

*Estudio de genes de
resistencia a
aminoglucósidos en
cepas hospitalarias de
Acinetobacter baumannii*

Trabajo autorizado y revisado por:

Dra. María del Mar Tomás Carmona

Dr. Germán Bou Arévalo

Laura Fernández García

29/06/2015

*Estudo dos xenes de
resistencia a
aminoglucósidos en
cepas hospitalarias de
Acinetobacter baumannii*

Trabajo autorizado y revisado por:

Dra. María del Mar Tomás Carmona

Dr. Germán Bou Arévalo

Laura Fernández García

29/06/2015

*Study of aminoglycoside resistant genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii**

Trabajo autorizado y revisado por:

Dra. María del Mar Tomás Carmona

Dr. Germán Bou Arévalo

Laura Fernández García

29/06/2015

Índice:

<u>Resumen</u>	5
<u>Abstract</u>	6
<u>Resumo</u>	7
<u>Introducción</u>	8
<u>Objetivos</u>	13
<u>Antecedentes</u>	14
<u>Material y métodos</u>	16
<u>Resultados</u>	22
<u>Discusión</u>	27
<u>Conclusión</u>	32
<u>Agradecimientos</u>	33
<u>Bibliografía:</u>	34

Resumen:

Con este estudio se pretende conocer la presencia de 6 genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs), en 151 cepas clínicas procedentes de 34 hospitales de todo el territorio español. El estudio de la presencia o ausencia de dichos genes se ha llevado a cabo mediante la técnica de PCR, con posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos, con el objeto de confirmar la amplificación. Los resultados obtenidos son similares a los esperados con una alta prevalencia del gen *aac(3)-Ia* asociado a la resistencia a gentamicina, antibiótico con el mayor número de resistencias dentro de las cepas analizadas; siendo la combinación más frecuente *aac(3)-Ia* con *aph(3)-Ia* seguida por la combinación de *aac(3)-Ia* con *aac(6)-Ib*, en el caso de combinación de dos genes y *aac(3)-Ia*, *aac(6)-Ib* y *aph(3)-Ia* en el caso de las combinaciones de tres genes. Tanto las combinaciones de genes, así como los valores de expresión de los genes observados en estas cepas se asemejan a las expuestas por otros investigadores en sus respectivos trabajos. Algunas de las cepas muestran un resultado anómalo, pero podría explicarse por la presencia de otros mecanismos de resistencia, mutaciones o bien por un fallo durante el proceso de estudio de resistencia. A pesar de los datos anómalos se ha demostrado claramente la amplia distribución de estos genes de resistencia y la importancia de su seguimiento y control no solo dentro del ámbito nacional, sino también en el resto del mundo.

Abstract:

In this study it is studied if there is any gen which codifies for aminoglycoside modifying enzymes in the 151 clinical isolates for 34 Spanish hospitals. The study of the presence or not of these genes has been done by PCR assays and in the cases of correct amplifications our samples were sent to sequencing program in order to confirm the results. The results obtained were similar to the expected ones with prevalence of aac(3)-Ia gen, which is associated with gentamicin resistant phenotype. This antibiotic is the one which has the most resistant assays in our study. The majority gen combination was aac(3)-Ia with aph(3)-Ia, followed by the combination of aac(3)-Ia with aac(6)-Ib; the three genes most frequent combination was aac(3)-Ia, aac(6)-Ib and aph(3)-Ia. The genes combinations and the number of assays with any resistant gen, which were observe in this study, have high correlation with the results that other researchers obtained in their experiments. In spite of some of the isolates have a different result than expected. Nevertheless, such results can be explained with the presence of other resistant mechanisms, mutations or possible errors during the resistant study in these isolates. However, it is undoubtedly shown that there is a wide presence of these resistant genes in Spain and the importance of vigilance and control of these resistant bacteria in this country and worldwide.

Resumo:

Con este estudo pretendíase coñecer a presenza de 6 xenes que codifican para encimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs), en 151 cepas clínicas procedentes de 34 hospitais de todo o territorio español. O estudo da presenza ou ausencia dos devanditos xenes levouse a cabo mediante a técnica de PCR e con posterior secuenciación dos fragmentos obtidos, co obxecto de confirmar a amplificación. Os resultados obtidos son similares aos esperados cunha alta prevalencia do xene aac(3)-Ia asociado á resistencia a gentamicina, antibiótico co maior número de resistencias dentro das cepas analizadas; sendo a combinación máis frecuente aac(3)-Ia con aph(3)-Ia seguida pola combinación de aac(3)-Ia con aac(6)-Ib, no caso de combinación de dous xenes e aac(3)-Ia, aac(6)-Ib e aph(3)-Ia no caso das combinacións de tres xenes. Tanto as combinacións de xenes, así como os valores de expresión dos xenes observados nestas cepas aseméllanse ás expostas por outros investigadores nos seus respectivos traballos. Algunhas das cepas mostran un resultado anómalo, pero podería explicarse pola presenza doutros mecanismos de resistencia, mutacións ou ben por un fallo durante o proceso de estudo de resistencia. A pesar dos datos anómalos demostrouse claramente a ampla distribución destes xenes de resistencia e a importancia do seu seguimento e control non só dentro do ámbito nacional, senón tamén no resto do mundo.

