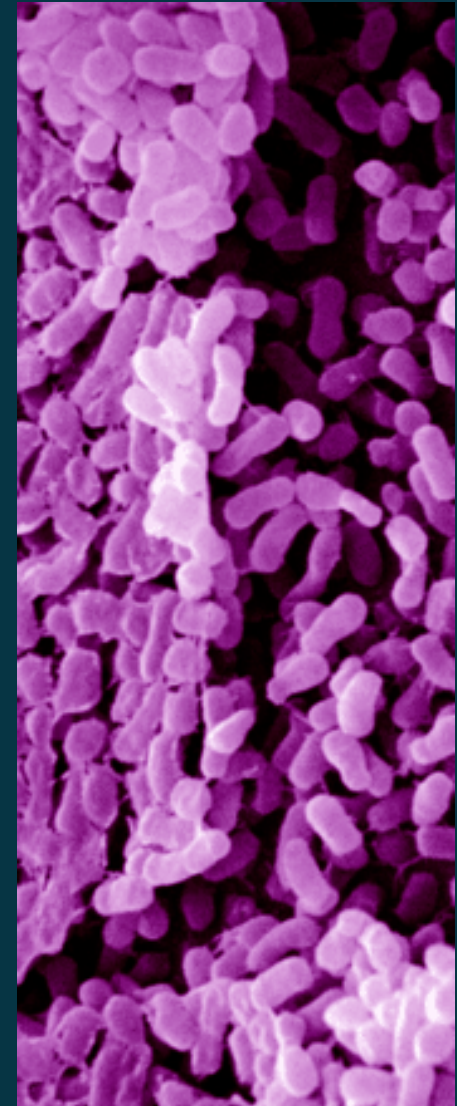
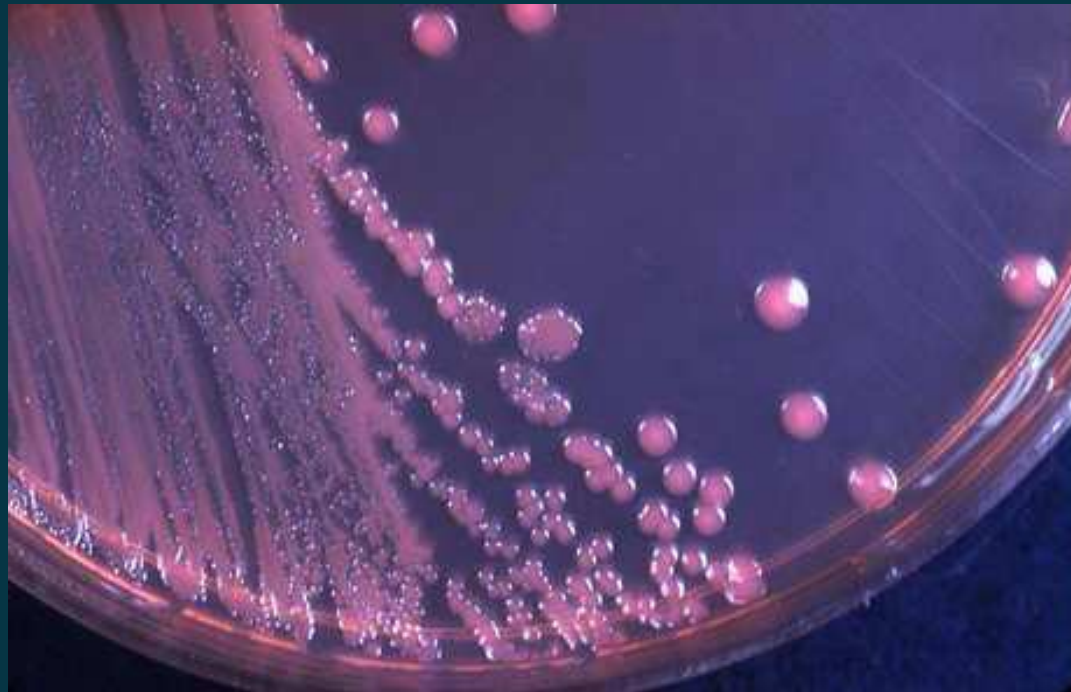


EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE INFECCIONES EMERGENTES POR *Acinetobacter baumannii*





**ESTUDIO GENÉTICO DE AISLAMIENTOS
MULTIRRESISTENTES DE
Acinetobacter baumannii PRODUCTORES DE LA
CARBAPENEMASA OXA-40
(AÑOS 1999-2008)**

FASE I: ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A
IMIPENEM EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Acinetobacter baumannii* Y DETECCIÓN DE
LAS CARBAPENEMASAS IMPLICADAS

OBJETIVOS

1. Determinar el nivel de resistencia en los aislamientos hospitalarios de *A. baumannii* en nuestro medio
2. Desarrollo de técnicas de identificación genética (DNA *fingerprinting*) para la identificación rápida y específica de los clones implicados en infecciones nosocomiales y determinar su origen y transmisión en el ambiente hospitalario.
3. Detección y caracterización de nuevos mecanismos de resistencia como la producción de carbapenemasas y la presencia de integrones de multirresistencia
4. Estudio de la evolución a lo largo del periodo de estudio de la población resistente y de los factores implicados.

1. HOSPITAL de SANTA MARINA:

- 240-camas
- Prevalencia de pacientes ancianos
- Hospitalización larga (media, 1 mes).

2. AISLAMIENTOS: todos los aislamientos de *A. baumannii* desde el año 1999, cada tres años

3. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

4. RELACIÓN CLONAL

5. ESTUDIO DE RESISTENCIA A IMIPENEM

AISLAMIENTOS ESTUDIADOS: Todos los aislamientos recogidos en el Servicio de Microbiología del Hospital de Santa Marina, un total de 102 en el año 1999, 86 en el año 2002 Y 30 en 2005

PLAN DE TRABAJO:

1. Determinación de la sensibilidad antibiótica (CMI)
2. Identificación genética de los clones presentes
 - RAPD-PCR fingerprinting (primers M13 y ERIC2)
 - Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) con *Apa I*
3. Estudio de la presencia de mecanismos de resistencia
 - Integrines de multirresistencia (PCR, *Hinf I*)
 - Enzimas inactivantes de aminoglicósidos
 - Carbapenemasas (Hodge, EDTA, Etest MBL, PCR)

PCR-fingerprinting

1. Extracción de ADN

2. Reacción de amplificación

AP3: 5' -TCA CGA TGC A -3'

1 x: 94°C 5 min. ; 35°C 5 min. ; 72°C 5 min;

28 x: 94°C 1 min. ; 35°C 2 min. ; 72°C 2 min;

1 x: 72°C 10 min.

M13: 5' -GAG GGT GGC GGT TCT -3

1 x: 94°C 2 min. ;

35 x: 94°C 20 seg. ; 50°C 1 min. ; 72°C 20 seg.

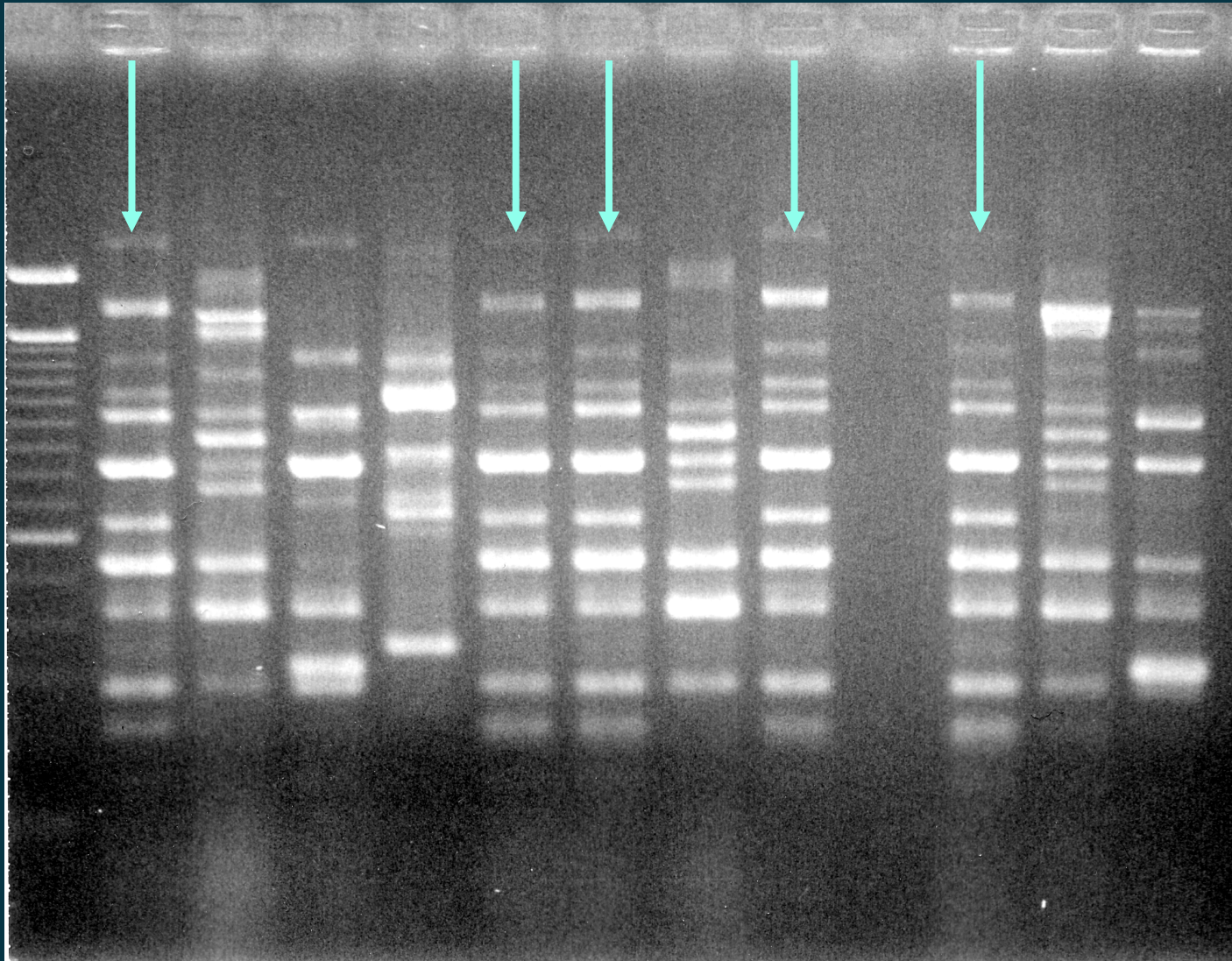
1 x: 72°C 5 min.

