



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Caracterización de plásmidos presentes en cepas bacterianas de *A. baumannii* y *S. maltophilia* con determinantes de resistencia a antibióticos, aisladas del Hospital Clínico Universitario.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Yuliana Guevara Guerra como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología

Tutora: Prof. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE 2009

ÍNDICE	
CONTENIDO	Pág.
I. Índice	i
II. Índice de Tablas y Figuras	iii
III. Índice de Abreviaturas	vii
IV. Resumen	ix
1. Introducción	1
1.1 <i>Acientobacter baumannii</i>	1
1.2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
1.3 Plásmidos	5
1.4 incompatibilidad	7
1.5 Elementos asociados a los plásmidos	8
1.6 transferencia de material genético en bacterias	10
1.6.1 Conjugación	10
1.6.2 Transformación	13
1.6.3 Transducción	14
1.7 Agentes antimicrobianos	14
1.7.1 Resistencia a los antibióticos	15
1.7.2 Mecanismos de acción de antimicrobianos	16
1.7.2.1 β -lactámicos	16
1.7.2.2 Glucopéptidos	17
1.7.2.3 Aminoglucósidos	17
1.7.2.4 Quinolonas	18
1.7.2.5 Tetraciclinas	18
1.8 Factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia a antibióticos	18
2 Antecedentes	22
2.1 Estudio a Nivel Internacional	22
2.2 Estudios a Nivel Nacional	30
3 Justificación	36

4. Objetivos	39
4.1 Objetivo General	39
4.2 Objetivos Específicos	39
5. Plan de Trabajo	40
6. Materiales y Métodos	41
6.1 Material Biológico	41
6.2 Medios de Crecimiento	41
6.3 Determinación Fenotípica	43
6.4 Conjugación bacteriana	45
6.5 Preparación de células competentes	46
6.6 Transformación	46
6.7 Aislamiento de ADN plasmídico	46
6.8 Digestión con enzimas de restricción	47
6.9 Electroforesis en geles de agarosa	48
7 Resultados	49
7.1 Determinación del fenotipo de resistencia a diversos antibióticos	49
7.2 Crecimiento de las cepas	52
7.3 Proceso de Conjugación	56
7.3.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	56
7.3.2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	58
7.4 Aislamiento de ADN plasmídico	58
7.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	59
7.4.2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	62
7.5 Digestión con enzimas de restricción	64
7.5.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	64
7.5.2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	70
8 Discusión	75
9 Conclusiones	91
10 Recomendaciones	92
11 Bibliografía	93

<u>TABLAS</u>	Pág.
Tabla 1. Componentes del Medio de Cultivo Luria-Bertani	42
Tabla 2. Contenido de los filtros con antibióticos empleados en la determinación de los perfiles de resistencia.	44
Tabla 3. Antibióticos empleados en el proceso de conjugación	44
Tabla 4. Perfil de resistencia de las cepas de <i>A. baumannii</i>	49
Tabla 5. Perfil de resistencia de las cepas de <i>S. maltophilia</i>	51
Tabla 6. Control de fenotipo de las cepas donantes (<i>A. baumannii</i>) y de la receptora para los ensayos de conjugación.	53
Tabla 7. Control de fenotipo de las cepas donantes (<i>S. maltophilia</i>) y de la receptora para los ensayos de conjugación.	53
Tabla 8. Crecimiento de las cepas donantes y receptora, empleando lactosa como fuente de carbono y crecimiento en MM.	55

<u>FIGURAS</u>	
Figura 1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
Figura 2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4
Figura 3. Características conferidas por los plásmidos a las bacterias.	7
Figura 4. Transferencia de una molécula plasmídica.	10
Figura 5. Sistemas de Secreción Tipo IV.	11

Figura 6. Esquema representativo de la formación del pilus	12
Figura 7. Proceso de transformación bacteriana.	13
Figura 8. Porcentaje de resistencia a diversos antibióticos de las cepas de <i>A. baumannii</i>	50
Figura 9. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> aisladas de pacientes de la UCI	60
Figura 10. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> aisladas de pacientes de la UCI.	60
Figura 11. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> aisladas del ambiente de la UCI.	61
Figura 12. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> aisladas del Servicio de Neonatología.	62
Figura 13. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídico de las cepas donantes de <i>S. maltophilia</i> aisladas del ambiente de la UCI.	63
Figura 14. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de <i>S. maltophilia</i> aisladas de pacientes de la UCI, y una cepa aislada del servicio de Neonatología (SN1).	63
Figura 15. Registro fotográfico del patrón de restricción con las enzimas EcoRI y BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas de pacientes de la UCI.	64

Figura 16. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas de pacientes de la UCI.	65
Figura 17. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima EcoR1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas de pacientes de la UCI	66
Figura 18. Registro fotográfico del patrón de restricción con las enzimas EcoR1 y BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas del ambiente de la UCI.	67
Figura 19. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas del ambiente de la UCI.	67
Figura 20. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima EcoR1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas del ambiente de la UCI.	68
Figura 21. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas del servicio de Neonatología	69
Figura 22. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima EcoR1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>A. baumannii</i> , aisladas del servicio de Neonatología.	70

Figura 23. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima EcoR1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>S. maltophilia</i> , aisladas del ambiente de la UCI	71
Figura 24. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>S. maltophilia</i> , aisladas del ambiente de la UCI,	72
Figura 25. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima EcoR1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>S. maltophilia</i> , aisladas de pacientes de la UCI, y una cepa aislada del servicio de Neonatología (SN1).	73
Figura 26. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima BamH1 de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de <i>S. maltophilia</i> , aisladas de pacientes de la UCI, y una cepa aislada del servicio de Neonatología (SN1).	74

ABREVIATURAS

A. baumannii: *Acinetobacter baumannii*

ADN: Ácido Dexosirribonucleico

AMP: Ampicilina

AMK: amikacina

BLEE: β-lactamasas de Espectro Extendido

CAZ: Ceftazidima

CIP: Ciprofloxacina

CN: Gentamicina

CRO: Ceftriaxoma

CTX: Cefotaxima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

E. coli: *Escherichia coli*

FEP: Cefepime

gr: Gramos

HUC: Hospital Clínico Universitario

IPM: Imipenen

LB: Medio Luria-Bertani

LBPB: Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos

M: Molar

min: Minutos

mL: Mililitro

mM: Milimolar

Mpf: Complejo de Formación del Par Conjugante

MEM: meropenem

NaOH: Hidróxido de Sodio

LEV: Levofloxacina

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RIF: Rifampicina

SDS: Dodecilsulfato Sódico

SXT: Trimetopin-Sulfametoxazol

TAE: Buffer Tris Acetato, EDTA

TET: Tetraciclina

TOB: Tobramicina

TZP: Tazobactam

T4SS: Sistema de Secreción Tipo IV

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UK: Unidades Klett

μg: Microgramo

μL: Microlitros

°C: Grados centígrados

RESUMEN

Acinetobacter baumannii y *Stenotrophomonas maltophilia* son patógenos emergentes de gran impacto en términos de salud pública, y son la causa de infecciones en la mayoría de los hospitales, especialmente en las áreas de Cuidados Intensivos. Presentan un perfil de resistencia bastante complejo, siendo resistentes a la mayoría de los antibióticos de uso actual. Las bacterias adquieren la capacidad de resistir a la acción de los antibióticos por varios mecanismos, entre los que destacan, como uno de los más importantes, los procesos de intercambio de información genética mediante la conjugación, proceso por el cual, de manera directa, el DNA plasmídico de una bacteria es transferido a otra, y pueden ser movilizados genes que confieran resistencias múltiples. Esta situación ha desencadenado que los Centros de Salud sean centros de selección y reservorio de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos.

En este trabajo nos propusimos analizar los plásmidos presentes en cepas de *A. baumannii* y *S. maltophilia* presentes en el HUC. Se aislaron 26 cepas de *A. baumannii* y 15 cepas de *S. maltophilia*. Mediante el método de difusión en disco se determinó el perfil de resistencia empleando 15 antibióticos de uso clínico actual. Los plásmidos fueron aislados y visualizados en electroforesis. Para determinar si estos plásmidos son capaces de conferir las resistencias a diversos antimicrobianos, se realizaron ensayos de transformación y de conjugación, en medio líquido y en sólido, con diferentes marcadores. También se obtuvo el patrón de restricción de los plásmidos presentes en las cepas en estudio. Nuestros resultados mostraron que las 26 cepas de *A. baumannii* presentaron multirresistencia, entre 12 y 15 de los antibióticos examinados. Los resultados de los ensayos de conjugación, tanto en líquido como en sólido, demostraron que en las condiciones empleadas, ninguna de las cepas en estudio logró transferir información genética a una cepa *E. coli* receptora utilizada. Esta información es relevante para las autoridades de Salud para mejorar el diseño de las medidas a implementar para el control de la dispersión de la multirresistencia.

1.- INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos unicelulares capaces de adaptarse a cualquier ambiente. Se les conoce como causantes de diversas enfermedades infecciosas, principalmente a nivel hospitalario, debido a su capacidad para colonizar diferentes ambientes. A lo largo de los años se ha reportado a nivel mundial, la aparición de infecciones nosocomiales producto de la acción de diversas bacterias. Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias, se definen como aquellas patologías que se presentan entre 48 y 72 horas después que el paciente ha ingresado al centro hospitalario (Alonso y col., 2001). Estas infecciones pueden ser ocasionadas por bacterias que han acumulado determinantes de resistencia, proceso que usualmente ocurre por la presencia de presión selectiva por el uso excesivo de los agentes antimicrobianos. El fenotipo de multiresistencia es usualmente adquirido por un genes, que son transferidos en conjunto y provienen de otro organismo, por medio de elementos extracromosómicos o plásmidos (Redondo y col., 2008).

Entre las bacterias con mayor impacto a nivel hospitalario se encuentran los géneros *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, ambos pertenecientes al filo *Proteobacteria*.

1.1.- *Acinetobacter baumannii*

Las bacterias del género *Acinetobacter* son bacilos o cocobacilos Gram negativos, que pertenece al filo *Proteobacteria*, muchas veces dispuestos en parejas. No fermentan la glucosa, son aerobios estrictos, inmóviles, catalasa

positivos y oxidasa negativos. Crecen bien en todos los medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 33 a 37° C.

Las especies de *Acinetobacter* se consideran en general no patógenas para los individuos sanos. Sin embargo, varias especies persisten en los entornos hospitalarios y causan infecciones graves que ponen en peligro la vida de los pacientes inmunocomprometidos. El espectro de resistencia a los antibióticos de estos organismos, junto con sus capacidades de supervivencia los hacen una amenaza seria para los hospitales. La mayoría de las infecciones ocurren en individuos inmunocomprometidos, sin embargo, cepas de *A. baumannii* puede ser aislada en diferentes muestras humanas.

A. baumannii es un patógeno nosocomial oportunista. Este microorganismo sobrevive en ambientes hospitalarios a pesar de condiciones desfavorables tales como desecación, escasez de nutrientes y tratamientos antimicrobianos. Se presume que su capacidad de persistir en estos ambientes, así como su virulencia, es resultado de su capacidad de formar biopelículas. *A. baumannii* forma biopelículas en superficies abióticas, tales como cristales, así como superficies bióticas, tales como células epiteliales y filamentos fungicidas (Gaddy y Actis, 2009).



Figura 1. *Acinetobacter baumannii*. (Tomado y modificado de: http://www.consumer.es/web/es/salud/problemas_de_salud/2007/01/16/158959.php. 2009)

A. baumannii está frecuentemente asociada a infecciones nosocomiales, especialmente en Unidades de Cuidados Intensivos. Estas infecciones son difíciles de tratar, debido a la habilidad de este patógeno de adquirir resistencia a múltiples antibióticos (Parra y Cabrera, 2005). Entre los mecanismos de resistencia a los antibióticos que usualmente son presentados por este microorganismo tenemos: β -lactamasas, alteraciones de los canales (porinas) de la pared celular y bombas de eflujo. *Acinetobacter baumannii* puede llegar a ser resistente a quinolonas por mutación en los genes *gyrA* y *parC* y a aminoglucósidos expresando enzimas modificadoras. Las β -lactamasas tipo AmpC, son cefalosporinasas cromosomales intrínsecas de todos los *A. baumannii* (Muñoz y Weinstein, 2008).

1.2.- *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia, anteriormente conocida como *Xanthomonas maltophilia* y *Pseudomonas maltophilia*, es una bacilo Gram negativo, no fermentador de la glucosa, reconocido como agente causal de diversas infecciones nosocomiales, y es reconocido por presentar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos (Antón y col., 2005). *S. maltophilia* es conocido como un patógeno nosocomial oportunista de la familia Xantomonadaceae, aislado de muestras provenientes de humanos, animales, alimentos y varias fuentes ambientales.



Figura 2. *Stenotrophomonas maltophilia*. (Tomado y modificado de: <http://genome.jgi-psf.org/stema/stema.home.html>. 2009)

Una característica importante de este patógeno oportunista es el perfil de resistencia a los antibióticos que posee. La mayoría de las cepas de *S. maltophilia* se caracteriza por su resistencia intrínseca a varios agentes antimicrobianos de amplio espectro, incluyendo los β -lactámicos, debido a la producción de betalactamasas inducibles; así como también a otras alternativas de tratamiento como aminoglucósidos y quinolonas (Anton y col., 2005). La resistencia a quinolonas es mediada primordialmente por la sobreexpresión de bombas de eflujo y a los bajos niveles de permeabilidad de la membrana. La resistencia a los aminoglucósidos es producto de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de eflujo y a cambios de las proteínas de membrana (Looney y col., 2009).