Introducción:

Acinetobacter baumannii es una bacteria Gram-negativa, aerobia estricta, no motil, no fermentadora, no patógena, catalasa positiva, oxidasa negativa, con morfología cocobacilar en agar no selectivo (Aliakbarzade K, *et al.*, 2014) y con un contenido de G-C en su DNA del 39-47% (Peleg AY, *et al.*, 2008). *A. baumannii* es una bacteria que se encuentra de forma habitual en casi todos los ambientes sólidos o líquidos y que se ha adaptado eficientemente al ambiente hospitalario (Peleg AY, *et al.*, 2012). De todos los *Acinetobacter* spp., *A.baumannii* es una de las que está más frecuentemente implicado en las infecciones nosocomiales, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (Coyne S, *et al.*, 2011). A pesar de considerarse un microorganismo poco virulento es capaz de producir infecciones en humanos, particularmente en pacientes con una enfermedad de base grave. El éxito de *A.baumannii* como patógeno nosocomial se atribuye a su capacidad para persistir en el ambiente hospitalario durante largos periodos de tiempo, probablemente asociado con la producción de *biofilms*, y a la facilidad que tiene para desarrollar resistencia a los antimicrobianos, incluyendo los de amplio espectro, como los carbapenémicos, la colistina y la tigeciclina. Estas dos características contribuyen a que los brotes nosocomiales causados por *A.baumannii* sean muy difíciles de controlar y a que las opciones terapéuticas para tratar las infecciones que causan sean escasas o nulas (Fernández-Cuenca F, *et al.*, 2013). Debido a esto *A.baumannii* ha sido reconocido como la causa más importante de infección nosocomial en inmunodeprimidos, especialmente de aquellos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). En las últimas dos décadas *A.baumannii* ha emergido como uno de los patógenos nosocomiales más relevantes en el mundo, se cree que es el agente causante de enfermedades como neumonía, bacteriemias, meningitis, infecciones tisulares, infecciones del tracto urinario, etc. todas asociadas con alta tasa de mortalidad (Diomedes A, 2005) (Peleg AY, *et al.*, 2008).

Desde la época de 1970, la multirresistencia (MDR, *Multiple Drug Resistance*) se ha ido extendiendo entre los miembros del género *Acinetobacter* de forma alarmante, afectando a pacientes hospitalizados y provocando las subsiguientes epidemias. Recientemente se ha publicado mucho sobre infecciones por *Acinetobacter* multirresistentes debido a que afectaron a un grupo de soldados americanos tras volver de Irak (Dijkshoorn L, *et al.*, 2007). Es alarmante como en los últimos 15 años han

aumentado significativamente ciertas habilidades de *A.baumannii* que le confieren resistencia a diferentes antibióticos (Peleg AY, *et al.*, 2008).

Algunos de los cambios más importantes que ha sufrido *A.baumannii* son (Villar M, *et al.*, 2014):

- El aumento de las infecciones en pacientes inmunodeprimidos de las UCIs y en algunos casos la producción de infecciones no nosocomiales.
- Incrementos en la resistencia a carbapenemas.
- La colistina ha reemplazado los carbapenemas como terapia elegida, pero ya se empiezan a ver resistencias a colistina.
- Se ha demostrado que un exitoso grupo de clones son los responsables de al menos la mitad de las infecciones, los cuales muestran resistencias a antimicrobianos lo que aumenta su virulencia.

Los mecanismos de resistencia que se conocen son divididos en cuatro categorías (Tafur JD, *et al.*, 2008):

- 1. La modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. Las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación.
- 2. Bombas de expulsión:** operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas.

Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos. Para ello utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico (generalmente con protones) como sustrato energético (Magnet S, *et al.*, 2001). El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro

de la célula. Pero también tienen funciones en la comunicación célula-célula vía *quorum sensing* (percepción del número de miembros de la comunidad) y en la patogenicidad bacteriana.

Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un fármaco (generalmente, codificadas en plásmido) o inespecíficas (expresadas en el cromosoma bacteriano). Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos empleándose un solo mecanismo. Las bombas de expulsión causan pequeños aumentos en las CMI's (Concentración Mínima Inhibitoria), pero cuando aparecen simultáneamente varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínicamente evidente. De esta manera, las bombas de expulsión, la disminución de la expresión de porinas, las mutaciones en los sitios de acción y las enzimas hidrolíticas trabajan conjuntamente para defender a la bacteria de cualquier producto tóxico incluidos los antibióticos.

Estos transportadores se pueden clasificar en seis superfamilias: la familia ABC (*ATP binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), MATE (*resistance nodulation division*), RND (*resistance nodulation division*), SMR (*small multidrug resistance*) y DMT (*drug metabolite transporter superfamily*). En *A.baumannii* la resistencia mediada por bombas de expulsión se asocia habitualmente a las familias RND y MFS (Coyne S, *et al.*, 2011).

- 3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** cambios de la bicapa lipídica mediante la realización de cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico.
- 4. Alteraciones del sitio de acción:** las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta. Este es un mecanismo utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas que se unen a penicilinas.

A.baumannii muestra una gran resistencia intrínseca, estos mecanismos de resistencia pueden estar codificados en el cromosoma (transferencia horizontal o mutación de genes existentes) o por el contrario haber sido adquiridos, bien por vía plasmídica, transposones, integrones, islas de resistencia, etc. (Esterly J, *et al.*, 2011) (Yoon EJ, *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos de resistencia más característicos de *A.baumannii* son las bombas de expulsión, de las que se han descrito miembros de cinco de las superfamilias (ABC, RND, SMR, MATE y MFS) como causantes de la resistencia (Nemec A, *et al.*, 2007) (Coyne S, *et al.*, 2011).

Los Gram negativos están asociados normalmente a bombas de expulsión de la familia RND. Los sistemas RND están implicados en varias funciones, incluyendo la homeostasis celular, exportación de factores de virulencia y expulsión de productos tóxicos. Las dos bombas de expulsión más caracterizadas de *A.baumannii* son la AdeABC y la AdeIJK (Rumbo C, *et al.*, 2013); el operón AdeABC se ha encontrado en el 80% de los aislados clínicos. La bomba AdeABC es el mayor mecanismo de resistencia a antibióticos descrito en *A.baumannii*. AdeIJK está presente en todos los *A.baumannii* y confiere resistencia a β -lactámicos, fluoroquinolonas, cloramfenicoles, rifampicina, eritromicina, clindamicina y tetraciclina-tigeciclina (Coyne S, *et al.*, 2010) (Coyne S, *et al.*, 2010).

Aminoglucósidos:

Los aminoglucósidos atacan a la bacteria en dos pasos, primero eliminan los aminoglucósidos internos de la bacteria (necesarios para su supervivencia) y posteriormente, se unen a los ribosomas bacterianos impidiendo la síntesis de proteínas. Los aminoglucósidos han sido el tratamiento de referencia para muchas infecciones, pero en los últimos años los mecanismos de resistencia han aumentado mucho. El mecanismo de resistencia a carbapenemas en *A.baumannii* es la producción de β -lactamasas tipo OXA y la resistencia a quinolonas está relacionada con las alteraciones en las dianas enzimáticas GyrA y ParC (Aliakbarzade K, *et al.*, 2014).