3. Electroforesis en gel de agarosa

4. Estudio de los perfiles de amplificación:

- *MA/MAC Fingerprinting 1.0 software BIORAD, QUANTITY ONE*
- Porcentajes de similitud (DICE); agrupación algoritmo UPGMA
- Clon > 80% similitud

PCR-fingerprinting de diferentes aislamientos



→ :perfiles idénticos

CLONES PREDOMINANTES



TIPADO GENÉTICO

AÑO 1999: Clon I: 28 aislamientos (27,4%)
Clon II: 50 aislamientos (49%)
Otros clones: 24 aislamientos

AÑO 2002: Clon I: 52 aislamientos (63,4%)
Clon II: 17 aislamientos (20,73%)
Otros clones: 13 aislamientos

AÑO 2005: Clon I: 25 aislamientos (83,3%)
Clon II: 5 aislamientos (16,6%)
Otros clones: 0 aislamientos

AÑO 2008: Clon I: 31 aislamientos (61.5%)
subclon Ia: 13 aislamientos (27%)
subclon Ib: 6 aislamientos (11.5%)

RESISTENCIA AÑO 1999-2008

CLON I

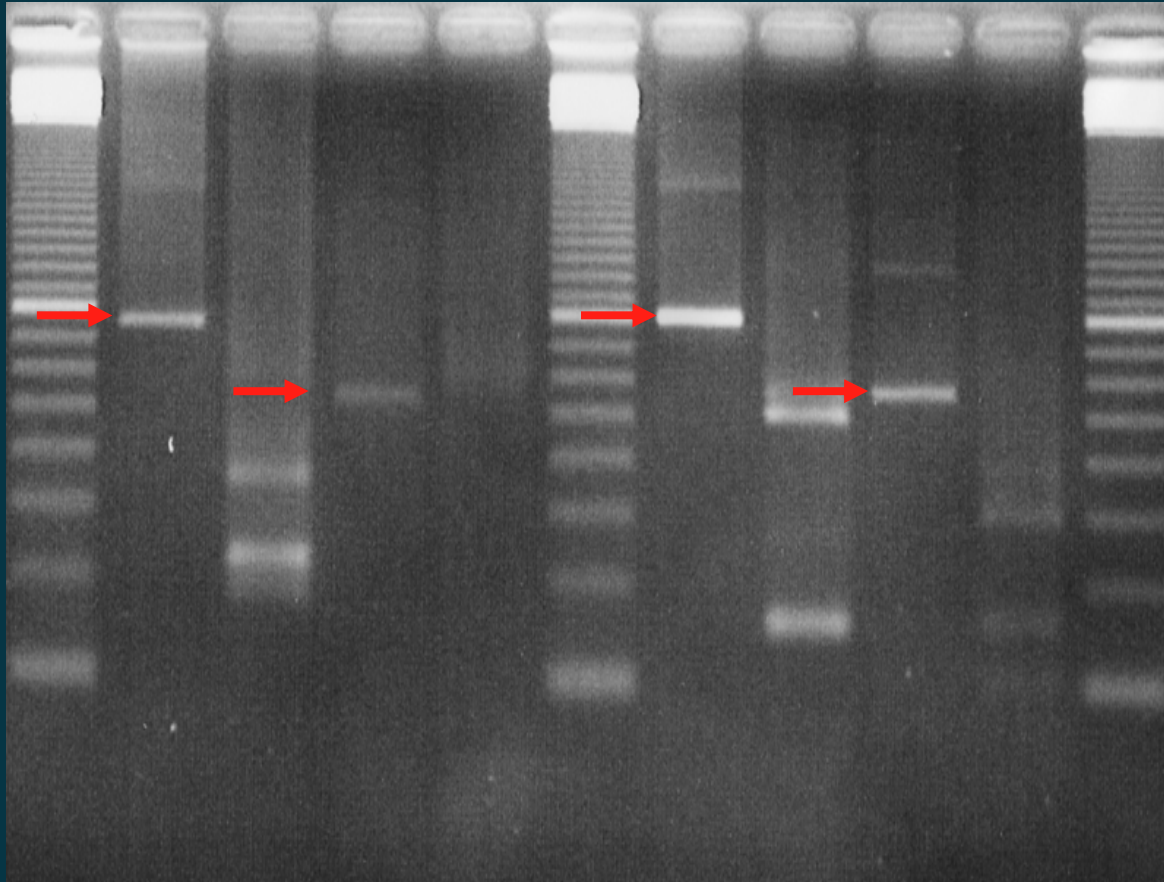
CLON II

	1999	2002	2005	2008	1999	2002	2005	2008
CTX	85%	91%	100%	94%	100%	100%	100%	-
CF	68%	85%	96%	63%	90%	100%	80%	-
IPM	32%	75%	100%	100%	84%	71%	80%	-
MEM	25%	85%	100%	93.1%	88%	82%	80%	-
AMK	18%	85%	76%	45%	52%	65%	0%	-
GEN	75%	83%	100%	87.2%	94%	71%	80%	-

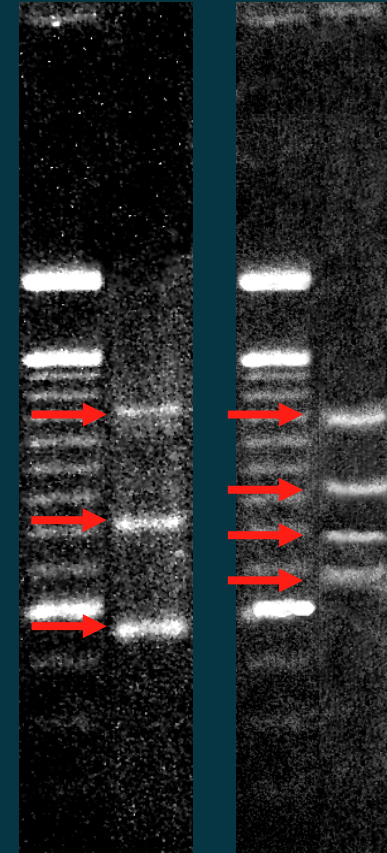
	CLONE I			CLONE II			OTHERS		
	1999	2002	2005	1999	2002	2005	1999	2002	2005
ANTIBIOTIC	n=28	n=52	n=25	n=50	n=17	n=5	n=24	n=13	n=0
CTX	85%	91%	100%	100%	100%	100%	70%	58%	-
CAZ	68%	85%	96%	90%	100%	80%	58%	66%	-
ATM	85%	-	100%	84%	-	100%	96%	-	-
IPM	32%	75%	100%	84%	71%	40%	41%	33%	-
MEM	25%	85%	100%	88%	82%	60%	33%	20%	-
AMK	18%	85%	76%	52%	65%	0%	8%	66%	-
GEN	75%	83%	95%	94%	71%	80%	95%	45%	-
TOB	10%	88%	96%	70%	27%	0%	60%	69%	-
CIP	93%	98%	100%	90%	100%	100%	84%	92%	-
OFX	96%	-	100%	100%	-	100%	80%	-	-
SAM	60%	42%	21%	6%	83%	20%	33%	15%	-
TZP	92%	94%	100%	6%	100%	100%	30%	69%	-
CRO	-	98%	100%	-	100%	100%	-	92%	-
FEP	82%	96%	96%	80%	94%	100%	72%	77%	-
TET	-	98%	96%	-	100%	100%	-	92%	-
CHL	-	94%	92%	-	72%	100%	-	100%	-
CT	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-
SXT	-	88%	96%	-	94%	80%	-	54%	-

INTEGRONES

año 1999



años 2002-08

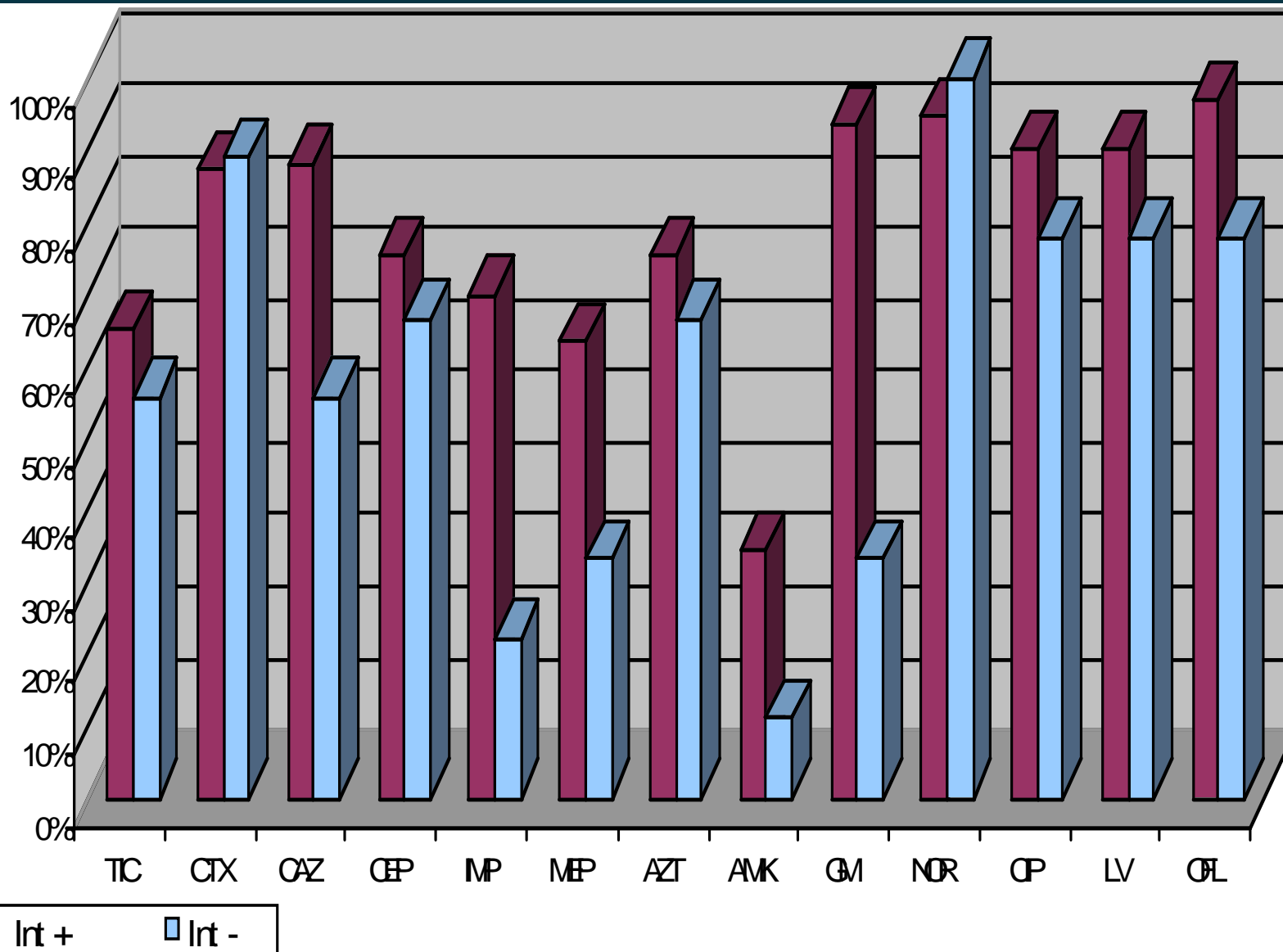


Tipo Integrón	Tamaño (pb)	Digestión con Hinf I	Genotipos (nº aislamientos)	Secuenciación
a	760	350, 220, 190	I ₍₂₁₎ , XI ₍₃₎	aadB, OXA7
b	550	550	II ₍₅₀₎ , V ₍₁₎ , VI ₍₂₎ , VIII ₍₁₎ , IX ₍₁₎ , X ₍₁₎	No definitivo
c	800	550, 170	III ₍₁₁₎ , VII ₍₁₎	aacA4
d	600	300, 170, 110	IV ₍₁₎	No definitivo
e	1200		II ₍₅₀₎ , IV ₍₁₎ , V ₍₁₎ , VI ₍₁₎ , VIII ₍₁₎ , IX ₍₁₎ , X ₍₁₎	-
f	1300		VI ₍₁₎	-
g	1600		I ₍₁₎ , II ₍₁₎ , III ₍₁₎ , V ₍₁₎	-

ENZIMAS INACTIVANTES DE AMINOGLICÓSIDOS presentes en aislamientos seleccionados portadores de uno de los cuatro tipo de integrones