Los aislados clínicos de esta bacteria, representan la mayoría de las veces casos de colonización; sin embargo, se describen cuadros graves tales como neumonía en pacientes de UCI con ventilación mecánica y bacteriemias asociadas a catéter venoso central. También puede producir, en forma inhabitual, meningitis, endocarditis, endoftalmitis y un amplio rango de infecciones cutáneas como celulitis y estoma gangrenoso. Se considera un patógeno emergente en pacientes con factores de riesgo como: uso

prolongado de diversos antimicrobianos (incluyendo carbapenémicos y cefalosporinas de última generación), neutropenia, edad avanzada y procedimientos invasores en pacientes de UCI (Juliet y Fernández, 2006).

1.3.- Plásmidos

Los plásmidos son elementos de DNA doble cadena, generalmente circulares. Su replicación depende de las mismas enzimas que replican al cromosoma de la célula hospedadora y de otras proteínas codificadas en el mismo plásmido. Las bacterias tienen la capacidad de portar estos plásmidos, los cuales les permiten colonizar ambientes adversos, donde existen algunos elementos o compuestos que, a ciertos niveles, son tóxicos para la mayoría de los seres humanos (Alonso y col., 2001).

Gran parte de los plásmidos estudiados tienen diferentes capacidades, pero una compartida por muchos de ellos, es la capacidad de poder movilizarse de una célula a otra. Si adicionalmente estos plásmidos presentan determinantes que confieren resistencia a distintos antimicrobianos, la bacteria que contenga dichos plásmidos tendrá un impacto importante sobre el área de salud pública, agravado por la fácil transferencia de estos plásmidos de una bacteria a otra, inclusive traspasando barreras taxonómicas.

Estos y otros determinantes genéticos, en especial los que codifican para propiedades metabólicas ventajosas y las que codifican para resistencia a diversos tóxicos, favorecen la sobrevivencia de las bacterias que los portan en un ambiente adverso o le proporciona una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la misma o diferentes especies que comparten su nicho ecológico. Eventualmente, en ambientes con una alta presión selectiva, estos

determinantes pueden convertirse indispensables para la viabilidad celular (Alonso y col., 2001, 2005a).

Los plásmidos transmisibles pueden ser clasificados en dos grupos: los plásmidos conjugativos, que codifican para toda la maquinaria necesaria para la conjugación, y los movilizables, que contienen un origen de transferencia (*oriT* junto con otros genes *mob*), pero que requieren de presencia de plásmidos conjugativos o autotransferibles para ser movilizados. Los plásmidos también pueden diferir en el rango de hospedadores a los cuales pueden colonizar. Algunos plásmidos poseen rango estrecho de hospedador, que sólo incluye especies muy relacionadas. Otros, por el contrario, pueden existir dentro de una gran variedad de tipos celulares y son entonces llamados promiscuos o de amplio rango de hospedador (Amábile-Cuevas y Chichurel, 1992).

De manera general, los determinantes genéticos codificados en los plásmidos se pueden clasificar en cuatro grupos como son (Figura 3): resistencia; energía y metabolismo; virulencia; patogenicidad y simbiosis, y diseminación y perpetuación (Kado., 1998).

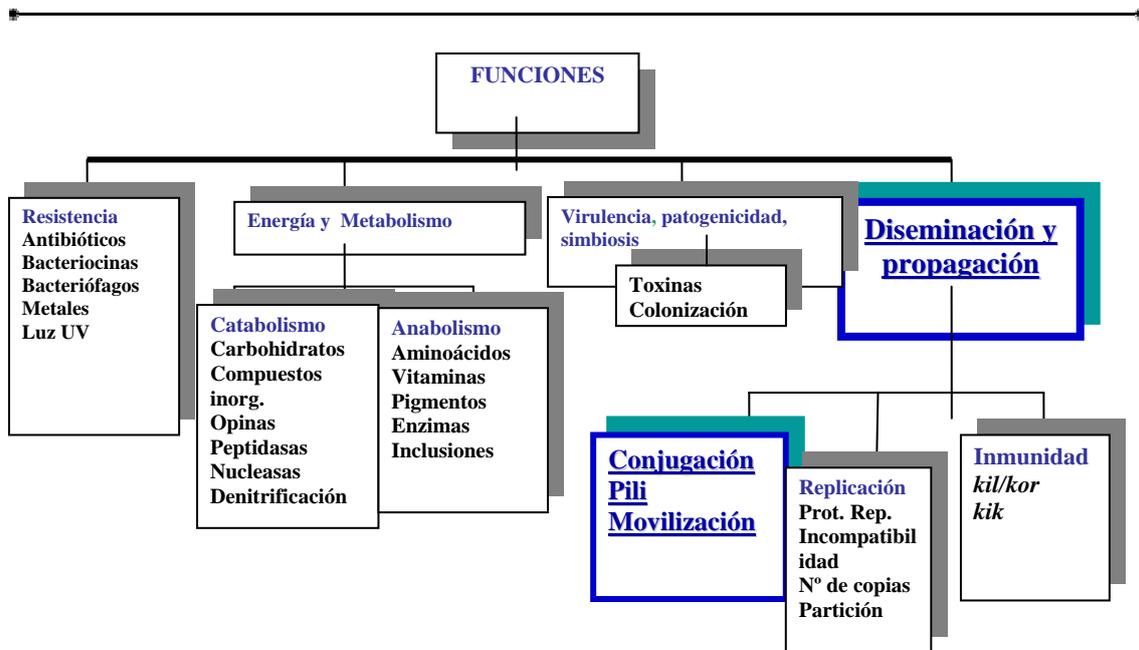


Figura 3. Características conferidas por los plásmidos a las bacterias. Debajo de cada clase se indican las características más relevantes. *kil*: gen de letalidad, *kor*: gen regulador de la letalidad, *kik*: gen letal de *Klebsiella pneumoniae*, *ard*: sistema de antirestricción (Tomado y modificado de Kado, 1998).

1.4.- Incompatibilidad

La estructura del origen de replicación, los determinantes que especifican el número de copias del plásmido, el gen *repA* y el determinante de incompatibilidad, constituyen algunos de los elementos involucrados en mantener y controlar la replicación del plásmido y la incompatibilidad (Couturier y col., 1988). Un fenómeno de importancia considerable en la investigación de los plásmidos, es la incompatibilidad que está controlada por genes codificados en la misma molécula. Los plásmidos clasificados en un mismo grupo de incompatibilidad excluyen a los plásmidos clasificados en el mismo grupo, pero son capaces de coexistir con plásmidos de otros grupos.

Existen datos que sugieren que los plásmidos de un grupo de incompatibilidad se han originado de una fuente ancestral común (Brock y Madigan, 1993). Si dos plásmidos no pueden mantenerse en una misma célula es porque comparten el mismo mecanismo de control de la replicación y, por lo tanto, se dice que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (Vílchez, 2002).

Hasta ahora, se conocen más de 30 grupos de incompatibilidad (Inc) en Enterobacterias. Los plásmidos de un mismo grupo de incompatibilidad están relacionados entre sí, básicamente en sus replicones y en sus sistemas de regulación de la replicación. Así, cuando una bacteria posee diferentes tipos de plásmidos, éstos no deben estar estrechamente relacionados, ya que son compatibles (Atlas, 1997).

Entre las características conferidas por los plásmidos, que están asociadas al grupo de incompatibilidad al cual pertenezca, está el tipo de pilus. Los plásmidos de un mismo grupo de incompatibilidad generalmente codifican para pili serológicamente relacionados y morfológicamente parecidos. Existen tres formas morfológicas de pilus: delgado flexible, grueso flexible y rígido. Los plásmidos representativos de los grupos de incompatibilidad N y P, que codifican para pilus rígido, transfieren mejor por conjugación en superficies sólidas que en medio líquido (Bradley y col., 1980).

1.5.- Elementos asociados a los plásmidos

La gran mayoría de los reportes de transferencia horizontal de genes en el medio ambiente corresponden al proceso de conjugación, la cual puede ser de varios tipos: a) transferencia de plásmidos conjugativos autotransferibles, b)

movilización, por medio de la cual un plásmido no autotransferible, que contiene un *oriT*, puede ser movilizado por la acción de las proteínas Tra de un plásmido conjugativo residente en la misma célula; y c) cointegración, en el cual dos plásmidos circulares diferentes pueden fusionarse para formar uno. Esta cointegración puede ser facilitada por la presencia, en alguno de los plásmidos, o en ambos, de elementos de inserción o transposones. Sin embargo, otros mecanismos de transferencia pueden ocurrir entre bacterias que residen en su nicho ecológico en colonias de multiespecies llamadas biopelículas. Estos agregados pueden constituir los ambientes ideales para aquellos eventos de conjugación que no ocurren bajo condiciones de laboratorio, así como también eventos de transducción y transformación, que anteriormente se pensaba que tenían poca importancia *in vivo* (Guariglia, 2006).

Asociados a los plásmidos y con propiedad de conferir a la bacteria resistencia a los antimicrobianos, también se encuentran los transposones. Estos elementos genéticos se caracterizan por ser secuencias de DNA de doble cadena que pueden ser traslocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema propio de recombinación (Guzmán, 2006). Al traslocarse, pueden también movilizar genes que confieran resistencia a algún agente antimicrobiano.

Otro elemento genético asociado a la resistencia bacteriana es el integrón. Se puede definir como un elemento genético dinámico, que codifica para un mecanismo de recombinación sitio específico y acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón (Alonso y

col., 2005b). Los genes estructurales presentes en los integrones clase 1, son en su mayoría, genes de resistencia a antibióticos.

1.6.- Transferencia de material genético en bacterias

En los seres vivos, la información genética puede transmitirse a la descendencia mediante los procesos de replicación y segregación vertical. En bacterias existe otra forma de transmisión denominada transferencia horizontal, la cual se refiere a la movilización de la información genética de un organismo a otro, y su posterior estabilización. Este intercambio es un proceso bien establecido en procariontes, así como también entre dominios diferentes. Este flujo genético se encuentra generalmente asociado a plásmidos bacterianos que codifican su propio sistema de transferencia. Existen tres mecanismos de transferencia horizontal: Conjugación, Transformación y Transducción (Davison, 1999).

1.6.1.- Conjugación

El proceso que permite la transferencia horizontal de los plásmidos es la conjugación y esta capacidad está determinada por proteínas codificadas en las moléculas plasmídicas. El proceso de conjugación está mediado por plásmidos conjugativos que contienen toda la información genética necesaria para promover su propia transferencia (Figura 4).

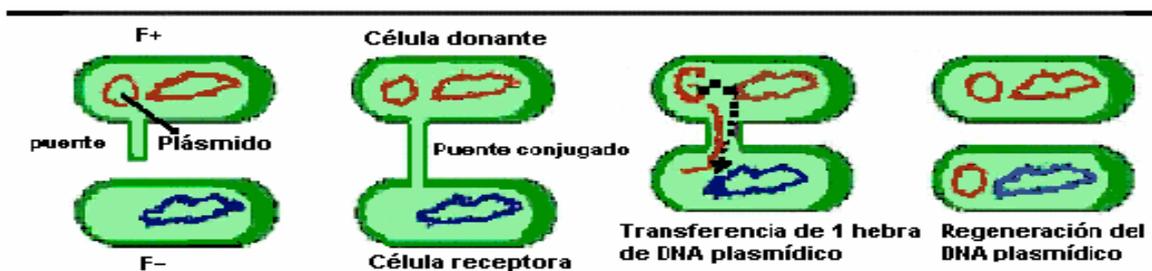


Figura 4. Transferencia de una molécula plasmídica. Proceso de Conjugación (Tomado y modificado de: <http://www.biotech.bioetica.org/clase29.jpg>, 2008).

Los plásmidos conjugativos son transferidos desde la cepa donante a la receptora, mediante el uso de una estructura llamada Complejo de Formación del Par Conjugante (Mpf), que es una estructura catalogada como Sistema de Secreción Tipo 4 (T4SS por sus siglas en inglés). El T4SS es un complejo proteico asociado a la membrana celular, responsable de la construcción del pilus y de la transferencia del ADN (Figura 5). La proteína acopladora, unida a la membrana interna, une el Mpf al sistema responsable del procesamiento de ADN antes de, y durante la transferencia por conjugación (Davison, 1999).

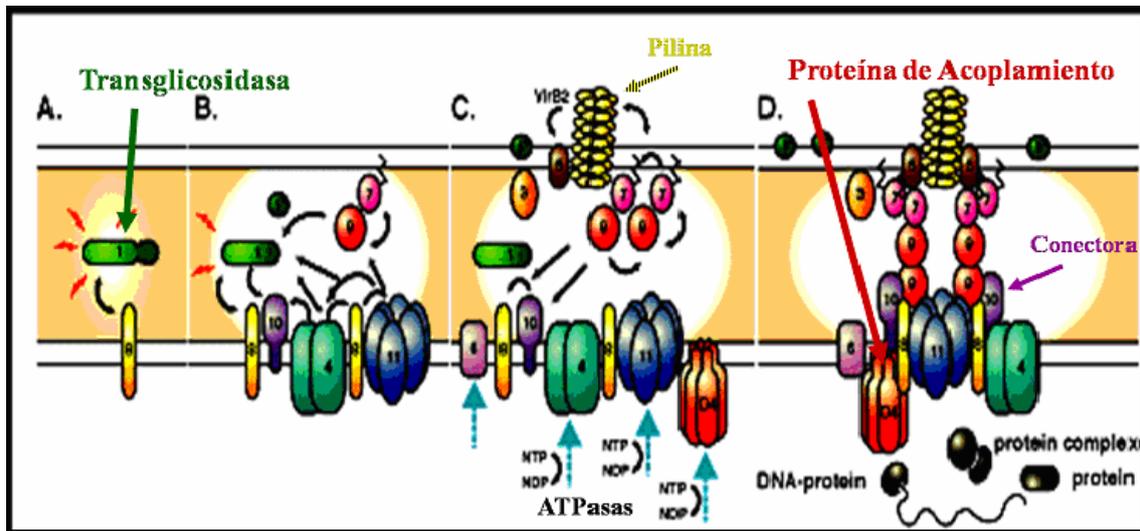


Figura 5. Sistemas de Secreción Tipo IV. (Tomado y modificado de: www.biologia.edu.ar/images/tipo4_vid.jpg, 2008)

Para el primer paso de la conjugación, que es la formación del pilus y la estabilización del contacto celular, se requieren aproximadamente 14 genes *tra*. La principal función de los pili es ayudar a la unión entre la célula donante y receptora. El contacto celular se establece a través de este puente de conjugación (figura 6). Posteriormente se inicia la transferencia de una hebra sencilla del ADN a través de una mella en una secuencia específica del

plásmido, llamada *oriT*. La replicación del ADN genera una copia de doble cadena del plásmido tanto para las células donantes como las receptoras (Llosa y col., 2002).