Existen tres clases de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs) y todas han sido descritas en *A.baumannii*. Estas enzimas son: acetiltransferasas (AAC), nucleotidil transferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH); generalmente los niveles más altos de resistencia son producidos por las AACs y las APHs (Akers KS, *et al.*, 2010) (Seward RJ, *et al.*, 1998).

ANT(2'')-Ia se identificó en *Klebsiella pneumoniae* en 1971 y es una de las enzimas más prevalentes clínicamente en Norte América. ANT(2'')-Ia confiere resistencia antibiótica por un mecanismo dependiente de magnesio que transfiere AMP (Adenosín Monofosfato) a los sustratos aminoglucósidos (Cox G, *et al.*, 2015).

Objetivos:

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la presencia de 6 genes que confieren resistencia a antibióticos del tipo aminoglucósidos, que están relacionados con las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs), en 151 cepas seleccionadas *A.baumannii* procedentes de 34 hospitales del territorio español.

Antecedentes:

En este proyecto han participado 34 hospitales de toda España que se han puesto de acuerdo para la realización de un estudio multicéntrico con objeto de estudiar la resistencia de ciertas bacterias implicadas en las enfermedades infecciosas provocadas por patógenos nosocomiales. Durante el desarrollo de este estudio se observa el acumulo de resistencias antibióticas en ciertas cepas de *A.baumannii*. Se procede a tres lecturas de cada antibiograma.

1. Se seleccionó las CMI de aminoglucósidos (AGs): gentamicina (Gm), tobramicina (To), amikacina (Ak) y netilmicina (Nt).
2. Consenso de lectura, cuando hay discrepancias de lectura tomo consenso de dos valores, solo ocurrió en un 10% de las cepas con una dilución de diferencia, y en ningún caso variaba la categoría de sensibilidad o resistencia.
3. Se eliminó 18 cepas no *A. baumannii* (*Pseudomonas*, *Serratia*...etc.)
4. Se analizó las CMI por categorías de Resistente o susceptible por puntos de corte EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (2014) y para netilmicina de los del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2014). (Tabla 1)

Tabla 1. Representación de los porcentajes y sensibilidad de las diferentes cepas estudiadas

446 cepas	EUCAST		CLSI		
	S (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Amikacina (A)	227 (50.9)	219 (49.1)	227 (50.9)	70 (15.6)	149 (33.5)
Gentamicina (Gm)	138 (31)	308 (69)	138 (31)	21 (4.7)	287 (64.3)
Tobramicina (To)	178 (40)	268 (60)	178 (40)	56 (12.5)	212 (47.5)
Netilmicina (Nt)			165 (37)	38 (8.5)	243 (54.5)

5. Análisis de los datos y selección de cepas para el estudio de AMEs.

De todas las cepas estudiadas 387 de las 446 (86,7%) son resistentes o de resistencia intermedia a alguno de los aminoglucósidos. Mientras que 59 de las 446

(13,2%) cepas son susceptibles a los cuatro aminoglucósidos. Los fenotipos de resistencia obtenidos a los aminoglucósidos estudiados (gentamicina, tobramicina, netilmicina o amikacina) en las 446 cepas de *A. baumannii* son representados en la tabla 2.

Tabla 2. Fenotipos de las bacterias estudiadas.

F. R AGs	N° cepas	%		F. R AGs	N° cepas	%
Ak, Gm, Nt, To	118	26.45		Gm, To	24	5.4
Gm, Nt, To	42	9.4		Ak, Gm, Nt	16	3.6
Nt, To	36	8.1		Ak, Gm, To	11	2.4
Ak, Gm	35	7.8		Ak	4	0.8
Ak, Nt, To	35	7.8		Nt	2	0.4
Gm, Nt	32	7.2		To	2	0.4
Gm	30	6.7		Sensibles	59	13.2

Material y métodos:

- Selección de cepas: Para la realización de este estudio se han seleccionado, del total de las 446 cepas de *A.baumannii* obtenidas de los pacientes de 34 centros hospitalarios españoles en colaboración, 128 cepas resistentes a antibióticos del tipo aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina y netilmicina) y 23 cepas sensibles a dichos antibióticos (tabla 3). Los criterios que se tuvieron en cuenta para la selección de las 387 cepas resistentes o intermedias a aminoglucósidos fueron:

1. Selección por REP-PCR (*Repetitive sequence-based – Polymerase Chain Reaction*) 55 REPs diferentes.
2. Selección por diferentes fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos y según el número de cepas aplicar este criterio: **>0=20** seleccionar 5 cepas, **entre 10-19** seleccionar 3, entre 5-9 seleccionar 2, **entre 1-5** seleccionar 1.
3. Para cepas con igual REP y Fenotipo de resistencia, seleccionar las estudiadas con MLST (*Multilocus sequence typing*) y PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Los criterios seguidos para la selección en las 59 cepas sensibles (a modo de control, para descartar que contengan algunos de los mecanismos investigados; si los resultados no fueran negativos) consistieron en la realización de MLST a las 59 cepas sensibles a los cuatro aminoglucósidos se realizó MLST en 31 (11 cepas del ST2 y 20 con STs únicos); seleccionamos 3 cepas del ST2 y una de cada ST único. Las cepas fueron congeladas en glicerol, tras haber crecido en placa de LB (*lysogeny broth*) durante 24h a 37°C.

