



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSGRADO

**TRATAMIENTO CON INHIBIDOR
FENILALANINA-ARGININA B-NAFTILAMIDA
SOBRE RESISTENCIA BACTERIANA EN CEPAS DE
ACINETOBACTER BAUMANNII AISLADAS
HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA 2018**

**PRESENTADO POR
ISAAC ALBERTO PEÑA TUESTA**

**TESIS PARA OPTAR
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN MEDICINA**

**ASESOR
DR. MANUEL HERNÁN IZAGUIRRE SOTOMAYOR**

**LIMA – PERÚ
2021**



Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA

El autor permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



UNIDAD DE POSGRADO

**TRATAMIENTO CON INHIBIDOR
FENILALANINA-ARGININA B-NAFTILAMIDA
SOBRE RESISTENCIA BACTERIANA EN CEPAS DE
ACINETOBACTER BAUMANNII AISLADAS
HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA 2018**

**TESIS PARA OPTAR
EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA**

**PRESENTADA POR
ISAAC ALBERTO PEÑA TUESTA**

**ASESOR
DR. MANUEL HERNÁN IZAGUIRRE SOTOMAYOR**

**LIMA, PERÚ
2021**

JURADO

Presidente: Mtro. Joseph Jesús Sánchez Gavidia

Miembro: Mg. Ricardo Aurelio Carreño Escobedo

Miembro: Mtro. Jorge Paz López

A mis padres Dorian y Alberto,
por su apoyo permanente e incondicional
y su confianza inquebrantable en mi potencial profesional

AGRADECIMIENTOS

A Juana Mercedes Del Valle Mendoza, doctora en Bioquímica y Biología Molecular, por la asesoría experimental y la mentoría profesional.

A Manuel Hernán Izaguirre Sotomayor, doctor en Medicina, por la asesoría metodológica.

A Rosa Angélica García Lara, maestra en Educación, por la asesoría en Redacción Científica.

El presente trabajo fue financiado por CONCYTEC, a través del proyecto denominado: “PLATAFORMA NANO-BIOTECNOLÓGICA MULTIDISCIPLINAR PARA CONTENER EL IMPACTO DE SÍNDROMES FEBRILES EN ZONAS DE ALTO RIESGO EN EL PERÚ” (contrato N° 164-2016-FONDECYT).

ÍNDICE

	Páginas
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de tablas y figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Bases teóricas	5
1.3 Definición de términos básicos	8
II. METODOLOGÍA	9
2.1 Tipos y diseño	9
2.2 Diseño muestral	9
2.3 Técnicas y procedimiento de recolección de datos	10
2.4 Procesamiento y análisis de datos	13
2.5 Aspectos éticos	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23

ANEXOS

1. Instrumento de recolección de datos
2. Tablas adicionales
3. Carta DIRESA Cajamarca

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas

		Páginas
Tabla 1	Secuencias de nucleótidos de los cebadores usados para la identificación del gen OXA-51	10
Tabla 2	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de las cepas aisladas de <i>A. baumannii</i>	16
Tabla 3	Cambios en la resistencia de tetraciclina después de la aplicación de PaβN en 47 cepas aisladas de <i>A. baumannii</i>	17
Tabla 4	Cambios en la resistencia de levofloxacina después de la aplicación de PABN en 47 cepas aisladas de <i>A. baumannii</i>	18

Índice de figuras

		Páginas
Figura 1	Resultados de la PCR tiempo real de las cepas aisladas de <i>A. baumannii</i> de las muestras ACC1 – ACC257	15
Figura 2	Resultados de la PCR tiempo real de las cepas aisladas de <i>A. baumannii</i> de las muestras ACC26 – ACC49	16

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto del inhibidor de bombas de eflujo fenilalanina-arginina β -naftilamida (Pa β N) sobre la resistencia bacteriana de levofloxacin y tetraciclina en cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca durante 2018.

Metodología: Se evaluó el efecto del inhibidor de bombas de eflujo fenilalanina-arginina β -naftilamida (Pa β N) en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de levofloxacin y tetraciclina, mediante la técnica de microdilución en caldo Mueller-Hinton; se siguieron los estándares dictados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

Resultados: Un total de 91.49% (43/47) de las cepas incluidas en el estudio expresaron medidas que confirman la presencia de bombas de eflujo. Se observó que un 17.02% (8/47) de las cepas mostraron una reducción significativa de la CMI con ambos antibióticos.

Conclusiones: Estos resultados confirman que el mecanismo de bombas de eflujo es importante para el desarrollo de la multirresistencia de las cepas de *A. baumannii* presentes en el Hospital Regional Docente de Cajamarca.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, microbiología, antibacterianos, levofloxacin, tetraciclina, farmacorresistencia bacteriana

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (Pa β N) on the antibiotic resistance of levofloxacin and tetracycline in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients of the Hospital Regional Docente de Cajamarca from the year 2018.

Methodology: The effect of the efflux pump inhibitor on the minimum inhibitory concentration (CMI) of levofloxacin and tetracycline was evaluated using the broth microdilution method using Mueller-Hinton broth, following the guidelines established by the Institute of Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

Results: A total of 91.49% (43/47) of the strains included in this study expressed measures that confirm the presence of efflux pumps. It was observed that 17.02% (8/47) of the strains showed a significant reduction on the minimum inhibitory concentration with both antibiotics.

Conclusions: These results confirm that the efflux pump mechanism is an important factor for the development of multidrug resistance of *A. baumannii* strains present in the Hospital Regional Docente de Cajamarca.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, microbiology, anti-bacterial agents, levofloxacin, tetracycline, drug resistance, bacterial

I. INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii es una bacteria nosocomial oportunista, que pertenece al grupo ESKAPE, comúnmente encontrada en el ámbito nosocomial en forma de cepas multirresistentes (1). Esta bacteria suele causar un amplio espectro de infecciones nosocomiales como neumonía asociada al ventilador, infecciones al tracto urinario, a heridas abiertas u osteomielitis, endocarditis y meningitis (2–8).

Durante los últimos años, se ha observado un incremento de casos de pacientes con infección de *A. baumannii*; la mayoría de pacientes que han sido hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) a nivel global. Según la Red Nacional de Seguridad Sanitaria de Estados Unidos (NHSN en sus siglas en inglés), reveló que, de 2009 a 2010, un 1.8% de infecciones asociadas al sistema de salud eran causadas por *A. baumannii* (7). De igual manera, se observa similar tendencia en hospitales de España, donde se observó que 25 de 28 hospitales (89.2%) que participaron en el estudio presentaron casos de colonización o infección de *A. baumannii*, de los cuales 47% de los casos fueron atribuidos a pacientes internados en la UCI (9).

En Latinoamérica, se ha reportado una distribución semejante, en donde se detectó una alta tasa de infecciones en la UCI, con una prevalencia de 24% en los hospitales de Argentina (10) y 57%, en nosocomios de Brasil (11); *A. baumannii* es uno de los tres patógenos que se encontró con mayor frecuencia (10,12).

La mayoría de brotes epidemiológicos de *A. baumannii* son causados por cepas multidrogo resistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) e inclusive pandrogo resistentes (PDR) (13–16). En el Perú, se observó en las UCI del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen que la incidencia de *Acinetobacter* en infecciones de vías respiratorias aumentó en un 50% entre los años 2004-2006 (17). De igual manera, un estudio conducido el 2016 en la UCI del Hospital Cayetano Heredia reportó que un 28% de las bacterias aisladas fueron *Acinetobacter* sp., siendo el 90% de las cepas MDR (18).