Isolate (integron structure)	Aminoglycoside disk zone sizes (mm)												Inferred aminoglycoside -modifying enzymes
	GEN	TOB	AMK	KAN	APR	NET	6'NET	2'NET	EPI	ISP	FOR	NEO	
SM36 (a)	nz	nz	9	nz	29	19	12	9	21	nz	24	12	APH(3')-VI*, ANT(2"), AAC(3)-?
SM80 (b)	nz	16	14	nz	24	11	nz	nz	19	11	22	13	APH(3')-VI*, AAC(3)-II
SM49 (c)	nz	nz	16	nz	25	nz	16	nz	nz	13	24	11	APH(3')-VI*, AAC(6')-I, AAC(3)-II
SM52 (d)	13	13	24	14	26	25	22	22	23	24	29	23	none
ATCC 19606 [†]	17	16	25	17	25	29	20	18	21	23	21	23	none

Relación entre la presencia de integrones y la resistencia mostrada



ESTUDIO DETALLADO DE LA RESISTENCIA A IMIPENEM: DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS

1. DETECCION FENOTÍPICA

TEST DE HODGE

TEST DE EDTA

E-TEST MBL

2. DETECCION GENOTÍPICA

- GENES *bla*OXA

- GENES *bla*IMP, *bla*VIM

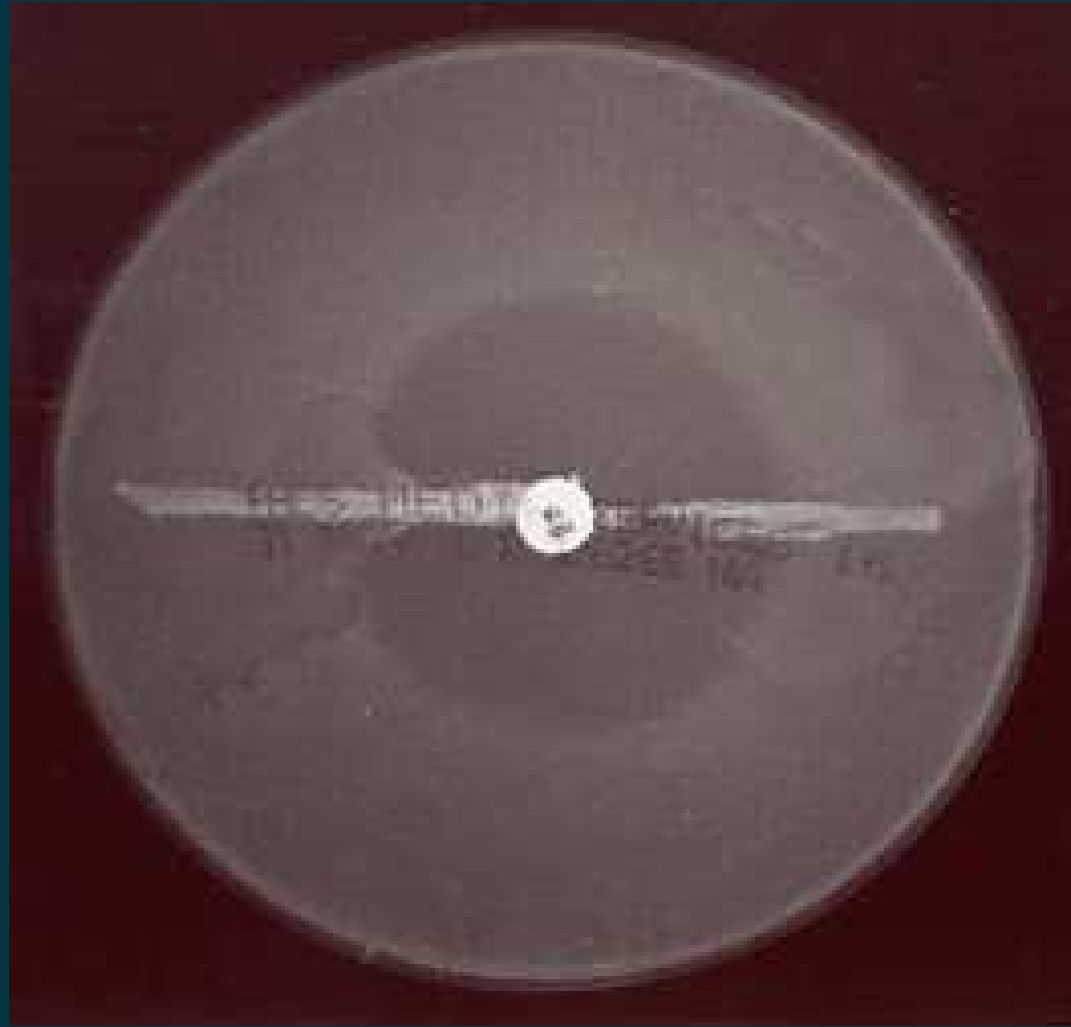
- SECUENCIACION

- ELEMENTOS MÓVILES ASOCIADOS:
PLÁSMIDOS, INTEGRONES

CARBAPENEMASAS

Test de Hodge

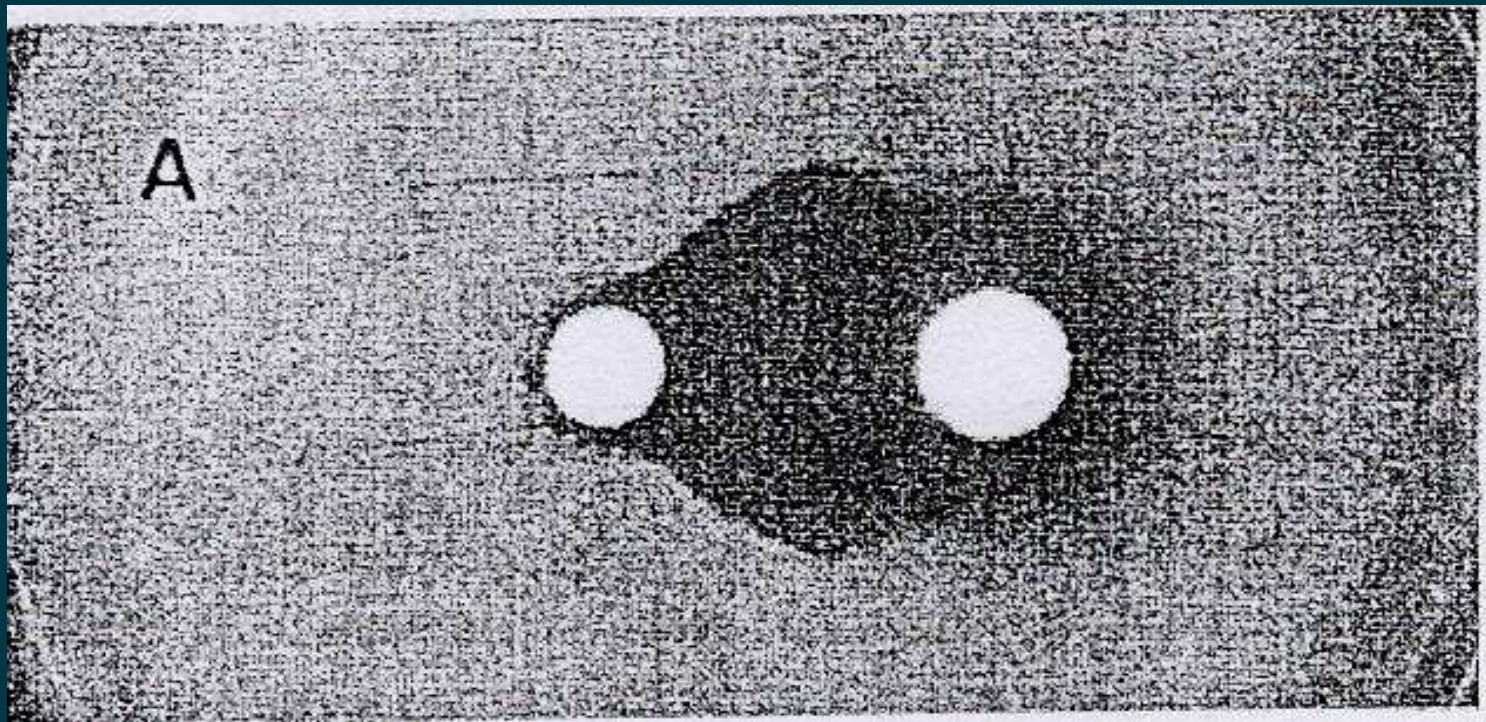
+



-

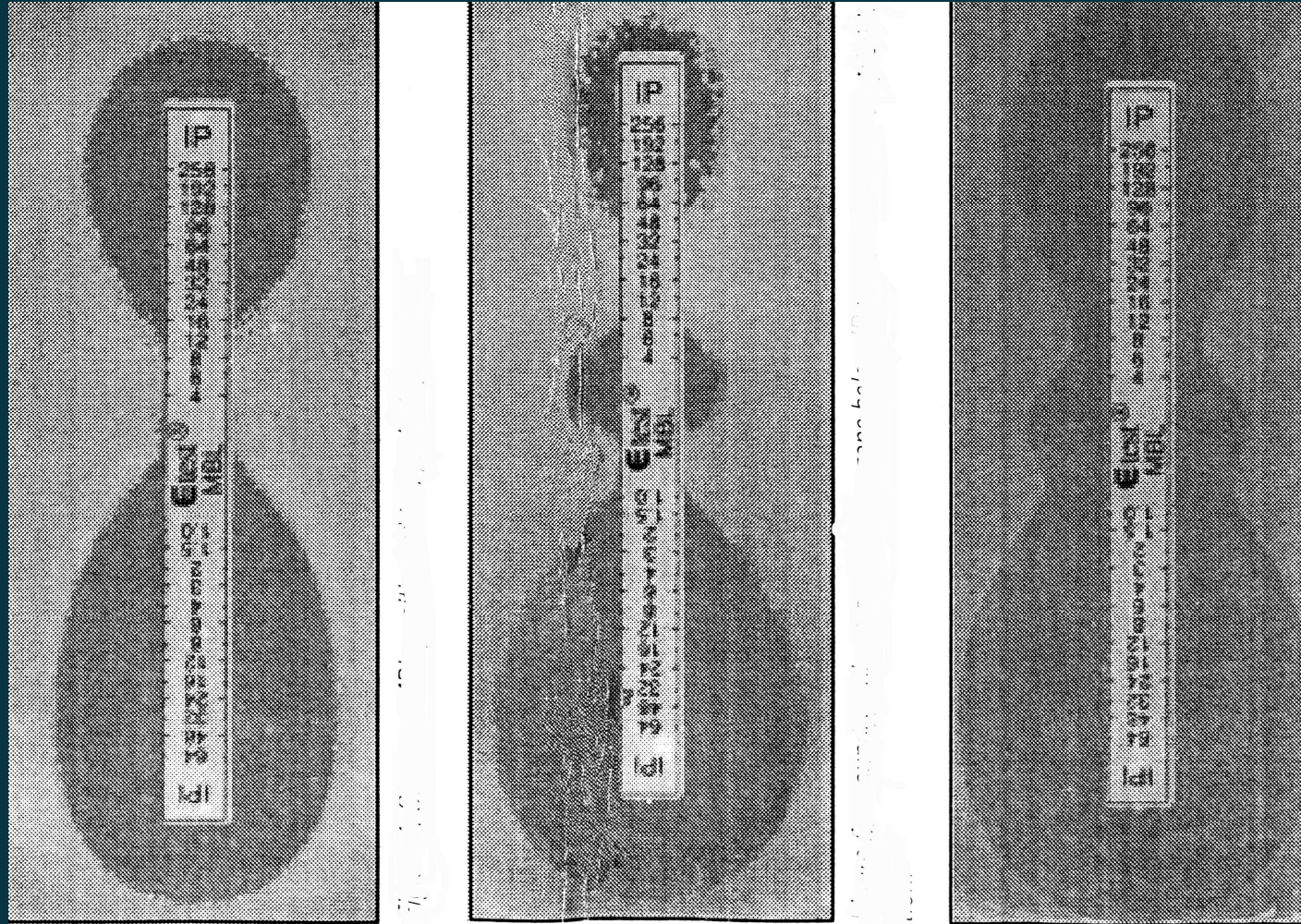
CARBAPENEMASAS

Test de EDTA



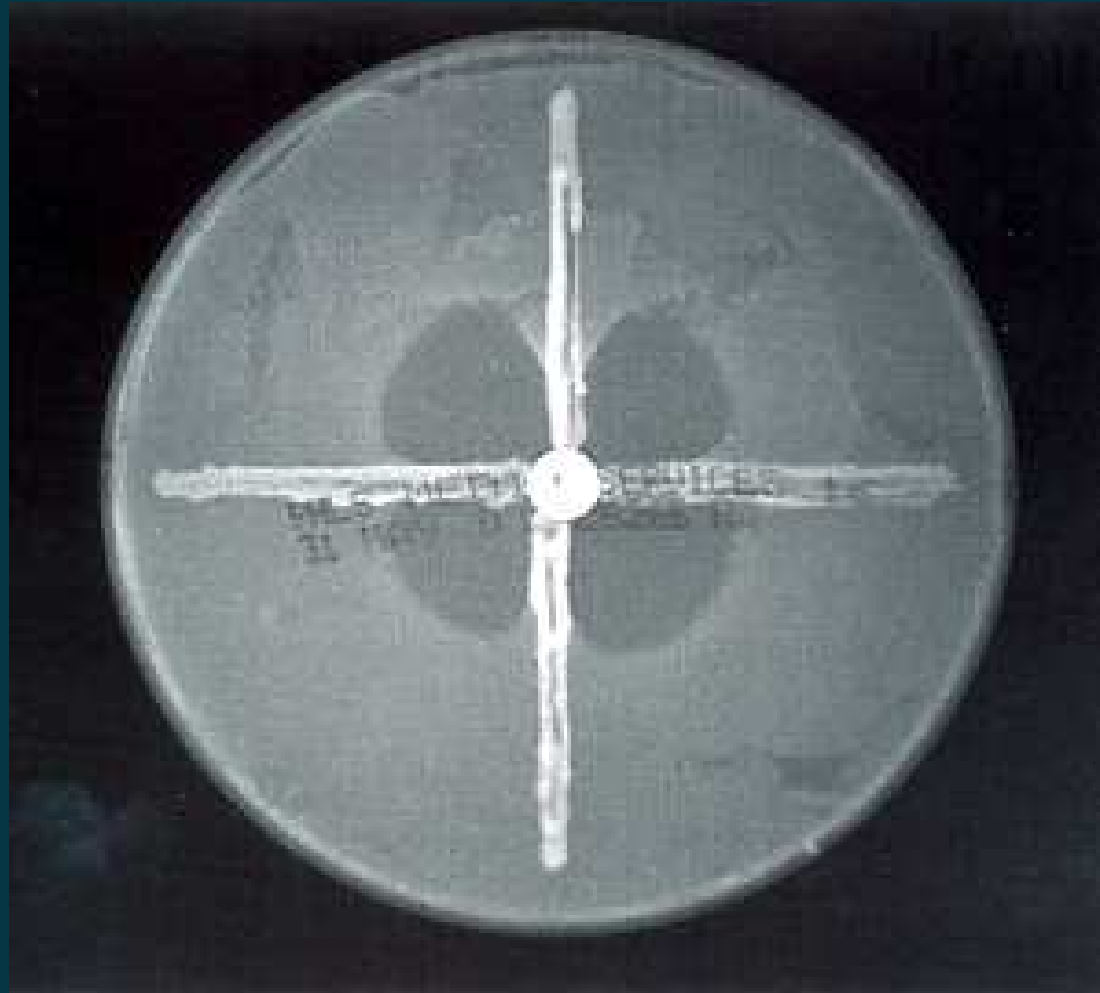
CARBAPENEMASAS

Test de EDTA



CARBAPENEMASAS

10



80

76

28

CARBAPENEMASAS

DETECCION DEL GEN OXA 24/40 MEDIANTE PCR

INICIADORES:

OXA-24F 5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3'

OXA-24R 5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT -3'

CICLOS:

1x 94°C 4 min.

30x 94°C 1min, 50°C 1 min, 72°C 2 min

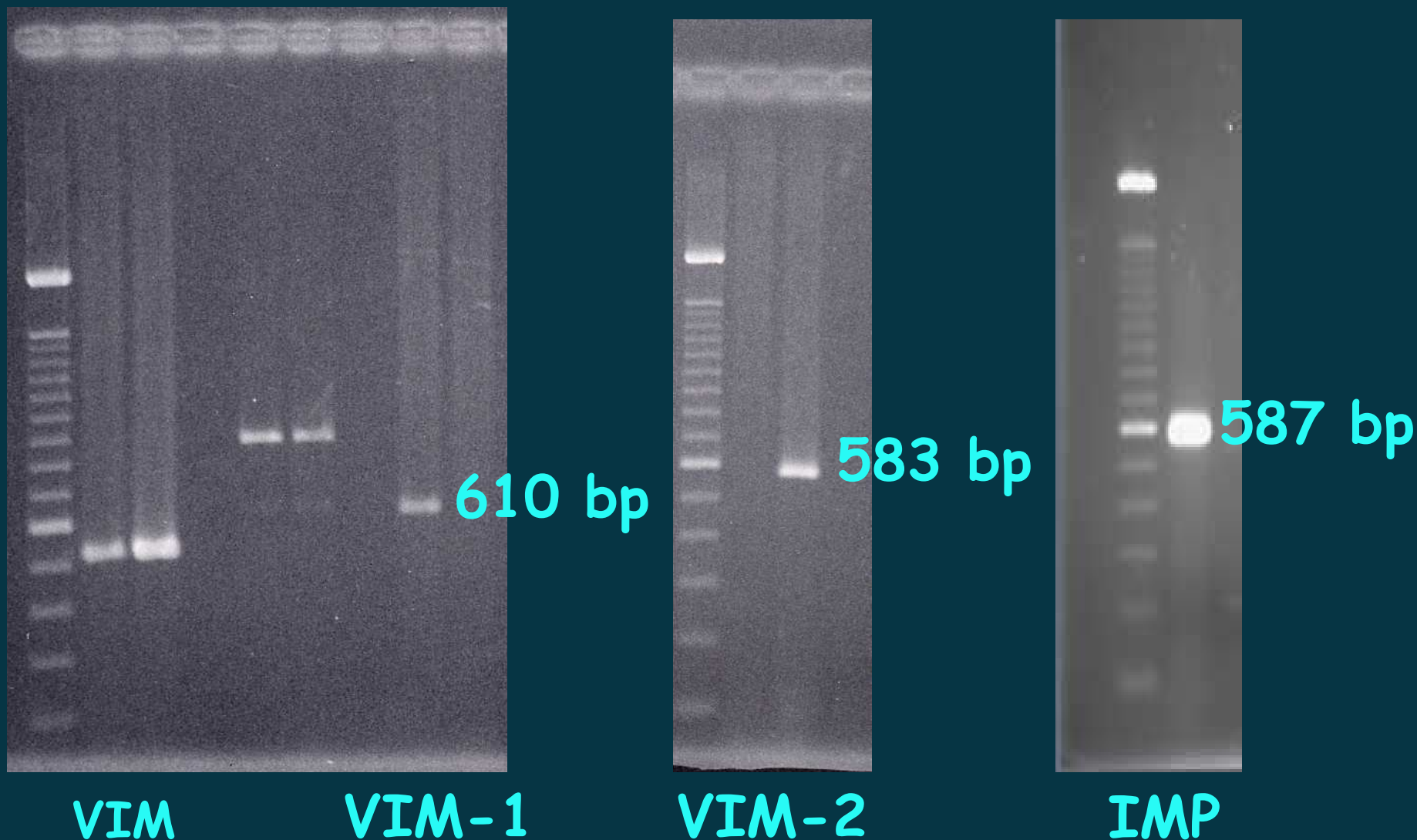
1x 72°C 10 min

AMPLIFICADO DEL GEN DE LA CARBAPENEMASA OXA-40



1030 bp