Tabla 3. Cepas seleccionadas por hospital

Hospital (ciudad)	Nº de cepas seleccionadas	Hospital (ciudad)	Nº de cepas seleccionadas
H. A Coruña	1	H. Reina Sofía	5
H. la Línea Cádiz	1	H. Marqués de Valdecilla (Santander)	19
H. Santiago de Compostela	5	H. Costa del Sol (Marbella)	2

H. San Agustín (Linares)	2	H. Gregorio Marañón (Madrid)	4
H. Donosti	1	H. Virgen de las Nieves (Granada)	3
H. Clinic (Barcelona)	1	H. U. Son Dureta (Mallorca)	2
H. Pontevedra	2	H. Sant Pau (Barcelona)	2
H. Arquitecto Marcide (Ferrol)	1	H. Puerta de Hierro (Madrid)	1
H. Xeral Calde (Lugo)	2	H. Valencia	19
H. Ourense	1	H. Virgen Victoria (Málaga)	3
H. Juan Grande (Jerez)	1	H. Doctor Molines (Valencia)	5
H. Virgen del Rocío (Sevilla)	23	H. San Cecilio (Granada)	4
H. de Soria	3	H. Insular de Gran Canaria	7
H. Puerta del Mar (Cádiz)	6	Hospital Alicante	4
H. Segovia	2	H. Torrecárdenas (Almería)	2
H. 12 de Octubre (Madrid)	5	H. de Bellvitge (Barcelona)	2
H. Asturias	6	Hospital del Mar (Barcelona)	3

- Extracción de ADN: Todas las cepas de *A.baumannii* fueron sembradas en placas de LB y cultivadas en estufa a 37°C durante 24h. La extracción del material genético se llevo a cabo mediante la realización de hervidos. Usando un asa de siembra desechable de 10µl se recogió una cantidad de bacteria igual al llenado del asa y se disolvió en 500µl de agua destilada, en un ependorf. Tras 10 minutos en un baño a 100°C se procede a su centrifugación a 14.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 1 minuto, se retira el sobrenadante a un nuevo ependorf rotulado correctamente y se descarta el precipitado. En el sobrenadante se encuentra el material genético de la cepa

correspondiente que es utilizado para la realización de la PCR y congelado a -20°C para posteriores usos.

- Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos: La PCR es un método rápido para la amplificación y la detección de genes. Los cebadores a utilizar para detectar la presencia o ausencia de AMEs en dichas cepas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cebadores usados para la detección de genes AMEs en *A.baumannii* (Akers KS, et al., 2010) (Miro E, et al., 2013) (Park CH, et al., 2006).

Gen	Fenotipo de resistencia		Secuencia de DNA 5`-3`	Referencia en GenBank
<i>aac(6`)-Ib</i>	Ak,K,Nt,To	aac6'-Ib F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	M21682
		aac6'-Ib R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>aac(3)-II</i>	Gm,Nt,To	aac3-IIa F	GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA	X13543
		aac3-IIa R	TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG	
<i>aac(3)-I</i>	Gm	aac3-Ia F	GCAGTCGCCCTAAAACAAA	X15852
		aac3-Ia R	CACTTCTTCCCGTATGCCCAACTT	
<i>ant(2``)-I</i>	Gm,K,To	ant2``-Ia F	ACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGT	X04555
		ant2``-Ia R	CTTTTCCGCCCCGAGTGAGGTG	
<i>aph(3`)-I</i>	K,Nm	aph3`-Ia F	CGAGCATCAAATGAAACTGC	V00359
		aph3`-Ia R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG	
<i>aac(6`)-Ih</i>	Ak,K,Nt,To	aac6'-Ih F	TGCCGATATCTGAATC	L29044
		aac6'-Ih R	ACACCACACGTTTCAG	

Los cebadores fueron pedidos a la casa comercial Sigma. A su llegada se procedió a la reconstitución de los mismos, siguiendo las especificaciones del fabricante, para obtener un stock a 100µM. Una vez reconstituidos se procedió a la realización de alícuotas de 200µl, con una concentración de 10µM (20µl de primer y 180µl de agua destilada). Tras la preparación de los cebadores se procedió al cálculo de sus temperaturas óptimas para la PCR (tabla 5). Dicho cálculo se realizó siguiendo la formula de $T^a = [(\sum G + \sum C) * 4] + [(\sum A + \sum T) * 2]$.

Tabla 5. Temperaturas de anillamiento de los cebadores.

Gen	Nombre del primer	µl de dH2O para reconstituir los cebadores	Temperatura de anillamiento	Temperatura de PCR	Tamaño de amplicón (pb)
<i>aac(6')-Ib</i>	aac6'-Ib F	652	68°C	62°C	500
	aac6'-Ib R	1081	62°C		
<i>aac(3)-II</i>	aac3-IIa F	743	72°C	71°C	563
	aac3-IIa R	592	74°C		
<i>aac(3)-I</i>	aac3-Ia F	886	60°C	59°C	441
	aac3-Ia R	625	72°C		
<i>ant(2'')-I</i>	ant2'' -Ia F	702	74°C	71°C	572
	ant2'' -Ia R	749	72°C		
<i>aph(3')-I</i>	aph3'-Ia F	491	58°C	57°C	625
	aph3'-Ia R	804	62°C		
<i>aac(6')-Ih</i>	aac6'-Ih F	597	46°C	45°C	>700
	aac6'-Ih R	619	46°C		

*µl: microlitros

- Análisis por PCR: La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 50µl (45µl de *master mix* con 5µl de ADN), la amplificación se realizó en un termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf), siguiendo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 36 ciclos consistentes en: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de anillamiento de los cebadores (tabla 5), 1 minuto de elongación a 72°C; 10 minutos de elongación final a 72°C. La presencia y el tamaño de los amplicones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% (en 100ml de TBE1x) teñido con 5µl de “SYBR® Safe DNA gel stain” (Invitrogen). En el gel se cargan 3µl de buffer (para la posterior observación de las bandas) y 5µl de DNA, así como 2µl de marcador flanqueando las muestras; la electroforesis se realiza a 90-100 voltios durante 30 minutos. El gel es revelado con luz ultravioleta en una cámara específica para dicho uso.