Un estudio ejecutado en la ciudad de Lima, en 2018, reportó que todas las cepas aisladas de *A. baumannii* incorporadas resultaron ser resistentes a al menos un antibiótico de las tres clases diferentes que se probaron mediante un ensayo de susceptibilidad antibiótica. De estas cepas, el 1.2% mostró resistencia PDR, el 46.3% de las cepas aisladas resistencia XDR y el 52.5% restantes fueron consideradas MDR (19).

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto del inhibidor de bombas de eflujo Pa β N sobre la resistencia bacteriana de cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados, en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, durante 2018.

Los objetivos específicos fueron caracterizar molecularmente las cepas aisladas de *A. baumannii* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de dos agentes antibióticos en las cepas aisladas y evaluar el cambio de la CMI en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de eflujo Pa β N para los dos agentes antibióticos.

La hipótesis que se formuló fue que existe un efecto inhibitorio en el tratamiento con inhibidor de bombas de eflujo Pa β N sobre la resistencia bacteriana en cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados, en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, durante 2018.

1.1 Antecedentes

Kanafani Z., especifica en el 2018 que *Acinetobacter baumannii* tiene la capacidad de albergar y transferir diferentes genes de resistencia antibiótica, lo que se desenlaza en cepas MDR, XDR y en algunos casos PDR. Uno de los mecanismos de resistencia más comunes y efectivos es la sobreexpresión de bombas de eflujo, el cual está basado en la extrusión de los agentes antibióticos del espacio intracelular al extracelular de la bacteria. El informe menciona que el mecanismo de bombas de eflujo es capaz de remover antibióticos β -lactams, quinolonas y tetraciclinas (20).

Leus I. V. publicó un estudio en el año 2018 donde evaluó individualmente la especificidad del sustrato de cada bomba de eflujo presente en una cepa estandarizada de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978.

Mediante la inhibición de la expresión de cada bomba de eflujo y sometiendo la bacteria a un estrés antibiótico, se pudo evaluar el cambio en el perfil de resistencia antibiótica y establecer el impacto de la expresión de las bombas de eflujo en cada caso. Como producto de estos experimentos, se confirmó que unos de los sustratos para el complejo de bombas de eflujo AdeABC son antibióticos de clase fluoroquinolonas y tetraciclinas (21).

Levy-Blitchtein S. publicó en 2018, un estudio evaluando los mecanismos de resistencia a carbapenem de *Acinetobacter baumannii* aislado de dos hospitales localizados en Lima, Perú. Sus resultados indicaron que un 1.2% mostró resistencia PDR, el 46.3% de las cepas aisladas resistencia XDR y el 52.5% restantes fueron considerados MDR. El estudio culmina sugiriendo que los resultados sean de garantía sobre la problemática surgente frente a las infecciones de *A. baumannii* multidrogorresistente, se necesita ejecutar medidas de control frente al patógeno y un programa de vigilancia en la región (19).

En el año 2017, Tacconelli E. publicó un exhaustivo análisis de los patógenos presentes en la lista de patógenos prioritarios para su investigación y desarrollo, el cual fue publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este análisis sitúa a *A. baumannii* resistente a carbapenem en el primer lugar de la categoría crítica en la lista. La autora destaca la necesidad e importancia de ejecutar investigaciones tanto en el ámbito epidemiológico como en el estudio de los mecanismos de resistencia antibiótica (22).

Zhang T. en el 2017 halló, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la expresión del gen *adeB*, que la sobreexpresión de dicho gen en *A. baumannii*, y por lo tanto de la bomba de eflujo AdeABC, cumple un rol determinante en la resistencia antibiótica de la bacteria (23).

Jamshidi S. publicó en el 2017, un estudio computacional donde evalúa la interacción entre el inhibidor de bombas de eflujo PaβN y la bomba de eflujo AdeABC. Mediante una simulación de la unión del inhibidor a la estructura de la bomba de eflujo, los autores pudieron concluir que dicha interacción incapacita a la bomba de eflujo de expulsar los sustratos, conduciendo a una inhibición de la bomba AdeABC (24).

Gholami M. en el 2015, estudió el efecto del inhibidor de bombas de eflujo PaβN sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI) de imipenem en cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados en hospital de Irán. Se determinó una disminución del 96.6% (58/60) al comparar las CMI de las muestras al tratarlas solamente con imipenem y las CMI de las muestras al añadir PaβN junto con imipenem (25).

Yoon E. publicó en el 2015, un estudio donde se caracterizó la contribución de las bombas RND a la resistencia antibacteriana. En este artículo se halló que la sobreexpresión de la bomba de eflujo AdeABC está relacionada a la resistencia antibiótica de la bacteria.

Sometiendo un mutante capaz de sobreexpresar la bomba de eflujo AdeABC a diferentes tipos de estrés antibiótico, se concluyó que esta bomba posee una amplia gama de sustratos, dentro de los cuales están las fluoroquinolonas y tetraciclinas. Además, concluye que la familia de bombas RND actúan en unión con otros mecanismos de resistencia, atribuyendo a la bacteria mayor posibilidad de sobrevivir ante la exposición a antibióticos (26).

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Aspectos generales

Acinetobacter baumannii es un patógeno nosocomial oportunista, reconocido por causar un amplio espectro de infecciones nosocomiales como infecciones al tracto urinario, infecciones en heridas abiertas u osteomielitis, endocarditis y meningitis (2,4–7,27). Sin embargo, los casos con mayores tasas de mortalidad son la neumonía nosocomial y las infecciones al torrente sanguíneo (28).

Uno de los factores frecuentemente estudiados en los casos de neumonía nosocomial es la neumonía asociada a ventilador. Estudios indican que es un resultado directo de la aspiración de *A. baumannii* por el establecimiento de biofilms en los tubos endotraqueales y ventiladores mecánicos (8,29,30). De la misma manera, las infecciones sanguíneas se muestran como consecuencia de la colonización de un catéter venoso o debido a una neumonía extendida, facilitando la diseminación de la bacteria (4).

Se ha descrito que las infecciones por *A. baumannii* ocurren comúnmente en pacientes que sufren enfermedades secundarias o que han pasado por procedimientos quirúrgicos mayores, además de estar altamente asociadas a periodos extensos de hospitalización y la edad avanzada de los pacientes (31–33).

1.2.2 Bombas de eflujo

Actualmente, *Acinetobacter baumannii* se encuentra ubicado en el primer lugar dentro de la lista de patógenos priorizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para su investigación y desarrollo (22). Esto se debe a la capacidad del patógeno para acumular diferentes mecanismos de resistencia a la mayoría de antibióticos disponibles en la actualidad incluyendo aminoglicósidos, quinolonas y β -lactámicos de amplio espectro (27,34,35). Como consecuencia se ha observado el surgimiento de cepas multidrogo y pandrogo resistentes, volviéndose un problema cada vez más frecuente en el ambiente clínico a nivel mundial (36,37).

La sobreexpresión de bombas de eflujo es uno de los mecanismos que más atribuye a la resistencia antibiótica de *A. baumannii*. Este mecanismo permite extruir fármacos antibióticos y compuestos tóxicos desde el espacio intracelular hacia el espacio extracelular de la bacteria (38).

Existen cuatro categorías de bombas de eflujo codificadas cromosómicamente en *A. baumannii*. La superfamilia de división-nodulación de resistencia (RND en sus siglas en inglés), la familia de extrusión de fármacos y compuestos tóxicos, la superfamilia de facilitación mayor, y la familia de los transportadores pequeños de resistencia antibiótica (39).