AMPLIFICADO DE GENES DE METALO- β -LACTAMASAS



SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA CARBAPENEMASA OXA-40 Y COMPARACIÓN CON OTRAS CARBAPENEMASAS DE LA MISMA FAMILIA

```

      *           *           *           *
      20         40         60
SM28  : MKKFLPIFSSISILVSLSACSSIRKESSEDMFHISQOHEKAIRSYFDEAQTQGVIIKMG
OXA-26 : .....
OXA-25 : .....
OXA-24 : .....

      *           *           *           *
      80         100        120
SM28  : KNLSTYGNALARANKKYVPASTYFHLNALIGLEHIXATPNEIFKMDKIKKRTYFMWELDHT
OXA-26 : .....
OXA-25 : .....
OXA-24 : .....

      *           *           *           *
     140        160        180
SM28  : LGKARALSAVYVYQSLARRTGLELHQKEVERVNFGRTHIGTQVDHFWLVGPIKITPVQIEV
OXA-26 : .....
OXA-25 : .....
OXA-24 : .....

      *           *           *           *
     200        220        240
SM28  : NFADDLANNLPPFLKLTQKEVERKMLIKREVNSKIYAKSGWGMGVTPQVQWLTQWVQGAN
OXA-26 : .....
OXA-25 : .....
OXA-24 : .....

      *           *
     260
SM28  : GKKIPFSLNLENEKSGSGSIRNEITYKSLNGLGI
OXA-26 : .....
OXA-25 : .....
OXA-24 : .....
    
```

SUSTRATOS

CEFTAZIDIMA
IMIPENEM

RESISTENTE A
INHIBICION POR:

CLAVULÁNICO
TAZOBACTAM
SULBACTAM
NaCl

PRESENCIA DE OXA-40 EN LOS AISLAMIENTOS DE LOS DIFERENTES AÑOS

1. AÑO 1999

CLON II: 98%

CLON I: 20%

2. AÑO 2002

CLON II: 98%

CLON I: 91%

3. AÑO 2005

CLON II: 98%

CLON I: 98%

4. AÑO 2008

TODOS LOS CLONES: 100%

CONCLUSIONES

1. DOS CLONES ENDÉMICOS CUYA PREVALENCIA HA CAMBIADO
2. FENOTIPO MULTIRRESISTENTE
3. PRODUCTORES DE CARBAPENEMASA OXA-40
(CLON I DE 22% EN 1999 A 100% EN 2008)
4. NO PRODUCEN METALOBETALACTAMASAS