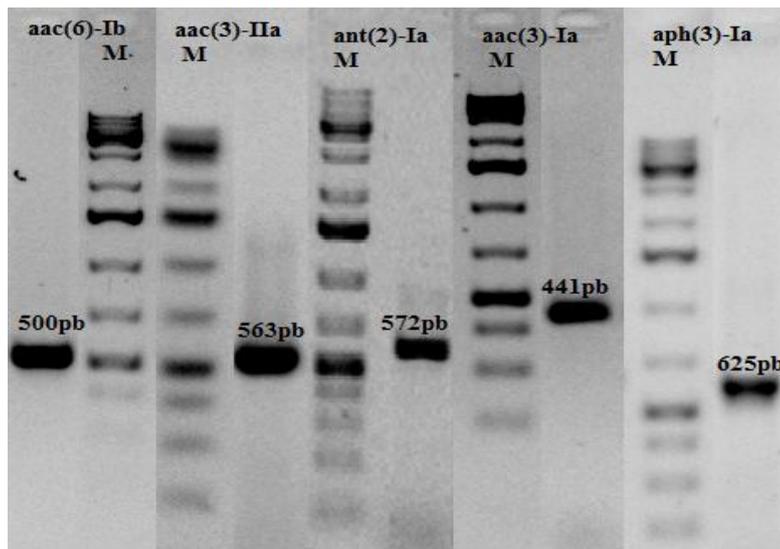


Figura 1: imagen de geles con las bandas correspondientes a cada gen de estudio.

- Secuenciación: aquellas muestras en las que se observe una única banda de amplificación (amplificación específica) del tamaño adecuado (figura 1) son enviadas a secuenciar. Para este propósito las muestras deben ser diluidas en una proporción 1:10, posteriormente se extraen 20µl de dicha dilución y se mezclan con 2,5µl del primer forward en un *ependorf* debidamente identificado y otros 20µl de la dilución a otro *ependorf* con 2,5µl del primer reverse. Posteriormente estos *ependorfs* son identificados con un número proporcionado por la casa comercial “Macrogen” (www.macrogen.com) e introducidos en un sobre para su transporte. Los resultados de la secuenciación se pueden obtener en la página web de la empresa, introduciendo el nombre de usuario y la contraseña correspondiente.

- Análisis de secuencias: lo primero antes de analizar la secuencia es comprobar el cromatograma (figura 2), si este tiene los picos definidos implica que la secuenciación ha sido correcta, pero por el contrario si los picos están mezclados y poco definidos (como muestra la ilustración 2b) la secuenciación ha sido incorrecta y por tanto hay que volver a enviar la muestra. Hay que tener en cuenta que a menudo el cromatograma de los primeros y los últimos nucleótidos siempre es del segundo tipo.

Resultados:

De las 151 cepas se han obtenido 56 (37,09%) cepas negativas a todos los genes, 53 (35,10%) cepas que han dado positivo a uno de los 6 genes, 30 (19,87%) que dieron positivas a dos genes, 11 (7,28%) que dieron positivo a 3 genes y 1 (0,66%) positivas para 4 genes. Siendo un 23,84% (36) de las cepas positivas para el gen *aac(6)-Ib*, un 5,96% (9) de las cepas positivas para el gen *aac(3)-IIa*, un 36,42% (55) de las cepas positivas para el gen *aac(3)-Ia*, un 11,92% (18) de las cepas positivas para el gen *ant(2)-Ia* y un 21,19% (32) de las cepas positivas para el gen *aph(3A)-Ia*. En el caso del gen *aac(6)-Ih* se han encontrado 110 cepas negativas y 41 (27,15%) de resultado dudoso. Obteniendo un total de 97 cepas (64,24%) con uno o varios genes de resistencia dentro de las 151 cepas del estudio, sin incluir a las correspondientes al gen *aac(6)-Ih*.

De todas las cepas positivas a algún gen se han dado 11 cepas en las que siendo sensibles a los antibióticos han dado positivo para alguno de los genes de estudio. De igual forma, de todas las cepas que dieron negativo para todos los genes se han dado 37 casos, en los que las cepas eran resistentes a algunos de los antibióticos estudiados.

Tras un análisis estadístico, mediante tablas de contingencia y test chi-cuadrado, se obtuvo que la presencia de los genes *aac(6)-Ib* y *aac(3)-Ia* son independientes de la expresión del fenotipo de resistencia (tablas 6 y 8); mientras que la presencia de los genes *aac(3)-II*, *ant(2)-Ia*, *aph(3)-Ia* si están relacionados con la expresión del fenotipo de resistencia (tablas 7, 9 y 10). En lo referente al gen *aac(6)-Ih* los datos obtenidos no son concluyentes, viéndose una relación entre aquellos fenotipos dudosos, probablemente positivos y la expresión del fenotipo de resistencia (tabla 11).

Tabla 6. Tabla de contingencia *aac6Ib* * resistencia6Ib y pruebas de chi-cuadrado.

			Resistencia <i>aac(6)-Ib</i>		Total
			sensible	resistente	
<i>aac6Ib</i>	-	Recuento	25	90	115
		Frecuencia esperada	29,7	85,3	115,0
	+	Recuento	14	22	36
		Frecuencia esperada	9,3	26,7	36,0
Total		Recuento	39	112	151
		Frecuencia esperada	39,0	112,0	151,0

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,209 ^a	1	,040		
Corrección por continuidad ^b	3,362	1	,067		
Razón de verosimilitudes	3,978	1	,046		
Estadístico exacto de Fisher				,050	,036
Asociación lineal por lineal	4,181	1	,041		
N de casos válidos	151				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,30.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Tabla 7. Tabla de contingencia aac3IIa * resistencia3IIa y pruebas chi-cuadrado.

			resistencia3IIa		Total
			sensible	resistente	
aac3IIa	-	Recuento	25	117	142
		Frecuencia esperada	23,5	118,5	142,0
	+	Recuento	0	9	9
		Frecuencia esperada	1,5	7,5	9,0
Total		Recuento	25	126	151
		Frecuencia esperada	25,0	126,0	151,0

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,899 ^a	1	,168		
Corrección por continuidad ^b	,838	1	,360		
Razón de verosimilitudes	3,369	1	,066		
Estadístico exacto de Fisher				,357	,187
Asociación lineal por lineal	1,886	1	,170		
N de casos válidos	151				

a. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,49.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Tabla 8. Tabla de contingencia aac3Ia * reitencia3Ia y prueba chi-cuadrado.