Dentro de la superfamilia RND, se encuentran catalogados los complejos de bombas de eflujo AdeABC, AdeFGH y AdeIJK, cuya sobreexpresión está fuertemente asociada a la disminución de la susceptibilidad de *A. baumannii* frente a los antibióticos (24,40).

Tradicionalmente, se conoce que la sobreexpresión del complejo AdeABC atribuye a las cepas de resistencia a diferentes agentes antibióticos, incluyendo β -lactámicos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina, macrólidos, lincosamidas y clorafenicol (26,41).

Sin embargo, recientes estudios señalan un incremento en la susceptibilidad antibiótica cuando sucede una inactivación del complejo AdeIJK a la mayoría de los antibióticos previamente mencionados. De igual manera, al ejecutar una delección del gen que codifica el complejo AdeFGH, se observó una disminución significativa en la concentración mínima inhibitoria de azitromicina, ciprofloxacina y gentamicina (21).

1.2.3 Inhibidores de bombas de eflujo

Debido a la facilidad de *A. baumannii* para desarrollar una no susceptibilidad a gran número de antibióticos disponibles en la actualidad, los investigadores han recurrido a buscar tratamientos alternativos para lidiar con la infección de la bacteria. Uno de estos consiste en el tratamiento con inhibidores de bombas de eflujo en combinación con antibióticos.

Experimentos de susceptibilidad antibiótica mediante la inhibición del complejo AdeABC han sido previamente ejecutados. Mediante la adición de fármacos como carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), reserpine, 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP) y fenil-arginina- β -naftilamida (Pa β N), se han observado reducciones significativas en la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos, demostrando que dicho tratamiento es una opción viable para combatir la infección de *A. baumannii* multirresistente (24,42–44).

Uno de los inhibidores que ha demostrado eficacia en incrementar la susceptibilidad antibiótica de *A. baumannii* es Pa β N. Estudios ejecutados in-vitro buscando evaluar la actividad del inhibidor en conjunto con antibióticos como fluoroquinolonas, tetraciclinas y algunos carbapenem han evidenciado la reversión parcial del perfil de resistencia antibiótica (25,45,46).

Esta interacción entre el inhibidor Pa β N y el complejo AdeABC se ha confirmado mediante simulaciones in-silico. Investigaciones a nivel molecular indican que Pa β N exhibe una buena afinidad a la unión hacia la rejilla receptora de AdeABC (47), lo que impide la extrusión de antibióticos y otros sustratos a través de la bomba de eflujo (48).

1.3 Definición de términos básicos

- PCR: Reacción en cadena de polimerasa para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular.
- *Acinetobacter baumannii*: Bacteria Gram negativa que causa neumonía nosocomial y una amplia variedad de infecciones.
- OXA-51: Oxacillinasa de clase D, enzima que atribuye a la resistencia antibiótica de *Acinetobacter baumannii*.
- Biomarcador: Marcador biológico que puede medir e indicar la presencia de una enfermedad. Se puede usar desde una molécula hasta el mismo ADN.
- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Definida como la mínima concentración necesaria para que un antibiótico inhiba el crecimiento de un microorganismo.
- MDR: La bacteria es no susceptible a al menos un agente en 3 o más clases de antibióticos.
- XDR: La bacteria es no susceptible a al menos un agente en todas menos dos o menos clases de antibióticos.
- PDR: La bacteria es no susceptible a todos los agentes antibióticos.
- adeABC: Complejo de bombas de eflujo perteneciente a la familia RND en *A. baumannii*.
- Fenil-arginina- β -naftilamida (Pa β N): Inhibidor de bomba de eflujo que demuestra afinidad.

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipos y diseño

Es un estudio observacional, debido a que no existe exposición al riesgo; es descriptivo, ya que se describe el comportamiento de las variables en un grupo de muestras.

2.2 Diseño muestral

Población universo

Pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca.

Población de estudio

Muestras microbiológicas de *Acinetobacter spp.* provenientes de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca durante 2018. El Hospital Regional Docente de Cajamarca es el nosocomio referencial de mayor complejidad de la Región Cajamarca, que pertenece a la categoría II-2.

Tamaño de muestra

Siguiendo los criterios de inclusión, se ingresó al estudio la totalidad de 47 cepas aisladas de *A. baumannii* provenientes de pacientes hospitalizados, en el Hospital Regional Docente de Cajamarca.

Muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico; se recolectando las cepas aisladas identificadas morfológicamente como *Acinetobacter spp.*

Criterios de selección

De inclusión

Cepas aisladas identificadas morfológicamente como *Acinetobacter spp.*

Cepas aisladas confirmadas molecularmente como *A. baumannii*.

De exclusión

Aquellas cepas aisladas que no fueron confirmadas morfológicamente ni molecularmente como *A. baumannii*.

2.3 Técnicas y procedimiento de recolección de datos

Diseño de *primers*

Para la detección de *A. baumannii*, se usó como secuencia específica el gen OXA-51, uno de los genes responsables de la resistencia antibiótica del patógeno. Dado que la oxacilinasasa de clase D OXA-51 se encuentra normalmente codificada en el cromosoma del patógeno, se usa como biomarcador para la detección del gen resistente a carbapenem (19,49).

Para la detección y amplificación de la secuencia OXA-51 en las muestras clínicas a evaluar, se usaron *primers* previamente diseñados; se tomó como referencia un estudio anterior (49).

Tabla 1. Secuencias de nucleótidos de los cebadores usados para la identificación del gen OXA-51.

Nombre	Secuencia (5'-- 3')	Referencia
OXA-51-F	TTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGA	(49)
OXA-51-R	CGGAGAAGGACCCACCAGCCAAAA	
OXA-51-Sonda	FAM-TGGCAATGTAGATATCGGTACCCAAGTC-TAMRA	

Sembrado de cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* en agar

Para el correcto almacenamiento de las cepas aisladas de *A. baumannii*, se usaron placas petri de 6 cm de diámetro. Se preparó en una botella de vidrio 300 mL de agar Tripticasa Soya (TSA), el cual luego fue autoclavado a 120°C por 15 minutos y se vertió dentro de las placas petri.

Una vez que el agar dentro de las placas Petri se solidificó, se sometió a un control de calidad a 37°C durante 24 a 48 horas. Pasado este tiempo, se comprobó si existe contaminación alguna de las placas.

Luego de comprobar la ausencia de contaminación en las placas, se sembró la cepa mediante estriado con un aza descartable y se dejó incubar a 37°C por 24 horas. Finalmente, se observó si hubo crecimiento bacteriano, para luego envolver las placas en parafilm y almacenarlas a 4°C.

Extracción de ADN bacteriano

Para la extracción del ADN bacteriano se retiró con ayuda de un aza de siembra una sola colonia de la placa Petri. Esta se resuspendió en 100 µL de agua free en un tubo eppendorf de 1.5mL y se calentó en un thermoblock a 100°C por cinco minutos. Luego, se centrifugó a 12 000 rpm por cinco minutos y se almacenó a -80°C. El ADN bacteriano se encontró en el sobrenadante del producto.

PCR a tiempo real para la detección de *Acinetobacter baumannii*

La reacción se realizó usando el producto LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Applied Science, Alemania). Para lo cual se preparó una mezcla que contiene: 10.6 µL de agua libre de DNAsa/RNAsa, 2.4 µL de solución Mg+2 a una concentración de 25 mM, 2.0 µL de enzima Faststart, 1µL de cada uno de los cebadores y sonda para OXA-51 a una concentración de 10 mM y 2 µL de la muestra de ADN obtenida previamente.