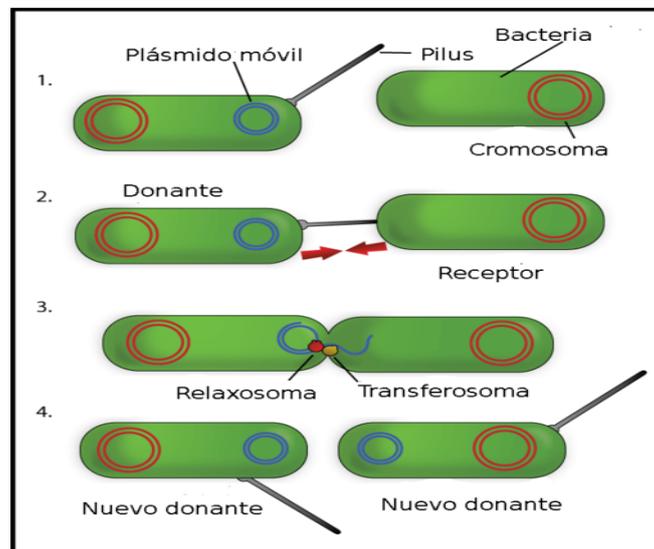


Figura 6. Esquema representativo de la formación del pilus. (Tomado de www.wikipedia.bacterial_conjugation.com . 2008)

Los procesos de transferencia horizontal son importantes para la evolución de la población bacteriana de un ambiente específico, la cual comparte un grupo de genes sin barreras aparentes entre las diferentes especies y géneros, y utilizando como vehículo de movilización a los plásmidos (Alonso y col., 2001). La cinética de conjugación de los plásmidos está influenciada por muchos factores, incluyendo el tipo de organismo involucrado, el estado fisiológico del donador, la disponibilidad de energía o nutrientes y la distribución y densidad bacteriana, entre otros. Si los plásmidos transferidos son parte de una respuesta adaptativa al estrés, entonces se ha sugerido que el estrés debe aumentar la capacidad de transferencia de la donante o la capacidad de adquirir un plásmido (Llosa y col., 2002).

La transferencia puede producirse entre células de especies y/o géneros diferentes, y capacita a la célula receptora de funciones que inicialmente no estaban presentes, tales como la resistencia a drogas, la producción de antibióticos, la resistencia a metales pesados, la producción de bacteriocinas, entre otros (Narváez y col., 2005).

1.6.2.- Transformación

La transformación genética es el proceso mediante el cual un fragmento de ADN libre o desnudo se incorpora en una célula receptora y lleva a cabo un cambio genético al incorporarse en el cromosoma (figura 7). Para que ocurra la transformación es necesario que la célula receptora se encuentre en un estado de competencia, es decir, que sea capaz de incorporar el material genético y replicarlo junto con el genoma de la célula receptora (Broca y col., 2005).

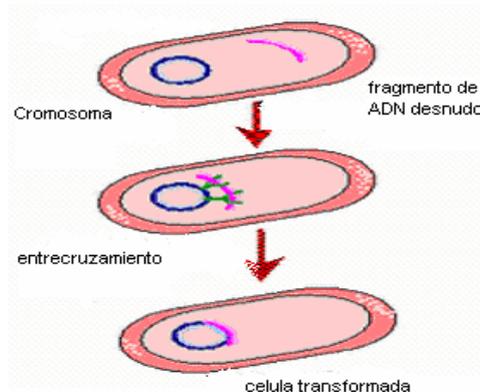


Figura 7. Proceso de transformación bacteriana. (Tomado y modificado de: <http://biologiaygeologiaguadalete.blogspot.com/2009/04/reproduccion-bacteriana.html> 2009).

Muchas especies de bacterias son naturalmente transformables. Varias especies como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* pueden convertirse en competentes naturalmente en sus ciclos de vida. Otros como *Neisseria gonorrhoeae* siempre están en un estado competente. Algunas especies pueden inducir la toma de ADN por diferentes mecanismos o procesos físicos o

químicos, incluyendo tratamientos con CaCl_2 , EDTA, cambios de temperatura etc. Se ha demostrado que la competencia natural se desarrolla en *E. coli* a bajas temperaturas, y/o en agua mineral conteniendo altas concentraciones de CaCl_2 (1-2 mM) (Davison, 1999).

1.6.3.- Transducción

La transducción es el proceso mediante el cual el ADN de la célula donante es fragmentado, encapsidado y transducido por un bacteriófago a una célula receptora. La transducción ocurre en una amplia variedad de especies bacterianas. Es importante señalar que no todos los fagos pueden transducir y no todas las bacterias son transducibles, sin embargo, está lo suficientemente extendido para suponer que desempeña un papel importante en la transferencia de la información genética en la naturaleza (Madigan y col., 1997).

1.7.- Agentes Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas que inhiben el desarrollo de los microorganismos (bacteriostáticos) o los matan (bactericida). Estos agentes ejercen una fuerte presión selectiva sobre las comunidades bacterianas que comparten un nicho particular, promoviendo la selección y acumulación de genes cuyos productos ofrecen resistencia a estos agentes, dando origen al fenómeno conocido como resistencia múltiple a los agentes antimicrobianos. La adquisición de estas propiedades de resistir el efecto de estos agentes, puede deberse a mutaciones en el cromosoma bacteriano (menos del 5% de los casos conocidos) o por la incorporación de genes o

conjunto de genes transferidos desde otro organismos, por medio de elementos genéticos extracromosómicos o plásmidos (Narváez y col., 2005).

Los microorganismos tienen un arsenal notable de mecanismos con los cuales superan los efectos de los agentes antimicrobianos. La presión selectiva que resulta de la administración antimicrobiana puede conducir al crecimiento de las cepas, previamente susceptibles, que han adquirido resistencia, o también al crecimiento excesivo de las cepas que son resistentes (Dzidic y Bedekovic, 2003).

1.7.1.- Resistencia a los antibióticos

La resistencia bacteriana se define como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural de una especie o género, es una característica del conjunto de cepas que pertenecen a esta especie o a todo un género, con independencia de las condiciones de aislamiento y es transmisible a su descendencia (transmisión vertical) por su naturaleza cromosómica. Esta resistencia natural determina los fenotipos “silvestre” de las especies bacterianas frente a los antibióticos (Jehl y col., 2004).

La resistencia adquirida concierne sólo a una porción, variable en el tiempo, de aislados de una misma especie o de un género. Se produce gracias a la adquisición de uno(s) mecanismo(s) de resistencia que determina(n) un fenotipo diferente al silvestre. Esta resistencia se adquiere por mutaciones o por la ganancia de determinantes genéticos que pueden formar parte de un

El espectro de acción de los β -lactámicos abarca las bacterias Gramnegativas, Grampositivas y espiroquetas. No son activos frente a micoplasma por carecer de pared celular, ni frente a bacterias intracelulares como *Chlamydia* spp. y *Rickettsia* spp (Calvo y Martínez, 2009).

1.7.2.2- Glucopéptidos

Actúan en un paso previo al de los β -lactámicos. Impiden la transferencia del disacárido pentapéptido, (unido al transportador lipídico de la membrana citoplásmica), al aceptor de la pared celular. El gran tamaño de estas moléculas impide su paso a través de la pared de las bacterias Gramnegativas, de forma que sólo resultan activas frente a Grampositivas. Aunque son bactericidas frente a *Staphylococcus* spp., sólo tienen actividad bacteriostática frente a *Enterococcus* spp (Calvo y Martínez, 2009).

1.7.2.3.- Aminoglucósidos

Son compuestos naturales obtenidos de actinomicetos del suelo o productos semisintéticos derivados de ellos. Poseen un anillo aminociclitol al que se unen diferentes azúcares. La diana principal de los aminoglucósidos está en los ribosomas. Los aminoglucósidos tienen su acción principal en la subunidad 30S, donde se unen a diferentes proteínas ribosomales y al ARN 16S. Bloquean la actividad normal del complejo de iniciación, impiden el inicio de la síntesis y provocan también una lectura errónea del ARNm (Calvo y Martínez, 2009).

1.7.2.4.- Quinolonas

Las quinolonas ejercen su acción bloqueando las topoisomerasa II y IV. Ambas son enzimas tetraméricas compuestas por 2 subunidades. La acción sobre las topoisomerasas no explica por si sola su potente acción bactericida, sino que se debe a fenómenos secundarios, entre los que se encuentran la activación del sistema de reparación de mutaciones SOS, el cual parece desempeñar un papel importante. Las quinolonas constituyen hoy en día, junto a los β -lactámicos, los antibióticos de mayor uso. De forma semejante a las cefalosporinas, las quinolonas se han clasificado en generaciones, atendiendo a su espectro de actividad y sus propiedades farmacocinéticas (Calvo y Martínez, 2009).

1.7.2.5.- Tetraciclinas

Son moléculas naturales o semisintéticas con un núcleo hidronaftaceno, que contiene cuatro anillos fundidos, al que se pueden unir distintos radicales que darán lugar a las diferentes tetraciclinas. Penetran en el citoplasma bacteriano por un proceso dependiente de energía y se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma, bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-ARN-t, por lo tanto impidiendo la continuación de la síntesis proteica (Calvo y Martínez, 2009) (Calvo y Martínez, 2009).

1.8.- Factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia a antibióticos

El incremento en el uso y abuso de los antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la

selección de diversas clases de resistencia bacteriana. Entre los factores más importantes que contribuyen al desarrollo de la resistencia se encuentran:

1. Las medidas ineficientes para el control de infecciones en los centros hospitalarios.
2. La falta de campañas educativas en el uso y manejo de los medicamentos, debido a las condiciones de pobreza e ignorancia en las prescripciones.
3. La severidad de las enfermedades y el manejo de pacientes en las unidades de cuidados intensivos.
4. La colonización previa por microorganismos con resistencias múltiples (Cabrera y col., 2004).

Para que los antimicrobianos alcancen su diana deben atravesar la cubierta bacteriana, salvo cuando la diana es la propia envoltura externa de los Gramnegativos. Las bacterias Gramnegativas ofrecen mayor resistencia que las Grampositivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglicano. Esa membrana es una bicapa lipídica que, a diferencia de las membranas eucariotas, contiene lipopolisacárido, y desempeñan un papel importante de barrera frente a determinados antimicrobianos.

En la misma existen un gran número de proteínas, que representan aproximadamente un 40% de su peso total, entre las cuales se encuentran las porinas, que son proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos que permiten el acceso al peptidoglicano. A través de estos poros difunden de forma pasiva pequeñas moléculas hidrofílicas (menores de 600 Da), pero se impide el paso de otras mayores, por ejemplo los glucopéptidos (peso molecular 1.000 Da). Por el contrario, los antibióticos mas

lipofílicos difunden a través de la bicapa lipídica, y algunos utilizan un mecanismo de transporte con gasto de energía. En las bacterias Grampositivas, que carecen de membrana externa, se estima que el límite de exclusión es de 100 kDa, mucho mayor que el tamaño de la mayoría de los antimicrobianos (Calvo y Martínez, 2009).

Otro factor que contribuye al aumento de la población bacteriana resistente a los antibióticos es la presencia y la dispersión de plásmidos portadores de genes de resistencia.

Aunque es bien conocida la asociación entre plásmidos y resistencia a los antibióticos, pocas veces se relaciona la presencia de un plásmido específico con un brote epidémico de resistencia antimicrobiana. En este sentido una manera sencilla, eficiente y confiable para caracterizar los plásmidos que se encuentran en algún ambiente en particular, es mediante el uso de endonucleasas de restricción, generando un patrón determinado, característico y único para cada molécula (Redondo y col., 2008).

Estos patrones de restricción (*fingerprinting*) proporcionan información acerca de la diseminación de los plásmidos, ya que su análisis permite observar posibles similitudes, discriminar entre diferentes moléculas y establecer relaciones entre plásmidos de origen diferente, y discernir la posible ocurrencia del proceso de conjugación entre géneros poco relacionados.

En el ámbito internacional, se han realizado numerosos estudios de caracterización de cepas bacterianas y los plásmidos de resistencia a antibióticos presentes en las cepas, que comprometen la salud pública de un país. En Venezuela se han elaborado reportes sobre la tendencia de la resistencia bacteriana a diferentes agentes antimicrobianos, pero son escasos

los trabajos relacionados con la identificación de los plásmidos de resistencia y la habilidad de un organismo para colonizar un determinado ambiente. Desde hace varios años, nuestro grupo de trabajo ha venido realizando estudios sobre la diseminación y predominio de cepas bacterianas causantes de infección intrahospitalarias, y caracterizando los plásmidos conjugativos presentes en aislados de ambientes hospitalarios, estableciendo su asociación y grado de distribución entre bacterias causantes de infecciones nosocomiales.

2.- ANTECEDENTES

La resistencia a los antibióticos es un problema que continua desafiando el sector de cuidados médicos. Se ha propuesto que tanto los antibióticos nuevos como las nuevas estrategias terapéuticas, son aproximaciones necesarias para vencer este desafío. Los avances en la identificación de nuevas fuentes de productos naturales con efectos antibióticos y la amplificación de la diversidad química antibiótica, están proporcionando la base de los componentes químicos para las drogas nuevas.

