



UNIVERSIDAD PARTICULAR DE CHICLAYO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESPECIALIDAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA



Patrón de clonalidad por REP y ERIC – PCR en cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciatura en: Tecnología Médica con la Especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

Autor: Bach. TM Fernández Valverde Darwin A.

Asesor: Lic. Blga. Carmen Moreno De La Cruz

Chiclayo – Lambayeque – Perú

2019

II. DEDICATORIA

A DIOS por permitirme llegar a este camino y por devolverme el alma, al cuerpo cuando estuve enfermo de gravedad, al mismo tiempo agradecerle el gran regalo que me concedió, mi hija María Fe y Sthefano Joaquín Fernández Díaz, quienes trajeron iluminación y bendición en mi vida.

A mi madre Mercedes Valverde Hernández, a todas las personas que han aportado para que esto se llegue a desarrollar y hacer realidad a la institución (Hospital Regional Lambayeque) la cual me alberga y me desarrollo en mi ámbito laboral

Para mis hermanas Sandra, Carla y Sirly quienes estuvieron conmigo en mi formación profesional. A mis amigos y a todas las personas con las cuales he compartido parte de mi carrera.

III. AGRADECIMIENTO

A DIOS.

Por permitirme concluir mis estudios y alcanzar mis objetivos, por regalarme salud, bienestar social y económico.

A MÍ MADRE.

Mercedes Valverde Hernández; quien fue mi guía. Por ayudarme y enseñarme buenos valores; por el apoyo constante cada vez que sentía que no podía y en cada una de las complicaciones y tropiezos en toda la carrera.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación.

A MIS AMIGOS.

Al Lic. T.M García Bracamonte; Fernando R. Por el apoyo incondicional y motivación durante toda mi formación profesional.

Al Lic. Blgo. Aguilar Gamboa Franklin; Lic. Blgo. Serquen López Luis. Por el apoyo incondicional durante todo el desarrollo y progreso de esta tesis.

A MIS PROFESORES.

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; a la Lic. Blga. Carmen Moreno De la cruz. Por su apoyo ofrecido en este trabajo.

INDICE

II. DEDICATORIA.....	2
III. AGRADECIMIENTO.....	3
V. RESUMEN	6
VI. INTRODUCCIÓN	1
6.1 Marco Teórico.....	2
a. Situación Problemática.....	2
b. Antecedentes bibliográficos	4
c. Base Teórica.....	14
d. Epidemiología molecular	16
6.2. Problema	18
6.3 Hipótesis.....	18
6.4. Objetivos:	18
6.4.1 Objetivo General:	18
6.4.2 Objetivos Específicos:.....	19
6.5 Justificación e importancia del estudio	19
6.6 Definición y Operacionalización de variables.....	21
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	23
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	23
7.2. Tipo de investigación:	23
7.3. Diseño de contrastación de hipótesis:	23
7.4. Población:.....	23
7.5. Muestra:.....	24
7.6. Tipo de muestreo:.....	24
7.7. Tamaño de muestra:	24
7.8. Instrumentos y Técnicas de Recolección de Datos:	24
7.9. Análisis estadístico.....	26
VIII. Resultados	28
IX. Cuadros y Gráficas.....	29
X. Discusión.....	36
XI. Conclusiones	38
XII. Recomendaciones	39

XIII. Referencias Bibliográficas	40
XIV. Anexos	45

V. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar el Patrón de clonalidad por REP y ERIC – PCR de cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aislados de colonización y/o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015. Para lo cual se planteó un diseño prospectivo transversal y descriptivo. Las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* obtenidas de colonización y/o infección en pacientes de este nosocomio, fueron aisladas por métodos convencionales. A los pacientes con resultado positivo se les revisó la Historia Clínica para su correspondiente llenado de ficha clínico-epidemiológica, posteriormente se obtuvo un dendograma de fusión de los marcadores de REP – ERIC PCR. Del estudio se obtuvieron 24 cepas de *Acinetobacter baumannii complex* procedentes de pacientes colonizados y/o infectados pertenecientes a los Servicios de Emergencias y Áreas Críticas, de las cuales 20 cepas se agruparon en 5 clústers con un rango de similitud > 88% y clústers independientes que no se agruparon: AC17, AC4, AC22, y AC8. Ante ello se concluye que el preocupante incremento de los aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii complex* muestran una propagación y diseminación sobre todo en Unidades de Cuidados Críticos exige a realizar estudios enfocados a determinar linajes clonales que permitan evaluar la presencia de brotes o microbrotes que muestran en modo de propagación y aumento epidemiológico.

PALABRAS CLAVES: Patrón de clonalidad, infección, colonización, clústers, dendograma.

VI. INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii complex. Es un microorganismo oportunista responsable de las infecciones más frecuentes y graves en pacientes ingresados a Unidades Críticas. Esta bacteria presenta una elevada virulencia y mecanismos de resistencia que motivan su cobertura empírica de forma precoz en las situaciones clínicas en que se presenta. (1)

La importancia clínica de este microorganismo radica en su capacidad de resistir condiciones ambientales adversas, formar biofilms y adquirir genes que le confieren multiresistencia. A si mismo su impacto no está circunscrito a Unidades Críticas de un solo nosocomio si no que clones de este pueden diseminarse a otros servicios, e inclusive a otros hospitales. Dichos clones con frecuencia albergan genes que confieren resistencia a Carbapenemes mediados principalmente por OXA – 23 y en la actualidad representan un problema emergente a nivel hospitalario. (2)

La especie más representativa y de importancia clínica del genero *Acinetobacter* es *A. baumannii complex*. Existen cepas de esta especie que han tenido gran éxito en su diseminación y en la actualidad son un problema emergente que afecta a hospitales de Europa y Asia principalmente. Las epidemias por *Acinetobacter baumannii complex* en esta parte del mundo son causadas por un limitado número de cepas pertenecientes a linajes clonales internacionales (IC), destacando los clones I, II y III originarios de Europa y los recientemente reportados clones ST15, ST25, ST78 y ST84. (3)

La importancia de determinar linajes clonales radica en las diversas características de virulencia que estos presentan; de este modo, estudios recientes han determinado las peculiaridades de ciertos clones en términos de resistencia a la desecación, adherencia a las superficies bióticas y abióticas e invasión de células epiteliales alveolares, encontrando que las cepas IC – I presentan mayor resistencia a la desecación, IC – 2 una mayor adherencia a las superficies bióticas como abióticas, mientras que los genotipos emergentes ST25 y ST78 presentan todas las características antes mencionadas, Además de mayor adherencia al epitelio alveolar lo cual se correlaciona con la capacidad de formar biofilms. (3)

Existen diversas técnicas para determinar los linajes clonales en *Acinetobacter* spp, de este modo la Electroforesis en campo pulsado (ECP) es la técnica gold estándar debido a su elevado poder de discriminación; Sin embargo su laboriosidad, tiempo requerido y elevado costo son sus más importantes limitaciones (4).

En este sentido existen otras técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la PCR de secuencias de ADN repetidas (REP-PCR), la cual, es una técnica más económica, menos laboriosa, y que generan patrones de bandas más fáciles de interpretar que la ECP. REP – PCR es una técnica molecular muy empleada en los estudios de brotes, se fundamenta en la utilización de cebadores que hibridan de forma específica con unas secuencias de ADN repetitivas (secuencias Rep), de función desconocida que se encuentran dispersas por todo el genoma de muchas bacterias, hongos y parásitos (4).

Existen 3 familias de secuencias repetitivas: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas de 35 y 40 pb (secuencias REP), las secuencias consensos repetitivos intergénicos de Enterobacterias de 124 y 127 pb (secuencias ERIC), y las secuencias o elementos BOX de 154 pb (4).

El Hospital Regional Lambayeque es un nosocomio de nivel 3 - I, ubicado al norte del Perú, el cual periódicamente presenta problemas con microorganismos de origen hospitalarios, dentro de los cuales destaca *Acinetobacter* spp, el cual es principalmente aislado en Áreas Críticas y que durante el 2015 fue implicado en un probable brote en este servicio. Por ello el objetivo del estudio fue caracterizar el patrón de clonalidad de *Acinetobacter baumannii* complex - MDR, empleando los marcadores REP y ERIC - PCR en muestras de infecciones intrahospitalarias del Hospital Regional Lambayeque

6.1 Marco Teórico

a. Situación Problemática

Según datos de la Organización Mundial de la Salud en países en vías de desarrollo entre un 15 a 20% de pacientes que ingresan a un nosocomio van a padecer de infecciones intrahospitalarias, esto se incrementa en la Unidad de cuidados Intensivos o el servicio de Neonatología, ya sea porque estas infecciones están vinculadas al tiempo de uso de dispositivos invasivos (catéteres, ventiladores respiratorios, entubados), como también al estado de inmunosupresión en la que se encuentran los pacientes ingresados en estos servicios (1).

Estas Infecciones son de suma importancia ya que pueden causar la muerte, involucra un costo mayor en el tratamiento de la enfermedad o puede dejar secuelas graves como discapacidad permanente. Los agentes etiológicos más comunes causantes de estas infecciones son Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), bacilos no fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii complex*), entre los Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus*) (1).

La aparición de cepas patógenas y brotes intrahospitalarios se debe mayormente al uso indiscriminado de antibióticos, ineficiente implementación de medidas de control y a la capacidad intrínsecas de algunas bacterias de vivir en medios poco favorables para la mayoría de microorganismos logrando vivir en ambientes con estrés de pH, salinidad, en superficies secas (biofilms) y hasta en desinfectantes (1).

Una de las más importantes es *Acinetobacter baumannii complex* con una mortalidad registrada es entre un 50-60% variando según diversos factores sobre todo en pacientes entubados, con ventilación mecánica y con una puntuación alta del sistema de clasificación de severidad o gravedad de enfermedades APACHE II (Acute Physiology y crónica Evaluación de la Salud) (1).

Por este motivo es de suma importancia conocer el linaje clonal, saber que cepas se encuentran circulando en los distintos ambientes de atención , hasta la

actualidad en el Hospital Regional Lambayeque no se ha realizado un estudio mediante herramientas de epidemiología molecular que permitan discriminar entre infección versus contaminación, el origen clonal frente a infecciones recurrentes y así discriminar entre re infección del mismo clon o infección de un clon distinto, este estudio pretende determinar el patrón de clonalidad es decir caracterizar las cepas circulantes de *Acinetobacter baumannii complex* e inferir los focos infecciosos para proponer mecanismos de prevención y control de Infecciones por bacterias intrahospitalarias en este importante nosocomio, el de mayor categoría a nivel Regional.

b. Antecedentes bibliográficos

b.1.- Antecedentes Internacionales:

Gulfem Ece et al. 2015 investigaron la susceptibilidad antimicrobiana y la relación clonal entre las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas de la UCI de un hospital en Turquía. La identificación y la susceptibilidad antimicrobiana de 33 cepas de *Acinetobacter baumannii complex* obtenidas se realizaron mediante Vitek versión 2.0 automatizada, y la relación clonal entre las cepas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del consenso intergénico repetitivo enterobacterial (ERIC), entre sus hallazgos las cepas se clasificaron en siete grupos sobre la base de los resultados de huellas genómicas. Revelando que dos grupos fueron los principales responsables de la prevalencia de *Acinetobacter baumannii complex* cepas en la UCI. Concluyendo que Las cepas MDR *Acinetobacter baumannii complex* causaron un incremento en la morbilidad y mortalidad, particularmente en las UCI. El uso de métodos epidemiológicos moleculares puede ayudarnos con la detección del patógeno y la prevención de la propagación de estas cepas resistentes.(5)

Hanosh et al. 2014 realizaron un estudio para detectar Metallo- β -lactamasas, cefalosporinasas y oxacilinasas y evaluar la diversidad genética en aislamientos

de *Acinetobacter baumannii complex* recuperadas de hemocultivos en Cinco hospitales diferentes en Brasil de Diciembre de 2008 a Junio de 2009. En estas hallaron una tasa de resistencia para Imipenem de 93,75% y 39,06% de Polimixina B. Todas las cepas fueron positivas para al menos uno de los 10 genes estudiados. El diagnóstico por ERIC-PCR Reveló un predominio de ciertos clones que diferían entre sí. Sin embargo, Se observó el mismo patrón de banda en muestras de los diferentes hospitales estudiados, Demostrando la correlación entre los resultados genotípicos y fenotípicos. Por lo tanto, ERIC-PCR Es un método apropiado para agrupar rápidamente aislamientos genéticamente relacionados. Estas Los resultados también muestran que la prevalencia de MDR *Acinetobacter baumannii complex* puede variar entre los clones Diseminados en hospitales específicos.(6)