Como control positivo, se usó ADN extraído de una cepa estándar de *A. baumannii* (ATCC 19606). Como control negativo se usó agua ultrapura de calidad PCR, la cual carece de ADN extraído.

Para la detección de la amplificación del material genético, se utilizó el equipo Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostic). Para ello, se utilizaron las siguientes condiciones: 95°C durante 10 minutos, seguidos de 55 ciclos que constan: desnaturalización a 95°C por cinco segundos, hibridación a 60°C durante cinco segundos y elongación a 72°C durante 15 segundos. Posteriormente, se procedió automáticamente con el protocolo de curva de melting, el cual se aplicó bajo las siguientes condiciones: 95°C por 20 segundos y luego se ejecutaron incrementos de 0.2°C/segundo entre 40°C a 85°C. La adquisición de datos fue habilitada durante la etapa de hibridación y en cada incremento de temperatura de la curva de melting.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

El perfil de resistencia antibiótica de las cepas fue determinado mediante la metodología de microdilución de caldo.

Se obtuvo la suspensión bacteriana a partir de las placas de cultivo. Se dejó incubar en un *shaker* a 37°C durante 18 horas. Se ajustó la turbidez a 0.5 estándar McFarland. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se usó el método de microdilución en caldo. Se adquirieron los antibióticos levofloxacin y tetraciclina en su presentación en polvo de la casa comercial Sigma-Aldrich. Los antibióticos en polvo se disolvieron en un solvente apropiado o en agua desionizada estéril; se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Las concentraciones antibióticas que se usaron para el experimento fueron de 256µg/mL, 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL, 1µg/mL, 0.5µg/mL y 0.25µg/mL (50). Se usaron microplacas de 96 pocillos de fondo plano de poliestireno provenientes de la casa comercial Corning.

Cada pocillo contó con un volumen de 10µL de inóculo bacteriano y un volumen final de 100µL de la dilución antibiótica y caldo Muller-Hinton. Se dejó la 12.^a columna de la microplaca sin ninguna concentración antibiótica a modo de control de crecimiento de la muestra.

Las placas se incubaron a 37°C por 18 horas. Se ejecutaron las lecturas de las microplacas en un espectrofotómetro y se usaron un filtro de 630 nm.

Tratamiento con inhibidor de bombas de eflujo

Se analizó el cambio en la susceptibilidad de los antibióticos en la presencia de 100µg/mL de PaβN y se siguió el protocolo de concentración mínima inhibitoria (CMI). Se añadió 2µL de solución *stock* de PaβN 5mg/mL al inóculo bacteriano antes de añadirlo a la placa.

2.4 Procesamiento y análisis de datos

Interpretación de resultados de la CMI

Los valores de densidad óptica se registraron en una base de datos en Excel. Se identificó la CMI mediante una gráfica, cuyos ejes fueron las concentraciones antibióticas versus las concentraciones en presencia y ausencia del inhibidor. Se interpretó el CMI siguiendo los estándares de la CLSI (50).

Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico IBM SPSS v26.0. Se usó la prueba de U de Mann-Whitney para identificar diferencias entre los grupos de tratamiento en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de eflujo.

2.5 Aspectos éticos

El proyecto se desarrolló bajo el Convenio de Cooperación en Actividades de Diagnóstico, Investigación, Transferencia Tecnológica y Docencia en Servicio en el Campo de la Salud y Ciencias afines establecido entre la Dirección Regional de Salud – Cajamarca (DIRESA Cajamarca) y la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC).

El proyecto cuenta con la autorización de DIRESA Cajamarca, para la caracterización y publicación de los resultados provenientes del estudio (ver anexo 3).

III. RESULTADOS

La muestra estuvo constituida por 47 cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca en 2018. Todas las muestras resultaron positivas en la identificación del gen *blaOXA-51* por PCR Tiempo Real, confirmando molecularmente la especie (figura 1 y 2).

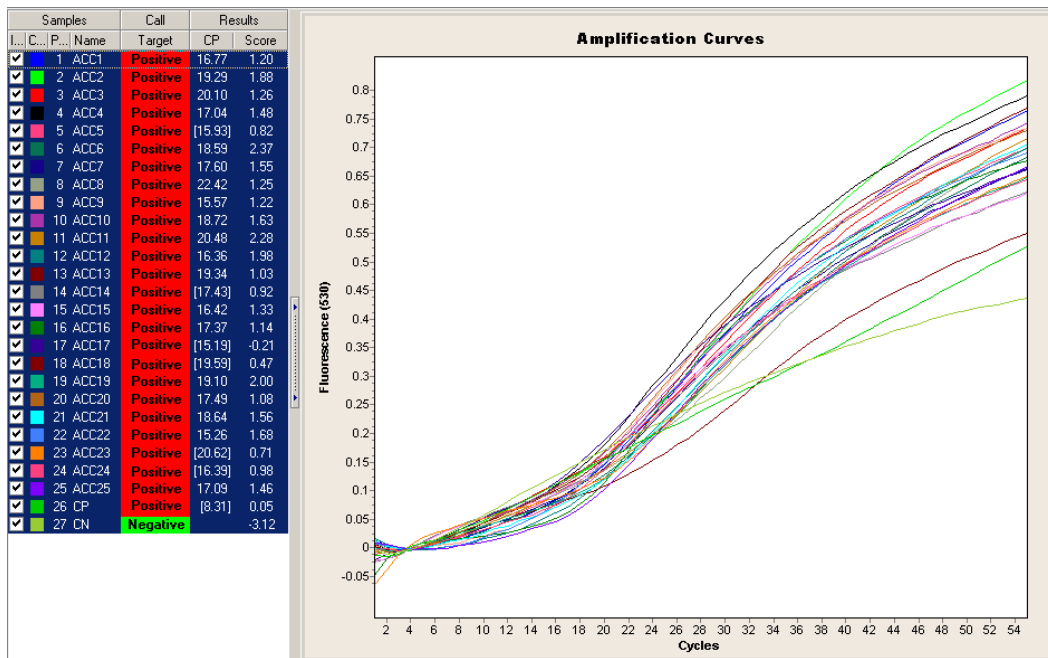


Figura 1. Resultados de la PCR tiempo real de las cepas aisladas de *A. baumannii* de las muestras ACC1 – ACC25