La rápida selección y diseminación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos contribuye a la aparición de epidemias nosocomiales y comunitarias, aumentando el riesgo de una elección inadecuada del antimicrobiano a administrar, y por tanto puede conducir al fracaso de los tratamientos, lo que ha llevado a elaborar programas de vigilancia de la resistencia bacteriana (Guzmán y col., 2008).

2.1- Estudios a nivel Internacional

En el ámbito internacional se han realizado numerosos estudios de caracterización de cepas bacterianas portadoras de marcadores de resistencia a antimicrobianos, que pueden comprometer la salud pública de un país. Una recomendación obtenida de estos estudios es que cada país o región adquiera la experiencia necesaria, a través de estudios en su propio ambiente, sobre los principales mecanismos de resistencia.

La resistencia antimicrobiana adquirida da lugar a un aumento de costos, por la extensión de la morbilidad y la mortalidad creciente. Durante las últimas décadas, la frecuencia y el espectro de infecciones resistentes a los antibióticos han aumentado constantemente en el mundo. Este aumento se ha atribuido a una combinación de las características microbianas, a la presión selectiva del uso de los antimicrobianos, y a los cambios sociales y técnicos que favorecen la transmisión de la resistencia y los factores de los organismos, tales como el uso erróneo de agentes antimicrobianos, el uso creciente de dispositivos y de procedimientos invasivos, un mayor número de hospedadores susceptibles, lapsos en la infección y otros factores que controlan las prácticas que conducen a la transmisión creciente de organismos resistentes (Dzidic y Bedekovic, 2003).

El desarrollo de resistencia a los antibióticos transmitida por conjugación fue notada por primera vez en Japón en 1958, cuando el tratamiento de infecciones entéricas con antibióticos, a menudo resultaba en una mezcla de resistencia y susceptibilidad del organismo con iguales serotipos, y siendo aislados del mismo paciente (Kei-Siu, 2002).

En el año 1985, Chopade y colaboradores, realizaron un estudio para determinar la transferencia y comportamiento de plásmidos en una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus*. Estos autores demostraron que por lo menos un plásmido de cada uno de los grupos de incompatibilidad B, C, Flv, H, S, Ia, I, P, W y X, fueron capaces de realizar la transferencia de *Escherichia coli* K12 a *A. calcoaceticus* EBF65/65. Sin embargo, no todos los plásmidos que pertenecían a un grupo determinado de incompatibilidad se comportaron de la misma forma. Todos los plásmidos eran inestables y variaban en *A.*

calcoaceticus EBF65/65, pero bajo condiciones convenientes era capaz de realizar la transferencia a otra cepa de *A. calcoaceticus* y volver a transferir a *E. coli* K12 sin dificultad. Sin embargo, 31 de los 40 plásmidos aislados requirieron la introducción de un segundo plásmido de movilización para que ocurriera nuevamente la transferencia (Chopade y col., 1985).

En 1993, se publicó un trabajo en el cual los investigadores establecieron como era la mediación plasmídica de la resistencia a plata en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Se aisló una cepa ambiental de *A. baumannii* resistente a 13 metales y 10 antibióticos. Determinaron que solamente la resistencia a la plata fue transferida a *E. coli* K12 durante la conjugación con una frecuencia de 1×10^{-6} . Esta transferencia fue mediada por un plásmido de 54 kb encontrado en la cepa de *A. baumannii* aislada, dicho plásmido fue transformado en cepas de *E. coli* DH5 α a una baja frecuencia (Deshpande y Chopade, 1993).

Takahashi y colaboradores en el 2000, estudiaron cepas de *A. baumannii* productoras de carbapenemasas. Nueve de los aislados de diversos pacientes hospitalizados fueron examinados para la actividad de hidrolisis de carbapenem y para la detección del gen *bla*_{IPM} por el método de PCR. Los nueve aislados mostraron producción de carbapenemasas. Además, las cepas hidrolizaron IPM y presentaban el gen *bla*_{IMP}. Estos autores determinaron que el gen *bla*_{IMP} era transmisible por conjugación a una cepa receptora IPM-susceptible de *A. baumannii*. Sugirieron que la frecuencia de la transferencia mediante conjugación del gen *bla*_{IMP} era algo alta en este estudio. Esto fue principalmente debido a la disponibilidad de una cepa receptora apropiada para recibir los plásmidos (Takahashi y col., 2000).

En el año 2000, Avison y colaboradores, realizaron un estudio para demostrar la presencia de betalactamasas TEM-2, en un aislado clínico de *S. maltophilia*. Estos autores realizaron una serie de ensayos entre los cuales se encontraban ensayos de conjugación. Encontraron que la transferencia de ADN plasmídico proveniente de la cepa en estudio era capaz de conjugarse con una cepa de *E. coli*, lo cual les indicó que las cepas de *S. maltophilia* aislada presentaba plásmidos conjugativos de alto peso molecular. Mediante estos ensayos los autores determinaron por primera vez, la presencia de betalactamasas TEM-2 en aislados clínicos de estas cepas (Avison y col., 2000).

El uso inapropiado de los antibióticos de manera profiláctica y terapéutica, y además; como promotores de crecimientos en granjas y alimentos para animales, se ha convertido en un factor importante en la selección y desarrollo de la resistencia bacteriana. Consecuentemente, la microflora multirresistente, principalmente compuesta por organismos colonizadores para humanos, aparece en los hospitales. En un trabajo realizado en el año 2001, se analizó un brote intrahospitalario producido por *Salmonella typhimurium*, en la sala de lactantes del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, de la Ciudad de Lima, a fin de determinar si los casos fueron contaminados e infectados por una única cepa que adquirió resistencia, dado que el primer aislamiento fue sensible a los antibióticos ensayados, mientras que los posteriores aislamientos del mismo paciente presentaron resistencia a los antibióticos probados. El estudio sugirió que la diseminación de estas bacterias en la sala de lactantes, pudo haber sido favorecida por un inadecuado manejo asistencial, con la consiguiente

transferencia de elementos genéticos responsables de la resistencia microbiana (Del Pozo y col., 2001).

En el año 2002, en la ciudad de Londres, Anandiotis y colaboradores demostraron los efectos sinérgicos entre dos antibióticos, la penicilina y la gentamicina, y determinaron que el 72.3% de las cepas aisladas, presentaban resistencias considerables a los agentes terapéuticos de primera línea, en especial a los antibióticos antes mencionados.

Un estudio realizado en España en el año 2004, mostró la presencia de una amplia variedad de genes de resistencia en cepas no patógenas, de *E. coli* aisladas de seres humanos, de animales y de productos alimenticios. Los autores determinaron que esta flora normal puede desempeñar un papel importante como donante de mecanismos antimicrobianos transmisibles. Por otro lado, establecieron que la inclusión de algunos integrones portadores de genes dentro de los mecanismos de resistencia, constituyen medios eficaces para dispersar los genes responsables de la resistencia antibiótica entre bacterias de diversos ecosistemas (Sáenz y col., 2004).

Las infecciones nosocomiales en pacientes recluidos en Terapias Intensivas se han presentado con mayor frecuencia que en otras áreas clínicas. En el año 2003, en Perú, se realizó un estudio en las Unidades de Cuidados Intensivos de 4 recintos hospitalarios, recogiendo datos de cerca de 1920 pacientes hospitalizados. Estos pacientes adquirieron cerca de 249 infecciones por cada 100 días en la Unidad de Cuidados Intensivos. Los autores sugieren que el control de la resistencia antibiótica requiere un uso más restrictivo de los desinfectantes, del aislamiento, y de un control en la diseminación de

microorganismos que ocasionan el desarrollo de este tipo de infecciones (Cuellar y col., 2008).

En el año 2003, Joshi y colaboradores, publicaron una investigación en la cual estudiaron plásmidos de aislados de *A. baumannii* que presentaban β -talactamasas de espectro extendido. Estos autores realizaron ensayos de conjugación utilizando como cepa receptora a *E. coli* DH5 α , las cuales fueron exitosas. Concluyeron que la transferencia plasmídica de determinantes de resistencia en estas cepas acarrea un grave problema a nivel hospitalario (Joshi y col., 2003).

En el año 2004, se realizó un estudio en la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital en Grecia, recogiendo datos entre los años 2002 a 2004 de los pacientes ingresados que presentaron infecciones nosocomiales. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia fueron *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados de este estudio mostraron que dichos aislados presentaban resistencia por lo menos a 16 de los 22 antibióticos utilizados en el estudio. Los autores sugirieron que esta situación era producto del uso excesivo de antibióticos en esta Unidad de Cuidados Intensivos (Markogiannakis y col., 2009).

En este mismo año (2004), Gulcan y colaboradores, presentaron un trabajo en el cual investigaron la presencia de cepas de *S. maltophilia* en la UCI del Servicio de Neonatología de un hospital en Turquía. Estos encontraron que dichas cepas presentaban resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones en este hospital, lo que les indicó que este patógeno es potencialmente mortal para la mayoría de los infantes cuya estadía hospitalaria fuera mayor de lo debido (Gulcan y col., 2004).

En el año 2006, Pardesi y colaboradores realizaron una investigación para estudiar la distribución de plásmidos y el perfil de la resistencia a los antibióticos de las genoespecies de *Acinetobacter* aisladas de piel humana sana de una población de la India occidental. Todos los aislados, mostraron un máximo de tres plásmidos con peso molecular de 1.5 a 40 kb. Cinco tipos diferentes de plásmidos fueron observados. Solamente ocho cepas tenían uno o dos plásmidos de bajo peso molecular estables además del plásmido de 40 kb, encontrado en la mayoría de las cepas. La resistencia encontrada fue para quinolonas y aminoglicosidos seguido de cerca, por las cefalosporinas y β -talactámicos (Pardesi y col., 2006).

Toleran y colaboradores en el año 2007, realizaron un estudio para determinar a que se atribuía la resistencia de las cepas de *S. maltophilia* al antibiótico cotrimoxazol. Luego de una serie de estudios a un grupo de aislados de esta bacteria, los autores determinaron que la resistencia a dicho antibiótico se encontraba relacionado con la presencia de genes *sul1* y *sul2*, los cuales se encuentran relacionados tanto a integrones clase 1 como a plásmidos de alto peso molecular. Los autores concluyeron que la movilización de genes *sul* mediante integrones clase 1 y plásmidos, hace predecible su diseminación, y esto acarrea la diseminación de la resistencia a cotrimoxazol (Toleran y col., 2007).

En Italia en el 2007, se publicó un trabajo en el cual se estudió un brote producido por *Acinetobacter baumannii* en 2 hospitales de Roma. Los investigadores caracterizaron 45 cepas de *A. baumannii*, que circulaban en dos hospitales, demostrando la presencia de una cepa clonal asociada a un brote ocurrido en la Unidad de Cuidado Intensivo de uno de los hospitales. Dos

genotipos frecuentes fueron identificados, uno que correspondía a una cepa epidémica resistente a carbapenem, causante del brote en la Unidad de Cuidado Intensivo de un hospital. Además, dos integrones clase 1, con diversos genes, también fueron identificados entre los dos genotipos frecuentes. El análisis de las regiones integrón-variables reveló la presencia del gen blaOXA-20. Además de esto, determinaron que todas las cepas resistentes a carbapenem analizadas en este estudio, llevaron el gen blaOXA-58 situado en plásmidos. En este estudio, el análisis del plásmido de blaOXA-58- contribuyó a la descripción del brote, sugiriendo que los perfiles del plásmido pueden ayudar en investigaciones epidemiológicas (Giordano y col., 2007).

En el año 2009, Barchitta y colaboradores realizaron un estudio en el cual querían determinar la clonalidad, el modo de transmisión y los riesgos de adquirir *A. baumannii* y *S. maltophilia* en la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital de Italia. Durante el período de estudio se obtuvieron 47 aislados de *A. baumannii* y 45 aislados de *S. maltophilia*. Y un total de 9 pacientes presentaron infecciones por ambos patógenos. Estos autores determinaron que las cepas aisladas de cada patógeno presentaban relación clonal y que los riesgos de adquirirlos aumentaban con la implementación de métodos invasivos en pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (Barchitta y col., 2009).

En este mismo año (2009), se realizó un estudio de aislados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de un hospital de Taiwan, estos autores querían determinar a que se encontraba asociada la resistencia de estas cepas al uso de carbapenem. Se determinó que de los 34 aislados, 28 presentaron

resistencia a carbapenem, debido a la presencia de plásmidos que contenían genes *bla*, los cuales permiten a la bacteria poseer resistencia a dicho antimicrobiano (Chen y col., 2009).

En este mismo año, otro grupo de investigadores estudiaron cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter calcoaceticus* que presentaban resistencia a carbapenem producto de la presencia de integrones clase 1. Estos investigadores detectaron y caracterizaron los integrones clase 1 presentes en las diversas cepas, demostraron que de 39 cepas, 33 presentaban integrones clase 1 portadores de la resistencia a carbapenem. Así mismo, estos integrones fueron localizados en plásmidos de un tamaño aproximado de 36 kb. Determinaron que la diseminación de la resistencia a carbapenem era producto de la movilización de dicho plásmido el cual contiene el integron clase 1 (Eng Hwa y col., 2009).

2.2.- Estudios a nivel Nacional

Se han realizado numerosos estudios a nivel internacional, para estudiar la caracterización de cepas bacterianas multirresistentes. En Venezuela, son muy pocos los estudios a nivel molecular realizados en esta área, es por esto que en el Laboratorio de Biología de Plásmidos (LBP), se adelantan proyectos para la caracterización y aislamiento de dichas cepas.