Pasanen et al. 2014. En Finlandia, realizaron un estudio con el objetivo de examinar la prevalencia y la diseminación clonal de especies del grupo *Acinetobacter baumannii complex* multirresistente y sus genes de carbapenemasas. Para ello evaluaron un total de 55 aislamientos de *Acinetobacter baumannii complex* con PCR repetitiva (DiversiLab) para analizar la clonalidad de los aislamientos, junto con el perfil de susceptibilidad antimicrobiana para diversos antibióticos. Además, desarrollaron un nuevo ensayo de PCR en tiempo real, que detectó los genes de carbapenemasas clínicamente más importantes sólo en dos reacciones multiplex. El ensayo detecta genes para KPC, VIM, IMP, GES-1 / -10, OXA-48, NDM, GIM-1, SPM-1, IMI / NMC-A, SME, CMY-10, SFC-1, 1, tipo OXA-23, tipo OXA-24/40, OXA-58 e ISAbal-OXA-51, y permite la detección segura de aislados que albergan genes de carbapenemasas adquiridos. Por último hubo una distribución clonal dependiente del tiempo de *Acinetobacter baumannii complex* multirresistente que se correlacionaba fuertemente con el perfil génico de la carbapenemasas, al menos en este material de estudio geográficamente restringido. El nuevo análisis de detección de carbapenemasas fue capaz de detectar todos los genes correctamente sugiriendo que podría ser adecuado para fines de cribado epidemiológico en laboratorios clínicos.(7)

Ying C et al. 2012. En Shanghai, China. Investigaron las correlaciones entre los aislamientos de *Acinetobacter baumannii complex* de los pacientes de la unidad de terapia intensiva neuroquirúrgica. En este estudio determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas de agentes antimicrobianos frente a 27 cepas clínicas y 28 aislamientos medioambientales mediante el método de dilución en agar. La genotipificación Molecular se realizó por enterobacterial repetitiva intergénica consenso PCR (ERIC-PCR), electroforesis en campo pulsado (PFGE) y multi-locus secuencia de mecanografía (MLST). La presencia de carbapenemasa y metalo- β -lactamasas genes fueron analizados por PCR específicos y secuenciación del ADN. De los aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii complex*, el 25,9% fueron resistentes a la minociclina, el 51,9% a cefoperazona-sulbactam, el 59,3% a imipenem y el 70% resistentes a otros antimicrobianos. Los aislamientos ambientales fueron más sensibles en comparación con los aislamientos clínicos ($P < 0,05$). Veintisiete aislamientos clínicos comprendían tres genotipos ERIC-PCR, cuatro pulsotipos PFGE principales y cinco tipos de secuencia MLST (ST) distintos (ST208, ST368, ST191, ST195, ST540), todos pertenecientes a CC92 con una diferencia de locus ellos. Las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas de los pacientes eran genéticamente similares a las cepas ambientales, con miembros CC92 como la fracción mayor, pero con diferentes susceptibilidades antibióticas.(8)

Higgins et al. 2012. En Alemania, estudiaron la reproducibilidad de las huellas genómicas Rep-PCR de DiversiLab entre dos laboratorios con el objetivo de determinar si dichas huellas y el agrupamiento son específicos del laboratorio o portátiles. En este estudio se utilizaron cien aislados no duplicados de *Acinetobacter baumannii complex*. El aislamiento del ADN y rep-PCR se realizaron por separado en dos laboratorios y los patrones de rep-PCR generados en el laboratorio A se compararon con los del laboratorio B. Doce aislamientos de *Acinetobacter baumannii complex* procesados en el laboratorio A mostraron

similitud de patrón de $\geq 98\%$ con los 12 aislamientos correspondientes Probados en el laboratorio B y se consideraron idénticos. Sesenta y cuatro aislamientos mostraron 95-97,9% de similitud con sus correspondientes aislamientos. Veintitrés aislamientos mostraron una similitud de 90-94% con los aislamientos correspondientes, mientras que un aislamiento mostró sólo 87,4% de similitud. Sin embargo, se conservó el agrupamiento intra-laboratorio: los aislados agrupados en el laboratorio A también se agruparon en el laboratorio B. Mientras que el agrupamiento se conservaba y reproducible en dos laboratorios diferentes, demostrando la robustez de REP - PCR, la comparación inter laboratorio de las huellas genómicas individuales mostró más variabilidad. Esta comparación permite llegar a conclusiones sobre la clonalidad independientemente del laboratorio donde se realiza el análisis.(9)

Zander, et al 2012. En Praga, República Checa. Investigaron sobre la correlación entre las variantes blaOXA-51 y los linajes clonales mundiales de *Acinetobacter baumannii complex*. Se secuenciaron los genes similares a blaOXA-51 de 102 aislamientos de *A. baumannii*. Utilizando DiversiLab secuencia repetitiva de PCR basada en PCR (REP - PCR) de mecanografía, 92 de estos aislamientos habían sido previamente asignados a WW1 a -8 y 10 fueron unclustered. Clustering de secuencias de ADN se realizó mediante el método de unión vecina y la corrección filogenética Jukes-Cantor. BlaOXA-51 variantes estaban en buena correlación con DiversiLab definidos linajes clonales. La tipificación basada en secuencias de las variantes de blaOXA-51 tiene el potencial de ser aplicado para la caracterización epidemiológica de *Acinetobacter baumannii complex* e identificar los linajes clonales 1 a 8 en todo el mundo(10).

Dessel et al. 2004. En Finlandia, se han empleado las técnicas AFLP y PFGE logro distinguir 23 genotipos de 47 aislados encontrando relación obtenido por ambas técnicas. Desde la llegada de técnicas rápidas y económicas de

secuenciamiento se han venido utilizando la secuencias de genes estructurales para la discriminación del *Acinetobacter baumannii complex*. (11).

Bartual et al. 2005. En España se desarrolló un esquema para la amplificación de 7 genes estructurales y su respectivo secuenciamiento (MLST), encontrando concordancia con los resultados obtenidos por la electroforesis de campo pulsado y AFLP, empleando 40 muestras clínica proveniente de hospitales europeos (12)

Dettori M et al. 2014. Reporto la presencia del gen OXA-23 y además del gen OXA-51 en aislados provenientes de un hospital al norte de Italia, la diferencias en el patrón de resistencia nos permite deducir el intercambio de clones en hospitales de distintos continentes o la aparición de nuevas cepas con el mismo patrón, este último estudio remarca la importancia de realizar estos estudios en áreas críticas para la adopción de estrictos hábitos de higiene, especialmente en el lavado de manos y en el uso adecuado de la indumentaria del personal para evitar la dispersión de cepas altamente patogénicas en los diversos ambientes del hospital (13)

HOSAM et al. 2015. Determinaron la epidemiología molecular y los mecanismos de resistencia de 117 aislamientos de *Acinetobacter baumannii complex* resistente a carbapenémicos en hospitales de Arabia Saudita. Los aislados se sometieron a evaluaciones de clonalidad basados en secuencias repetitivas de REP – PCR. De todos ellos 16 grupos se relacionaron clonalmente e incluso había relación entre grupos de diferentes hospitales. (14)

GÜLBUDAK et al. 2014. Determinaron patrones de clonalidad en *Acinetobacter spp.* Aislados de muestras clínicas de pacientes hospitalizados mediante el método de Rep-PCR. Entre octubre de 2011 y mayo de 2012, Se incluyeron un total de 75 aislamientos de *Acinetobacter* en muestras clínicas de pacientes hospitalizados con un Susceptibilidad a los antibióticos de los

aislados de *Acinetobacter*, de acuerdo con las recomendaciones de CLSI, disco de Kirby-Bauer, fue probado por el método de difusión. Se determinó la resistencia a los antibióticos (resistencia a múltiples fármacos). Como resultado del análisis de relaciones clonales con Rep-PCR se identificaron un total de ocho (A-H) clones, dos clones principales [A (7 subtipo), B (3 subtipo)]; para Se determinó que el clon era el tipo dominante. Un clon del 72% (n = 54) de 75 aislamientos de *Acinetobacter*. Encontrado para pertenecer 13 aislamientos pertenecientes al clon B, dos aislamientos en los clones C y D, en otros clones. Este trabajo se realizó en Turquía. (15)

BERRIN SARI et al. 2015. En Turquía. Desarrollaron un estudio con el fin de investigar los genes de la Oxacilinasas responsables de la resistencia al carbapenem en cepas de *A. baumannii* resistentes a múltiples fármacos (MDR) y evaluar la relación clonal entre estas cepas. Un total de 62 MDR cepas de *A. baumannii* aisladas de diversas muestras clínicas, de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (n = 42) y otras clínicas para pacientes hospitalizados (n = 20) entre febrero y marzo de 2012, se incluyeron en el estudio. Identificación y susceptibilidad antibiótica de *A. baumannii* los aislamientos se realizaron mediante el sistema automatizado Vitek-2 (bioMérieux,). (16)

La presencia de genes OXA productores de carbapenemasa (similar a blaOXA-23, similar a blaOXA-40, similar a blaOXA-51 y similar a blaOXA-58) se detectó mediante PCR multiplex (sistema de prueba Hyplex® CarbOxaID, Amplex Diagnostics, Alemania) y la relación clonal entre aislamientos se investigó mediante el método de rep-PCR (DiversiLab, bioMérieux, Francia). Todos los aislamientos de *A. baumannii* fueron susceptibles a la colistina. (16)

Todas las cepas fueron positivas para los genes blaOXA-23 y blaOXA-51, mientras que los genes blaOXA-40 y blaOXA-58 no se detectaron en ninguno

de ellos. Cultivos simultáneos de muestras ambientales obtenidas de clínicas de pacientes hospitalizados en las que las cepas MDR *A. baumannii* aisladas fueron negativas en términos de *A. baumannii* crecimiento. En la evaluación de la relación clonal entre aislamientos, 48 cepas (77.4%) mostraron una similitud superior al 95% y formaron un grupo grande, llamado Cluster A. (16)

El análisis por rep-PCR de estos aislamientos indicó que una gran parte de las cepas de *A. baumannii* estaban estrechamente relacionadas entre sí, y probablemente de la misma fuente y ancestro común, y se separaron brevemente unas de otras. Estos datos enfatizan que las opciones de tratamiento son bastante limitadas para pacientes hospitalizados y la necesidad de mejorar las medidas de control de infecciones en nuestro hospital. (16)

SHIRMOHAMMADLOU et al. (2018). Desarrollaron un estudio en Irán en un total de 100 aislamientos clínicos de *A. baumannii* de pacientes inmunocomprometidos hospitalizados en UCI en Irán fueron investigados por su susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de genes de resistencia a la antiséptica y carbapenemasa. Todos los aislamientos fueron resistentes a uno o más antibióticos, encontrándose la resistencia más frecuente contra ciprofloxacina e imipenem (100%) y piperacilina (99%). (17)

Las MIC de los biocidas se determinaron por el método de dilución en agar. No se observó resistencia aparente a los biocidas entre los 100 aislamientos de *A. baumannii*. Todos los aislamientos fueron inhibidos efectivamente por las concentraciones definidas de cetrimida, cloruro de benzalconio y glutardaldehído del usuario. El gen intrínseco de β -lactamasa, similar a blaOXA-51, se detectó en todos los aislamientos de *A. baumannii*. La coexistencia de blaOXA-51 y blaOXA-23 se encontró en el 89% de los aislamientos. Sin embargo, los genes blaOXA-58, blaSIM y blaIMP no se detectaron en ningún aislado. Si bien los aislamientos de *A. baumannii* eran

sensibles a los biocidas, los genes *qac* eran los más comunes, con el gen *qacEΔ1*, con una frecuencia del 91%. (17)