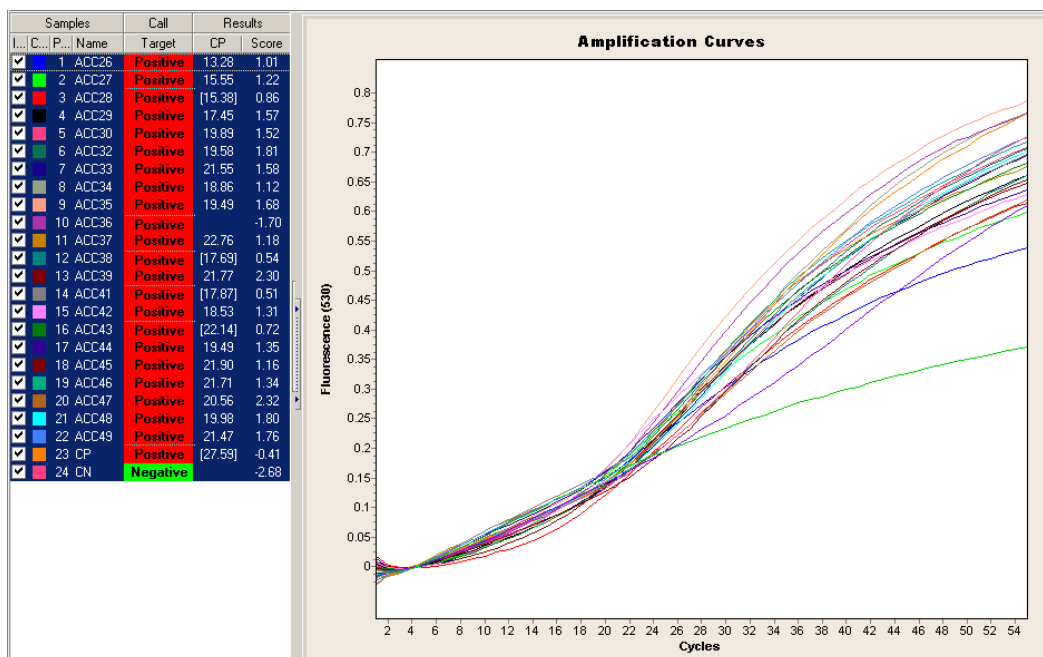


Figura 2. Resultados de la PCR tiempo real de las cepas aisladas de *A. baumannii* de las muestras ACC26 – ACC49

La tasa de resistencia fue la siguiente: levofloxacina (21, 44.7%) y tetraciclina (18, 38.3%). Posterior a la adición de PaβN, las tasas de susceptibilidad cambiaron de 25.5% (12/47) a 51.1% (24/47) para levofloxacina y de 53.2% (25/47) a 70.2% (33/47) en tetraciclina (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de las cepas aisladas de *A. baumannii*

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Susceptible	p-valor
Levofloxacina	21 (44.7%)	14 (29.8%)	12 (25.5%)	0.000
Levofloxacina + PAβN	3 (6.4%)	20 (42.6%)	24 (51.1%)	
Tetraciclina	18 (38.3%)	4 (8.5%)	25 (53.2%)	0.059
Tetraciclina + PAβN	9 (19.1%)	5 (10.6%)	33 (70.2%)	

En el caso de tetraciclina (tabla 3), la adición de PaβN llevó a una reducción de más de 4 diluciones en la CMI de 17.02% (8/47).

Se observó una reducción de hasta 3 diluciones en un 40.43% (19/47) de los casos, además de un incremento de la CMI de hasta 3 diluciones en un 8.51% (4/47).

El 34.04% (16/47) de las cepas no demostraron ningún cambio en la CMI. Tabla 3.

Tabla 3. Cambios en la resistencia de tetraciclina después de la aplicación de PABN en 47 cepas aisladas de *A. baumannii*

Cambios en la CMI	PaβN		p-valor
	Número de cepas	Porcentaje	
Reducción de ≥4 diluciones	8	17.02	0.002
Reducción de ≤3 diluciones	19	40.43	
Sin cambios	16	34.04	
Incremento de ≤3 diluciones	4	8.51	
Incremento de ≥4 diluciones	0	0.00	
Total	47	100	

De igual manera, en el caso de levofloxacin (tabla 4), la adici3n de Pa β N llev3 a una reducci3n de m1s de cuatro diluciones en la CMI de 17.02% (8/47).

Al contrastar los grupos de levofloxacin en presencia y ausencia de Pa β N, se obtuvo una reducci3n de hasta tres diluciones en un 48.94% (23/47), un incremento de hasta tres diluciones en un 8.51% (4/47) y un incremento significativo en 4.26% (2/47) de los casos.

El 21.28% (10/47) de las cepas no exhibieron ning3n cambio en la CMI (tabla 4).

Tabla 4. Cambios en la resistencia de levofloxacin despu3s de la aplicaci3n de Pa β N en 47 cepas aisladas de *A. baumannii*

Cambios en la CMI	Pa β N		p-valor
	N3mero de cepas	Porcentaje	
Reducci3n de ≥ 4 diluciones	8	17.02	0.46
Reducci3n de ≤ 3 diluciones	23	48.94	
Sin cambios	10	21.28	
Incremento de ≤ 3 diluciones	4	8.51	
Incremento de ≥ 4 diluciones	2	4.26	
Total	47	100	

IV. DISCUSIÓN

Según el objetivo general, evaluar el efecto del inhibidor de bombas de eflujo PaβN sobre la resistencia bacteriana de cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, durante 2018, los resultados de la tabla 2 muestran que existe una diferencia significativa ($p=0.000$) entre el grupo bajo el tratamiento de solamente levofloxacina y el grupo con tratamiento de levofloxacina y PaβN, datos comparados con lo publicado, en 2017, por Zhang T en el artículo titulado Active efflux pump adeB is involved in multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* induced by antibacterial agents, quien concluyó que la bomba de eflujo adeABC cumple un rol significativo en la farmacorresistencia de *A. baumannii* inducida por agentes antibacteriales como la levofloxacina; estos resultados sugieren que el tratamiento de levofloxacina y el inhibidor PaβN es más efectivo que con el antibiótico por si solo en cepas farmacorresistentes de *A. baumannii*, al inhibirse el complejo adeABC (23).

Jamshidi S, en 2017, publicó en el artículo titulado Computational study reveals the molecular mechanism of the interaction between the efflux inhibitor PaβN and the adeB transporter from *Acinetobacter baumannii*, en el cual afirma que el inhibidor PaβN se une con afinidad a la bomba de eflujo adeABC, lo que resultó en una inhibición y prevención de la extrusión hacia fuera de la bacteria de fármacos como la levofloxacina (48).

Por otro lado, no se observó ninguna diferencia significativa ($p=0.059$) entre el grupo bajo tratamiento de tetraciclina y el que se trata con tetraciclina y PaβN, resultado que, al ser comparado con lo publicado en 2006 por Pannek S. en el artículo titulado Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: Comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide, se concluye que no existe un efecto significativo en la susceptibilidad de tetraciclina de cepas de *A. baumannii* farmacorresistentes tras la adición de PaβN (51).

Ambos resultados insinúan la existencia de otro mecanismo de acción, adicional a la bomba de eflujo *adeABC*, que toma un rol significativo en la resistencia antibiótica de tetraciclina. Ribera A manifestó que la resistencia a tetraciclina en *A. baumannii* está dominada principalmente por otro complejo de bomba de eflujo llamado TetA (52).

Siguiendo lo establecido por Valentine S. en el 2008, en el estudio nombrado Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles county, California, se interpretó en los resultados una disminución en la CMI de 4 a más diluciones como una reducción significativa (53). Los resultados observados en la tabla 3 muestran que hubo una reducción significativa en la CMI de levofloxacina en un 17.02% (8/47) después de la adición de Pa β N, que al ser contrastado por lo publicado, en 2006, por Pannek S, en el artículo titulado Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: Comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide, en el cual se observan porcentajes similares de reducción significativa en la CMI de levofloxacina (14%) tras una adición de Pa β N (51). Gracias a estos resultados se puede inferir que la adición de Pa β N aumenta la susceptibilidad a levofloxacina; además, Coban confirma que mediante la adición de un inhibidor de bombas de eflujo aumenta la susceptibilidad de fluoroquinolonas en cepas de *A. baumannii* (54).