Desde hace algunos años en el LBP, se han realizado estudios sobre la diseminación y la prevalencia de cepas bacterianas causantes de infecciones intrahospitalarias ó nosocomiales, proponiéndose caracterizar los plásmidos presentes en dichas cepas. Los estudios preliminares se iniciaron con cepas de enterobacterias aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias adquiridas en el Hospital Universitario de Caracas (HUC). Se realizaron

pruebas de conjugación a las muestras de diferentes géneros, obteniéndose varias cepas transconjugantes. Los plásmidos provenientes de estas cepas fueron purificados por el método de lisis alcalina, observándose la prevalencia de plásmidos de gran tamaño en todas las muestras analizadas. El 37% de las cepas reveló la presencia de más de un plásmido, indicando que ocurrió la cotransferencia de más de una molécula extracromosomal. Se realizó el patrón de restricción (fingerprinting) del DNA plasmídico aislado de las transconjugantes, obteniéndose que el 36% de ellas, presentaban patrones únicos y diferentes entre sí, mientras que para el resto de las bacterias se pudieron diferenciar 5 patrones sobre la base de la similitud entre las bandas obtenidas, revelándose la prevalencia de dos de ellos entre los plásmidos de las transconjugantes. Estos resultados permitieron sugerir que en el HUC se encontraban considerablemente diseminados dos tipos principales de plásmidos diferentes, portadores de multiresistencia a antibióticos y con un amplio rango de hospedador. Estos plásmidos, con determinantes de resistencia múltiples, han sido seleccionados en los ambientes clínicos por el abuso de los agentes antimicrobianos (Alonso y col., 2001).

Además de caracterizar los plásmidos de estas cepas, también se analizaron los integrones. Los integrones se han definido como elementos genéticos que contienen los componentes de un sistema de recombinación sitio-específico, que captura casetes génicos móviles. La clase más estudiada de integrones es la Clase 1, los cuales se han encontrado principalmente en bacterias de origen clínico y la mayoría tiene integrados casetes génicos cuyos productos confieren resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados en clínica. En el LBP, se determinó la presencia de integrones Clase 1 en los

aislados bacterianos multirresistentes. Se analizaron 41 cepas, 25 cepas transconjugantes, portadoras de los plásmidos provenientes de aislados obtenidos en el HUC, durante los años 1997 y 1998; y 16 aislados obtenidos en el HUC en el año 2001. La presencia de integrones se determinó utilizando la técnica de PCR, con indicadores que permitieron amplificar la región variable de los integrones, donde se insertan los casetes génicos. Las cepas transconjugantes, portadoras de plásmidos de muestras clínicas, presentaron una frecuencia de integrones clase 1 del 36%, mientras que los amplificadas tenían un tamaño promedio de 750 pb, lo que sugirió que la región variable de estos integrones podían tener insertados 1 ó 2 casetes génicos. La PCR realizada a los aislados del año 2001, reveló que el 75% de las muestras presentaban integrones Clase 1. La mayoría de las cepas produjeron un amplificado de 750 pb, sin embargo, algunas cepas de *E. coli* produjeron amplificadas de tamaño superior a 1000 pb, lo que indicó que esos integrones pudieron contener entre 2 y 3 casetes génicos insertados en su región variable, representando un incremento en el tamaño de la región variable al encontrado en las muestras aisladas en los años 1997 y 1998. Los resultados indicaron que la frecuencia de estos elementos aumentó un 39% en un período de 3 años (Alonso y col., 2005a).

En el año 2002, Pedroza y colaboradores caracterizaron plásmidos presentes en cepas de *A. baumannii* aisladas de 3 centros hospitalarios de la ciudad de Caracas. Los resultados presentados por estos autores, sugirieron que la presión ejercida por el uso de antibióticos en áreas restringidas como las Unidades de Terapia Intensiva, ha favorecido la diseminación y prevalencia de plásmidos que han ido acumulando determinantes de resistencia a una amplia

variedad de antibióticos. En estos aislados se demostró la presencia de plásmidos de diferentes tamaños moleculares a los cuales pudieran estar asociados los determinantes de resistencia identificados mediante pruebas de fenotipos (Pedroza y col., 2002).

En el año 2005, Antón y colaboradores realizaron un estudio para caracterizar fenotípicamente cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, así como también establecer un patrón de actividad *in vitro* a diferentes antimicrobianos. Dichas cepas fueron suministradas por un hospital de Cumaná. Se identificaron fenotípicamente 24 cepas de *S. maltophilia* que mostraron 100 % de resistencia a Imipenem, cefepime, amikacina y ácido nalidixico. Estos autores determinaron que los aislados presentaron gran homogeneidad en su perfil antimicrobiano mostrando multirresistencia a la mayoría de los antibióticos probados, siendo trimetoprima-sulfametoxazol y la levofloxacina los antimicrobianos mas efectivos *in vitro* (Antón y col., 2005).

En otro estudio realizado en la Facultad de Medicina de la UCV en el año 2006, aislaron 224 cepas de Enterobacterias, que presuntamente eran productoras de BLEE. Las muestras fueron tomadas de pacientes hospitalizados principalmente en los servicios de Cuidados Intensivos de niños y adultos de 8 Centros de Salud en Caracas. Se identificó la presencia de plásmidos de alto peso molecular en aislados provenientes de los diferentes centros hospitalarios. Estos autores sugirieron que la presión ejercida por el uso de antibióticos en áreas restringidas como las UCI, han favorecido la diseminación y prevalencia no sólo de plásmidos transferibles, sino también la presencia de otros elementos genéticos móviles como

transposones e integrones, que codifican altos niveles de resistencia asociados con varias familias de antibióticos (Torres y col., 2006).

En el año 2007, el LBP publicó un trabajo con el análisis de 60 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multiresistentes aisladas de pacientes hospitalizados en varios servicios de los 4 centros hospitalarios. Los resultados evidenciaron que el 67% de los aislados poseían plásmidos de alto peso molecular, movilizables en las condiciones ensayadas, capaces de transferir desde 3 hasta 10 determinantes de resistencia contra diferentes clases de antibióticos. Estos resultados demostraron la alta capacidad de transferencia horizontal, con la concomitante diseminación de múltiples genes de resistencia entre diferentes cepas clínicas provenientes de los distintos centros hospitalarios (Redondo y Alonso, 2007).

En el año 2008, se presentó un trabajo para establecer las posibles fuentes de transmisión de los agentes causales de infecciones nosocomiales a partir de muestras de los ambientes hospitalarios y las áreas públicas y restringidas al público y personal en general. Para ello, se identificaron los géneros aislados de las distintas áreas y de pacientes con infecciones nosocomiales. Haciendo uso de baterías bioquímicas, se identificaron 67 cepas. De estos microorganismos, el 23,9% fueron clasificados como pertenecientes a la especie *P. aeruginosa*, 61,2% a *A. baumannii* y un 14,9% a *S. maltophilia*. Los resultados obtenidos demostraron que las cepas aisladas de ambientes hospitalarios, identificadas como microorganismos potencialmente patógenos, evidenciaron determinantes de resistencia un rango que va de 3 a 15 antibióticos de uso clínico frecuente en la actualidad. Estos resultados sugieren que estos microorganismos puedan ser causantes de

infecciones intrahospitalarias, y representen un grave problema de salud pública (Chalbaud y Alonso, 2008).

En Venezuela, son pocos los estudios epidemiológicos y moleculares de cepas causantes de infecciones intrahospitalarias dirigidas a demostrar relaciones clonales. En el año 2008, Rivas y colaboradores, genotipificaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, provenientes de aislados nosocomiales de cuatro centros de salud del Área Metropolitana de Caracas. Se analizaron 60 cepas de *E. coli* y 26 cepas de *K. pneumoniae*. Estos estudios revelaron una considerable variabilidad genética entre diferentes cepas de la misma especie aisladas de los diferentes recintos hospitalarios, sugiriendo que no hay diseminación entre los hospitales que conformaron parte del estudio. Sin embargo, se encontraron algunas cepas con relación clonal, aisladas de pacientes ubicados en las distintas áreas del mismo hospital, lo que sugirió que puede haber alguna vía de transmisión común, que permitió la diseminación de cepas entre los pacientes. La mayoría de las cepas en estudio presentaron variabilidad en sus perfiles de resistencia, lo que sugirió que en los cuatro centros hospitalarios, la diseminación de los determinantes de resistencia no es por la propagación de clones bacterianos sino por vía horizontal (Rivas y col., 2008).

Con el fin de ahondar aun más en la búsqueda de una solución al problema creciente de la diseminación de plásmidos resistentes a antimicrobianos, los cuales se presentan como un grave problema de salud pública tanto a nivel nacional como internacional, en este trabajo nos proponemos la caracterización de plásmidos presentes en cepas aisladas de ambientes hospitalarios.

3.- JUSTIFICACION

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud pública a nivel mundial y un tema de preocupación permanente por parte de los organismos responsables de la salud, ya que alargan el tiempo de estancia hospitalaria, incrementan la mortalidad, elevan los costos de atención y afectan la calidad de vida del individuo (Pedroza y col., 2001).

El impacto económico y social de las infecciones nosocomiales es muy difícil de evaluar, no obstante, si se considera el prolongado período de hospitalización, el uso indiscriminado de los antibióticos y la demora en la recuperación y reincorporación del paciente en la vida productiva, resulta evidente que la prevalencia y control de estas infecciones constituyen una prioridad en salud pública (Pedroza y col., 2001).

Desde el inicio de la era antibiótica, se conoce la resistencia de las bacterias a los agentes empleados para combatirlas. Esto debido a la continua competencia entre los microorganismos que infectan al hombre y los antibióticos usados. Es claro que la aparición de resistencia bacteriana conlleva al fracaso de tratamientos, al uso de antibióticos cada vez más potentes, aumento del consumo de antibióticos buscando sinergismo o diferentes mecanismos de acción y por todo esto ocasiona un aumento de los costos, principalmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (Fajardo y col., 2000).

Por esto que es necesario para toda UCI tener conocimiento de la flora que coloniza e infecta a sus pacientes y del nivel de resistencia y patogenicidad

de estas bacterias, más aun si conoce que estas varían entre instituciones de una misma región, ciudad o entre diversas áreas de una misma institución.

En nuestro país, no se cuenta con la adecuada información que permita conocer la verdadera magnitud de las infecciones nosocomiales, ni siquiera en las UCI. Venezuela carece de un sistema de vigilancia epidemiológica eficiente, lo que conlleva a las dificultades en la prevención de las mismas, agravado por las deficiencias en los métodos diagnósticos.

Según estadísticas del HUC, se ha estimado que alrededor del 95% de las infecciones nosocomiales son causadas por bacterias, de las cuales la mayoría es producida por bacterias Gramnegativas. También se ha reportado que el 22% de las infecciones del HUC son causadas por *A. baumannii* y un 12% por *S. maltophilia* en las Unidades de Cuidados Intensivos de este hospital (Pitteloud y col., 2007).

Aunque *S. maltophilia* es un microorganismo con limitada virulencia, presenta multirresistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos, incluyendo carbapenémicos y cefalosporinas de última generación, exhibe alta resistencia a una gran gama de antibióticos, entre ellos ciprofloxacina, aminoglucósidos y a varios antibióticos betalactámicos y puede ser susceptible al trimetropín-sulfamethoxazole, moxalactam y cloramfenicol.

En los últimos años se ha reportado un importante incremento de las infecciones nosocomiales por *A. baumannii*, siendo responsable de infecciones graves como sepsis, neumonía y meningitis. No es infrecuente que algunas de estas infecciones nosocomiales aparezcan en forma de brotes. Las unidades más afectadas son las de cuidados intensivos y quemados, donde el uso

masivo de antibióticos puede seleccionar la aparición de cepas multirresistentes (Takahashi y col., 2000).

El propósito fundamental de esta investigación es presentar el total de aislamientos de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter baumannii*, sus patrones de resistencia, y la caracterización de los plásmidos presentes en cada una de estas bacterias.

4.- OBJETIVOS

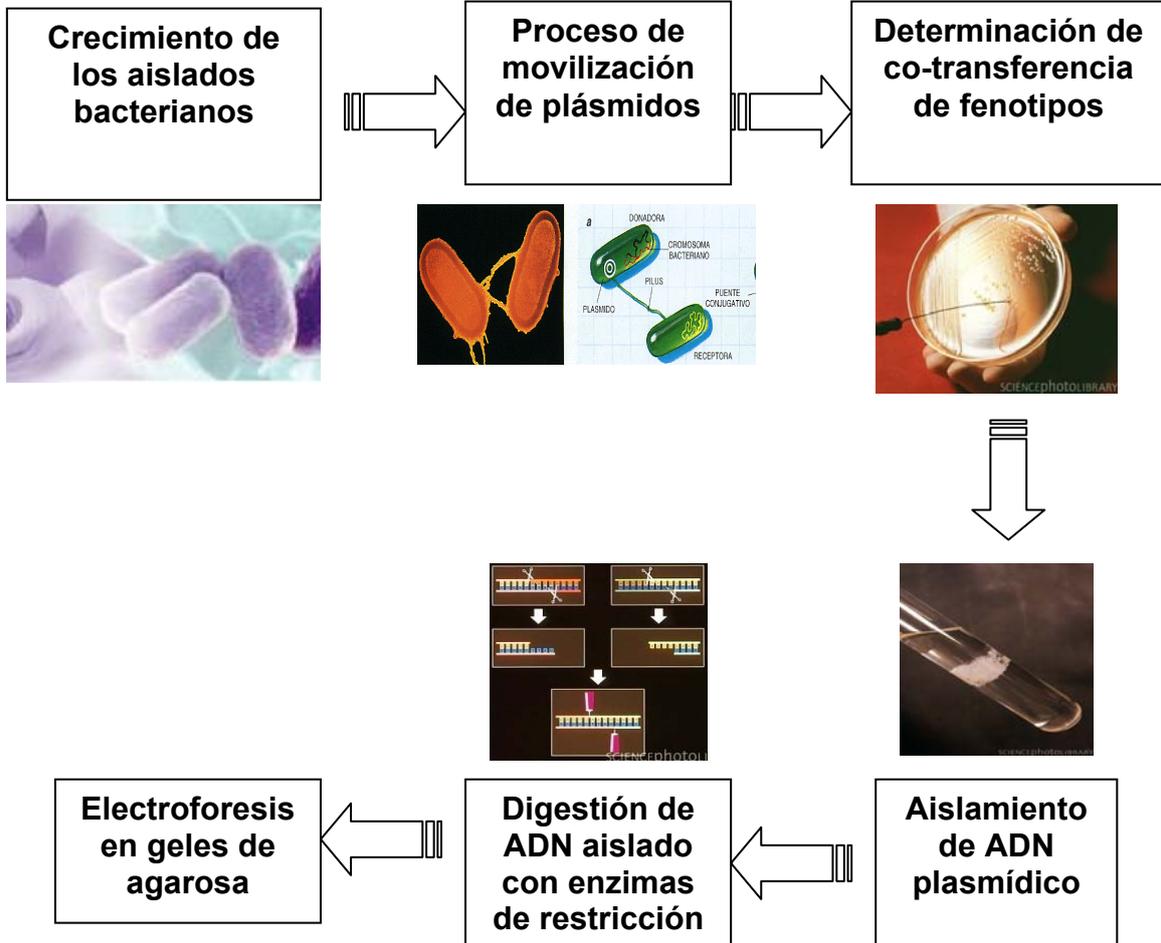
4.1.- Objetivo General

Caracterización fenotípica y molecular de los plásmidos presentes en cepas bacterianas multirresistentes aisladas del Hospital Clínico Universitario de Caracas durante el período 2007-2008.