El estudio reveló la alta frecuencia de aislamientos de *A. baumannii* resistentes a múltiples fármacos y carbapenem en pacientes en UCI, con una alta prevalencia de los genes *blaOXA-23* y *blaOXA-51*. Sin embargo, no se observó resistencia aparente a los biocidas en los aislamientos de *A. baumannii*. Parece que las medidas apropiadas de vigilancia y control son esenciales para prevenir la aparición y transmisión de MDR *A. baumannii* en Irán. (17)

Zahra Shamsizadeh et al. 2017 en Irán se realizó un estudio para demostrar que *Acinetobacter baumannii* resistente a los antibióticos se ha convertido en uno de los patógenos hospitalarios más problemáticos del mundo. Este estudio fue diseñado para investigar la presencia de *A. baumannii* resistente a los antibióticos en diversos entornos hospitalarios. Se tomaron muestras de aire, agua y superficie inanimada en diferentes salas de cuatro hospitales y se analizó la presencia de *A. baumannii*. (18)

Se confirmaron los aislamientos confirmados de *A. baumannii* para determinar la susceptibilidad antimicrobiana y también se examinó la presencia de los tres genes más comunes que codifican la carbapenemasa tipo OXA. *A. baumannii* se detectó en el 11% (7/64) de las muestras de aire con la mayor recuperación en unidades de cuidados intensivos (UCI). También se detectó *A. baumannii* en 17% (7/42) y 2% (1/42) de muestras de superficie y agua, respectivamente. Se recuperaron un total de 40 aislamientos de *A. baumannii* y el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana mostró la mayor resistencia a la ceftazidima (92.5%, 37/40). El 85% (34/40) y el 80% (32/40) de los aislamientos también fueron resistentes a imipenem y gentamicina, respectivamente. El análisis de los genes de resistencia mostró que el 77,5% (31/40) de las cepas contenía OXA-23 y el 5% (2/40) de las cepas contenía OXA-24, pero no se detectó OXA-58 en ninguna de las cepas. (18)

Pilar Villalón Et al. 2011. En Madrid, analizaron la diversidad clonal de 729 cepas epidémicas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de 19 hospitales españoles (principalmente de unidades de cuidados intensivos) durante un período de 11 años. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) identificó 58 tipos de PFGE que fueron sometidos a pruebas de susceptibilidad, secuenciación del gen *rpoB* y tipificación de secuencias multilocus (MLST). (19)

Todos los tipos de PFGE fueron resistentes a múltiples fármacos; La colistina fue el único agente al que todos los agentes patógenos fueron susceptibles. Los 58 tipos de PFGE se agruparon en 16 clones en función de su similitud genética (corte del 80%). Estos clones se distribuyeron en un grupo principal (grupo D), tres grupos de medios (grupos A, B y C) y tres grupos menores (grupos E, F y G). La secuenciación del gen *TherpoB* y los resultados de MLST reflejaron una distribución clonal, de acuerdo con los resultados de PFGE, ST-79 y ST-80 podrían ser nuevos clones emergentes.(19)

Este trabajo confirma que PFGE y MLST son herramientas complementarias en los estudios de clonalidad. Aquí, PFGE pudo demostrar el patrón monoclonal de la mayoría de los brotes, la transmisión inter e intrahospitalaria de bacterias y su persistencia endémica en algunas salas. MLST permitió monitorear la evolución temporal y la distribución espacial de los clones españoles y permitió realizar comparaciones internacionales. (19)

Ramazanzadeh et al. (2013) Determinaron la transmisión de infecciones bacterianas mediante el análisis genético de doscientas treinta cepas de *Escherichia coli*, aisladas de diferentes muestras clínicas, se caracterizaron por la técnica enterobacteriana repetitiva de consenso intergénico (ERIC) –PCR. Los resultados y la similitud entre las cepas se determinaron sobre la base del coeficiente de similitud de Jaccard en el programa SAHN del software NTSYS-pc. (20)

De este modo los perfiles ERIC – PCR permitieron la tipificación de los 230 aislamientos en 205 tipos ERIC que se agruparon en veinte grupos principales (C01 – C20). El primer grupo representò el 4,34% del total de aislamientos. De los 230 aislamientos, el 34,2% pertenecía al grupo filogenético D que se asoció con muestras extraintestinales. El estudio hallò una alta diversidad en los aislamientos de *E. coli*, lo que indica una baja tasa de infección hospitalaria en nuestros hospitales universitarios. La mayoría de los aislamientos pertenecían al grupo D filogenético. Trabajo realizado en Irán.(20)

D'Arezzo et al. (2009) estudiaron la epidemiología molecular y la base genética de la resistencia a los antibióticos en 88 cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a múltiples fármacos (MDR) aislados durante 18 meses en pacientes infectados en siete unidades de cuidados intensivos (UCI) en Roma. El análisis de ADN se realizó por RAPD-PCR y de macro restricción identificándose dos tipos clonales predominantes, genéticamente relacionados con los clones epidémicos europeos I y II, que representan el 98,9% de los aislados de la UCI de *A. baumannii*. (21)

El tipo 1 se aisló de todas las UCI bajo encuesta. Integrones de clase 1 De 2.2 y 2.5 kb fueron detectados en aislamientos tipo 1 y tipo 2, respectivamente. Las estructuras de integron fueron similares a las previamente determinadas. Para las cepas epidémicas de *A. baumannii* de varios países europeos, y sugiere un reordenamiento / intercambio de integrones entre aislamientos Relacionados con los clones epidémicos europeos I y II. La resistencia al carbapenem se asoció con la presencia del gen blaOXA-58 en aislamientos tipo 1. Los resultados indican que el clon tipo 1 de *A. baumannii* tiene un alto potencial de propagación entre los hospitales. (21)

b.2.-Antecedentes Nacionales y Regionales:

No se encontraron antecedentes Nacionales, Regionales y Locales.

c. Base Teórica

Las infecciones intrahospitalarias constituyen un grave problema de la salud pública a nivel mundial por su elevada frecuencia y mortalidad, lo que se traduce no sólo en un incremento en los días de hospitalización y costos de atención, si no que constituyen un desafío ineludible para las autoridades de los hospitales, al ser consideradas un evento adverso para el paciente que influye en la calidad de atención así como los elevados costos del cuidado de los pacientes. (22)

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) se producen entre 48 a 72 horas de haber ingresado en el hospital, y 72 horas posteriores al alta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los países en vías de desarrollo el riesgo de adquirir infecciones intrahospitalarias es del 15 % pero esto puede llegar hasta un 25 % en países en vías de desarrollo, donde existen mayormente medidas deficientes de vigilancia y control. (23)

Esta cifra llegan a su valor más alto en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y neonatología, esto se debe a la severidad de la enfermedad subyacente que conlleva a una mayor frecuencia de intervenciones invasivas y al mayor uso de antibióticos de amplio espectro entre otras causas. La neumonía asociada a ventilador mecánico, la infección del torrente sanguíneo asociada a catéter venoso central, e infecciones del tracto urinario asociadas a catéter urinario producen alta mortalidad en pacientes que ingresan a estas unidades y son en su mayormente causadas por patógenos oportunistas con un perfil de resistencia a antibióticos que limita su control. (23)

La resistencia a antibióticos es un problema creciente en la salud pública en todo el mundo principalmente en microorganismo causantes de infecciones

intra hospitalarias, esto se debe mayormente al uso indiscriminado de antibióticos en estos establecimientos cuyas cepas presentan cada vez mayor número de genes de resistencia, aumentando la patogenicidad a través del tiempo, estas cepas denominadas multidrogo resistente o MDR, pueden adquirir esta capacidad por transmisión horizontal de genes de resistencia (plásmidos y transposones), por recombinación cromosómica con ADN foráneo (Intra específica o Inter específica) o por mutaciones en diferentes loci de origen Cromosómico o plasmídico. (24) (25)

El conocimiento adecuado de los clones bacterianos que circulan en el Hospital Regional Lambayeque intrahospitalario es de vital importancia, para ello los estudios epidemiológicos permiten conocer la distribución e identificar los puntos críticos para un adecuado control además provee la capacidad de diagnosticarlas con mayor rapidez un pronto tratamiento, estos estudios epidemiológicos se basa en métodos fenotípicos de poca estabilidad, reproducibilidad o poder discriminatorio.

Además con elevados costos en el cultivo de bacterias de crecimiento lento y poco apropiados para determinar las relaciones a nivel de sub especie, cepa o clon; en cambio los métodos genotípicos no están influenciados por el ambiente siendo una alternativa con mayor estabilidad, reproducibilidad y poder discriminatorio siendo capaz de resolver entre cepas muy emparentadas a nivel de sub especie, cepa o clon.

Cuando se tiene diferentes aislamientos bacterianos se parte de la premisa que todos estos aislados se encuentran filogenéticamente relacionadas por tal motivo poseen un precursor clonal común con un nivel de similitud entre sus genotipos mayor del que se pueda encontrar entre cepas seleccionadas al azar.

Una adecuada discriminación entre las cepas en estudios de epidemiología molecular ayudara a discriminar entre infección versus contaminación, el origen clonal frente a infecciones recurrentes y así discriminar entre re infección del mismo clon o infección de un clon distinto, datos importantes cuando se trata de

establecer relaciones entre cepas causantes de brotes de infecciones intrahospitalarias.

Acinetobacter baumannii complex es una bacteria gran negativa ubicua involucrada en la colonización e infecciones en pacientes hospitalizados especialmente en unidades de cuidados intensivos causando infecciones como neumonía, infección en heridas e infecciones vía sanguínea, la capacidad de causar infecciones intrahospitalaria se le atribuye a la resistencia antimicrobiana, a la capacidad de colonizar materiales inanimados y superficies secas contribuyendo estas características a incrementar el tiempo de supervivencia en ambientes hospitalarios. (24) (26)

Se han usado diversos marcadores moleculares para conocer la distribución e identificar el número de clones circulantes de *Acinetobacter baumannii complex* mediante estudios de epidemiología molecular.

Desde fines del siglo XIX ha sido revisado el género *Acinetobacter* sufriendo a lo largo del tiempo cambios taxonómicos, fue recién en 1971 donde se determinó que el género *Acinetobacter baumannii complex* comprende solamente cepas oxidasa negativas característica importante para la caracterización fenotípica utilizada hasta la actualidad. (27)

d. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular ha sido considerada como una nueva disciplina en la cual se implementan técnicas moleculares en los estudios epidemiológicos. Debido a la epidemiología molecular se ha incrementado el conocimiento sobre un conjunto de organismos tales como bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades infecciosas. Esta disciplina se ha convertido en un componente importante en la investigación de este tipo de enfermedades, lo que involucra un mejor conocimiento de su distribución y la posibilidad de diagnosticarlas con mayor rapidez y ofrecer un mejor tratamiento. (28)

Tomando en cuenta la definición actual de epidemiología, algunos autores mencionan que la epidemiología molecular podría ser definida como la ciencia que estudia las causas de la aparición, propagación, mantenimiento y descenso de los problemas de salud en poblaciones mediante el uso de las técnicas de la biología molecular, como el estudio del ADN para identificar bio-marcadores en muestras humanas, con la finalidad de prevenirlos o controlarlos. Es decir, epidemiología molecular es la biología molecular ciencia experimental al servicio del enfoque epidemiológico salud pública. (29)

Entre los objetivos de los estudios epidemiológico-moleculares podemos mencionar que permiten determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. La información obtenida es útil, cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistente, debido a que permite determinar el número de clones circundantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva. (30)

Las infecciones nosocomiales siempre han generado preguntas a los investigadores en diferenciar entre cepas de bacterias epidemiológicamente importantes de las insignificantes que muchas veces son fenotípicamente indistinguible, por lo cual la epidemiología molecular cumple un rol significativo, Sin embargo, en un sentido más amplio, los problemas y perspectivas más importante de la epidemiología molecular en el campo de las enfermedades infecciosas son la evolución de microorganismos patógenos, el mantenimiento de infecciones emergentes o re emergentes, las causas y mecanismos de la formación de nuevos patógenos y el banco de ADN e identificación de genes que codifican factores de patogenicidad. (31)

Los marcadores moleculares mayormente utilizados para estos estudios epidemiológico son la electroforesis de campo pulsado (PFGE) considerado la técnica gold Standard, por otro lado el uso de marcadores conocidos como AP-PCR, REP-PCR y ERIC-PCR también han sido empleados en estudios

epidemiológicos con resultados variados por ultimo las nuevas técnicas de secuenciamiento han abierto las posibilidades de obtener mayor información del ADN en esto se basa la técnica de tipificación por secuenciamiento de multi locus o MLTS por sus siglas en ingles. (8) (32)

Son diversos los estudios que han demostrado la utilidad de MLTS para determinar la diversidad clonal en *A. baumannii-calcoaceticus*, demostrando en todos estos casos el poder de discriminación además cuenta con un alto nivel de resolución y una clara concordancia con los resultados obtenidos por técnicas más laboriosas como son AFLP y PFGE, además los resultados de la genotipificación por MLTS ofrece la posibilidad de transferir los datos de la tipificación de laboratorio a laboratorios o comparar los resultados vía Internet (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk>) de esta manera se puede considerar una poderosa herramienta para estudios epidemiológicos a nivel mundial. (33)

6.2. Problema

¿Las cepas de *Acinetobacter baumannii complex*, aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015 estarán relacionadas al mismo linaje clonal?

