

**BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA DE ALTO NIVEL A
TRIMETOPRIM EN CEPAS HOSPITALARIAS DE *Acinetobacter*
*baumanni***



POR
MARLENE ROXANA MUÑOZ CAMPOS

TESIS PRESENTADA A
LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

CONCEPCIÓN - CHILE

2002

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo Gram negativo de importancia en el ambiente hospitalario, como agente etiológico de infecciones severas que afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos. Actualmente, gran parte de las cepas son resistentes a la mayoría de los agentes antibacterianos, limitándose las alternativas terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones producidas por este microorganismo. Por ello, existe interés por aumentar el conocimiento acerca de las bases genéticas de los mecanismos de resistencia de esta bacteria. Trimetoprim es un agente antibacteriano utilizado en infecciones respiratorias y urinarias. Los genes que codifican la resistencia más frecuente a este compuesto son extracromosomales. Se han descrito 19 tipos de dihidrofolato reductasas (DHFRs) insusceptibles a trimetoprim, codificadas extracromosomalmente, que otorgan diferentes niveles de resistencia a este compuesto antibacteriano.

El objetivo de la presente tesis fue investigar acerca de las bases genéticas de la resistencia de alto nivel a trimetoprim en cepas hospitalarias de *A. baumannii*. Se evaluaron los niveles de resistencia a trimetoprim mediante la técnica de dilución seriada en agar, se investigó la presencia de genes que codifican para 8 enzimas DHFRs insusceptibles a trimetoprim descritas en bacterias Gram negativas de elevada resistencia a trimetoprim y la presencia de integrones clase 1 y clase 2 mediante la técnica de hibridación por colonia con oligonucleótidos específicos. Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en las hibridaciones, se seleccionaron cepas al azar y mediante la

técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplificó el gen *dhfrIa* y el de las integrasas clase 1 y clase 2 utilizando partidores específicos en cada caso.

Para determinar si en las cepas que presentan ambos genes (*dhfrIa* e *intI2*) el gen *dhfrIa* se encontraba inserto en el integrón se seleccionaron 17 cepas al azar y se utilizó la técnica PCR con partidores IntI2F/dhfrAR.

La mayoría de las cepas estudiadas (94 %) fue resistente a trimetoprim (CMI \geq 32 μ g/ml) y la mitad de ellas (56 %) presentó resistencia de alto nivel a este compuesto (\geq 1.024 μ g/ml). En 64 cepas con resistencia de alto nivel a trimetoprim se investigó la presencia de 8 genes que codifican para enzimas DHFRs insusceptible a trimetoprim. Los genes detectados fueron *dhfrIa*, *dhfrIb*, *dhfrIII*, *dhfrV*, *dhfrVI*, *dhfrVIII*, *dhfrX* y *dhfrXII*. El 64,1 % (n=41) de las cepas estudiadas hibridó con la sonda para el gen *dhfrIa*, el 10,9 % hibridó con sondas para genes de otras DHFR y el 25 % de las cepas (n=16) no hibridó con ninguno de los oligonucleótidos. Las cepas estudiadas no hibridaron con las sondas para los genes *dhfrIIIa*, *dhfrVIII* y *dhfrXII*. De acuerdo a los resultados de los experimentos de hibridación con sondas específicas para integrón clase 1 y clase 2, 78,1 % de las cepas (n=64) presentó integrón clase 2 y sólo 1,6 % (n=1) presentó integrón clase 1, en tanto, 20,3 % de las cepas no hibridó con ninguna de las sondas utilizadas en este trabajo para la detección de integrones. Un alto porcentaje (48,4 %) presentó el gen para *dhfrIa* y el integrón clase 2; 20,3 % presentó sólo el gen *dhfrIa* y 28,1 % sólo el integrón clase 2 y finalmente sólo 3,1 % de las cepas no presentó ninguno de los genes. El alto porcentaje de cepas que presentan el gen *dhfrIa* (64,1%) confirma que los altos niveles de resistencia a trimetoprim se debe, principalmente, a la síntesis de una dihidrofolato

reductasa adicional insuceptible a trimetoprim, siendo éste uno de los mecanismos más frecuentemente descritos en otros bacilos Gram negativos. Por otra parte, en las cepas estudiadas mediante la técnica de PCR (con partidores IntI2F/dhfrAR), se encontró que en 90,9% (n=10) de ellas, el gen *dhfrIa* se encontraba inserto en el integrón clase 2, lo que sugiere que el gen *dhfrIa* podría encontrarse principalmente asociado a estructuras genéticas relacionadas al transposon Tn7, (integrón clase 2) integradas al cromosoma, y que de esta forma favorecen su diseminación. Finalmente, el conocimiento de los mecanismos de resistencia bacteriana y su diseminación es información fundamental, que permitirá conocer los factores que favorecen la aparición de cepas multiresistentes, problema que actualmente agrava e impide el tratamiento de las infecciones bacterianas, y el rol de estos microorganismos como un reservorio o vehículo de transmisión de genes de resistencia a agentes antibacterianos utilizados en el ambiente hospitalario.