			reitencia3Ia		Total
			sensible	resistente	
aac3Ia	-	Recuento	39	57	96
		Frecuencia esperada	32,4	63,6	96,0
	+	Recuento	12	43	55
		Frecuencia esperada	18,6	36,4	55,0
Total		Recuento	51	100	151
		Frecuencia esperada	51,0	100,0	151,0

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,529 ^a	1	,019	,021	,014
Corrección por continuidad ^b	4,720	1	,030		
Razón de verosimilitudes	5,743	1	,017		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	5,493	1	,019		
N de casos válidos	151				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 18,91.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Tabla 9. Tabla de contingencia ant2Ia * resistencia2Ia y prueba chi-cuadrado.

			resistencia2Ia		Total
			sensible	resistente	
ant2Ia	-	Recuento	23	110	133
		Frecuencia esperada	22,9	110,1	133,0
	+	Recuento	3	15	18
		Frecuencia esperada	3,1	14,9	18,0
Total		Recuento	26	125	151
		Frecuencia esperada	26,0	125,0	151,0

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,004 ^a	1	,947	1,000	,625
Corrección por continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitudes	,004	1	,947		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	,004	1	,947		
N de casos válidos	151				

a. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,10.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Tabla 10. Tabla de contingencia aph3Ia * resistenciaaph3 y prueba chi-cuadrado.

			resistenciaaph3		Total
			sensible	resistente	
aph3Ia	-	Recuento	21	98	119
		Frecuencia esperada	18,9	100,1	119,0
	+	Recuento	3	29	32
		Frecuencia esperada	5,1	26,9	32,0
Total		Recuento	24	127	151
		Frecuencia esperada	24,0	127,0	151,0

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,291 ^a	1	,256	,413	,197
Corrección por continuidad ^b	,746	1	,388		
Razón de verosimilitudes	1,428	1	,232		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	1,282	1	,257		
N de casos válidos	151				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,09.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Tabla 11. Tabla de contingencia aac6lh * resistencia6lh y prueba de chi-cuadrado.

			resistencia6lh		Total
			sensible	resistente	
aac6lh	-	Recuento	26	84	110
		Frecuencia esperada	28,4	81,6	110,0
	Dudoso	Recuento	13	28	41
		Frecuencia esperada	10,6	30,4	41,0
Total		Recuento	39	112	151
		Frecuencia esperada	39,0	112,0	151,0

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,016 ^a	1	,314		
Corrección por continuidad ^b	,638	1	,424		
Razón de verosimilitudes	,989	1	,320		
Estadístico exacto de Fisher				,403	,211
Asociación lineal por lineal	1,009	1	,315		
N de casos válidos	151				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10,59.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Discusión:

A.baumannii es un importante patógeno que está implicado en infecciones nosocomiales, especialmente en los pacientes de las UCIs. Esta bacteria es una de las más problemáticas en los hospitales en nuestro tiempo. Este organismo es muy difícil de erradicar debido a su resistencia intrínseca a los antibióticos, por lo que las opciones terapéuticas son muy pocas y con una reducida eficacia. Los aminoglucósidos son un importante grupo de antibióticos, especialmente contra los Gram negativos, pero en los últimos años se ha descrito una emergencia sanitaria debido al aumento de resistencias en *A.baumannii* a lo largo de todo el mundo. Las enzimas modificadoras de antibióticos de *A.baumannii* son principalmente acetil-transferasas, fosfotransferasas y adenilil-transferasas (Aliakbarzade K, *et al.*, 2014).

En este estudio nos centramos en la presencia de ciertos genes modificadores de aminoglucósidos en la población de cepas hospitalarias de diversos hospitales de la geografía Española, especialmente centrándonos en la resistencia a amikacina, gentamicina, tobramicina y netilmicina. Hemos observado que entre todas las cepas estudiadas se han dado 99 positivos para los genes *aac* entre los que se encuentran *aac(6)-Ib*, *aac(3)-IIa* y *aac(3)-Ia*; 12 positivos de los genes *ant* (*ant(2)-Ia*) y 32 positivos de los genes *aph* (*aph(3)-Ia*).

Los genes AACs (acetil-transferasa), que incluyen al *aac(3)-Ia*, *aac(3)-II* y *aac(6)-Ib* actúan causando una acetilación de los grupos hidroxilo libres del aminoglucósido. Los genes APH (fosfotransferasa), entre los que se encuentra el *aph(3)-Ia*, actúan fosforilando los grupos hidroxilo libres del aminoglucósido. Los genes ANT (nucleotidil transferasa), donde se clasifica el *ant(2)-Ia*, produce una nucleosidación de los grupos hidroxilos libres de los aminoglucósidos (Wen JT, *et al.*, 2014).

Jiang y colaboradores declararon la asociación entre la presencia del gen *aac(3)-I* con la resistencia a gentamicina, así como la presencia del gen *aac(6)-I* con la resistencia a tobramicina (Jiang M, *et al.*, 2014). Otros autores determinaron que el gen *aac(6)-Ib* codificaba para una acetiltransferasa que reducía la susceptibilidad al ciprofloxacino (Park CH, *et al.*, 2006).