FASE II: ESTUDIO DE LA
EVOLUCION DE LOS CLONES
PREDOMINANTES Y ESTRUCTURAS
GENETICAS RELACIONADAS CON
LA RESISTENCIA

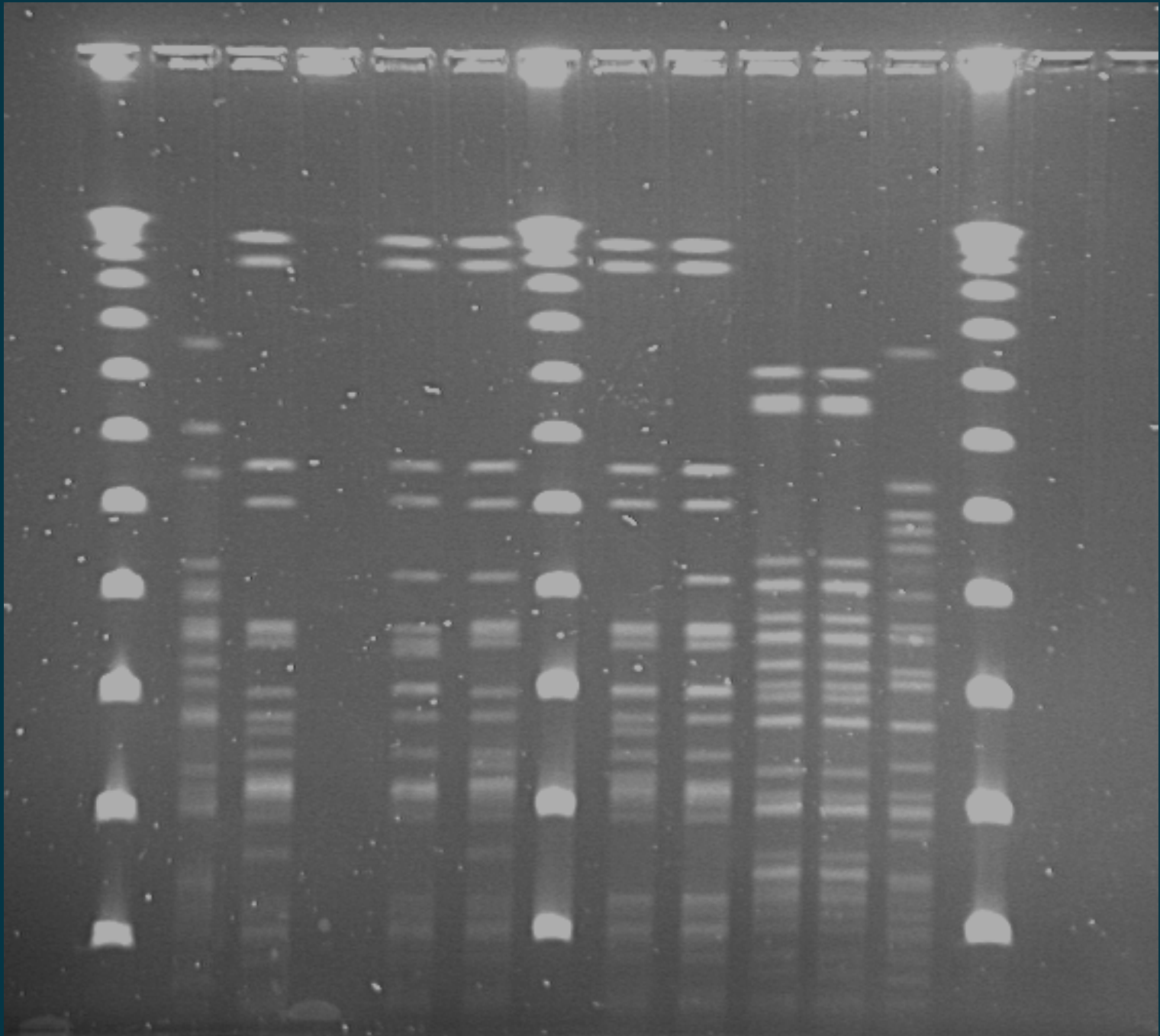
OBJETIVO

1. INVESTIGAR AISLAMIENTOS SECUENCIALES DE DOS CLONES ENDÉMICOS MULTIRESISTENTES PRODUCTORES DE LA CARBAPENEMASA OXA-40 AISLADOS EN EL HOSPITAL DE SANTA MARINA DESDE EL AÑO 1999 AL 2005
2. EVOLUCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS
3. ANÁLISIS DE PLÁSMIDOS Y SU RELACIÓN CON EL GEN *bla*_{OXA-40}

- **AISLAMIENTOS:** 17 *A. baumannii* seleccionados como representativos incluyendo $bla_{\text{OXA-40}}$ positivos y negativos por año y clon.
- **MULTIPLEX-PCR:** búsqueda de $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, y $bla_{\text{OXA-40-like}}$ e *Int1* genes. Se diseñó una PCR para amplificar selectivamente los genes *ompA*, *csuE* y $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (Laboratory of HealthCare Associated Infection, Colindale, UK)
- **ANÁLISIS DE PLÁSMIDOS:** obtención de DNA plasmídico mediante un kit comercial. El tamaño se determinó por comparación con plásmidos de cepas control *E.coli* NCTC 50193 y NCTC 59192

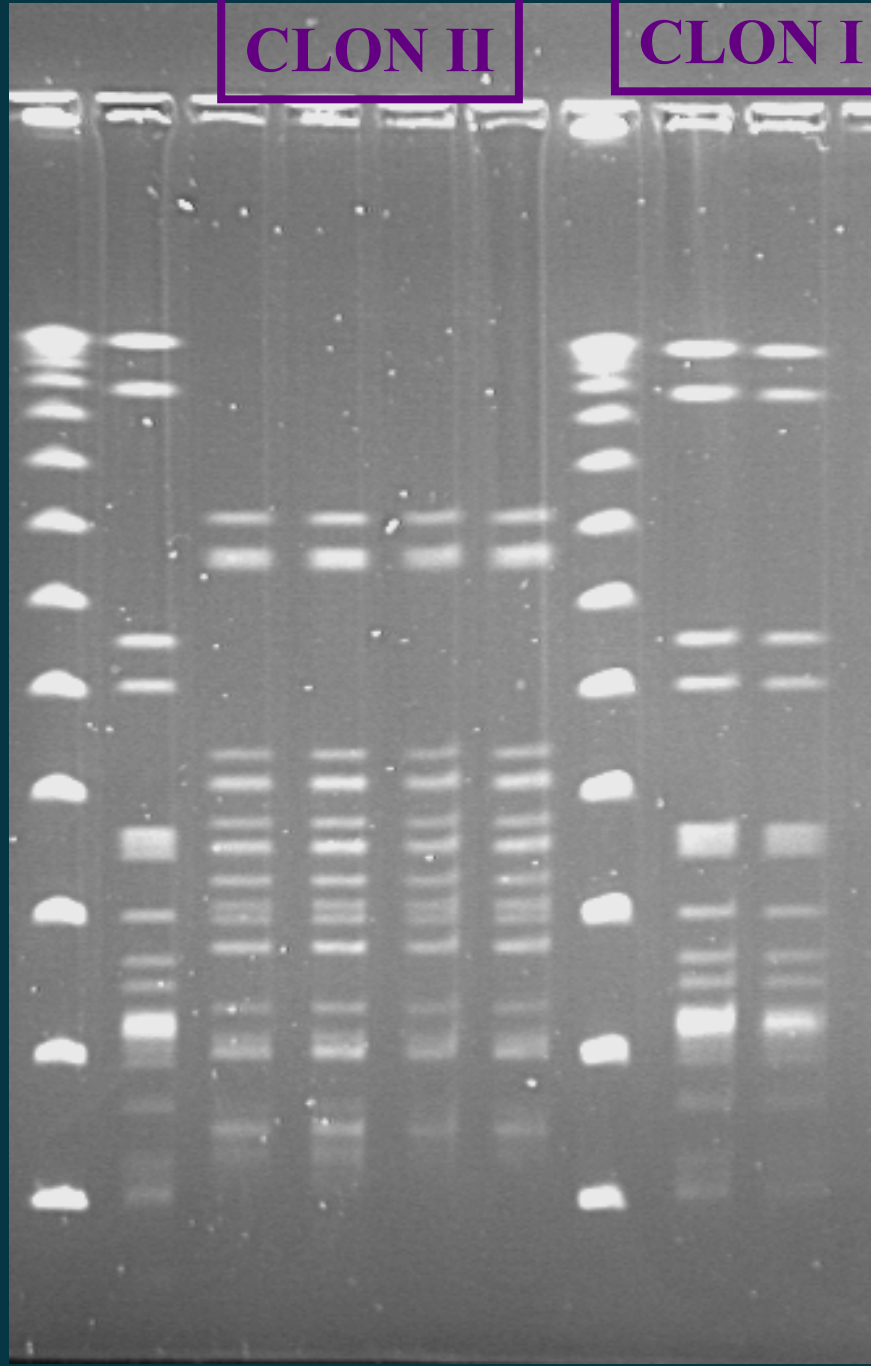
PFGE/*Acinetobacter baumannii*: COMPARACIÓN DE LOS CLONES PREDOMINANTES CON AISLAMIENTOS DE OTROS PAISES

1. EXTRACCION DE DNA
2. DIGESTION CON *ApaI*
3. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO:
200 V DURANTE 20 HORAS A 14°C
PULSOS EN RAMPAS: INICIAL 5 SEG., FINAL 13 SEG
4. RESULTADO EN IMAGEN COMPUTERIZADA
5. BASES DE DATOS INTERNACIONALES