6.3 Hipótesis

Las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* no pertenecen al mismo linaje clonal aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

6.4. Objetivos:

6.4.1 Objetivo General:

Determinar el Patrón de clonalidad por REP y ERIC – PCR de cepas de *Acinetobacter baumannii complex*; aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

6.4.2 Objetivos Específicos:

- Obtener cepas de *Acinetobacter baumannii complex* a partir de muestras biológicas procesadas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.
- Establecer las características clínico-epidemiológicas en los pacientes de las cuales proceden las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas en el Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.
- Construir el dendograma a partir de las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas en el Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

6.5 Justificación e importancia del estudio

Dentro de los patógenos de mayor importancia en infecciones intrahospitalarias es *Acinetobacter baumannii complex* con una tasa de mortalidad del más del 50% de pacientes infectados y esta mayormente asociado a dispositivos invasivos y a altos índices de puntuación del sistema de clasificación de severidad o gravedad de la enfermedad APACHE II en este proyecto se pretende conocer el patrón de clonalidad y resistencia a antibióticos de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas en la Unidad de cuidados Intensivos, la Unidad de cuidado intensivos neonatal, Unidad de cuidados intermedios,

salas quirúrgicas entre otros, y así inferir los posibles reservorios para su vigilancia y control. (1)(34)

Desde el año 2012 donde se dio inicio a las actividades del Hospital Regional Lambayeque, distintos patógenos se han venido adecuando al ambiente hospitalario, es importante determinar si durante este periodo han adquirido genes de resistencia que complican su eliminación y son los causantes de muerte por sepsis presentados en áreas críticas como son los servicios de unidad de cuidados intensivos (UCI), Unidad de cuidados intermedio (UCIN), salas quirúrgicas, UCI neonatología entre otros, de esta manera caracterizar las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* que circulan en el hospital Regional Lambayeque el cual permitirá crear mecanismos de vigilancia y control evitando brotes epidemiológicos de infecciones intrahospitalarias causadas por este patógeno, el uso de marcadores moleculares posibilitará la construcción del mapa microbiológico y diferenciar a nivel de clon las distintas cepas aisladas, siendo imposible realizarlos por medio de técnicas fenotípicas, del mismo modo las técnicas moleculares ayudará a conocer el patrón de clonalidad de las cepas en estudio, ello evitará la diseminación de las cepas multidrogo resistentes que actualmente circulan en la Unidad de Cuidados Intensivos, Unidad de Cuidado Intensivos Neonatal y Unidad de Cuidados Intermedios, contribuyendo a su eliminación manteniendo la calidad del servicio que viene brindando este nosocomio el de mayor complejidad en la Región Lambayeque.

6.6 Definición y Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES (Variables contenidas en la definición conceptual)	INDICADORES (Definición operacional)	Valores, categorías o unidades de medida
Patrón de clonalidad de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> complex	Es el grado de similitud entre las cepas aisladas de <i>Acinetobacter baumannii</i> de muestras clínicas, pertenecientes a la UCI, Unidad de cuidados Intermedio, UCI Neonatología, emergencia y medicina.	Patrones de clonalidad obtenidos por REP – ERIC PCR Son marcadores moleculares	Polimorfismo: Bases Nucleotídicas que se encuentran en más del 5% y en menos del 95% de la población.	Alto Medio Bajo
			Monomorfismo: Bases nucleotídicas que se encuentran en menos del 5% y más del 95% de la población.	Alto Medio Bajo
		PACIENTES INFECTADOS O COLONIZADOS	Sexo	Masculino Femenino
		Se define como la interacción entre el patógeno	Edad del paciente al momento del estudio	Numérico Discreto

		(Acinetobacter baumannii complex) y el individuo hospedero.	Procedimiento invasivo empleado dentro de las últimas 72 horas antes de la fecha del estudio	(Nominal) Catéteres urinarios, ventiladores mecánicos...etc
			Fecha de ingreso del paciente al hospital	Numérico Fecha(dd/mm/aa)
			En caso de neonatos: Peso al nacer	Numérico
			Tipo de intervención quirúrgica	Nominal
			Diagnóstico médico principal	Nominal
			Ambiente hospitalario: Ambiente en el que se encuentra el paciente a la hora de la toma de muestra, puede incluir el número de cama.	(Cuantitativo discreto) Ambiente1,2,3...
Los servicios infectados por las cepas de <i>Acinetobacter baumannii complex</i> .	Áreas de un hospital (UCI, Unidad de cuidados Intermedio, UCI Neonatología, emergencia y medicina) que contienen pacientes infectados por el microorganismo.	Área dónde se encuentran los pacientes infectados.	-. Medicina. -. Unidad de cuidados críticos (UCI) -. Unidad de cuidados críticos intermedios (UCIN). -. Unidad de cuidado crítica pediátrica (UCEP) -. Emergencia.	Cualitativa

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Bacteriología y el laboratorio de Biología Molecular y Genética del área de Investigación del Hospital Regional Lambayeque.

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

7.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN: Prospectiva; la recolección de la información se realiza de manera planificadas por el mismo investigador, de modo que este puede disponer de las variables que desea estudiar. Transversal; La medición se realizara en una sola oportunidad.

7.3. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS: Descriptivos.

7.4. POBLACIÓN: La población en estudio estuvo constituida por todas las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

7.5. MUESTRA: La muestra fueron cepas bacterianas de *Acinetobacter baumannii complex* aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

Criterios de inclusión

- ✚ Cepas bacterianas de *Acinetobacter baumannii complex*; aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.
- ✚ Al paciente reincidente con la solicitud del análisis se tendrá en cuenta para validar la relación clonal.

Criterios de exclusión:

- ✚ Cepas positivas, pero diferentes tipos de aislamiento bacterianos para *Acinetobacter baumannii complex* en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.
- ✚ Cepas positivas para *Acinetobacter baumannii complex* aisladas de pacientes, procedentes de consultorio externo del Hospital Regional Lambayeque.

7.6. TIPO DE MUESTREO: No probabilístico; el investigador selecciona muestras basadas en un juicio subjetivo en lugar de hacer la selección al azar. Consecutivo; Aquí, el investigador elige una sola persona o un grupo de muestras, realiza una investigación durante un periodo de tiempo.

7.7. TAMAÑO DE MUESTRA: El número de muestra estuvo conformado por 24 cepas bacterianas de *Acinetobacter baumannii complex* aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

7.8. INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII COMPLEX*:

Se realizaron las siembras de aislamientos primarios en el Agar Mac Conkey y Agar Sangre, incubándose a 37ª C por 16 – 18 H. Al día siguiente se efectuó el cultivo en pruebas de identificación primarias (35)

Las cepas obtenidas fueron registradas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis molecular. Los datos epidemiológicos serán ingresados en fichas según las recomendaciones de la norma técnica para Infecciones Intrahospitalarias. Ficha en el anexo N° 01

PATRÓN DE CLONALIDAD MEDIANTE ERIC Y REP – PCR DE CEPAS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII COMPLEX*

La relación clonal de cepas de *Acinetobacter baumannii complex* aisladas de los diferentes servicios del Hospital Regional Lambayeque, fueron evaluadas mediante los marcadores ERIC y REP – PCR (Instituto Nacional de salud, 2002). La extracción de ADN para las cepas se basó en el método de purificación de ADN genómico bacteriano según el manual de Current Protocols in Molecular Biology (2003). La preparación de los reactivos empleados se indica en el cuadro N° 01. Para optimizar la extracción de ADN genómico, se trabajó con cultivos bacterianos jóvenes, el cual se obtuvo mediante la inoculación de esta cepa en caldo de BHI (Brain Heart Infusion) y posteriormente se incubó a 37º C por 16 – 18 horas, posteriormente se precipitó por centrifugación a 12 000 r.p.m por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

El ADN genómico total de los aislamientos fue extraído y purificado empleando la técnica salting out; este ADN genómico fue utilizado para el análisis por PCR de los elementos repetitivos intergénicos consenso de enterobacterias (ERIC) y elementos repetitivos extragénicos palindromos (REP). Ambos análisis, ERIC-PCR y REP-PCR se realizaron empleando oligonucleótidos previamente

reportados por Versalovic Et al 1991(36) y siguiendo el método del mismo autor (Tabla N° 02).

Todos los cebadores (“primers”) fueron sintetizados por Operon Biotechnologies GmbH, Alemania. Para los análisis se utilizaron las mismas condiciones de PCR: el volumen final de reacción fue 12,5 µl, 0.75 µL de Taq ADN polimerasa Platinum ® (Invitrogen), 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (A, G, C y T), 1 µL de MgCl₂ (Invitrogen), 1.25 µL de cada cebador o “primer” y 100 ng de ADN genómico como molde (tabla N° 03). Las condiciones termodinámicas de PCR se describen en la (tabla N° 04). Terminado este paso 12.5 µl de los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%. (Tabla N° 05).

7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los patrones de bandas *Acinetobacter baumannii complex* generados con los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR se estudiaron aplicando el Análisis multivariado, utilizando el paquete estadístico del software Quantity One® BIORAD Julio A. Et al 2009 (37); asimismo, la posición de bandas se normalizó con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

CONSTRUCCIÓN DE LA MATRIZ BINARIA DE DATOS

Se realizó una inspección visual de los perfiles electroforéticos generados producto de la amplificación mediante ERIC-PCR y REP-PCR, de esta manera se lograron identificar los patrones de bandas en cada cepa, estos caracteres se ordenaron en pares de bases de acuerdo al tamaño que presentaron, a partir de esto se armó una matriz con valores binarios de presencia (1) y ausencia (0) de bandas por cada cepa y para ambos marcadores moleculares, donde las filas correspondieron a los caracteres y las columnas a las cepas. La información se ingresó en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2016 (Anexo N° 09).

ANÁLISIS MULTIVARIADO

Con la finalidad de entender el patrón de clonalidad a través de REP – ERIC PCR entre todas las cepas en estudio, se realizó un análisis de Loci (caracteres) y OTUs, ordenados en una matriz básica, siendo los Loci las filas y los OTUs las columnas (Figura 01).

Se utilizó el paquete estadístico de Quantity one® (Biorad Pharos FX Plus®) mediante este software se realizaron análisis de REP – ERIC PCR: agrupamiento por UPGMA. En primer lugar, se calculó la similitud entre cada par de genotipos considerando el coeficiente de DICE, expresan de manera cuantitativa el parecido entre distintos OTUs, que permiten calcular las similitudes o las diferencias a través de operaciones matemáticas Julio Et al 2009 (37)

Estos coeficientes pueden variar entre un valor mínimo de 0 (cuando el par de individuos no tienen bandas en común) y un valor máximo de 1 (cuando todas las bandas presentes en un individuo están presentes en el otro).

Debido a esto se logra la construcción de una “matriz de similitud”. En la comparación de OTU_i vs OTU_j, se puede dar las siguientes Julio Et al 2009(37) coincidencia del carácter presencia (1,1) en ambos genotipos, presencia en el genotipo i y no en el j (1,0); ausencia en el genotipo i y no en el j (0,1) y coincidencia de ausencias en ambos genotipos (0,0).