Comprobando el antibiograma realizado se observa que de las cepas estudiadas, 98 muestran resistencia a gentamicina, 88 a tobramicina, 87 a netilmicina y 61 a amikacina, por lo que se espera que los genes más presentes en estas cepas sean aquellos que codifiquen para los tres primeros antibióticos (aac(3)-Ia, aac(6)-Ib y ant(2)-Ia). En este estudio se ha demostrado que tal como se esperaba los genes más frecuentes son los genes aac(3)-Ia con 56 cepas positivas, el gen aac(6)-Ib con 37 cepas positivas y el gen aph(3)-Ia con 32 cepas positivas. El gen aac(3)-Ia se relaciona principalmente con la resistencia a gentamicina, netilmicina y tobramicina, los tres antibióticos con mayor índice de resistencias dentro de las cepas de estudio, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. El gen aac(6)-Ib está asociado con resistencias a amikacina, netilmicina y tobramicina, y el gen aph(3)-Ia está asociado con la resistencia a clindamicina y netilmicina. Estos datos contrastan con un estudio realizado en Estados Unidos en el que observaron que el gen predominante era aac(3)-Ia, como en nuestro caso, pero estos autores encontraron una alta incidencia del gen ant(2)-Ia, en contraposición con nuestro estudio; en el que si bien el gen ant(2)-Ia es uno de los genes mayoritarios no tiene tanta incidencia como en el caso de estos autores (Akers KS, *et al.*, 2010). Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo en Corea establecieron que el gen mayoritario entre las cepas clínicas de *A.baumannii* resistente a los antibióticos, que ellos estudiaron, era el gen aph(3)-Ia y con una alta prevalencia del gen aac(6)-Ib (Cho YJ, *et al.*, 2009). Estos datos tienen mayor similitud con los obtenidos en nuestro estudio, ya que si bien nosotros tenemos un mayor número de cepas con aac(6)-Ib que con aph(3)-Ia ambos tienen valores muy similares. Todo esto demuestra que la presencia mayoritaria de ciertos genes podría estar relacionada con el ambiente y el país en el que se lleve a cabo el estudio, y que por tanto no se puede generalizar que gen es el más abundante cuando se está hablando de AMEs.

Seward y su equipo durante su estudio observaron que la mayoría de los genes se encontraban en relación unos con otros, pero la combinación mayoritaria era aac(3)-Ia y ant(2)-I asociada con la mayoría de las resistencias a gentamicina (Seward RJ, *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio se observó una asociación mayoritaria entre los genes aac(3)-Ia y aph(3)-Ia encontrándose en 9 de las cepas con presencia demostrada de más de un gen. La siguiente relación mayoritaria se da entre el gen aac(6)-Ib y el gen aac(3)-Ia, presente en 7 de las cepas (tabla 12). En lo referente a las cepas con tres de los genes AMEs, encontramos una clara mayoría en la relación del gen aac(6)-Ib con el

gen *aac(3)-Ia* y el gen *aph(3)-Ia*, encontrándose en 6 de las 11 cepas positivas para 3 genes (tabla 13); estando presente esta combinación junto con el gen *ant(2)-Ia* en la cepa positiva para cuatro genes AMEs.

Tabla 12. Combinaciones entre genes dos a dos.

	<i>aac(6)-Ib</i>			
<i>aac(3)-II</i>	2	<i>aac(3)-II</i>		
<i>aac(3)-I</i>	7	1	<i>aac(3)-I</i>	
<i>ant(2)-Ia</i>	3	0	6	<i>ant(2)-Ia</i>
<i>aph(3)-Ia</i>	1	0	9	1

Tabla 13. Combinaciones entre genes de tres en tres.

	<i>aac(3)-II</i>			
<i>aac(6)-Ib/aac(3)-I</i>	0	<i>aac(3)-I</i>		
<i>aac(6)-Ib/ant(2)-Ia</i>	1	2	<i>ant(2)-Ia</i>	
<i>aac(6)-Ib/aph(3)-Ia</i>	0	6	1	<i>aph(3)-Ia</i>
<i>aac(3)-II/aac(3)-I</i>	0	0	0	1

Es destacable que en todas las combinaciones mayoritarias y en la mayoría de las minoritarias aparece el gen *aac(3)-Ia*, el cual como ya mencionamos antes, está implicado en la resistencia a gentamicina, antibiótico con mayor tasa de resistencia.

En otro estudio realizado en China observaron que la combinación mayoritaria entre sus cepas era la de los genes *aac(3)-I*, *aac(6)-Ib* y *ant(3)-I* (gen relacionado con el *ant(2)-Ia*), seguida por *aac(6)-Ib*, *ant(3)-I* y *aph(3)-I*. Con una combinación de cuatro genes formada por *aac(3)-I*, *aac(6)-Ib*, *ant(3)-I* y *aph(3)-I* (Wen JT, *et al.*, 2014). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en este experimento, ya que si bien la combinación de los genes *aac(3)-I*, *aac(6)-Ib* y *ant(2)-I* no es la más frecuente, es la segunda mayoritaria. Y la combinación de cuatro genes efectivamente coincide, cambiando *ant(3)* y *ant(2)*, genes altamente relacionados.

En lo referente a las 37 cepas que no mostraron ningún gen modificador de aminoglucósidos, podría ser debido a la presencia de cualquiera de los otros métodos de resistencia bacteriana, como la hiperexpresión de bombas de expulsión, especialmente del tipo RND o en caso de que sean transmitidas por un plásmido de tipo Tet; la disminución del efecto del antibiótico sobre la bacteria también puede deberse a una modificación de su membrana por la disminución de la expresión de porinas o la modificación de las dianas, todos ellos son métodos ya explicados en la introducción (Miro E, *et al.*, 2013). Se ha observado que ciertos hospitales tienen una concentración más alta de estas cepas que el resto de los hospitales que forman parte del estudio; como es el caso del Hospital de Asturias y el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, pudiendo

darse el caso de que en estos hospitales haya un plásmido que transmita un gen que codifique para una bomba de expulsión (de tipo Tet). La presencia de este plásmido explicaría la alta concentración de resistencia no asociada a genes modificadores de aminoglucósidos en estos lugares.

En el caso de las cepas sensibles podría darse el caso de que los genes aunque presentes no se expresaran en ellas, debido a la presencia de reguladores negativos que produzcan el silenciamiento del gen (opción poco probable). También podría darse el caso de que faltara el promotor del gen o que la secuencia del gen estuviera troncada, dando lugar a una proteína incompleta. Otra posible explicación sería que dicho gen estuviera metilado, acetilado, etc. lo que llevaría a la falta de expresión del mismo. Incluso pudiera ser que estas cepas hayan sufrido una mutación espontánea, volviéndose resistentes durante el tiempo del estudio. Una última opción, la más plausible de todas, es que haya habido un error al llevar a cabo el estudio de las CMI's (Concentración Mínima Inhibitoria), por lo que se tomaría como sensible una cepa que no lo sea.