CLON II

CLON I



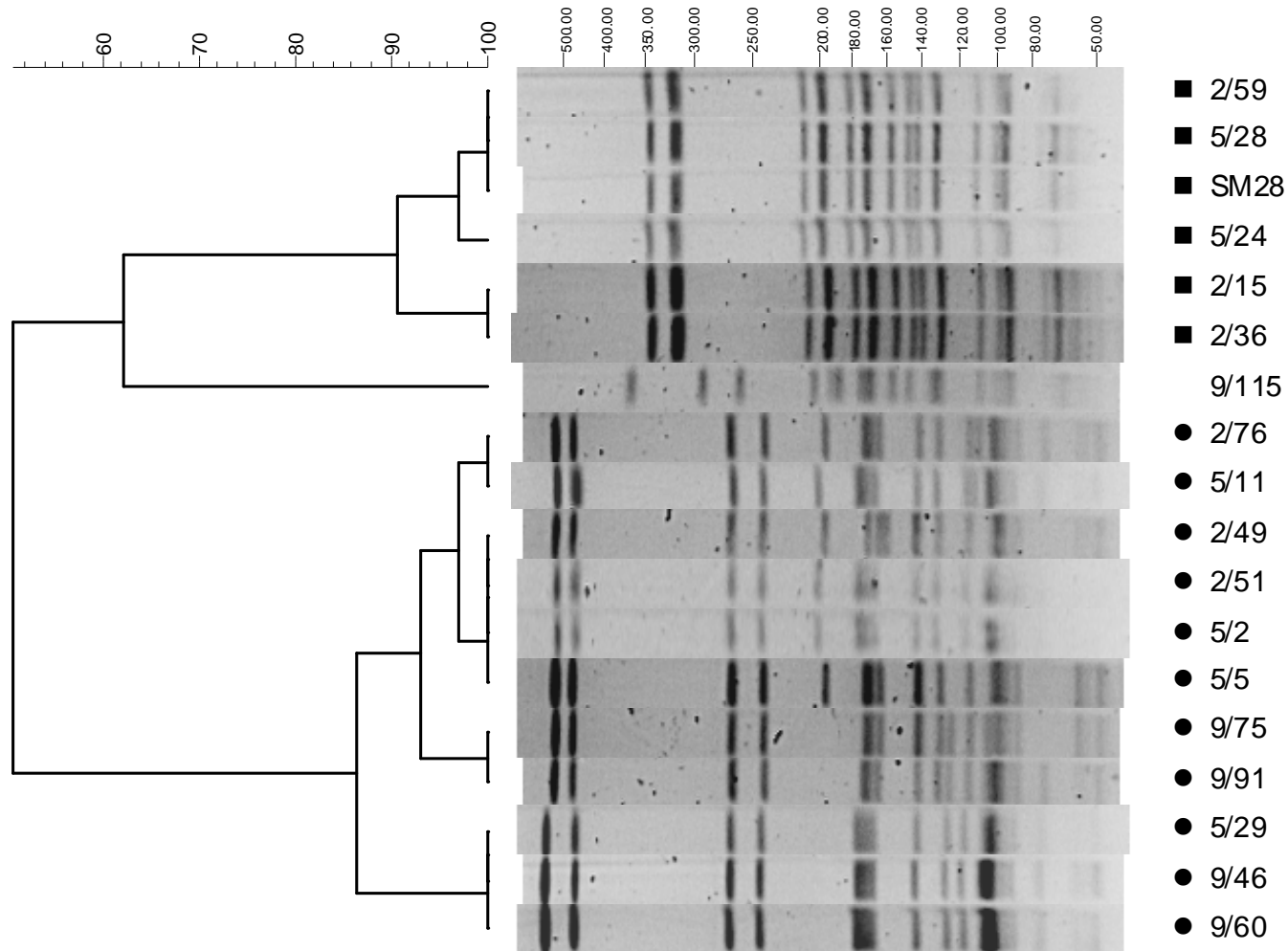
PFGE *Apa I*

Aislamientos del clon I
y II desde 1999-2005

Dice (Opt0.20%) (Td 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE

PFGE

kb

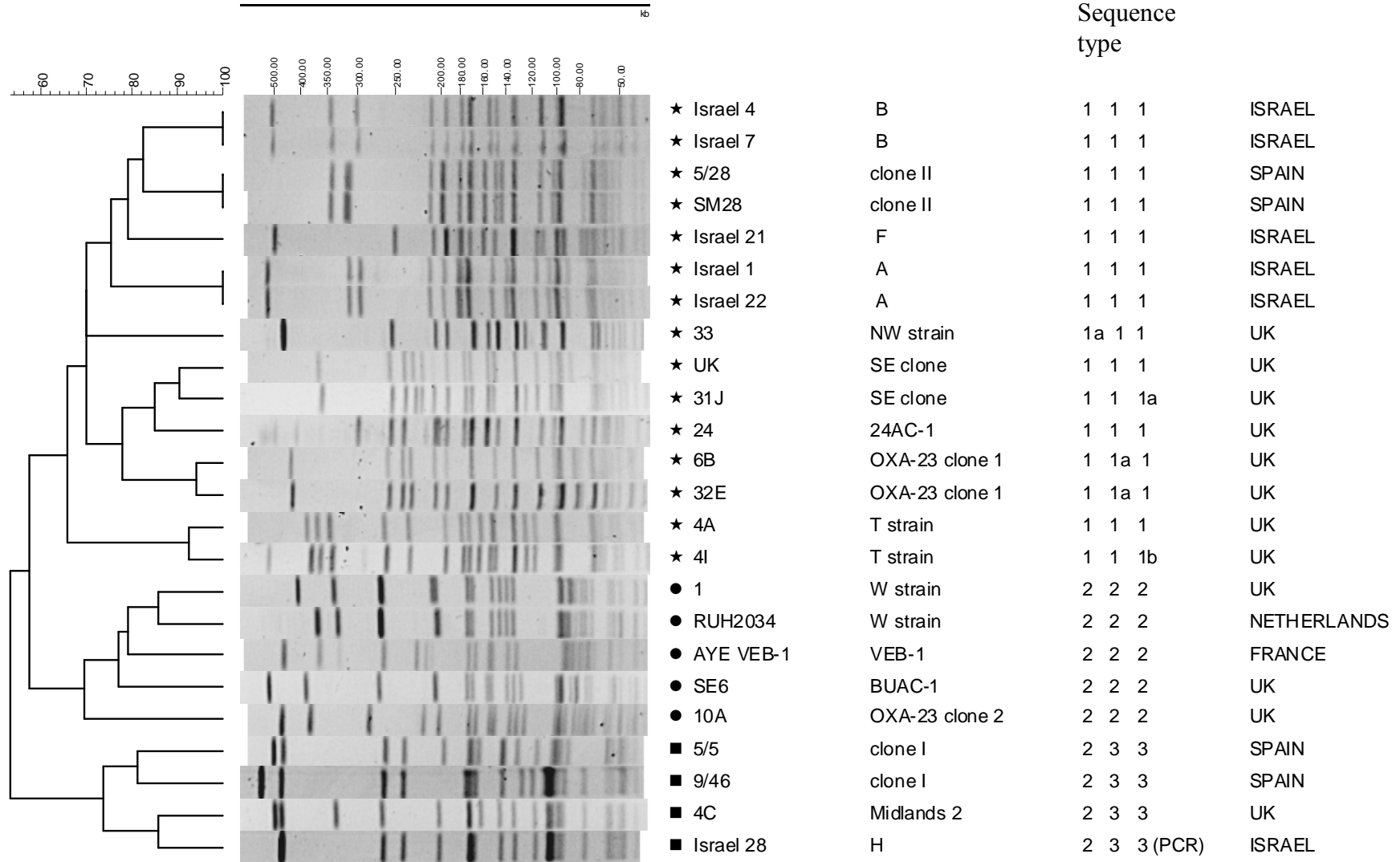


Comparación de aislamientos del clon I y II con otros de procedentes de otros países

Dice (Opt:0.20%) (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

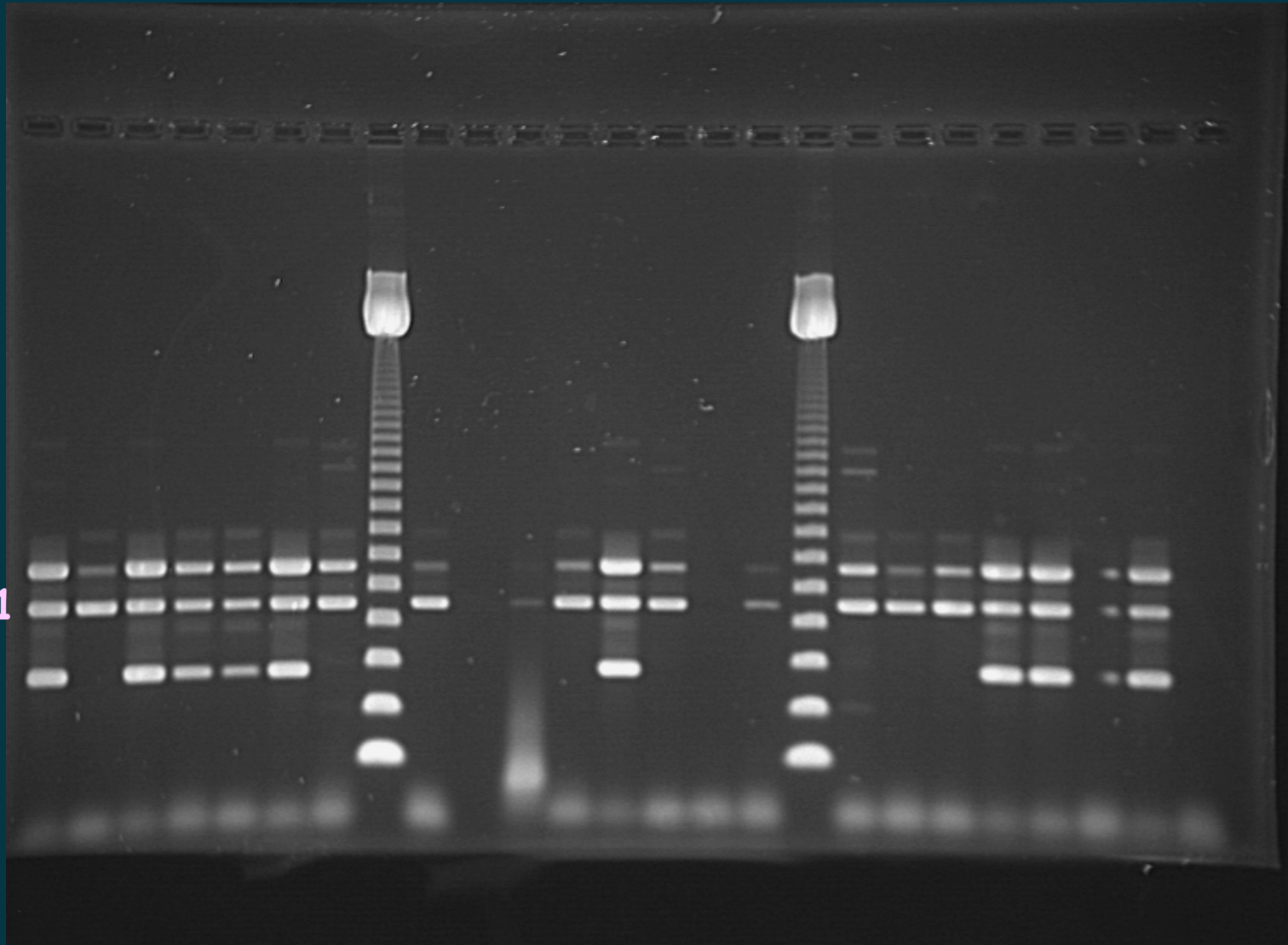
PFGE

PFGE



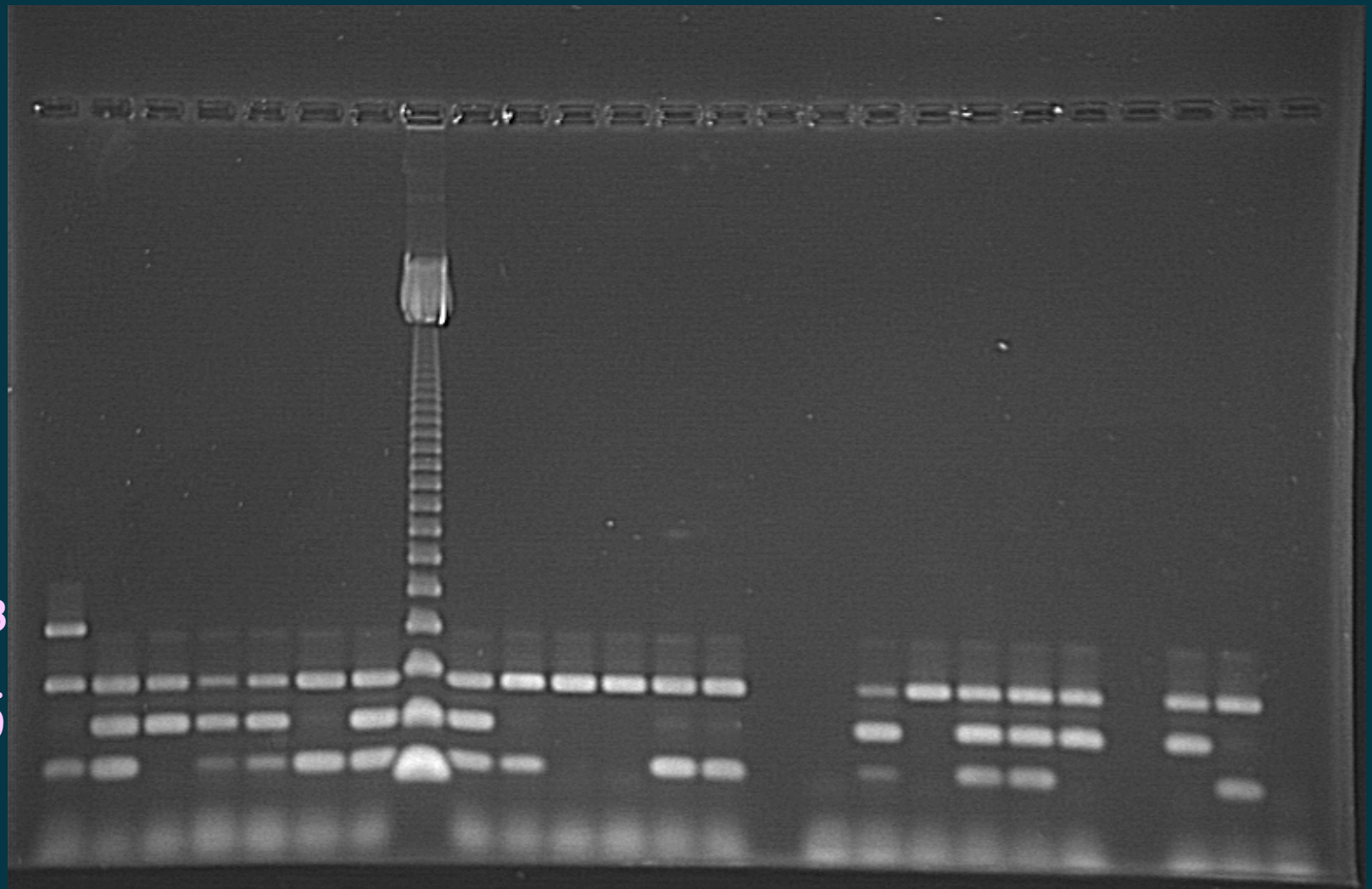
Multiplex-PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