Esto se resume en la siguiente matriz.

		OTU j	
		1	0
OTU i	1	a	b
	0	c	d

Figura 1. Representación de los valores entre OTUs en la construcción de la matriz de similitud

$$\text{DICE: } 2a / (2a+b+c)$$

AGRUPAMIENTO UPGMA Y ELABORACIÓN DEL DENDROGRAMA

Formada la matriz de similitud con el paquete estadístico del software Quantity One® BIORAD, se llevó a cabo un agrupamiento UPGMA (Unweighted pair group methodus ingarithmetic averages), el cual mediante un algoritmo jerárquico reúne a las cepas en grupos similares, este procedimiento se evidenció gráficamente en un dendograma. En este estudio se elaboró un dendograma por especie, combinando los datos obtenidos por ambos marcadores, aumentando así la especificidad de las pruebas y mejorando el agrupamiento generado Julio Et al 2009(37).

VIII. RESULTADOS

Durante el periodo de Julio a Noviembre del 2015 fueron recolectadas 24 cepas de *Acinetobacter baumannii complex*, procedentes de pacientes colonizados o infectados pertenecientes a los servicios de emergencias y áreas críticas del Hospital Regional Lambayeque.

Las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* fueron procesadas por REP y ERIC – PCR obteniéndose 18 - 20 Amplicones los cuales estuvieron en un rango de 131 - 4063 pares de bases (pb) para REP PCR (Ver Anexo N° 07) y de 115 – 2215 para ERIC PCR (Ver Anexo N° 08). Generándose bandas polimórficas dentro de las cuales se hallaron 5 agrupamientos de clusters, los cuales se identifican con C1 – C5.

Las bandas obtenidas en el gel tras el proceso fueron analizadas por el software “Gel Comprar II Applied Maths Company” tomando como coeficiente de similitud el 88%. De este modo se pudo determinar que las cepas del clusters C1 estuvieron conformadas por los subclusters C1a, C1b, C1c, C1d y el C1e; con sus correspondientes genotipos cada uno de ellos. Al mismo tiempo se puede apreciar los clusters C2, C3, C4 y C5. Ver en anexo N° 10

En la tabla N° 06 se registraron características clínico epidemiológicas de los pacientes que albergaban a estas bacterias, para ello se consideraron variables como: Fechas de ingreso,

servicios de procedencia, enfermedad de base, tratamiento, los procedimientos invasivos (ventilación mecánica, laparotomía explorativa, etc), y el tipo de muestra así como la calidad de la misma Vecchiola Et al 2008(1). (Ver gráfico 07)

Los pacientes fueron categorizados de acuerdo con la enfermedad de base en infectados, traumatizados, enfermedad cerebrovascular y otras patologías. Considerando pacientes infectados aquellos cuyo motivo de ingreso fue sepsis, neumonía, obstrucción abdominal, bronconeumonía e infección respiratoria aguda. Los pacientes traumatizados incluían a aquellos cuyo motivo de ingreso eran relacionados a accidentes. Con respecto a los pacientes cerebrovascular, su motivo de ingreso fue intervención operatoria. Finalmente, los pacientes de otras patologías tenían un motivo de ingreso de enfermedad renal crónica, falla sistémica y síndrome de Guillain-Barré Vecchiola Et al 2008(1).

IX. CUADROS Y GRÁFICAS

Tabla N^a 01. Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico bacteriano, según el manual de Current Protocols in Molecular Biology (2003)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN FINAL	CANTIDADES
Buffer TE pH 8.0	Tris 10 mM EDTA 1 Mm	50 ml	Tris 0.06 g EDTA 0.01861 g H ₂ O estéril 50 mL
SDS	10%	50 ml	SDS 5 g H ₂ O estéril 50 mL
NaCl	5 M	100 ml	NaCl 29.22 g H ₂ O estéril 100 mL
CTAB/NaCl	CTAB 10% NaCl 0.7 M	100 ml	NaCl 4.1 g CTAB 10 g H ₂ O estéril 100 mL
Cloroforma – OH isoamílico	C: I 24: 1	50 ml	Cloroforma 48 mL OH isoamílico 2 mL
Fenol – Cloroforma – OH isoamílico	P: C: I 25: 24: 1	100 ml	Fenol 50 mL Cloroforma 48 mL OH isoamílico 2 mL

Buffer TE: El pH 8.0 se regula con NaOH en caso de acidez, y con HCl en caso de alcalinidad.

Preparación del fenol: El envase de fábrica contiene 100 g de fenol cristalizado, al cual se agregaron 250 mL de Tris base 0.5 M, y se llevó a un agitador magnético por 30' (pudiendo mantenerlo por tiempos de 60' o 90') a una temperatura de 70°C, seguido se dejó reposar observándose la formación de dos capas, se extrajo entonces el tris residual de la capa superficial, ya que el fenol formado se ubicará en el fondo; para seguir neutralizando se hicieron dos lavados más con 250 mL de Tris Base **0.1 M con 30' de agitación.**

***Tris Base 0.5 M:** 30.285g de Tris base y 400 mL de H₂O estéril

***Tris Base 0.1 M:** 100 mL Tris Base 0.5 M y 400 mL de H₂O estéril

Tabla N° 02. Oligonucleótidos utilizados para el estudio molecular de las cepas *Acinetobacter baumannii complex* aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

Oligonucleótido	Secuencia	Bases del DNA
ERIC 1R	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA - 3'	21 bases
ERIC 2	5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGAGCG - 3	24 bases
REP 1R-I	5'- IIIICGICGICATCIGGC - 3'	11 bases
REP 2-I	5'- ICGICTTATCIGGCCTAC - 3'	15 bases

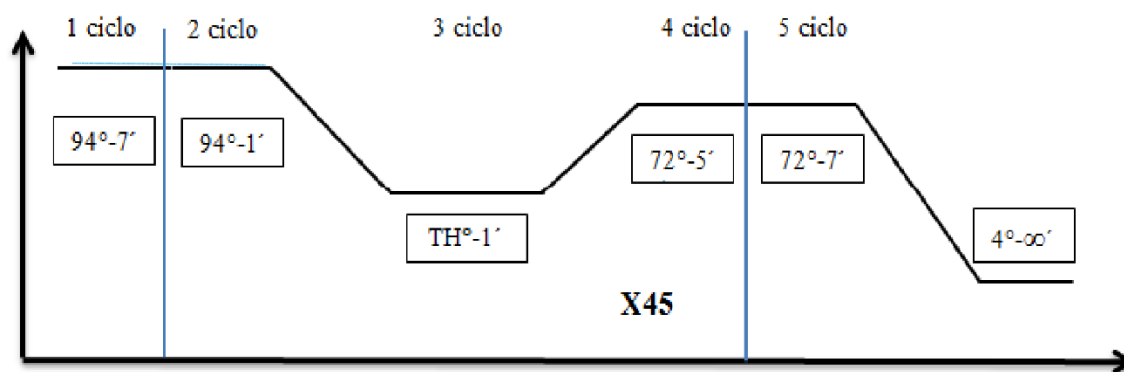
Fuente: Hoja de especificaciones según Integrated DNA Technologies ®; I: representa al nucleósido inosina.

Tabla N° 03. Concentraciones del mix de reacción para ERIC-PCR y REP-PCR para volumen final de 12.5 µL

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final
PCR Master Mix 2x	2 X	1 X	6.25 µL
Taq	50 U/ mL	0.625 U	
Dntps	400 µM	200 µM	

MgCl ₂	3 mM	1.5 mM	
Primer F	10 µM	1 µM	1.25 µL
Primer R	10 µM	1 µM	1.25 µL
DNA	-----	-----	2 µL
Taq Pol	50 U/ mL	0.375 U	0.75 µL
MgCl ₂	25 mM	1 mM	1 µL
Volumen final	-----	-----	12.5 µL

Tabla N° 04. Las condiciones termodinámicas de PCR programadas en el termociclador Eppendorf



TH°: Temperatura de hibridación, 41.2°C para ERIC-PCR y 40.3°C para REP-PCR; X45: Cantidad de 45 ciclos

Tabla N° 05. Preparación de reactivos para la corrida electroforética de las cepas *Acinetobacter baumannii* complex aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

MEDIO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN FINAL	CANTIDADES
-------	---------------------	---------------	------------

Gel de Agarosa 1%	1%	35 mL	Agarosa 0.3 g Buffer TAE 1X 30 mL Agua destilada 5 mL
Gel de Agarosa 2%	2%	85 mL	Agarosa 1.6 g Buffer TAE 1X 80 mL Agua destilada 5 mL
Buffer TAE 1X	1X	100 mL	Buffer TAE 10X 10 mL Agua bidestilada 90 mL

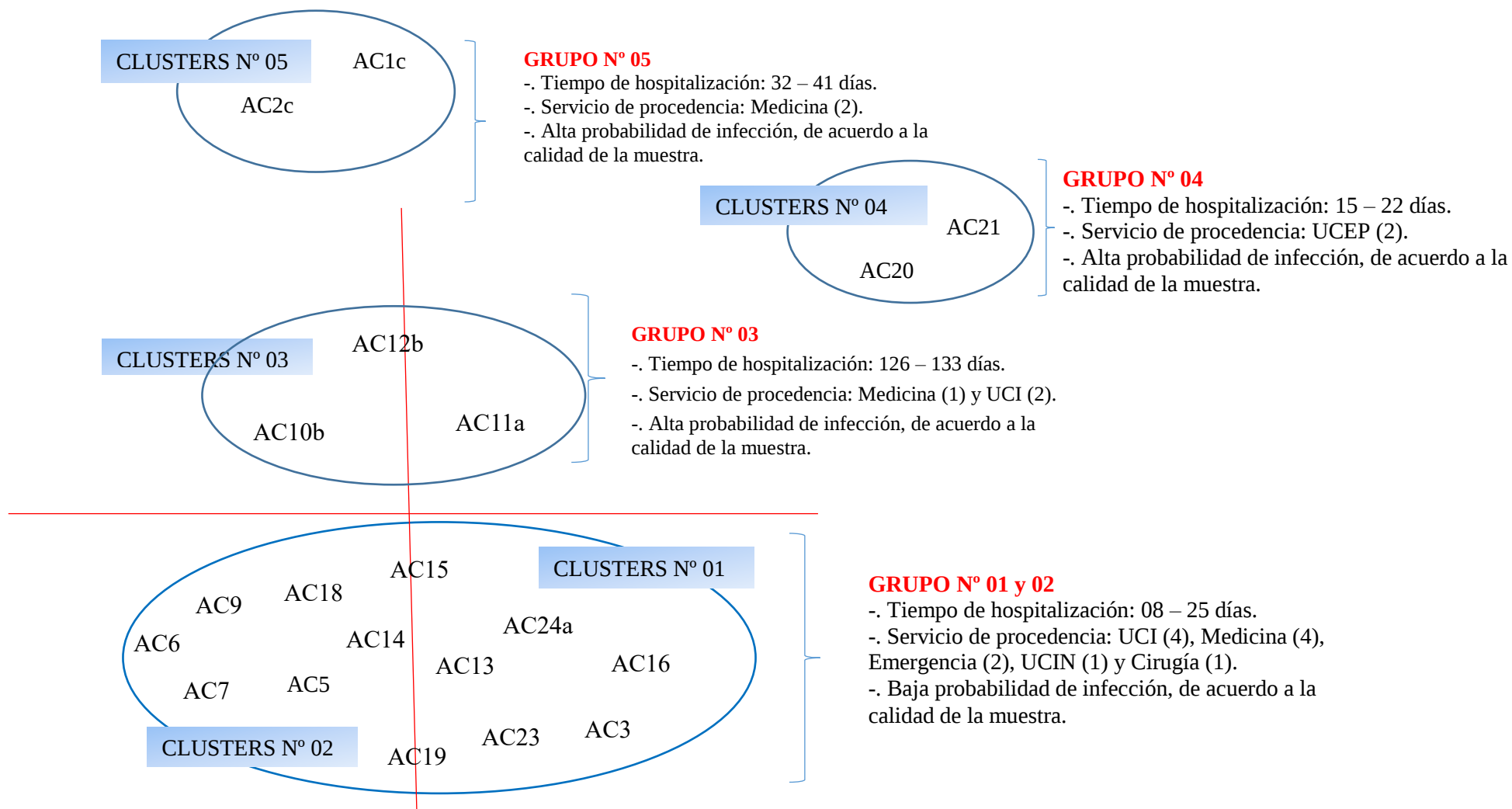
* Buffer TAE 10X: El buffer se almacena a una concentración 10X, en la cual no precipitan los solutos. Las cantidades para preparar 1 litro de Buffer TAE 10X fueron: 48.4 g de tris base (hidroximetilaminometano), 11.4 mL de ácido acético glacial, 3.7 g ó 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y agua bidestilada.