A pesar de los resultados obtenidos y de su comprobación mediante secuenciación, se sigue trabajando con estas cepas, especialmente con las que muestran anomalías para confirmar de una forma definitiva el resultado. Si se diera el caso de que tras las repeticiones pertinentes los resultados no variaran, se procederá a la revisión de las CMI's. Posteriormente y una vez obtenidos los resultados definitivos se procederá al estudio, en otro centro de investigación, de otros antibióticos a los que podrían presentar resistencia estas cepas, como son arbekacina, plazomicina, [kanamicina] y neomicina; así como otros estudios que se consideren pertinentes a la finalización del proyecto.

Es destacable, que tal como expresan algunos autores, no hay asociaciones específicas entre los genes implicados en la resistencia a aminoglucósidos y otros genes de resistencia. Sin embargo, Miro y su equipo, estudiaron 330 cepas que producían AMEs y encontraron que el 6,7% de ellas eran productoras de BLEEs (Beta-Lactamasa de Espectro Extendido), un 0,9% producían β -lactamasas Amp-C procedentes de un plásmido y más del 50% eran resistentes a quinolonas o co-trimoxazoles. Muchas de los genes AME se encuentran en elementos transponibles o integrones. Por el contrario en literatura hay muy pocos datos que describan los tipos de plásmidos que contienen estos genes (Miro E, *et al.*, 2013). Por lo que se debería estudiar la resistencia a otros antibióticos, así como los mecanismos de transmisión de estos genes.

Conclusiones:

- I) La presencia de resistencia esta estadísticamente asociada con la presencia de la mayoría de los genes que codificas para las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs).
- II) El gen más frecuentemente encontrado entre las cepas del estudio es el aac(3)-Ia, altamente relacionado con la resistencia a gentamicina.
- III) La combinación de dos genes más frecuente es la de aac(3)-Ia con aph(3)-Ia estando asociada con la resistencia a gentamicina. Seguida por la combinación de aac(3)-Ia y aac(6)-Ib, asociada con la resistencia a gentamicina, netilmicina, tobramicina en la mayoría de los casos.
- IV) La combinación de tres genes más frecuente es la de los genes aac(3)-Ia, aac(6)-Ib y aph(3)-Ia, combinación asociada a la resistencia frente a los cuatro antibióticos del estudio, amikacina, gentamicina, tobramicina y netilmicina.
- V) Por todo lo anterior, es de gran importancia el seguimiento y control de este tipo de bacteria multirresistente, no solo dentro del ámbito nacional, sino también en el resto del mundo.

Agradecimientos:

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi familia por su apoyo durante la realización de este estudio. También me gustaría agradecer M^a del Mar Tomás por guiarme en este trabajo, así como a Germán Bou por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto. Además me gustaría agradecer a todo el grupo de investigación de microbiología del INIBIC por su acogida y su ayuda durante mi investigación. Por último, agradecer a los profesores y a la organización del máster de Biología Molecular, Celular y Genética por todo lo que me han enseñado a lo largo de este curso.

Bibliografía:

1. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, Guymon C, Keen EF 3rd, Robinson BJ, Mende K, Murray CK. (2010). Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* comple. *J Clin Microbiol* , April 2010, 1132–1138.
2. Aliakbarzade K, Farajnia S, Karimi Nik A, Zarei F, Tanomand A. (2014). Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Jundishapur J Microbiol* , vol. 7 (10) .
3. Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. (2009). Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* , vol. 64 (2), 185-190.
4. Cox G, Stogios PJ, Savchenko A, Wright GD. (2015). Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylyltransferase ANT(2'')-Ia. *MBio* , vol. 6 (1).
5. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. (2011). Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* , March 2011, 947–953.
6. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Perichon B. (2010). Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Agents Chemother* , January 2010, 333–340.
7. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. (2010). Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* , October 2010, 4389–4393.
8. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* , vol. 5 (12), 939-951.
9. Diomedi A. (2005). Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil Infect* , vol. 22 (4), 298-320.
10. Esterly J, Richardson CL, Eltoukhy NS, Qi C, Scheetz MH. (2011). Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann Pharmacother* , Epub.
11. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros J M, Rodríguez-Baño J, Pascual A. (2013). In vitro activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. *Enferm Infecc Microbiol* , vol. 31 (1), 4-9.

12. Jiang M, Zhang Z, Zhao S. (2014). Epidemiological characteristics and drug resistance analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a China hospital at a certain time. *Pol J Microbiol* , vol. 63 (3), 275–281.
13. Magnet S, Courvalin P, Larmbert R. (2001). Resistance-Nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM 4454. *Antimicrob Agents Chemother* , December 2001, 3375–3380.
14. Miro E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. (2013). Characterization of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Enterobacteriaceae Clinical Strains and Characterization of the Plasmids Implicated in Their Diffusion. *Microbial drug resistance* , vol. 19 (2), 94-99.
15. Nemeč A, Maixnerová M, van der Reijden T, van den Broek P, Dijkshoorn L. (2007). Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* , vol. 60, 483–489.
16. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. (2006). Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* , November 2006, 3953–3955.
17. Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, Nibbering PH, Earl AM, Ward DV, Paterson DL, Seifert H, Dijkshoorn L. (2012). The success of acinetobacter species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One* , vol. 7 (10).
18. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* , July 2008, 538–582.
19. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Bou G, Tomás M. (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* , vol. 57 (11), 5247-5257.
20. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. (1998). Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* , vol. 47, 455-462.
21. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. (2008). Mecanismos de Resistencia a los antibióticos en las bacterias G-. *Centro internacional de entrenamiento e investigaciones médicas, CIDEIM* , vol. 12 (3), 217-226.
22. Villar M, Cano ME, Gato E, Garnacho-Montero J, Miguel Cisneros J, Ruíz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pascual A, Tomás M, Bou G, Rodríguez-Baño J. (2014). Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. *Medicine (Baltimore)* , vol. 93 (5), 202-210.

23. Wen JT, Zhou Y, Yang L, Xu Y. (2014). Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains. *Genet Mol Res* , vol. 13 (2), 3842-3849.
24. Yoon EJ, Goussard S, Touchon M, Krizova L, Cerqueira G, Murphy C, Lambert T, Grillot-Courvalin C, Nemeč A, Courvalin P. (2014). Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3')-VI. *MBio* , vol. 5 (5).