El incremento en la susceptibilidad de *A. baumannii* frente al tratamiento de levofloxacina en conjunto con un inhibidor de bombas de eflujo no se reduce exclusivamente al inhibidor Pa β N. Coban A. en el 2011 publicó, mediante un test usando discos antibióticos en presencia y ausencia del inhibidor 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP), un aumento en el diámetro del halo de inhibición al usar levofloxacina en conjunto con NMP (43).

Los resultados obtenidos en la tabla 4 demuestran que, a pesar que no existió un cambio significativo en la farmacorresistencia de tetraciclina en las cepas de *A. baumannii*, existió una reducción significativa en la CMI de tetraciclina en un 17.02% (8/47) después de la adición de PaβN, porcentajes que al ser comparados con lo publicado por Pannek S en el artículo titulado Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: Comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide, quien concluyó que la adición de un inhibidor de bombas de eflujo incrementó la susceptibilidad de tetraciclina en cepas clínicas de *A. baumannii* (51). Magnet S demostró que antibióticos como la tetraciclina eran sustratos para la bomba adeABC (55).

Inhibidores como PaβN han sido ampliamente estudiados en la clase antibiótica de las tetraciclinas, incluyendo en fármacos como tetraciclina, tigeciclina y minociclina entre otros. Peleg A. en el año 2006 reportó que, al someter unas cepas de *A. baumannii* provenientes de una infección del torrente sanguíneo a un tratamiento de tigeciclina con PaβN, se redujo el CMI de las cepas, incrementando su susceptibilidad a tigeciclina (56). De igual manera, Bowers D. en el 2015 reveló un incremento de susceptibilidad al exponer cepas de *A. baumannii* a un tratamiento de minociclina en presencia y ausencia de PaβN (57).

Se conoce que el complejo de bombas de eflujo adeABC atribuye resistencia a la bacteria mediante la expulsión de antibióticos, dentro de ellos las fluoroquinolonas y tetraciclinas (58). En un estudio realizado por Lin F. en el 2017, se detectó un incremento relativo en la expresión del gen *adeB* en las cepas no susceptibles a levofloxacina y tetraciclina, así como para otros antibióticos y biocidas (59). Los resultados observados en este estudio implican que el complejo de bombas de eflujo adeABC es el mecanismo que atribuye en mayor parte a la resistencia antibiótica de levofloxacina, determinando la excepción con tetraciclina.

CONCLUSIONES

1. El efecto del inhibidor de bombas de eflujo Pa β N sobre la resistencia a levofloxacin de cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, en 2018, fue estadísticamente significativo.
2. Se encontró que no hubo un efecto inhibitorio significativo en la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *A. baumannii* al añadir tetraciclina junto con el inhibidor de bombas de eflujo Pa β N.
3. Al comparar el cambio en las CMI, se observaron reducciones significativas en ambos antibióticos, al añadirlos junto con Pa β N.

RECOMENDACIONES

El Hospital Regional Docente de Cajamarca necesita incentivar la vigilancia cercana de los perfiles de susceptibilidad antibiótica de las bacterias ESKAPE circundantes dentro de la población de sus pacientes hospitalizados, para conocer el tratamiento adecuado para las infecciones nosocomiales ocurriendo en el ambiente de la Unidad de Cuidados Intensivos.

Además, se sugiere que se estimule la ejecución de estudios clínicos, en búsqueda de nuevas alternativas para tratamientos contra bacterias de resistencia PDR.

Es necesario la identificación de la fuente de infección y los métodos de propagación de las cepas en las áreas de Hospitalización y Unidad de Cuidados Intensivos.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESCAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 10 de marzo de 2013 [citado 17 de abril de 2020];11(3):297–308. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.13.12>
2. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. abril de 1996 [citado 16 de noviembre de 2018];9(2):148–65. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8964033>
3. Roca I, Espinal P, Vila-Fanés X, Vila J, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol* [Internet]. 23 de abril de 2012 [citado 16 de noviembre de 2018];3(APR):148. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536199>
4. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter* [Internet]. Vol. 11, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier; 2005 [citado 21 de noviembre de 2018]. p. 868–73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216100>
5. De Carvalho VC, De Oliveira PRD, Dal-Paz K, De Paula AP, Félix C da S, Munhoz Lima ALL. Gram-negative osteomyelitis: Clinical and microbiological profile. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 1 de enero de 2012 [citado 21 de noviembre de 2018];16(1):63–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867012702763?via%3Dihub>
6. Yun HC, Branstetter JG, Murray CK. Osteomyelitis in Military Personnel Wounded in Iraq and Afghanistan. *J Trauma Inj Infect Crit Care* [Internet]. 1 de febrero de 2008 [citado 21 de noviembre de 2018];64(Supplement):S163–8. Disponible en: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00005373-200802001-00024>
7. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al.

Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2 de enero de 2013 [citado 17 de noviembre de 2018];34(1):1–14. Disponible en:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0195941700031921/type/journal_article

8. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: A state of concept. *Crit Care* [Internet]. 23 de mayo de 2012 [citado 21 de noviembre de 2018];16(3):R93. Disponible en:
<http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc11357>
9. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, et al. Clinical Features and Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* Colonization and Infection in Spanish Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2 de octubre de 2004 [citado 16 de noviembre de 2018];25(10):819–24. Disponible en:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0195941700080310/type/journal_article
10. Lossa GR, Giordano Lerena R, Fernández LE, Vairetti J, Díaz C, Arcidiácono D, et al. [Prevalence of hospital infections in adult intensive care units in Argentina]. *Rev Panam Salud Publica* [Internet]. noviembre de 2008 [citado 17 de noviembre de 2018];24(5):324–30. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141174>
11. Toufen Junior C, Hovnanian ALD, Franca SA, Carvalho CRR. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* [Internet]. 2003 [citado 17 de noviembre de 2018];58(5):254–9. Disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0041-87812003000500004&lng=en&tlng=en
12. Luna CM, Rodriguez-noriega E, Bavestrello L, Guzmán-blanco M. Gram-

- Negative Infections in Adult Intensive Care Units of Latin America and the Caribbean. 2014;2014.
13. Chen CH, Kuo HY, Hsu PJ, Chang CM, Chen JY, Lu HHS, et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* across a community hospital and its affiliated long-term care facilities: A cross sectional study. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 1 de junio de 2018 [citado 20 de noviembre de 2018];51(3):377–84. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118217301536?via%3Dihub>
 14. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 1 de marzo de 2012 [citado 20 de noviembre de 2018];18(3):268–81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793988>
 15. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 20 de noviembre de 2018];72(12):3277–82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28961773>
 16. Rivera G, Bulnes J, Castillo C, Cristina Ajenjo M, García P, Labarca J. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in a university hospital: Role of inter-hospital transmission. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 31 de enero de 2016 [citado 20 de noviembre de 2018];10(1):96–9. Disponible en: <https://jids.org/index.php/journal/article/view/26829543>
 17. Luis E, Rojas P, Ponce De León Pandolfi D, Ponce RR. Antimicrobial resistance in an intensive care unit and current trends: *Critical Care*. Vol. 25, *Acta Med Per*. 2008.
 18. Fernández Merjildo D, García Apac C, Zegarra Piérola J, Granados Bullon L. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de secreción endotraqueal en la

- unidad de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, 2016. *Rev Medica Hered* [Internet]. 21 de diciembre de 2017 [citado 7 de febrero de 2019];28(4):236. Disponible en:
<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RMH/article/view/3223>
19. Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 4 de julio de 2018 [citado 11 de agosto de 2018];7(1):119. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29970918>
 20. Zeina A Kanafani, MD, MS, Souha S Kanj M. *Acinetobacter* infection: Treatment and prevention. 2018;(table 1):1–20.
 21. Leus I V., Weeks JW, Bonifay V, Smith L, Richardson S, Zgurskaya HI. Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* [Internet]. 1 de julio de 2018 [citado 14 de junio de 2019];200(13). Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29661860>
 22. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2017;3099(17):1–10.
 23. Zhang T, Wang M, Xie Y, Li X, Dong Z, Liu Y, et al. Active efflux pump *adeB* is involved in multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* induced by antibacterial agents. *Exp Ther Med* [Internet]. abril de 2017 [citado 14 de junio de 2019];13(4):1538–46. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28413506>
 24. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 24 de agosto de 2018];7:55. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348979>
 25. Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M. Efflux

pump inhibitor phenylalanine-arginine B-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in acinetobacter baumannii strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran.