Tabla N° 6. Características clínico epidemiológicas de los pacientes.

Aislamiento	Tipo de muestra	Fecha de ingreso al nosocomio	Servicio de ingreso al nosocomio	Fecha de toma de muestra	Servicio en toma de muestra	Enfermedad de base	Proceso invasivo	Categorías P.R	Reacción inflamatoria	Calidad de la muestra
AC 13	Sec. Bronq.	27/09/2015	EME	09/10/2015	UCI	Infectado	V.M	MDR	Negativa	Mala
AC 23	Orina	07/09/2015	EME	17/09/2015	Med	Infectado	V.M	XDR	Positiva	Regular
AC 24	Orina	09/09/2015	EME	21/09/2015	Med	Infectado	Laparatomía explorativa	MDR	Positiva	Buena
AC 16	Sec. Bronq.	03/10/2015	EME	09/10/2015	Eme	Infectado / Enf. Cerebro vascular	V.M	XDR	Positiva	Buena
AC 19	Sec. Bronq.	04/10/2015	EME	12/10/2015	UCI	Infectado	V.M	XDR	Positiva	Regular
AC 14	Sec. Bronq.	01/10/2015	EME	05/10/2015	Eme	Otras patologías	V.M	XDR	Positiva	Regular
AC 18	Sec. Bronq.	04/10/2015	EME	12/10/2015	Med	Infectado	V.M	XDR	Negativa	Mala
AC 3	Sec. Bronq.	03/07/2015	EME	09/07/2015	UCI	Infectado	V.M	MDR	Positiva	Buena
AC 15	Sec. Bronq.	08/09/2015	EME	03/10/2015	UCIN	Infectado	V.M	XDR	Positiva	Regular
AC 2	LCR	18/09/2015	EME	20/10/2015	Med	Traumatizado	V.M	XDR	Positiva	Buena
AC 1	LCR	18/09/2015	EME	29/10/2015	Med	Traumatizado	V.M	XDR	Positiva	Buena
AC 21	Sec. Bronq.	04/10/2015	EME	26/10/2015	UCEP	Infectado/Otras patologías	V.M	XDR	Positiva	Regular
AC 20	Sec. Bronq.	01/10/2015	EME	16/10/2015	UCEP	Infectado / Otras patologías	V.M	XDR	Positiva	Buena
AC 10	Sec. Bronq.	15/05/2015	EME	21/09/2015	UCI	Traumatizado	V.M	MDR	Positiva	Buena
AC 12	H. faríngeo	15/05/2015	EME	25/09/2015	UCI	Traumatizado	V.M	MDR	Negativa	Mala
AC 11	Sec. Bronq.	09/09/2015	EME	21/09/2015	Med	Infectado	Laparatomía explorativa	XDR	Negativa	Mala
AC 17	Sec. Bronq.	01/10/2015	UCI	11/10/2015	UCIN	Traumatizado	V.M	XDR	Negativa	Mala
AC 4	Sec. Bronq.	01/07/2015	EME	13/07/2015	Med	Infectado / Traumatizado	V.M	MDR	Negativa	Mala
AC 22	Sec. Herida	23/10/2015	EME	08/11/2015	Med	Infectado	V.M	XDR	Negativa	Mala
AC 8	Sec. Bronq.	10/08/2015	EME	13/09/2015	Eme	Infectado	V.M	MDR	Negativa	Mala
AC 5	Sec. Bronq.	04/07/2015	EME	17/07/2015	Eme	Infectado / Enf. Cerebro vascular	V.M	MDR	Negativa	Mala
AC 7	Punta de C.V.C	28/08/2015	EME	09/09/2015	Cirugía	Infectado	V.M	XDR	Negativa	Mala
AC 6	Sec. Bronq.	12/07/2015	EME	18/07/2015	Med	Traumatizado	V.M	MDR	Positiva	Regular
AC 9	Sec. Bronq.	10/05/2015	EME	13/09/2015	UCI	Traumatizado	V.M	MDR	Negativa	Mala

Fuente: Patrón de clonalidad por REP y ERIC – PCR en cepas de *Acinetobacter baumannii* complex aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

Tabla N° 7. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA MULTIPLEX (Que comparten más de 3 características).



Fuente: Patrón de clonalidad por REP y ERIC – PCR en cepas de *Acinetobacter baumannii* complex aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

COMENTARIO: La tabla N° 7.

Los pacientes que albergaban las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* presentaron características clínicas las cuales fueron organizadas y analizadas en un cuadro de correspondencia multiplex. En este los 5 clústers hallados mediante técnicas ERIC Y REP PCR fueron organizados de acuerdo al número de días de estancias hospitalarias, al servicio de procedencia.

De los 5 clústers el número 1 y 2 compartieron nicho ecológico, estancia hospitalaria cercana, la probabilidad de infección es baja, de acuerdo a la calidad de la muestra, al mismo tiempo los servicios relacionados son: UCI, Medicina, Emergencia, UCIN y Cirugía.

En el clústers 3 el tiempo de hospitalización fue mucho más prolongado, los servicios vinculados son: Medicina y UCI, la probabilidad es alta de infección, por la calidad de muestra.

El clústers 4 presentan una estancia hospitalaria corta, el servicio es UCEP y la alta calidad de la muestra que representa es buena.

El clústers 5 presenta una hospitalización reducida, el servicio de Medicina y la alta probabilidad de infección, por la calidad de la muestra.

X. DISCUSIÓN

Acinetobacter baumannii complex es una bacteria de gran importancia clínica, y es la que produce el mayor incremento de mortalidad en el desarrollo de infecciones intrahospitalarias, Vanegas Et al 2014(24). La epidemiología molecular, cuenta con implementación de técnicas, para los diversos estudios epidemiológicos. En este trabajo empleamos métodos de REP – ERIC PCR; para determinar la relación clonal, de los microorganismos aislados. A si mismo estas técnicas son empleadas debido a su elevada reproducibilidad, sencillez y bajo costo, fáciles de realizar, lo cual las coloca como unas técnicas ideales para este tipo de trabajo Vílchez Et al 2009(28).

El empleo de ambos marcadores permite incrementar la especificidad y sensibilidad de la técnica y un mejor análisis del dendograma. Además si ha este se le suma la detección de genes de resistencia se convierte en una gran herramienta para caracterizar cepas multiresistentes tal y como lo reporta Rakotonirina Et al 2013(38).

Los estudios de clonalidad permiten detectar la propagación de clones epidémicos, esto es importante para el estudio de infecciones intrahospitalarias donde se sospecha de transmisión cruzada por parte del personal asistencial o entre los pacientes hospitalizados. De esta manera autores como Reem Aljidam Et al. 2018(39) reportan que el incremento de incidencia de *Acinetobacter baumannii complex* en su nosocomio se debió a la propagación de 7 clones epidémicos, caso similar es reportado por Gulfem Et al 2015(40) quienes también hallaron 7 grupos clonales en áreas críticas. Los 5 grupos clonales en este estudio nos revelan que el Hospital Regional Lambayeque sufrió la presencia de microbrotes durante el periodo de estudio.

Los clusters son un conjunto de genes que permiten revelar patrones similares en aislamientos lo que les permite identificarse como clones. Estos, al ser hallados en un lugar específico (tal como un servicio hospitalario) son responsables de brotes o microbrotes dependiendo del número de clones involucrados. En este sentido estudios como los de Gulfem Et al 2015(40) describen la presencia de agrupamientos en el área de UCI. En el presente estudio el dendograma nos revela que los grupos más grandes correspondientes a los clústers 1 y 5 estuvieron conformados por clones procedentes de diferentes servicios del

Hospital Regional Lambayeque tales como Emergencia, UCI, UCIN, UCEP, Medicina, y Cirugía. El hecho de encontrar 2 agrupamientos con tan variada procedencia nos indica dos probables escenarios: El primero que se trate de una cepa ampliamente diseminada en todos los servicios y que sea la responsable de los microbrotes. En el segundo, puede tratarse de una cepa bien establecida en el hospital de origen endémico. En ambos casos sería necesario un número mayor de aislamientos para confirmar estas teorías

En el presente estudio la muestra estuvo constituida por secreciones procedentes del aparato bronquial. La calidad de la muestra es un factor crítico para discriminar entre un colonización y una verdadera infección la guía de las Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) del año 2008 estipula que una buena muestra debería contener menos de 10 células epiteliales y un número mayor a 25 leucocitos por campos de 1.000 aumentos, Meseguer Et al 2008(41).

En el estudio se empleó este criterio para clasificar a las muestras y determinar la presencia de colonización o infección. En base a ello se hallaron que dentro de los agrupamientos más importantes; el clústers 1 estuvo conformado por cepas procedentes en su mayoría de casos de probables infección, mientras que el clústers 5 estuvo conformado por cepas de colonización. Como se evidencia es difícil determinar infección o colonización con herramientas fenotípicas por ello en la actualidad se emplean mucho las características clínico epidemiológicas que presentan los pacientes en la determinación de un proceso infeccioso como tal.

Todos los aislamientos obtenidos en el presente estudio se caracterizaron por presentar múltiple resistencia, a múltiples antibióticos siendo estos extremadamente resistentes, como XDR (resistentes a uno o más agentes antimicrobianos clave. Que para el caso del presente estudio fueron los Carbapenémicos) y MDR (resistentes a tres o más clases de antimicrobianos) teniendo como referencia a Magiorakos Et al 2012(42)

La mayoría de estas bacterias son resistentes a Carbapenémicos, la bacteriemia y la neumonía asociada al ventilador causada por XDR *Acinetobacter baumannii complex* se encuentra asociada en tasas de mortalidad superiores al 50%. En general, aproximadamente

75,000 casos de infecciones XDR *Acinetobacter baumannii complex* ocurren anualmente en el mundo, resultando en 30.000 muertes, Brad Spellberg Et al 2015(43)

XI. CONCLUSIONES

Por lo expuesto los aislamientos *Acinetobacter baumannii complex* XDR en los distintos servicios del hospital Regional Lambayeque así como su relación clonal ponen en evidencia la preocupante exposición de las distintas áreas de este nosocomio a este tipo de microorganismo. Así mismo determinó que no existe presencia de un solo clon si no varios clones los cuales se comportan como microbrotes. Esto revela en evidencia el papel que juegan las infecciones/colonizaciones por *Acinetobacter baumannii complex* en el ámbito nosocomial.

En la tabla N° 7, muestra cómo se han agrupado los clones. Este análisis de correspondencia múltiple agrupa variables con más de tres características, lo cual se evidencia que las cepas de *Acinetobacter baumannii complex* se encuentran diseminadas por diferentes servicio y al mismo tiempo ayuda a discernir, cuando se está frente a una infección/colonización.