4.2.- Objetivos Específicos

- Determinar los fenotipos de resistencia a los antibióticos en las cepas en estudio (*Acinetobacter baumannii*, y *Stenotrophomonas maltophilia*).
- Realizar el proceso de conjugación bacteriana. Determinar la frecuencia de la transferencia plasmídica.
- Determinar la co-transferencia de los marcadores de resistencia.
- Aislamiento de los plásmidos portadores de los determinantes de resistencia movilizados.
- Análisis de los patrones de restricción de los plásmidos aislados.

5.- PLAN DE TRABAJO



6.- MATERIALES Y METODOS

6.1.- Material Biológico

El material biológico que se utilizó para la realización de este estudio fueron muestras bacterianas provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos, y del Servicio de Neonatología del Hospital Clínico Universitario de Caracas. Las muestras fueron suministradas por la Lic. Adriana Chalbaud.

Se seleccionaron cepas identificadas como *Acinetobacter baumannii*, y *Stenotrophomonas maltophilia*. La recolección de las muestras se realizó entre el año 2007-2008, realizándose 1 toma cada 2 meses. En total se realizaron 6 tomas de muestra en las diferentes áreas.

La cepa que se utilizó como receptora para los ensayos de conjugación fue *E. coli* K12 J62-2, del Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM), de genotipo: F^- , RIF^+ , his^- , lac^- , pro^- , trf^- .

La cepa receptora utilizada para el proceso de transformación fue *E. coli* DH10B, del Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM), de genotipo: str , F^- , $mcr\Delta$, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$; $\Delta lacX74$; $end\Delta 1$; $recAQ$; $deoR$ $\Delta(ara,leu)$ 7697; $araD139$, $galU$ $galK$ $nupG$; $rpsL$; ($\pi 80dlacZ\Delta M15$).

6.2.- Medios de crecimiento

Caldo y Agar LB (Luria-Bertani).

La composición de estos medios se muestra en la tabla número 1.

TABLA 1. Componentes del Medio de Cultivo Luria-Bertani.

Sustancia	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	2,5 gr
Triptona	5,0 gr
Extracto de Levadura	2,5 gr
Volumen (agua destilada)	500 ml

Para el crecimiento bacteriano sobre placas de agar se utilizó el medio rico agar LB el cual contiene la misma composición del caldo LB suplementado con agar al 1,5 %.

Agar Mueller Hinton (MH)

Este medio sólido se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante (OXOID). De los muchos medios disponibles, se considera este como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias.

Agar Mac Conkey (MC)

Es un medio diferencial, que permite distinguir entre bacterias que hidrolizan o no lactosa. Este medio sólido contiene por litro de agua destilada, 51,5 g de agar Mac Conkey, de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial OXOID.

Medio Mineral sólido (MM)

Este medio sólido se obtiene de mezclar Agar 2X y Sales 2X. Estas se mantienen por separado hasta el momento de su utilización. Para un volumen final de 500 ml se prepara: Agar 2X (agar 7,5 g en 250 ml de agua destilada); y Sales 2X (K_2HPO_4 5,25 g; KH_2PO_4 2,25 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g; citrato de sodio 0,2 g en 250 ml de agua destilada) (Coello y col., 2003).

6.3.- Determinación fenotípica

Para la determinación de los perfiles de resistencia se utilizaron los antibiogramas (método de Kirby-Bauer), siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), empleando los antibióticos que se muestran en la Tabla 2, los cuales fueron utilizados para corroborar las características fenotípicas de resistencia de las cepas donantes, así como determinar la cotransferencia de marcadores de resistencia durante los procesos de conjugación y transformación. Se colocó un inóculo estándar de bacterias en una placa que contenía agar MH. Sobre la superficie del agar se colocaron los discos que contenían los diferentes antibióticos. Se midió el diámetro de las zonas circulares en torno a cada disco de antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano y se comparó con los valores proporcionados por el CLSI para determinar la resistencia o sensibilidad a los antibióticos (Walker, 2000).

TABLA 2. Contenido de los filtros con antibióticos empleados en la determinación de los perfiles de resistencia.

Antibiótico	Contenido del filtro (µg)
Imipenem	10
Amikacina	30
Tobramicina	10
Gentamicina	10
Meropenem	10
Trimetropin-sulfametoxazol	25
Tetraciclina	30
Levofloxacina	5
Cefotaxima	30
Ceftriaxoma	30
Ceftazidina	30
Ampicilina	10
Ciprofloxacina	5

TABLA 3. Antibióticos empleados en el proceso de conjugación

Antibiótico	Concentración	
	[STOCK mg·ml⁻¹]	[USO µg·ml⁻¹]
AMP	50	150
TET	10	15
AMK	20	10
RIF	30	100

STOCK, concentración de la solución concentrada.

USO, concentración final.

6.4.- Conjugación bacteriana.

Los ensayos de conjugación que se siguieron en el laboratorio se realizaron tanto en medio líquido como en medio sólido. Se verificaron los fenotipos reportados de las cepas donantes y receptora. Se sembró por agotamiento una alícuota, tanto de la cepa donante como de la receptora, en placas de agar LB, con las concentraciones de sus respectivos antibióticos marcadores y se dejaron crecer a 37 °C durante 24 h. Los antibióticos marcadores utilizados en el proceso de conjugación y sus concentraciones se muestran en la tabla 3.

Para la conjugación en medio líquido se tomaron 0,2 ml de cada cepa y se inocularon en értulas con 9,8 ml de caldo LB, se incubaron en baño de María con agitación a 37 °C, hasta que el cultivo de la cepa donante alcanzó 80 UK (Unidades Klett) y la cepa receptora alcanzó 60 UK. En este punto de crecimiento, se colocaron 0,1 ml de la cepa donante y 0,4 ml de la cepa receptora en un tubo eppendorf con 0,5 ml de caldo LB, constituyendo la mezcla de conjugación. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 24 h, luego se realizaron diluciones seriadas y se sembró por rastrilleo 0,1 ml en placas de agar LB suplementadas con los antibióticos marcadores (Ramos, 2006).

Para la conjugación en medio sólido, se realizó el proceso inicial igual al descrito para la conjugación en medio líquido. Al tener la mezcla de conjugación, se colocaron 100 µl de dicha mezcla en un filtro millipore de 0,45µm, que se encontraba sobre una placa de LB. Esta placa fue incubada toda la noche a 37 °C durante 24 h, luego dicho filtro fue lavado con solución salina, y a partir de este lavado se realizaron diluciones seriadas y se

sembró por rastrilleo 0,1 ml en placas de agar LB suplementadas con los antibióticos marcadores.

6.5.- Preparación de Células Competentes

Se inocularon 20 ml de medio LB con una dilución 1/100 de un cultivo de la cepa receptora. Se incubó a 37 °C con agitación hasta que la ABS_{600} alcanzó valores comprendidos entre 0,3 y 0,5 U. se centrifugaron las células a 5000 xg durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 10 ml de $CaCl_2$ 50 mM/L, incubándolo durante 30 minutos en hielo. La suspensión se centrifugó nuevamente a 3000 xg durante 10 minutos, el sedimento se resuspendió en 2 mL de $CaCl$ 50 mM/L (Sambrook y Russell, 2001).

6.6.- Transformación

Se mezclaron 200 μ L de las células competentes con 0,1 μ g de DNA, incubando la mezcla durante 15 minutos. Al terminar el tiempo de incubación, la mezcla fue sometida a un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos, al cabo del cual se le añadió 0,5 mL de medio LB y se incubó a 37 °C durante 30-60 minutos. Se sembró en placas de medio selectivo adecuado mediante rastrilleo.

6.7.- Aislamiento de ADN plasmídico de la población Donante.

El DNA plasmídico puede ser aislado de un cultivo de bacterias, al ser tratadas con álcali y SDS. El procedimiento que se siguió es el siguiente: se preparó un cultivo de 6 mL de la cepa. Las células se precipitaron por centrifugación (14000 xg durante 5 min). Se resuspendió en 500 μ l de

solución salina y se centrifugó durante 1 minuto. Luego se descartó el sobrenadante y al sedimento se le agregó 200 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8) y 10 µl de lisozima, y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Luego se añadió 200 µl de solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1%), se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se agregó 200 µl de solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial, pH 4,5) y se incubó durante 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 14000 xg durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se realizó una extracción con un volumen de cloroformo-fenol (1:1) centrifugando durante 15 minutos a 14000 xg, tomando luego la fase superior con sumo cuidado. El sobrenadante se precipitó con 900 µl de etanol 100 %, se incubó a -20 °C por 20 minutos y se centrifugó a 14000 xg durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 mL de etanol 70 % y se centrifugó a 14000 xg durante 10 minutos, luego de descartar el sobrenadante, el pellet se colocó a 37°C hasta que el ADN plasmídico estuviese completamente seco, finalmente se resuspendió en 40 µL de agua mQ y se dejó a 37°C durante la noche.

6.8.- Digestión con enzimas de restricción del DNA plasmídico

El DNA plasmídico aislado, fue sometido a la digestión por enzimas de restricción. Para la digestión total del DNA se prepararon digestiones que contenían de 1-3 µg de DNA. En un tubo eppendorf se mezclaron, en el mismo orden, los siguientes componentes: agua bidestilada, hasta completarse el volumen deseado; 1X del tampón adecuado para cada enzima usada; DNA plasmídico; enzima de restricción y enzima RNAasa. Las digestiones fueron

incubadas a la temperatura óptima de las enzimas empleadas (Sambrook y Russell, 2001).

6.9.- Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon pesando la agarosa y disolviéndola en tampón TBE 1X. La composición del tampón TBE 1X es: Tris Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M y EDTA 0,002 M a pH 8. Una vez polimerizado el gel de agarosa, se colocó dentro de la cámara que contiene el tampón TBE 1X. Se colocó la muestra con el tampón de carga, que contiene: azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25% y glicerol 50%. Se cargó en uno de los bolsillos del gel, un marcador de peso molecular, a fin de estimar el peso molecular de las muestras. Al final de la corrida, el gel se trató con bromuro de etidio durante 10 min y luego en agua durante otros 10 min. El gel se observó en un equipo Gel Doc 1000 (Bio Rad), donde se fotografió y registró la imagen. Luego se analizó con el sistema Multy-Analyst.

7.- RESULTADOS

7.1.- Determinación del fenotipo de resistencia a diversos antibióticos

Se obtuvieron 26 cepas de *A. baumannii* aisladas de las Unidades de Cuidados Intensivos y el Servicio de Neonatología. Las cepas fueron sometidas a pruebas para la determinación del perfil de resistencia a los antibióticos, utilizándose el método de difusión en disco. Se ensayaron 13 antibióticos (sección 5.3). En la tabla 4, se presentan los resultados obtenidos para los perfiles de resistencia de las cepas de este estudio. Se utilizaron estos antibióticos debido a que son los utilizados de rutina en clínicas y se tiene los valores proporcionados por el CLSI.

TABLA 4. Perfil de resistencia de las cepas de *A. baumannii*

CEPA	Antibióticos														
	AMK	AMP	FEP	IPM	TZP	TOB	CTX	CAZ	CN	CIP	MEM	LEV	SXT	CRO	TET
AB1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB2	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R
AB3	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AB4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AB7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AB8	I	R	R	I	R	R	I	R	R	I	R	S	S	I	S
AB9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AB13	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I
AB16	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R
AN2	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	I	I
AN3	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	I	R	R	R
AN5	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	I	R	I	R
AN17	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	I	R
AU13	S	R	R	S	R	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S
AU14	I	R	R	S	R	S	I	S	S	S	S	I	S	I	S
AU16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AU21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AU29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AU32	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	I
AU33	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AU34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
AU40	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AU41	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

AB: aislados de Pacientes; AN: aislados del ambiente de Neonatal; AU: aislados del ambiente de Terapia Intensiva.
 AMK: amikacina; AMP: ampicilina; FEP: Cefepime; IPM: imipenem; TZP: Tazobactam; TOB: tobramicina, CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; MEM: meropenem; LEV: levofloxacina; SXT: trimetropim-sulfametoxazol; CRO: ceftriaxona; TET: tetraciclina. R: resistente, I: intermedio, S: sensible

Los resultados mostrados en la tabla 4, nos permitieron corroborar cuales cepas eran resistentes a los antibióticos probados bajo las concentraciones empleadas en el laboratorio, determinándose así perfiles de resistencia elevados a AMP (100%), TET (85,7%), MEM (82,1%), CN (71,4%), IPM (71,4%), CRO (71,4%), CAZ (67,8%), CIP (67,8%), AMK (64,2%), TOB (60,7%), mientras muestran valores bajos de resistencia a LEV (32%) (figura 8).