Jundishapur J Microbiol [Internet]. 12 de octubre de 2015 [citado 29 de enero de 2019];8(10):e19048. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568800>

26. Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, Dé E, et al. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. MBio. 24 de marzo de 2015;6(2).
27. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Front Microbiol [Internet]. 23 de abril de 2012 [citado 16 de noviembre de 2018];3:148. Disponible en:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00148/abstract>
28. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol [Internet]. 1 de diciembre de 2007 [citado 20 de septiembre de 2018];5(12):939–51. Disponible en:
<http://www.nature.com/articles/nrmicro1789>
29. Raad II, Mohamed JA, Reitzel RA, Jiang Y, Dvorak TL, Ghannoum MA, et al. The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. Biomaterials [Internet]. 1 de abril de 2011 [citado 21 de noviembre de 2018];32(11):2689–94. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121001570X?via%3Dihub>
30. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev [Internet]. julio de 2008 [citado 20 de noviembre de 2018];21(3):538–82. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625687>
31. Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H. Risk Factors for Nosocomial Bloodstream

- Infections Due to *Acinetobacter baumannii*: A Case-Control Study of Adult Burn Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. enero de 1999 [citado 20 de noviembre de 2018];28(1):59–66. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028073>
32. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med* [Internet]. 23 de mayo de 2005 [citado 20 de noviembre de 2018];31(5):649–55. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785929>
 33. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen [Internet]. Vol. 71, *Pathogens and Disease*. Oxford University Press; 2014 [citado 16 de noviembre de 2018]. p. 292–301. Disponible en:
<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/2049-632X.12125>
 34. Chen TL, Lee YT, Kuo SC, Hsueh PR, Chang FY, Siu LK, et al. Emergence and distribution of plasmids bearing the blaOXA-51- like gene with an upstream ISAbal in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. noviembre de 2010 [citado 22 de noviembre de 2018];54(11):4575–81. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713680>
 35. Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R, BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de noviembre de 2008 [citado 23 de noviembre de 2018];62(Supplement 2):ii55–63. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18819980>
 36. Morgan DJ, Weisenberg SA, Augenbraun MH, Calfee DP, Currie BP, Furuya EY, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in New York City - 10 years into the epidemic. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. febrero de 2009 [citado 23 de noviembre de 2018];30(2):196–7. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19146464>

37. Rossolini GM, Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. diciembre de 2008 [citado 23 de noviembre de 2018];14:2–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19040461>
38. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1 de septiembre de 2006 [citado 18 de junio de 2019];43(Supplement_2):S49–56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16894515>
39. Lin MF, Chang KC, Lan CY, Chou J, Kuo JW, Chang CK, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in five proximal hospitals in Taiwan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(3):222–7.
40. Pagdepanichkit S, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Distribution and expression of the Ade multidrug efflux systems in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Can J Microbiol* [Internet]. septiembre de 2016 [citado 29 de enero de 2020];62(9):794–801. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2015-0730>
41. Royer S, Amaral de Campos P, Araújo BF, Ferreira ML, Gonçalves IR, William da Fonseca Batistão D, et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial blaOXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* [Internet]. 2018 [citado 14 de junio de 2019];13(6):e0198643. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29889876>
42. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Vol. 55, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011. p. 947–53.
43. Coban AY, Guney AK, Tanriverdi Cayci Y, Durupinar B. Effect of 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine, an efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibilities of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Curr Microbiol* [Internet]. 18 de febrero de 2011 [citado 29 de enero de 2019];62(2):508–11. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-010-9736-9>

44. Lertsrisatit Y, Santimaleeworagun W, Thunyaharn S, Traipattanakul J. In vitro activity of colistin mono- and combination therapy against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, mechanism of resistance, and clinical outcomes of patients infected with colistin-resistant *A. baumannii* at a Thai university hospital. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2017 [citado 14 de junio de 2019];10:437–43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29200878>
45. Vera-Leiva A, Carrasco-Anabalón S, Lima CA, Villagra N, Domínguez M, Bello-Toledo H, et al. The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 1 de marzo de 2018 [citado 26 de noviembre de 2019];12:73–6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716517302333>
46. Deng M, Zhu MH, Li JJ, Bi S, Sheng ZK, Hu FS, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de enero de 2014 [citado 29 de enero de 2019];58(1):297–303. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24165187>
47. Verma P, Tiwari M, Tiwari V. In silico high-throughput virtual screening and molecular dynamics simulation study to identify inhibitor for AdeABC efflux pump of *Acinetobacter baumannii*. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2018;36(5):1182–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2017.1317025>
48. Jamshidi S, Sutton JM, Rahman KM. Computational Study Reveals the Molecular Mechanism of the Interaction between the Efflux Inhibitor PA β N and the AdeB Transporter from *Acinetobacter baumannii*. *ACS Omega* [Internet]. 30 de junio de 2017 [citado 14 de junio de 2019];2(6):3002–16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30023681>
49. Chen T-L, Lee Y-T, Kuo S-C, Hsueh P-R, Chang F-Y, Siu L-K, et al. Emergence and Distribution of Plasmids Bearing the blaOXA-51-Like Gene with an Upstream ISAba1 in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de noviembre de

- 2010 [citado 12 de noviembre de 2018];54(11):4575–81. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713680>
50. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne PC and LSI 2015. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial. 2019.
 51. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: Comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de mayo de 2006 [citado 18 de junio de 2019];57(5):970–4. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531429>
 52. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de septiembre de 2003 [citado 15 de septiembre de 2020];52(3):477–80. Disponible en:
<https://academic.oup.com/jac/article/52/3/477/775882>
 53. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1 de agosto de 2008 [citado 29 de enero de 2019];46(8):2499–507. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524965>
 54. Coban AY, Guney AK, Tanriverdi Cayci Y, Durupinar B. Effect of 1-(1-Naphtylmethyl)-piperazine, an efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibilities of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Curr Microbiol* [Internet]. 18 de febrero de 2011 [citado 29 de enero de 2019];62(2):508–11. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-010-9736-9>
 55. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. diciembre de 2001 [citado 11 de febrero de 2019];45(12):3375–80. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709311>

56. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: A cautionary report. *J Antimicrob Chemother.* enero de 2007;59(1):128–31.
57. Bowers DR, Cao H, Zhou J, Ledesma KR, Sun D, Lomovskaya O, et al. Assessment of minocycline and polymyxin B combination against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2720–5.
58. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. marzo de 2011 [citado 11 de febrero de 2019];55(3):947–53. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173183>
59. Lin F, Xu Y, Chang Y, Liu C, Jia X, Ling B. Molecular characterization of reduced susceptibility to biocides in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 14 de junio de 2019];8(SEP):1836. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018420>

ANEXOS

1. Instrumento de recolección de datos

Se usó un espectrofotómetro para la medición de Absorbancia de las muestras durante el experimento de concentración mínima inhibitoria.