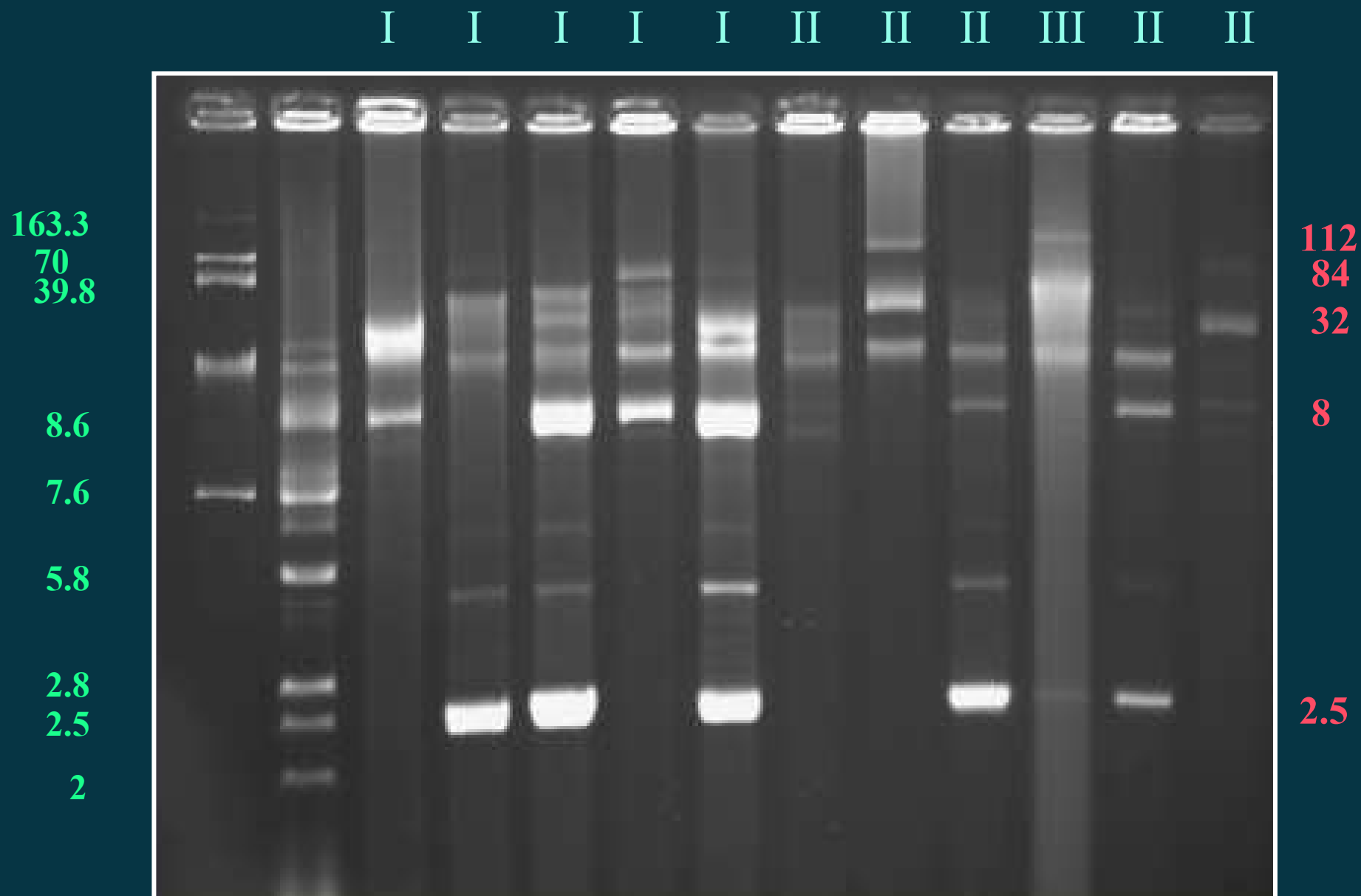
CsuE
bla OXA-51
OmpA



Multiplex-PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE CARBAPENEMASAS Y DE LA INTEGRASA TIPO 1

bla OXA-23
bla OXA-51
bla OXA-40
Int 1





PERFILES DE PLÁSMIDOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES AISLAMIENTOS ESTUDIADOS DE LOS CLONES I y II, CON SU CORRESPONDIENTE TAMAÑO EXPRESADO EN Kb

Isolate	Year	Sample	PFGE	MIC (mg/L)						OXA-type carbapenemase		Sequence type group	Plasmids (kb)
				IPM	MEM	CAZ	CTX	AMK	GEN	-40	-51		
9/46	1999	sputum	I	128	>128	>128	>128	0.25	4	+	+	3	2.5, 8, 32
9/75	1999	Sputum	I	>128	>128	16	>128	64	128	+	+	3	8
9/91	1999	Urine	I	>128	>128	>128	>128	32	>128	-	+	3	2.5, 70
9/60	1999	Sputum	I	>128	4	16	64	8	4	+	+	3	2.5
2/49	2002	Sputum	Ia	64	>128	>128	>128	16	>128	+	+	3	2.5, 8, 29, 82
2/76	2002	Sputum	Ia	128	>128	128	128	>128	128	+	+	3	8, 32
5/2	2005	Sputum	Ia	64	32	16	>128	4	4	-	+		2.5, 8, 22
5/5	2005	Sputum	Ia	>128	>128	>128	>128	8	>128	+	+	3	2.5, 8, 32
5/29	2005	Sputum	I	>128	>128	64	>128	128	>128	+	+	3	2.5, 8, 29
2/51	2002	Sputum	Ia	128	>128	>128	>128	128	>128	-	+	3	2.5, 30
5/11	2005	Urine	Ia	>128	>128	32	>128	128	>128	-	+	3	2.5, 8, 30
9/28	1999	Wound	II	>128	>128	32	>128	16	>128	+	+	1	8, 32, 82, 112
2/15	2002	Sputum	II	64	128	32	>128	128	>128	+	+	1	2.5, 8, 32
2/36	2002	Sputum	II	64	128	>128	>128	32	>128	+	+	1	84, 125
2/59	2002	Wound	II	8	8	128	>128	4	>128	-	+	1	2.5, 8
5/24	2005	Sputum	II	64	>128	64	>128	8	>128	+	+	1	8, 32
5/28	2005	sputum	II	>128	>128	>128	>128	32	>128	+	+	1	8, 32, 82

RESULTADOS MÁS RELEVANTES ENCONTRADOS EN LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

CONCLUSIONES

1. El estudio de los alelos del gen *ompA* y *csuE* mostraron la similitud entre el clon I y el grupo SG 3 de Reino Unido, y el clon II con el grupo SG 1.
2. Todos los aislamientos fueron PCR-positiva para OXA-51 y PCR-negativa OXA-23 y OXA-58.
3. Todos los aislamientos presentaron integrones de clase 1 (rango de 550 a 1200 bp) y plásmidos que oscilaban entre 2.5 y 125 (frecuente la presencia de varios plásmidos en el mismo aislamiento).

FASE III

ESTUDIO DEL SOPORTE GENÉTICO DE
LA CARBAPENEMASA OXA-40 Y DE
LAS ESTRUCTURAS RELACIONADAS
CON SU TRANSFERENCIA

MÉTODOS

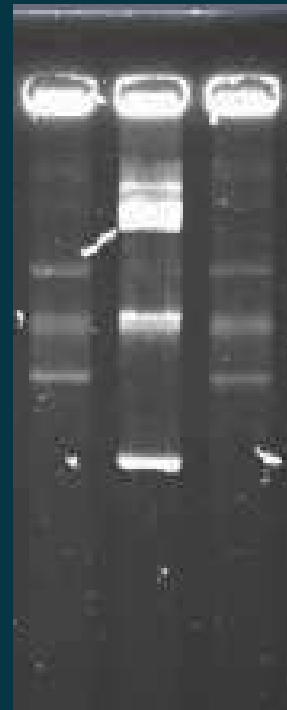
- LOCALIZACIÓN DEL GEN *bla*_{OXA-40}: mapeo de plásmidos con enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI* and *HindIII* y posterior hibridación mediante Southern transfer de DNA plasmídico y de las correspondientes digestiones con una sonda *bla*_{OXA-40} (dUTP-digoxigenina)
- EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA:
 - Conjugación
 - Transformación
 - Electroporación
- SECUENCIAS DE INSERCIÓN *IsAba* 1, 2 y 3: PCR

