

DISEÑO DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA EL DIAGNÓSTICO DE CARBAPENEMASAS EN *Acinetobacter* spp.

E. Albornoz, M.A. Menocal, B. Sanz, F. Martino, J. M. de Mendieta, M. Echegorry, M. Rapoport, A. Corso, D. Faccone.

INTRODUCCION: El complejo *A. baumannii* (Aba) se considera uno de los principales patógenos causante de infecciones asociadas al cuidado de la salud, con alto nivel de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos y escasas opciones de tratamiento. En Argentina, la resistencia a carbapenemes en Aba supera el 85% desde el 2010, fundamentalmente por adquisición o hiperproducción de carbapenemasas (CBP) de clase D típicas de este género. En 2014 emergen en nuestro medio los primeros aislamientos de Aba portadores de metalo- β -lactamasa tipo NDM.

OBJETIVO: Diseñar una PCR múltiple de tiempo final para detectar en simultáneo *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{NDM}, las CBP adquiridas más frecuentes en *Acinetobacter* spp. (ACI), y *bla*_{OXA-51}, la betalactamasa propia de especie de Aba.

MATERIALES Y METODOS: Se utilizaron 98 aislamientos clínicos de ACI resistentes a carbapenemes: 82 Aba, 3 *A. bereziniae*, 3 *A. junii*, 2 *A. nosocomialis*, 2 *A. pittii*, 2 *A. haemolyticus*, 1 *A. indicus*, 1 *A. johnsonii*, 1 *A. lwoffii* y 1 *A. ursingii*, procedentes del repositorio de nuestro laboratorio, previamente caracterizados por PCR convencional para *bla*_{OXA-23} (n=65), *bla*_{OXA-58} (n=16), *bla*_{NDM} (n=22), *bla*_{OXA-51} (n=82), *bla*_{IMP} (n=1) y/o WGS, e identificados por MALDI-TOF MS. El extracto de ADN se obtuvo por calentamiento (10 min. a 100°C) de una suspensión de colonias en agua bidestilada y posterior centrifugación a 12000 G por 5 min. Los cebadores utilizados fueron: O23x-F (5'-ACGCCTATTCAAGAGGTAGAG), O23x-R (5'-GTATAGATGCCGGCATTCTGA), O58-F (5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG), O58-R (5'-TACGACGTGCCAATTCTTGA), NDM-F (5'-AGCACACTTCTATCTCGAC), NDM-R (5'-GGCGTAGTGCTCAGTGTC), O51x-F (5'-GAGGCACAGTTTGCTTACAAGC), O51x-R (5'-GCTGAACAACCCATCCAGTT). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L, en diferentes condiciones, modificando la temperatura de pegado de cebadores y concentraciones de cebadores. Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio. Los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger.

RESULTADOS: Las condiciones óptimas para la reacción fueron: 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH: 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,04 U/ μ L Taq-DNA polimerasa, 0,2 μ M de cada cebador. Se utilizaron 2,5 μ L del extracto de ADN como templado. Condiciones de ciclado: 5' a 95°C, 35 ciclos de 30'' a 95°C, 30'' a 52°C y 30'' a 72°C, con un paso final de 10' a 72°C. En 97 aislamientos se obtuvo amplificación que correspondió con los tamaños esperados (65/65 *bla*_{OXA-23}, 16/16 *bla*_{OXA-58}, 22/22 *bla*_{NDM}, 82/82 *bla*_{OXA-51}). Un aislamiento de *A. bereziniae* portador de *bla*_{IMP} resultó negativo. Se obtuvo 100% de sensibilidad y especificidad.

CONCLUSIONES: La PCR múltiple permitió detectar en simultáneo *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-51} en aislamientos clínicos de ACI. Esta PCR múltiple permitirá a los laboratorios clínicos la caracterización de las CBP prevalentes en ACI de Argentina, lo que contribuirá al conocimiento de la epidemiología local y al diseño de medidas de prevención y control de las infecciones.