Como control de calidad del experimento, se usarán cepas ATCC, cuyos valores se encuentran estandarizados en el manual M100 perteneciente a la CLSI.

Para el análisis estadístico de los resultados, se usó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 26.0.

2. Tablas adicionales

Tabla 5. Perfiles de susceptibilidad de las cepas de *Acinetobacter baumannii* incluidas en el estudio^a.

Cepa	CMI (µg/ml) (perfil de susceptibilidad) para el antibiótico indicado			
	Antibiótico		Antibiótico + PaβN	
	TET	LEV	TET	LEV
Acc1	64 (R)	4(I)	32 (R)	4(I)
Acc2	32 (R)	2(S)	4 (S)	4(I)
Acc3	4 (S)	2(S)	1 (S)	0.25(S)
Acc4	4 (S)	4(I)	1 (S)	4(I)
Acc5	64(R)	4(I)	32(R)	4(I)
Acc6	8(I)	8(R)	4(S)	1(S)
Acc7	32(R)	4(I)	4(S)	2(S)
Acc8	2(S)	8(R)	0.5(S)	4(I)
Acc9	8(I)	8(R)	4(S)	0.5(S)
Acc10	0.5(S)	8(R)	16(R)	2(S)
Acc11	0.5(S)	8(R)	4(S)	8(R)
Acc12	4(S)	8(R)	2(S)	4(I)
Acc13	64(R)	8(R)	4(S)	4(I)
Acc14	1(S)	4(I)	2(S)	4(I)
Acc15	64(R)	4(I)	32(R)	4(I)
Acc16	8(I)	4(I)	8(I)	4(I)
Acc17	≤0.25(S)	8(R)	0.25(S)	2(S)
Acc18	16(R)	4(I)	0.25(S)	4(I)
Acc19	32(R)	2(S)	8(I)	4(I)
Acc20	0.25(S)	4(I)	≤0.25(S)	4(I)
Acc21	16(R)	≤0.25(S)	4(S)	≤0.25 (S)
Acc22	32(R)	≤0.25(S)	16(R)	≤0.25 (S)
Acc23	32(R)	≤0.25(S)	4(S)	0.25(S)
Acc24	32(R)	8(R)	8(I)	4(I)
Acc25	16(R)	8(R)	8(I)	4(I)
Acc26	2(S)	8(R)	4(S)	4(I)
Acc27	2(S)	8(R)	2(S)	4(I)
Acc28	16(R)	4(I)	16(R)	2(S)
Acc29	32(R)	8(R)	16(R)	4(I)
Acc30	≤0.25(S)	4(I)	≤0.25(S)	2(S)
Acc32	8(I)	16(R)	4(S)	2(S)
Acc33	32(R)	8(R)	16(R)	1(S)
Acc34	16(R)	8(R)	8(I)	2(S)
Acc35	0.5(S)	≤0.25(S)	≤0.25(S)	≤0.25 (S)
Acc36	≤0.25(S)	≤0.25(S)	≤0.25(S)	≤0.25 (S)
Acc37	≤0.25(S)	0.5(S)	≤0.25(S)	≤0.25 (S)
Acc38	2(S)	4(I)	0.5(S)	0.25(S)
Acc39	0.25(S)	≤0.25(S)	≤0.25(S)	≤0.25 (S)
Acc41	4(S)	8(R)	0.5(S)	0.25(S)
Acc42	≤0.25(S)	8(R)	≤0.25(S)	2(S)

Acc43	64(R)	2(S)	16(R)	0.25(S)
Acc44	≤0.25(S)	8(R)	≤0.25(S)	4(I)
Acc45	128(R)	4(I)	16(R)	4(I)
Acc46	2(S)	2(S)	0.25(S)	0.5(S)
Acc47	≤0.25(S)	8(R)	≤0.25(S)	8(R)
Acc48	≤0.25(S)	4(I)	≤0.25(S)	8(R)
Acc49	0.5(S)	8(R)	2(S)	4(I)

^aTET, tetraciclina; LEV, levofloxacin; R, resistente; S, susceptible; I, intermedio

Tabla 6. Prueba estadística U. de Mann Whitney entre los grupos de levofloxacin y levofloxacin + PaβN

Estadísticos de prueba ^a	
	RESISTENCIA ANTIBIOTICA
U de Mann-Whitney	633.500
W de Wilcoxon	1761.500
Z	-3.797
Sig. asintótica(bilateral)	0.000
a. Variable de agrupación: GRUPOS	

Tabla 7. Prueba estadística U. de Mann Whitney entre las CMI de los grupos de levofloxacin y levofloxacin + PaβN

Estadísticos de prueba^a	
	CMI-LEV
U de Mann-Whitney	581,000
W de Wilcoxon	1401,000
Z	-3,081
Sig. asintótica(bilateral)	0,002
a. Variable de agrupación: Levofloxacin	

Tabla 8. Prueba estadística U. de Mann Whitney entre los grupos de tetraciclina y tetraciclina + PaβN.



<i>Estadísticos de prueba^a</i>	
	RESISTENCIA ANTIBIOTICA
U de Mann-Whitney	889.500
W de Wilcoxon	2017.500
Z	-1.889
Sig. asintótica(bilateral)	0.059
a. Variable de agrupación: GRUPOS	

Tabla 9. Prueba estadística U. de Mann Whitney entre las CMI de los grupos de tetraciclina y tetraciclina + PaβN

Estadísticos de prueba^a	
	CMI-TET
U de Mann-Whitney	627,500
W de Wilcoxon	1488,500
Z	-1,999
Sig. asintótica(bilateral)	0,046
a. Variable de agrupación: Tetraciclina	

3. Carta DIRESA Cajamarca

4914074

 DIRECCION REGIONAL DE SALUD CAJAMARCA
GOBIERNO REGIONAL DE CAJAMARCA
Centro Regional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades
"Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad" 

OFICIO N° 4757-2019-GR-CAJ-DRSC-ORE

Cajamarca, 18 de octubre del 2019.

Señora Doctora:
JUANA DEL VALLE MENDOZA
Docente Investigadora
Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC)
Prolongación Primavera 2390, Monterrico, Santiago de Surco

LIMA.-

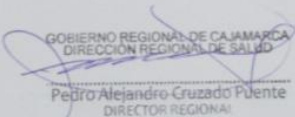
ASUNTO: Solicita apoyo con la caracterización molecular de cepas bacterianas hospitalarias

De mi consideración :

Es grato dirigirme a Usted; para saludarle cordialmente y por medio de la presente solicitarle nos apoye con la caracterización de 102 cepas aisladas de muestras biológicas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Cajamarca. Además se autoriza la publicación, mediante artículo científico, de los resultados del estudio.

Agradeciendo la atención que brinde al presente, es propicia la ocasión para expresarle las muestras de mi consideración.

Atentamente;


GOBIERNO REGIONAL DE CAJAMARCA
DIRECCION REGIONAL DE SALUD
Pedro Alejandro Cruzado Puente
DIRECTOR REGIONAL

PACPIV/2019/0103/01
C.c. Archivo
Folios 01

www.diresacajamarca.gob.pe

Av. Mario Urteaga N° 500 – Cajamarca
Teléfono: 076 363864 – Anexo 127