XII. RECOMENDACIONES

- Realizar el trabajo a un número mayor de cepas para obtener resultados más representativos.
- Realizar estudios de clonalidad por REP y ERIC PCR en más servicios de un hospital donde exista más evidencia de infecciones intrahospitalarias
- Determinar no solo la clonalidad si no el tipo de clon que circula mediante técnicas de secuenciamiento con el objetivo de buscar la probable presencia de clones internacionales.
- Incluir en estudios de clonalidad solo en cepas de *Acinetobacter baumannii* complex; si no otro microorganismo de importancia clínica tales como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, etc.
- Determinar los patrones de resistencia a nivel genético con el fin de no solo determinar la clonalidad de los microorganismos si no también los genes de resistencia que estos albergan.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vecchiola H M. Infecciones por *Acinetobacter*. Rev Chil infectología [Internet]. 2008;25(5):397–9. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000500016&lng=es&nrm=iso&tlng=es
2. Andriamanantena TS, Ratsima E, Rakotonirina HC, Randrianirina F, Ramparany L, Carod J-F, et al. Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]. 2010;9:17. Available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/9/1/17>
3. Giannouli M, Antunes LCS, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. BMC Infect Dis [Internet]. 2013;13(1):282. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3691691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. y Microbiología Clínica. 2013;31(Supl 4):3–11.
5. Ece G, Erac B, Cetin HY, Ece C, Baysak A. Antimicrobial susceptibility and clonal relation between *Acinetobacter baumannii* strains at a tertiary care center in Turkey. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(2).
6. Martins HSI, Bomfim MRQ, França RO, Farias LM, Carvalho MAR, Serufo JC, et al. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(2):1465–78.
7. Pasanen T, Koskela S, Mero S, Tarkka E, Tissari P, Vaara M, et al. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. PLoS One. 2014;9(1).
8. Ying C, Li Y, Wang Y, Zheng B, Yang C. Investigation of the molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients and environmental contamination. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. 2015;68(9):562–7. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed13&AN=2015417004%5Cnhttp://sfx.ucl.ac.uk/sfx_local?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:10.1038/ja.2015.30&issn=0021-8820&isbn=&volume=68&issue=9&spage=562&pages=562-567&date=2015&title=J
9. Higgins PG, Hujer AM, Hujer KM, Bonomo R a, Seifert H. Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates. J Med Microbiol [Internet]. 2012;61(Pt 1):137–41. Available

from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

10. Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG. Association between β -lactamase-encoding blaOXA-51 variants and diversilab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1900–4.
11. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2017 Feb 28];155(2):105–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250803002316>
12. Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella T-TD, Agasino Ivy C, et al. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 Aug 28];44(8):2921–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16891513>
13. Dettori M, Piana A, Deriu MG, Lo Curto P, Cossu A, Musumeci R, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *New Microbiol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Feb 28];37(2):185–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858645>
14. Zowawi HM, Sartor AL, Sidjabat HE, Balkhy HH, Walsh TR, Johani SM Al, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Gulf Cooperation Council states: Dominance of OXA-23-type producers. Vol. 53, *Journal of Clinical Microbiology*. 2015. 896-903 p.
15. Gulbudak H, Aslan G, Tezcan S, Ersoz G, Ulger M, Otag F, et al. [Investigation of the clonal relationship between nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates by Rep-PCR]. *Mikrobiyol Bul* [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Nov 3];48(2):316–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24819269>
16. Sarı B, Baran I, Alaçam S, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Aksu N. [Investigation of oxacillinase genes in nosocomial multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates by multiplex PCR and evaluation of their clonal relationship with Rep-PCR]. *Mikrobiyol Bul* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Nov 4];49(2):249–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26167825>
17. Shirmohammadlou N, Zeighami H, Haghi F, Kashefieh M. Resistance pattern and distribution of carbapenemase and antiseptic resistance genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *J Med Microbiol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2018 Nov 4];67(10):1467–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30175954>
18. Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Nasr Esfahani B, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter*

infections. [cited 2018 Nov 4]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664838/pdf/12199_2017_Article_653.pdf

19. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal Diversity of Nosocomial Epidemic *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated in Spain. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 [cited 2018 Nov 3];49(3):875–82. Available from: www.ub.edu/dnasp/
20. Ramazanzadeh R, Zamani S, Zamani S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals [Internet]. [cited 2018 Nov 4]. Available from: <http://ijm.tums.ac.ir>
21. S. D'Arezzo¹, A. Capone¹, N. Petrosillo¹ and P. Visca^{1,2} on behalf of G. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2009 [cited 2018 Nov 4];15:347–357. Available from: https://ac.els-cdn.com/S1198743X14603967/1-s2.0-S1198743X14603967-main.pdf?_tid=5be1ebfd-b8a6-4e3c-8fc2-6fc3ecbea8d1&acdnat=1541311486_b6891ed77673ee01dd10ee964763688c
22. Humberto L, Montoya P, Margoth I, Villarroel Z, Rojas NP, Cabrera NP, et al. Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención.
23. Salazar Cuba V. Infecciones intrahospitalarias. *Rev la Soc Boliv Pediatría*. 2012;51(3):187–90.
24. VANEGAS-MÚNERA JM, RONCANCIO-VILLAMIL G, JIMÉNEZ-QUICENO JN. *Acinetobacter baumannii*: Clinical importance, resistance mechanisms and diagnosis. *CES Med*. 2014;28(2):233–46.
25. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev Otorrinolaringol y cirugía cabeza y cuello* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Feb 28];69(2):185–92. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162009000200014&lng=en&nrm=iso&tlng=en
26. Dario Rodriguez Buenahora R, Enrique Bustillo Zarate D, Carolina Caicedo Sanchez D, Cristina Cadena Sarmiento D, Castellanos Gomez C, Colombia S. Infectología Revisión de Tema *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente.
27. Ángeles Marcos M. ACINETOBACTER BAUMANII [Internet]. [cited 2018 Nov 23]. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/acinetobacter.pdf>
28. Vílchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos Scope and limitations of molecular methods applied to epidemiological studies. *Rev la Soc Venez Microbiol*. 2009;29(1):6–12.

29. Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. *Rev Peru Epidemiol* ISSN-e 1609-7211, Vol 15, N° 1 (Abril), 2011. 2011;15(1):1.
30. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2004 [cited 2016 Sep 1];22:355–60. Available from: file:///C:/Users/Darwin/Downloads/S0213005X04731080_S300_es.pdf
31. Peña YA, Pérez ALS, García RD. Contribuciones de la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa a la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba. *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2014;13(6).
32. Chalbaud A, Redondo C, Fernandez S, Pino Guillermina Alonso ZY. Genotipificación bacteriana y Epidemiología Molecular de las infecciones bacterianas. *Memorias del Inst Biol Exp*. 2012;6:41–4.
33. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2004 Jan [cited 2017 Feb 28];22(6):355–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X04731080>
34. Zuñiga A, Chávez M V, Gómez bSc R, Cabrera Cristina, Corral R, López Bertha. Relación entre virulencia y resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii*. 2010;8(14):121–240.
35. Sacsquispe R, Ventura G. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. 2005;109.
36. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. [cited 2018 May 25];19(24):6823–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC329316/pdf/nar00104-0140.pdf>
37. Julio A, Wong AC. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. 2009 [cited 2018 Jun 18]; Available from: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/244/Chia_wj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
38. Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. [cited 2018 Feb 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3639105/pdf/1471-2180-13-85.pdf>
39. Aljindan R, Alsamman K, Elhadi N. ERIC-PCR genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens. *Saudi J Med Med Sci* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jan 11];6(1):13. Available from: <http://www.sjmmms.net/text.asp?2018/6/1/13/220794>

40. Ece G, Erac B, Cetin HY, Ece C, Baysak A. Antimicrobial susceptibility and clonal relation between *Acinetobacter baumannii* strains at a tertiary care center in Turkey. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2015 Feb [cited 2018 Jan 10];8(2):e15612. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825641>
41. Meseguer MA, Cacho JB, Oliver A, De La Bellacasa JP. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(7):430–6.
42. Magiorakos AP, 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]. 2012;18(3):268–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
43. Spellberg B, Bonomo RA. Combination Therapy for Extreme Drug Resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii*: Ready for Prime-Time? [cited 2018 May 25]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620434/pdf/nihms-671747.pdf>

XIV. ANEXOS

Anexo N° 01: La ficha de recolección de datos es la Dirección General de Epidemiología

ESTUDIO DE PREVALENCIA DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS FICHA DE REGISTRO DE DATOS DEL PACIENTE

N° FICHA: _____

I.- DATOS GENERALES:

1.1 DETERMINAR EL ESTABLECIMIENTO DE SALUD: _____

FECHA: _____

1.2 SERVICIO DE HOSPITALIZACIÓN: _____

II.- DATOS DEL PACIENTE:

2.1.- NÚMERO DE HISTORIA CLÍNICA: _____

EDAD: _____

2.2.- FECHA DE INGRESO DEL PACIENTE: _____

SEXO: _____

III.- PROCEDIMIENTO INVASIVO E INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

3.1.- PROCEDIMIENTO INVASIVO N° 1: _____

FECHA:

3.2.- PROCEDIMIENTO INVASIVO N° 2: _____

FECHA:

3.3.- PROCEDIMIENTO INVASIVO N° 3: _____

FECHA:

3.4.- TIPO DE INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA: _____

IV.- DIAGNÓSTICO MÉDICO PRINCIPAL: _____

4.1.- OTROS DIAGNÓSTICOS:

4.2.- _____

4.3.- _____

V.- ANTIMICROBIANOS

5.1.- EL PACIENTE TIENE PRESCRIPCIÓN DE ANTIMICROBIANOS

SI ☐ NO ☐

5.2.- ANTIMICROBIANO (NOMBRE GENÉRICO) VÍA DE ADM.

FIVIO DE USO

VI.- INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA (IIH)

6.1.- EL PACIENTE PRESENTA IIH: _____

6.2.- TIPO DE IIH: _____

6.3.- DISPOSITIVO O PROCEDIMIENTO ASOCIADO A IIH: _____

6.4.- TIPO DE CULTIVO: _____

6.5.- GERMEN AISLADO: _____

6.6.- GERMEN ASOCIADO: _____

6.7.- RESISTENCIA ANTIMICROBIANA:

SENSIBLE	MULTIRESISTENTE (MDR)	RESISTENCIA EXTENSA (XDR)	PANRESISTENTE (PDR)

Anexo N° 02 – Extracción de ADN genómico bacteriano, según el manual de Current Protocols in Molecular Biology

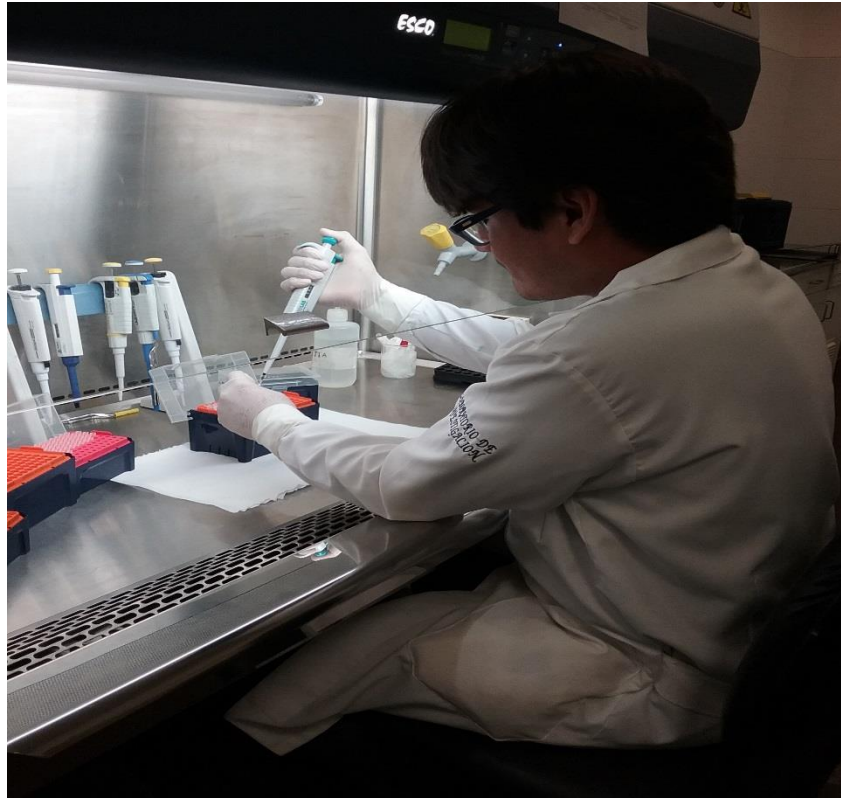
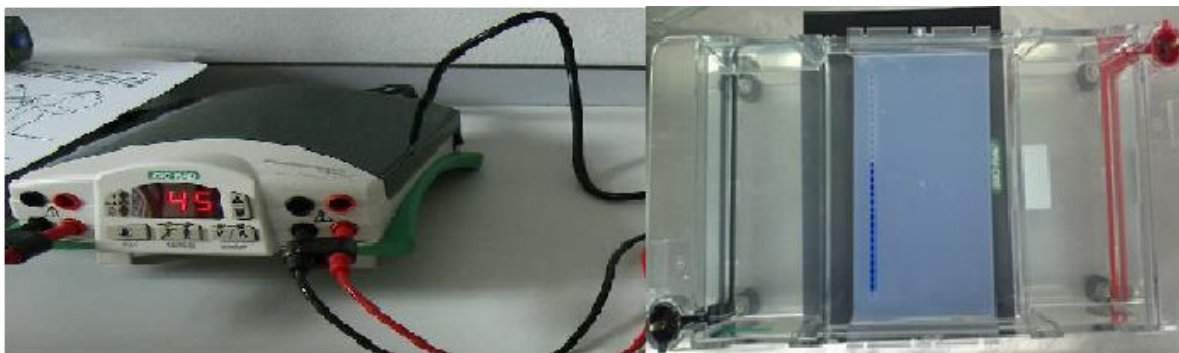


Foto N° 03. Corrida electroforética de las cepas.

