mecanismo de resistencia a las carbapenemas es la expresión de β -lactamasas de clase D donde están incluido el OXA-24 que fue detectado en el hospital^(1,3).

Los mecanismos de diseminación de estos genes entre las cepas no se comprenden en su totalidad, pero existen estudios en los que se ha comprobado que el gen blaOXA-24 es transmitido por plásmido, por lo que es conveniente señalar que en esta investigación se detectó la presencia del integron clase 1, debido a que los integrones juegan un papel importante en la captura de genes, los cuales se han descrito en otras investigaciones asociados a transferencia y diseminación de genes de resistencia⁽⁵⁾, podemos considerar este como un factor más presente en el Hospital, el cual requiere ser considerado con atención puesto que se han detectado otros genes metabelactamicos en combinación con la presencia del Oxa24 y Oxa51, también descritas en otras bacterias Enterobacterias y la *Pseudomonas aeruginosa*^(6,7)

De acuerdo a los resultados, se recomienda orientar investigaciones más específicas del uso de antibióticos que podría mostrar un seguimiento a este estudio, se debe tratar de minimizar el uso de antibióticos de forma empírica en esta clase de bacterias resistentes, por ejemplo, algunas investigaciones han sugerido que el tratamiento endovenoso de polimixinas adicionado a otros antibióticos, para infecciones nosocomiales por *Acinetobacter baumannii* MDR produce una favorable respuesta clínica^(8,9). Sin embargo, en estudios con diseños más apropiados en pacientes elegidos de forma aleatoria infectados con *Acinetobacter baumannii* multiresistentes tratados con colistina o colistina más rifampicina pudo demostrar, que si bien se fue más rápida con el esquema combinado no hubo diferencias en la mortalidad y tiempo de hospitalización⁽⁹⁾ por lo que siendo la finalidad del tratamiento no es recomendable su uso de forma rutinaria, como ya se mencionó de establecer el uso de una terapia que puedan propiciar una selección de resistencia que aumente el problema es recomendable establecer investigaciones que conlleven a una valoración del uso de antibióticos de forma más eficiente.

Conclusión

El OXA-24 es el gen de resistencia de las Oxacilinas predominante en las cepas de *Acinetobacter baumannii* analizadas.

Existe la presencia del Gen NDM en las cepas resistentes a carbapenemicos dentro del Hospital.

Bibliografía

1. N. Woodford, M. Ellington, J. Coelho, J. Turton, M. Ward, S. Brown, S. Amyes, D. *Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. International Journal of Antimicrobial Agents.* 2006; 27:351—353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>
2. Adam, M. A., & Elhag, W. I. *Prevalence of metallo-β-lactamase acquired genes among carbapenems susceptible and resistant Gram-negative clinical isolates using multiplex PCR, Khartoum hospitals, Khartoum Sudan. BMC infectious diseases.* 2018; 18(1), 668. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3581-z>
3. Mariya Afzal-Shah, Neil Woodford, David M. *Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, Molecular Class D β-Lactamases Associated with Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2001; 45(2), 583–588. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.583-588.2001>
4. M. J. Ellington, J. Kistler, D. M. Livermore, N. *Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 59: 321-322. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl481>
5. Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. *Multidrug Resistance among Enterobacteriaceae Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. The Journal of Infectious Diseases.* 2003;187(2):251-259. doi:10.1086/345880
6. Patrice Nordmann, Laurent Poirel, Timothy R. Walsh, David M. Livermore. *The emerging NDM carbapenemases. Trends in Microbiology.* 2011; 19: 588-595. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005>
7. Mudathir Abdallah Adam, Wafa I. *Prevalence of metallo-β-lactamase acquired genes among carbapenems susceptible and resistant Gram-negative clinical isolates using multiplex PCR, Khartoum hospitals, Khartoum Sudan. BMC infectious diseases.* 2018. 18(1), 668. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3581-z>
8. N. Petrosillo, M. F. Proietti, L. Cecchini, M. Masala, C. Franchi, M. Venditti, S. Esposito, E. Nicastrì, P. Chinello. *Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections: clinical outcome and adverse events. Clinical Microbiology and Infection.* 2005; 11: 682-683. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01198.x>
9. Sobieszczyk ME. *Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2004;54(2):566-569. doi:10.1093/jac/dkh369

Declaración de conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existió ningún conflicto de interés en la presente revisión.