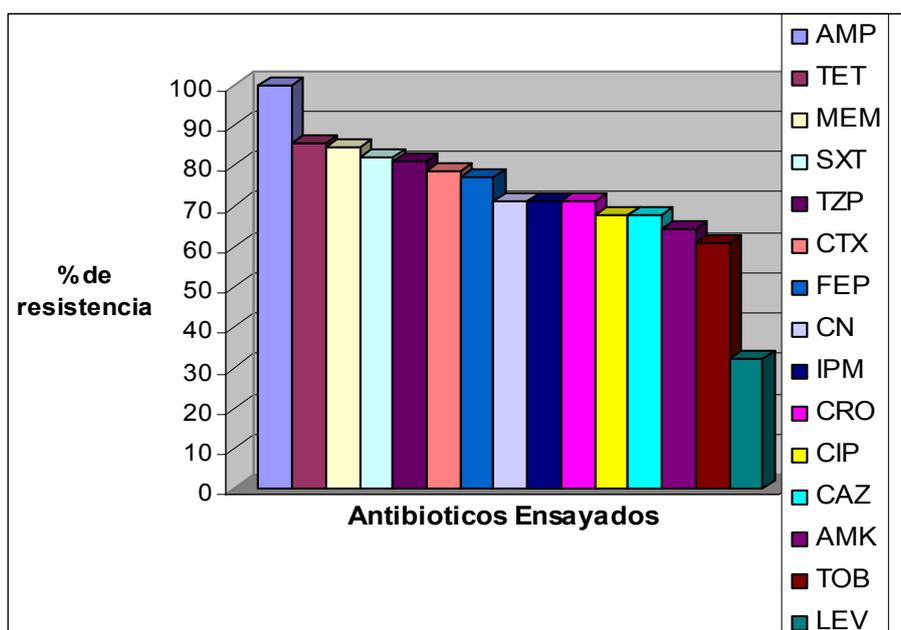


Figura 8. Porcentaje de resistencia a diversos antibióticos de las cepas de *A. baumannii*

En la figura 8 se grafican los porcentajes de resistencia que presentan las cepas de *A. baumannii*, se observa que 100% de las cepas son resistentes a AMP seguidas por TET (85,7%), por esto, estos dos antibióticos fueron utilizados como marcadores para los ensayos de conjugación.

Los resultados mostrados en la tabla 4, fueron buscados para conocer cuales cepas eran resistentes a AMP y TET, bajo las concentraciones empleadas en el laboratorio, determinándose así una población de 22 cepas de *A. baumannii* resistentes a TET, el cual puede ser utilizado como marcador para la conjugación. Entre estas 22 cepas resistentes a TET, se obtuvieron valores elevados de resistencia a AMP (100%), MEM (86%) y AMK (74%), aunque todas las cepas aisladas presentan un porcentaje elevado de resistencia a la mayoría de los antibióticos probados. La mayoría de las cepas presenta un patrón de sensibilidad variado y muy bajo.

También se obtuvieron quince cepas de *S. maltophilia*, a las cuales se les determinó el perfil de resistencia, que se muestra en la tabla 5.

Para este género solo se probaron dos antibióticos debido a que son los únicos valores proporcionados por el CLSI, para la metodología de difusión en disco.

TABLA 5. Perfil de resistencia de las cepas de *S. maltophilia*

CEPA	ANTIBIOTICOS		
	SXT	LEV	AMK
SB1	S	S	R
SB2	S	S	R
SB3	S	S	R
SB4	S	S	R
SB5	S	S	R
SB6	S	S	R
SB7	S	S	R
SN1	S	S	R
SU1	S	S	R
SU2	S	S	R
SU3	R	S	R
SU4	S	S	R
SU5	S	S	R
SU6	S	S	R
SU7	S	S	R

SB: aislados de Pacientes; SN: aislados de ambiente de Neonatal; SU: aislados de ambientes de Terapia Intensiva. SXT: trimetropim-sulfametoxazol; LEV: levofloxacina; AMK: amikacina. S: sensible, R: resistente.

7.2.- Crecimiento de las cepas

A las 26 cepas de *A. baumannii*, y a las 15 cepas de *S. maltophilia* se les realizó el control de fenotipo, que es un requerimiento indispensable para poder establecer los antibióticos marcadores a emplear para el proceso de conjugación. A la cepa receptora también se le realizó dicho control. Las cepas se sembraron, por agotamiento, en medio sólido LB suplementado con los antibióticos marcadores (TET, AMP, RIF) para el caso de *A. baumannii* y (AMK, RIF) para el caso de *S. maltophilia*. Estos marcadores fueron seleccionados visualizando el perfil de resistencia de todas las cepas, y observando a cual antibiótico presentaban resistencia la mayoría, en este caso obtuvimos TET para *A. baumannii* y AMK para *S. maltophilia*. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 6 y 7 respectivamente.

TABLA 6. Control de fenotipo de las cepas donantes (*A. baumannii*) y de la receptora para los ensayos de conjugación.

MEDIO		LB			
CEPA	TET	AMP	RIF	RIF/TET	RIF/AMP
J62-2	-	-	+	-	-
AB1	+	+	-	-	-
AB2	+	+	-	-	-
AB3	+	+	-	-	-
AB4	+	+	-	-	-
AB7	+	+	-	-	-
AB8	-	+	-	-	-
AB9	+	+	-	-	-
AB11	+	+	-	-	-
AB12	+	+	-	-	-
AB13	-	+	+	-	+
AB15	+	+	-	-	-
AB16	+	+	-	-	-
AN2	+	+	-	-	-
AN3	-	+	-	-	-
AN5	+	+	-	-	-
AN17	+	+	-	-	-
AU13	-	+	-	-	-
AU14	-	+	-	-	-
AU16	+	+	-	-	-
AU23	+	+	-	-	-
AU29	+	+	-	-	-
AU32	-	+	-	-	-
AU33	+	+	-	-	-
AU34	+	+	-	-	-
AU40	+	+	-	-	-
AU41	+	+	-	-	-

(+) Las cepas crecieron en este medio; (-) Las cepas no crecieron en este medio.
 AB: Pacientes; AN: Neonatal; AU: Terapia Intensiva.

TABLA 7. Control de fenotipo de las cepas donantes (*S. maltophilia*) y de la receptora para los ensayos de conjugación.

MEDIO		LB	
CEPA	AMK	RIF	RIF/AMK
J62-2	-	+	-
SB1	+	-	-
SB2	+	-	-
SB3	+	-	-
SB4	+	-	-
SB5	+	-	-
SB6	+	-	-
SB7	+	-	-
SN1	+	-	-
SU1	+	-	-
SU2	+	-	-
SU3	+	-	-
SU4	+	-	-
SU5	+	-	-
SU6	+	-	-
SU7	+	-	-

(+) Las cepas crecieron en este medio; (-) Las cepas no crecieron en este medio.
 SB: Pacientes; SN: Neonatal; SU: Terapia Intensiva.

En la tabla 6 se observa que 100% de las cepas de *A. baumannii* son resistentes a AMP, y 100% sensibles a RIF. La cepa receptora mostró 100% resistencia a RIF y 100% sensibilidad tanto a AMP como a TET. En la tabla 7 se muestra que 100% de las cepas de *S. maltophilia* fueron resistentes a AMK y a RIF, la cepa receptora mostró 100% resistencia a AMK y fue 100% sensible a RIF. Estos resultados nos permitieron determinar los marcadores a utilizar para los ensayos de conjugación. Todas las cepas, tanto donantes como receptora, fueron 100% sensibles a los medios de selección de las cepas transconjugantes, a excepción de la cepa AB13 la cual fue eliminada de estos ensayos por presentar resistencia a los medios de selección de las cepas transconjugantes.

En la tabla 8, se muestran los resultados obtenidos al utilizar otros medios para determinar otras características de las cepas donantes y receptora, como lo son la utilización de la lactosa y el crecimiento en MM. Todos estos fenotipos nos permitirían verificar posteriormente el correcto fenotipo de las transconjugantes, y así determinar si realmente se realizó el proceso de transferencia de material genético de la cepa donante a la receptora eficientemente.

TABLA 8. Crecimiento de las cepas donantes y receptora, empleando lactosa como fuente de carbono y crecimiento en MM.

MEDIO CEPA (<i>A. baumannii</i>)	Mac Conkey (Lac)	Medio Mineral	MEDIO CEPA (<i>S. maltophilia</i>)	Mac Conkey (Lac)	Medio Mineral
J62-2	–	–	SB1	–	+
AB1	–	+	SB2	–	+
AB2	–	+	SB3	–	+
AB3	–	+	SB4	–	+
AB4	–	+	SB5	–	–
AB7	–	+	SB6	–	+
AB8	–	+	SB7	–	+
AB9	–	+	SN1	–	+
AB11	–	+	SU1	–	+
AB12	–	+	SU2	–	+
AB13	+	+	SU3	–	+
AB15	+	+	SU4	+	–
AB16	–	+	SU5	–	+
AN2	–	+	SU6	–	+
AN3	–	+	SU7	–	+
AN5	–	+			
AN12	–	+			
AN17	–	+			
AU3	–	+			
AU13	–	+			
AU14	–	+			
AU16	–	+			
AU23	–	+			
AU29	–	+			
AU32	–	+			
AU33	–	+			
AU34	–	+			
AU40	–	+			
AU41	–	+			

(+) Las cepas utilizaron Lac como fuente de carbono y/o crecieron en este medio (–) Las cepas no emplean Lac como fuente de carbono y/o no crecieron en este medio. AB: Pacientes; AN: Neonatal; AU: Terapia Intensiva. SB: Pacientes; SN: Neonatal; SU: Terapia Intensiva.

Se obtuvo que el 92% de las cepas donantes de *A. baumannii* no fermentaron la lactosa y que 100% de estas cepas fueron capaces de producir los aminoácidos necesarios para su crecimiento debido a que crecieron en medio MM en ausencia de aminoácidos. El 96% de las cepas de *S. maltophilia* no fermentaron la lactosa y 100% de estas cepas crecieron en el medio MM al igual que las cepas de *A. baumannii*.

La cepa receptora exhibió las características reportadas por el CVCM, ya que no fermenta la lactosa y es incapaz de crecer en MM sin histidina, prolina y triptofano como aminoácidos suplementados en el MM.

Estos resultados nos permiten diferenciar transconjugantes de mutantes espontáneas para la resistencia a Rifampicina.

7.3.- Proceso de Conjugación

7.3.1.- *Acinetobacter baumannii*

Las 25 cepas de *A. baumannii* resistentes tanto a AMP como a TET, provenientes de diversos ambientes del HUC, fueron utilizadas como donantes para los ensayos de conjugación, tanto en medio líquido como en medio sólido. Se emplearon diferentes medios de selección para las cepas transconjugantes que permitirían determinar si la resistencia tanto a AMP ó a TET, pudieran ser transferidas a través de moléculas plasmídicas. Sin embargo, una de las cepas (AB13) debió ser eliminada de los ensayos de conjugación ya que presentó resistencia además a RIF, el cual es el marcador de la cepa receptora. Esto nos impediría determinar si realmente tendríamos transconjugantes en los ensayos con esta cepa. En total se realizaron mas de 104 ensayos de conjugación utilizando *A. baumannii* como donante.

Los resultados obtenidos tanto en medio líquido como en medio sólido, seleccionando con dos marcadores, demuestran que ninguna de ellas logró transferir información genética a la cepa receptora *E. coli* J62-2, en las condiciones ensayadas en el laboratorio. Los controles utilizados para estos ensayos fueron placas de LB suplementadas con TET/AMP/RIF, RIF/AMP y RIF/TET. Estos marcadores nos permitirían determinar si la

transferencia de moléculas plasmídicas que portaban genes de resistencia, llevaron consigo solo la resistencia a TET o a AMP, o que ambas resistencias fueron transferidas juntas. También se realizaron ensayos de conjugación con cepas obtenidas previamente en el laboratorio que habían logrado transferir su material genético hacia la cepa receptora. Estos experimentos fueron utilizados como control positivo para nuestros ensayos de conjugación.

Debido a estos resultados negativos con todas las condiciones ensayadas para transferir material genético por conjugación, se iniciaron ensayos de transformación, utilizando como célula receptora *E. coli* DH10B, la cual fue tratada con CaCl_2 para lograr un estado de competencia. Se empleó Estreptomicina como marcador de selección de la cepa receptora. Se aisló el ADN plasmídico de las bacterias donantes, y posteriormente se realizaron ensayos de transformación con el ADN plasmídico aislado de 25 cepas de *A. baumannii*, y empleando como marcadores de la donante, los antibióticos AMP y TET. El ADN de estas cepas no fue capaz de transformar a *E. coli*, en las condiciones ensayadas en el laboratorio. El control utilizado para estos ensayos de transformación fue ADN de una cepa que logró transformar en estas células, y que nos permitió determinar si las células DH10B se encontraban realmente competentes para recibir ADN foráneo.

7.3.2.- *Stenotrophomonas maltophilia*

Se realizaron ensayos de conjugación en medio líquido y en medio sólido para 15 cepas aisladas de *S. maltophilia*. Ninguna de las cepas fue capaz de realizar la transferencia de material genético hacia la cepa receptora *E. coli* J62-2, en las condiciones ensayadas en el laboratorio.

Debido a estos resultados, también se realizaron ensayos de transformación con el ADN plasmídico aislado de estas cepas, obteniéndose que no fueron capaces de transformar a la cepa receptora DH10B. En algunos casos hubo crecimiento de colonias en las placas de selección, pero al realizarse las pruebas fenotípicas correspondientes fueron descartadas por no ser *E. coli*.