HALLAZGOS QUE HACÍAN SOSPECHAR DEL SOPORTE PLASMÍDICO DEL GEN *bla* OXA-40

P23

Ab28

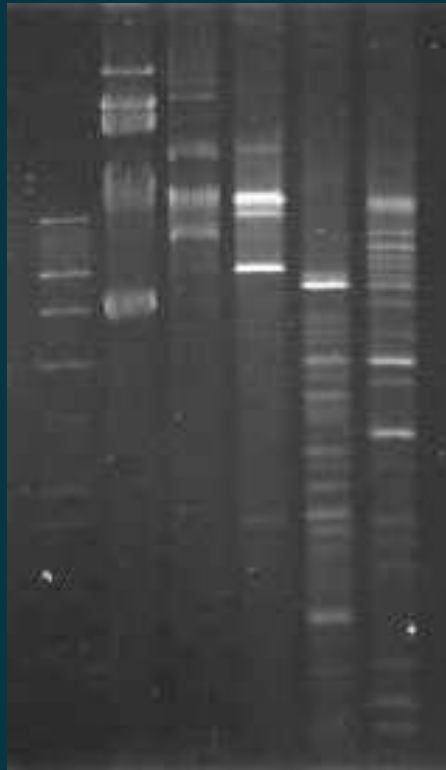
Sonda *bla* OXA-40



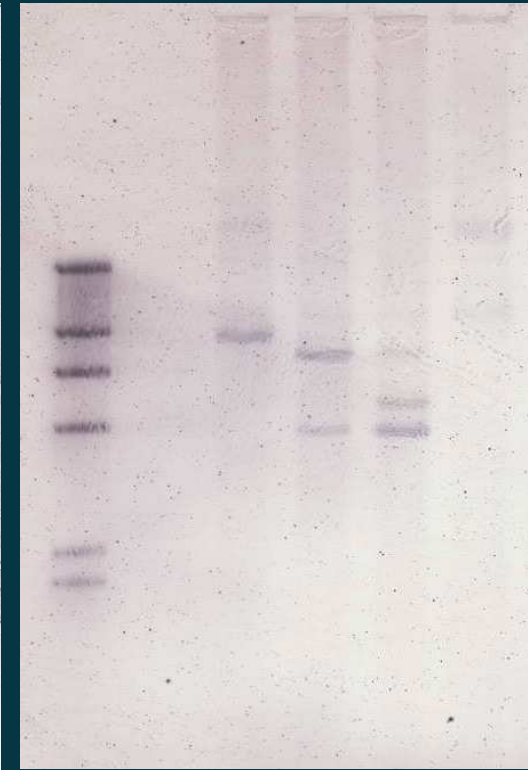
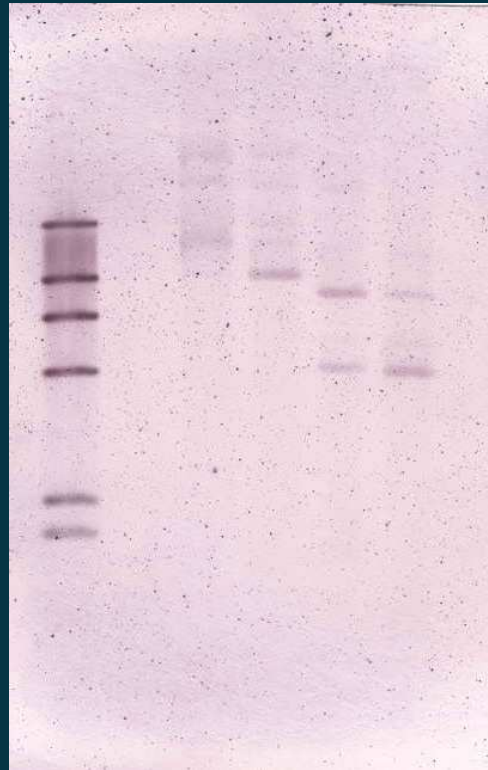
→ 112
→ 82
→ 32
→ 8



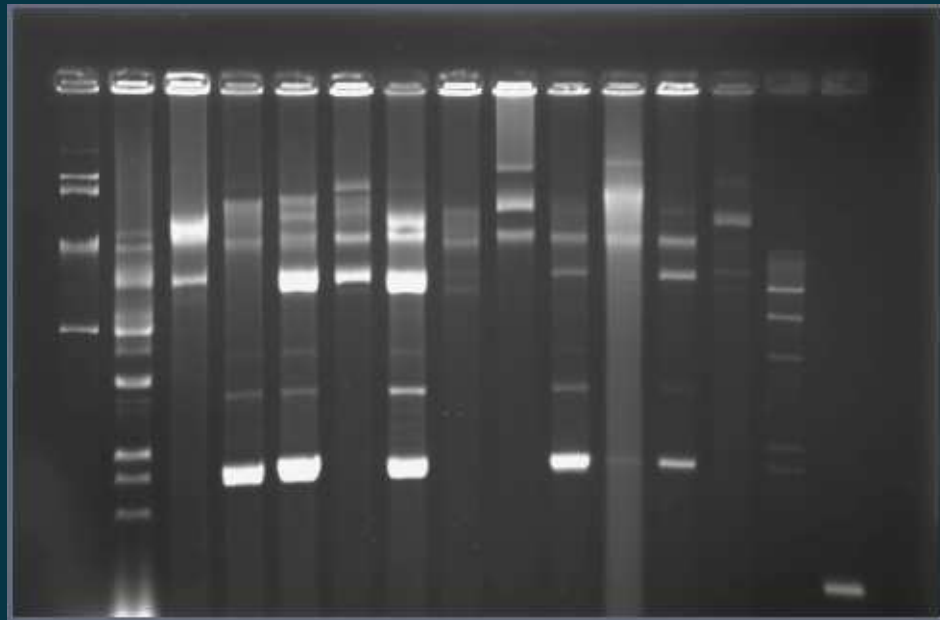
- Clon endémico de *Acinetobacter baumannii* en España y Portugal
- *Acinetobacter haemolyticus* en Portugal
- *Acinetobacter baumannii* en Estados Unidos
- *Pseudomonas aeruginosa* en España



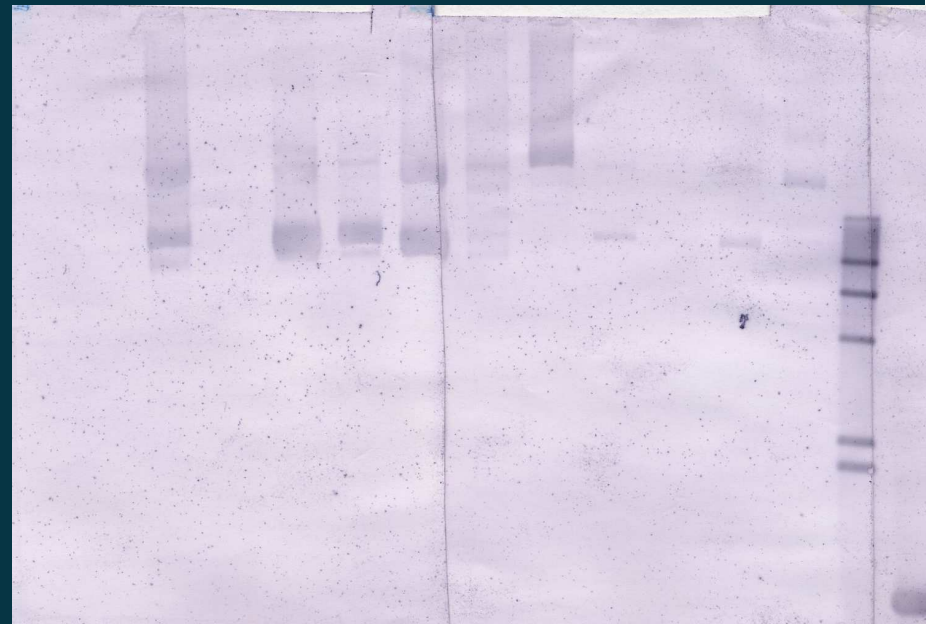
23130 bp
9416bp
6557 bp
4300 bp



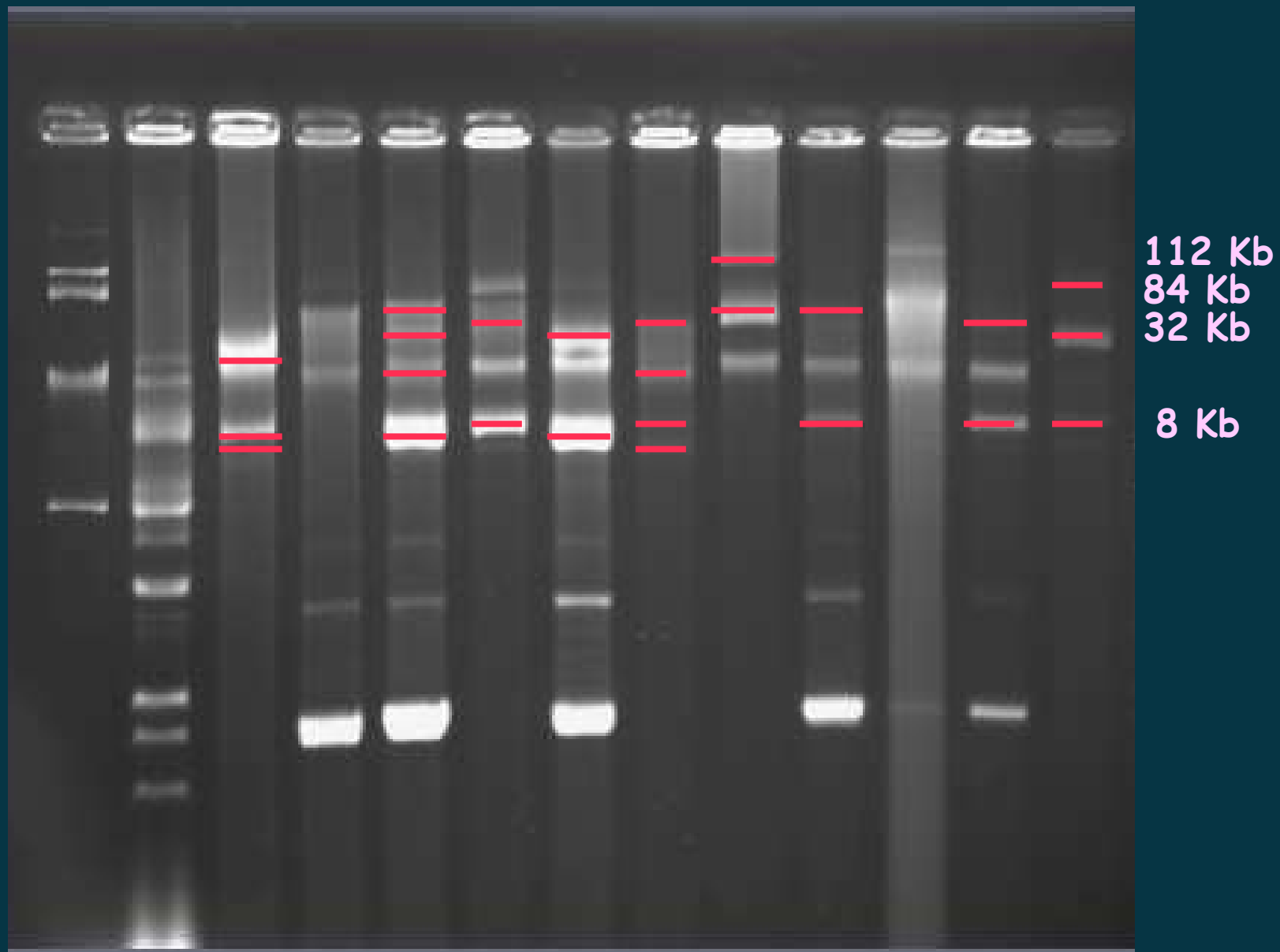
1. DNA PLASMÍDICO Y DIGESTIONES CON *Pst* I, *Hind* III y *Eco* RI
2. HIBRIDACIONES CON LA SONDA OXA-40



*SOUTHERN BLOT Y SU
CORRESPONDIENTE HIBRIDACIÓN
CON LA SONDA *bla*_{OXA-40}*



FRAGMENTOS QUE HIBRIDARON CON LA SONDA *bla*_{OXA-40}



RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN: SEÑALES POSITIVAS EN DIFERENTES ESTRUCTURAS DE TAMAÑOS DE 8, 32, 84 Y 112 Kb LO QUE EVIDENCIA EL SOPORTE PLASMÍDICO DEL GEN *bla*_{OXA-40}
- SECUENCIAS DE INSERCIÓN IS*Aba* 1, 2 y 3: DIEZ AISLAMIENTOS IS*Aba* 1 POSITIVOS DE LOS CUALES CUATRO TAMBIEN CONTENÍAN IS*Aba* 2