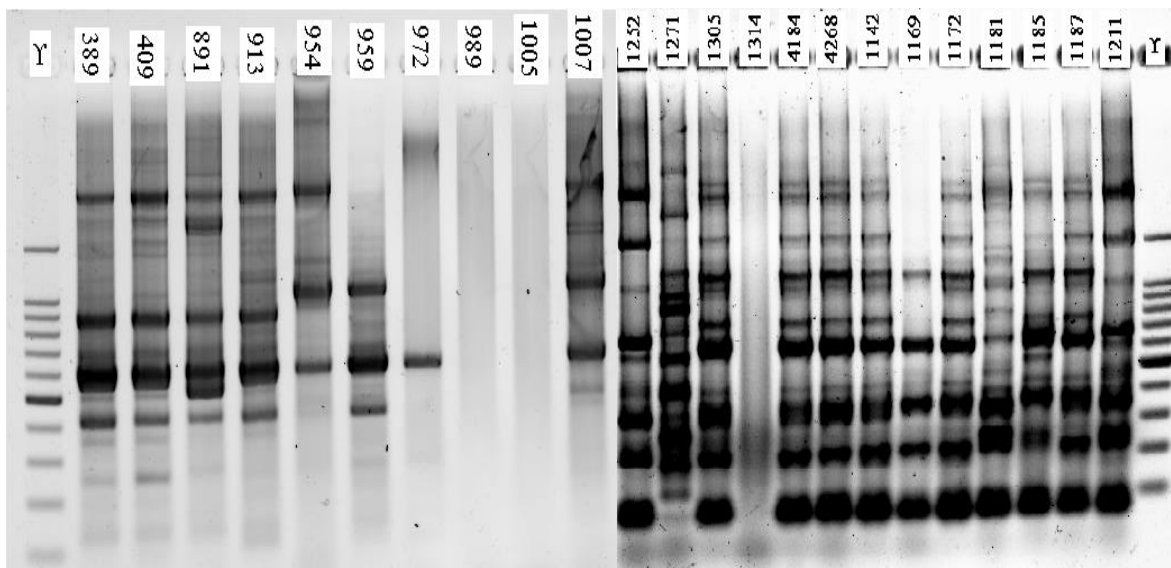


Cámara de corrida electroforética de la marca BIORAD

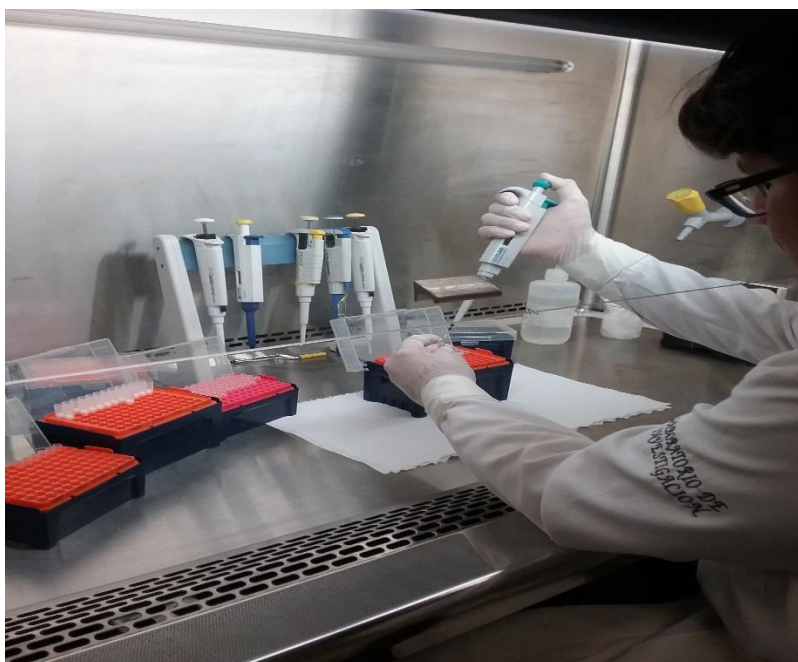
Anexo N° 04. Tinción del gel con bromuro de etidio de las cepas



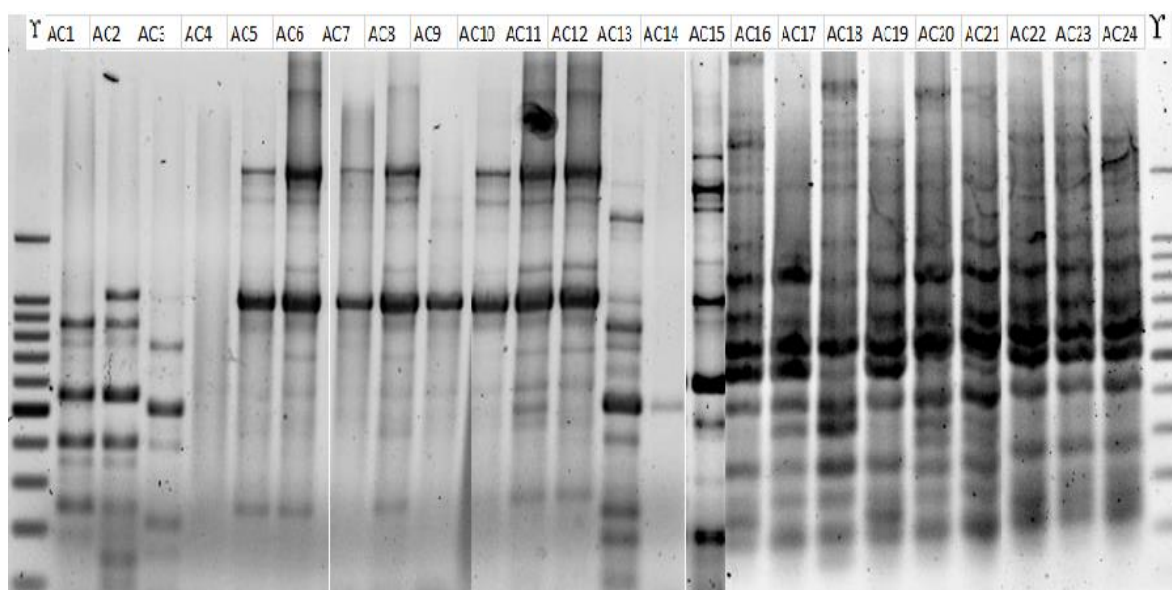
Anexo N° 05. Electroforesis de ADN genómico en gel de Agarosa al 2%.



Anexo N° 06. Preparación del mix de reacción con ERIC – REP PCR para cepas *Acinetobacter baumannii* complex aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015.

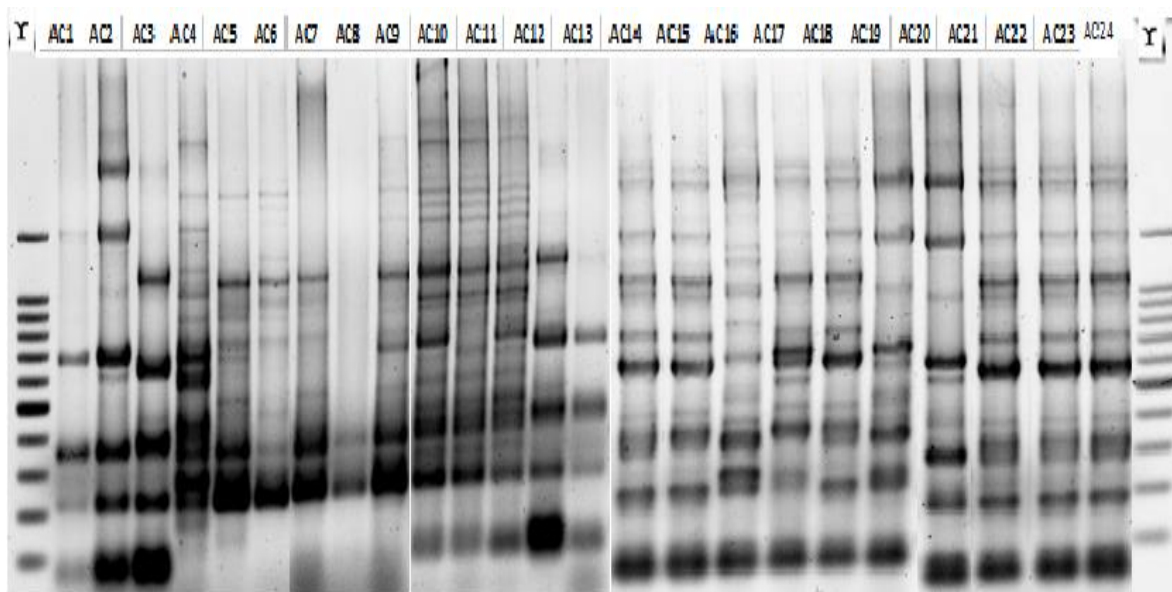


Anexo N° 07. REP – PCR



Corrida electroforética con buffer TAE 1X en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción en solución de bromuro de etidio, fotografiado con el escáner molecular PHAROX FX Plus. □: Marcador de peso Molecular, AC1 a AC24: Patrones clonales.

Anexo N° 08. ERIC – PCR:



Corrida electroforética con buffer TAE 1X en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción en solución de bromuro de etidio, fotografiado con el escáner molecular PHAROX FX Plus. □: Marcador de peso Molecular, AC1 a AC24: Patrones clonales.

Anexo N° 9: MATRIZ BINARIAS DE LAS 24 CEPAS DE *Acinetobacter baumannii*
complex

	1110	1305	4184	1142	4268	1172	1187	1185	1131	891	1252	1211	409	389	1005	959	954	1007	989	1061	1096	1062	1181	913
4.06E3pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
3454pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
2515pb-eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
2313pb-eric/2317pb rep	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
2189pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2096pb-eric	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1933pb-eric/1996pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1892pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1767pb-eric/1785pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1686pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1603pb-eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
1508pb rep	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
1430pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
1421pb-eric	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
1280pb-eric/1267pb rep	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
1085pb-eric/1153pb rep	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
994pb-eric	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
874.70pb-eric/877.89pb rep	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
886.19pb-eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
800.03pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
789.10pb-eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
774.52pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
717.82pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
707.68pb-eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
659.33pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
639.98pb-eric/605.03pb rep	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
578.00pb-eric/553.08pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
538.53pb-eric		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
498.75pb eric	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
471.48pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
447.77pb eric	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
420.95pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
412.62pb rep	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
396.98pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
379.49pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
368.85pb eric	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1		0		0	0
350.98pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
326.21pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
315.31pb/329.54 pb re	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
296.97pb/295.87pb re	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
284.11pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
277.68pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
258.30pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
238.37pb rep	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
237.48pb/190.41pb re	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
213.87pb eric	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
202.33pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
181.77pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
177.89pb rep	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
160.12pb/159.17 pb re	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
144.39pb eric	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
138.84pb rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
133.25pb/131.06pb re	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
115.86pb eric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo N° 10: CLUSTERS Y SUBCLUSTERS CON SUS CORRESPONDIENTES GENOTIPOS.