Se han reportado trabajos en los cuales se indica que bacterias de los géneros en estudio tienen la capacidad de transformar su ADN en cepas competentes de *E. coli*. Nuestros resultados muestran que el ADN purificado de los aislados de *S. maltophilia* resultó incapaz de promover la transformación en cepas competentes, en las condiciones ensayadas en el laboratorio.

7.4.- Aislamiento de ADN plasmídico de cepas donantes

Debido a estos resultados, en los cuales ninguna de las cepas aisladas fue capaz de transferir su ADN a células *E. coli*, y considerando que el objetivo principal de este trabajo es la caracterización de los plásmidos, se procedió a realizar el aislamiento del material plasmídico que pudiera estar presente en estas bacterias, mediante el método modificado de lisis alcalina, para realizar

la posterior caracterización de los plásmidos utilizando enzimas de restricción *EcoRI* y *Bam* HI.

En las cepas en estudio nunca se logró obtener un buen rendimiento del ADN plasmídico utilizando el método estandarizado previamente en el laboratorio. Quizás esto fue debido a que las cepas poseen una cápsula polisacárida en la envoltura externa, y entonces se decidió añadir lisozima en la solución I, con el propósito de degradar los polisacáridos. Con esta modificación se logró aumentar la eficiencia y la calidad del ADN plasmídico purificado. Sin embargo, para algunas cepas en las cuales fue imposible obtener un mayor rendimiento y eficiencia del ADN plasmídico aislado.

7.4.1.- *Acinetobacter baumannii*

En las próximas figuras se presentan los registros fotográficos de los aislamientos plasmídicos de cada una de las cepas de *A. baumannii*, de acuerdo al lugar de su procedencia. La figura 9 y 10 muestran el aislamiento plasmídico de las cepas aisladas de pacientes de la UCI. Se observa que estas cepas, tienen al menos, un plásmido de alto peso molecular y además moléculas plasmídicas de tamaño variable.

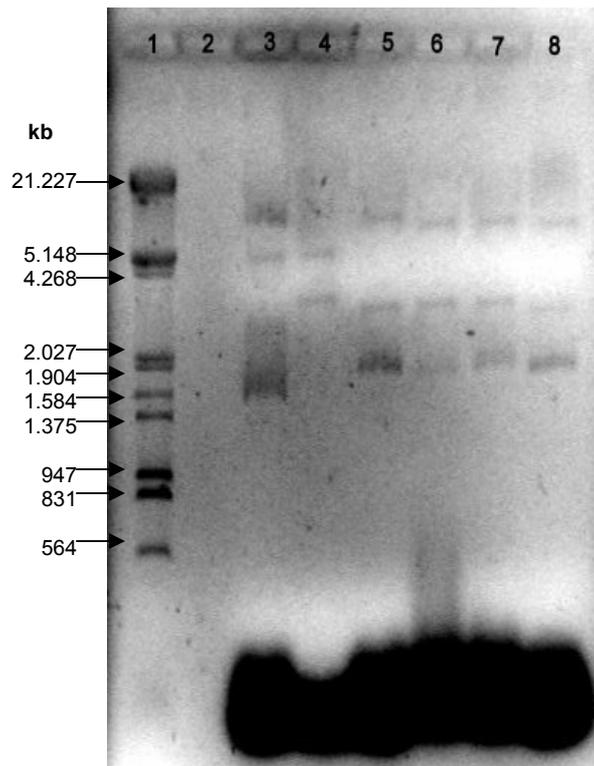


Figura 9. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de *A. baumannii* aisladas de pacientes de la UCI. Carril 1: marcador de peso, carril 2: J62-2, carril 3: AB1, carril 4: AB2, carril 5: AB11, carril 6: AB12, carril 7: AB15, carril 8: AB16.

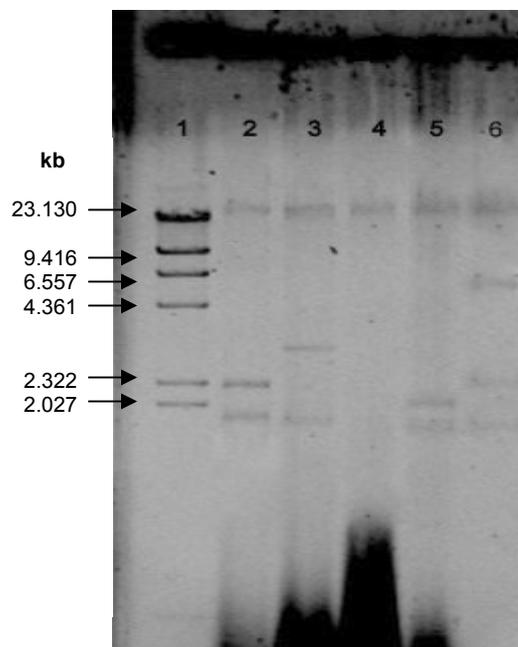


Figura 10. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de *A. baumannii* aisladas de pacientes de la UCI. Carril 1: marcador de peso, carril 2: AB3, carril 3: AB4, carril 4: AB7, carril 5: AB8, carril 6: AB9.

En la figura 11, se muestra el aislamiento plasmídico de las cepas de *A. baumannii* aisladas de ambientes de la UCI. En la figura se observa que estas cepas presentan número variable de moléculas plasmídicas, siempre con un plásmido de alto peso molecular.

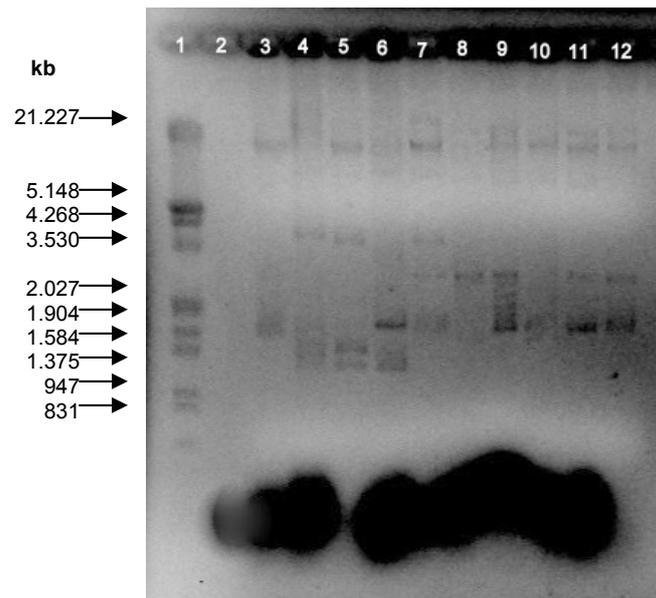


Figura 11. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de *A. baumannii* aisladas del ambiente de la UCI. Carril 1: marcador de peso, carril 2: J62-2, carril 3: AU13, carril 4: AU14, carril 5: AU16, carril 6: AU21, carril 7: AU29, carril 8: AU32, carril 9: AU33, carril 10: AU34, carril 11: AU40, carril 12: AU41.

En la figura 12, se muestra el aislamiento plasmídico de las cepas de *A. baumannii* aisladas del servicio de Neonatología. Estas cepas presentan un número bajo de moléculas plasmídicas. Sin embargo, todas presentan como mínimo, una molécula plasmídica de alto peso molecular al igual que los aislamientos anteriores en las figuras (9, 10 y 11).

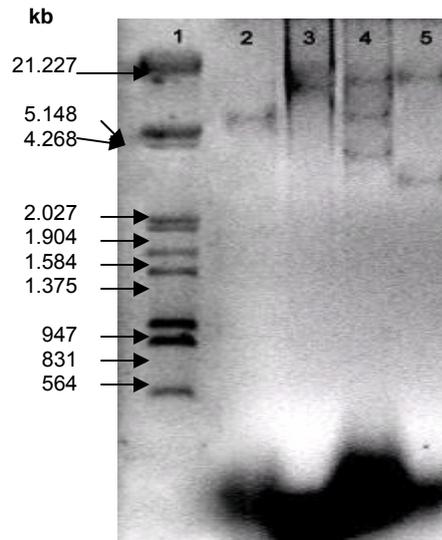


Figura 12. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de *A. baumannii* aisladas del Servicio de Neonatología. Carril 1: marcador de peso, carril 2: AN2, carril 3: AN3, carril 4: AN5, carril 5: AN17.

7.4.2.- *Stenotrophomonas maltophilia*

La figura 13 ilustra el aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas de *S. maltophilia* aisladas de ambiente de la UCI. Todas las cepas presentan al menos una molécula de alto peso molecular, además de moléculas de tamaño variable.

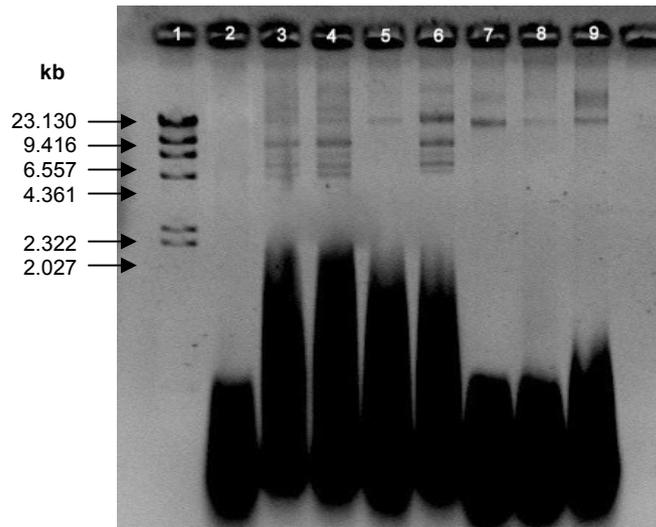


Figura 13. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídico de las cepas donantes de *S. maltophilia* aisladas del ambiente de la UCI. Carril 1: marcador de peso, carril 2: J62-2, carril 3: SU1, carril 4: SU2, carril 5: SU3, carril 6: SU4, carril 7: SU5, carril 8: SU6, carril 9: SU7.

En la figura 14, se presenta el aislamiento plasmídico de las cepas de *S. maltophilia* aisladas de los pacientes de la UCI, y además una cepa aislada del servicio de Neonatología. En la figura se muestra que estas cepas presentan moléculas plasmídicas de alto peso molecular.

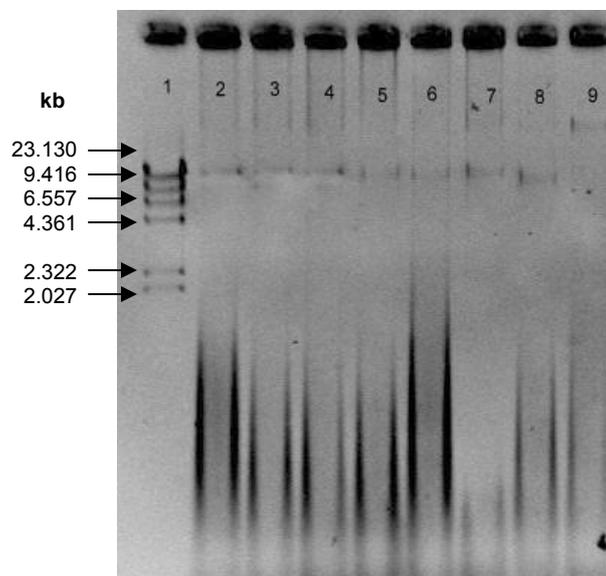


Figura 14. Registro fotográfico del aislamiento de las moléculas plasmídicas de las cepas donantes de *S. maltophilia* aisladas de pacientes de la UCI, y una cepa aislada del servicio de Neonatología (SN1). Carril 1: marcador de peso, carril 2: SB1, carril 3: SB2, carril 4: SB3, carril 5: SB4, carril 6: SB5, carril 7: SB7, carril 8: SN1.

Los resultados del aislamiento del DNA plasmídico de todas las cepas donantes por lisis alcalina, permitieron comprobar la presencia de al menos,

una molécula plasmídica de alto peso molecular en las distintas cepas estudiadas.

7.5.- Digestión con Enzimas de Restricción

Luego de realizar el aislamiento del DNA plasmídico de todas las cepas, se procedió a tratar el ADN aislado de las cepas donantes, tanto de *A. baumannii* como de *S. maltophilia*, con EcoRI y BamHI

7.5.1.- *Acinetobacter baumannii*

En la figura 15, se muestra el patrón de digestión de los aislamientos plasmídicos de dos cepas aisladas de los pacientes de la UCI, utilizando dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *BamHI*). Se observa que estos aislados plasmídicos presentan un patrón de digestión muy diferente, con las dos enzimas utilizadas, lo que indica que estas cepas bacterianas no presentan plásmidos en común.

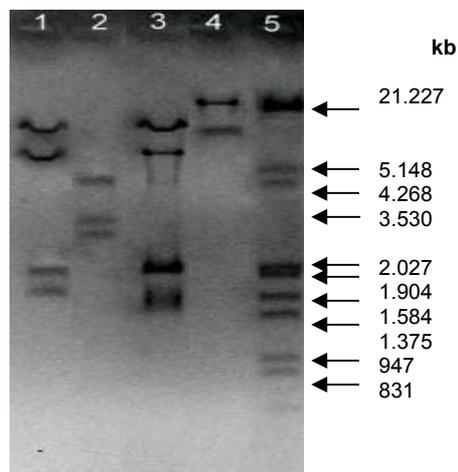


Figura 15. Registro fotográfico del patrón de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas de pacientes de la UCI. Carril 1: AB1/EcoRI, Carril 2: AB2/EcoRI, Carril 3: AB1/BamHI, Carril 4: AB2/BamHI, Carril 5: Marcador de peso.

En la figura 16, se muestra el patrón de digestión de los aislados plasmídicos del resto de cepas aisladas de pacientes de la UCI con la enzima

*Bam*HI. Se observan distintos patrones de bandas para distintos aislados, a excepción de las cepas correspondientes a los carriles 6, 7 y 8 (AB12, AB15 y AB16, respectivamente), en los cuales se observa el mismo patrón de bandas con esta enzima.

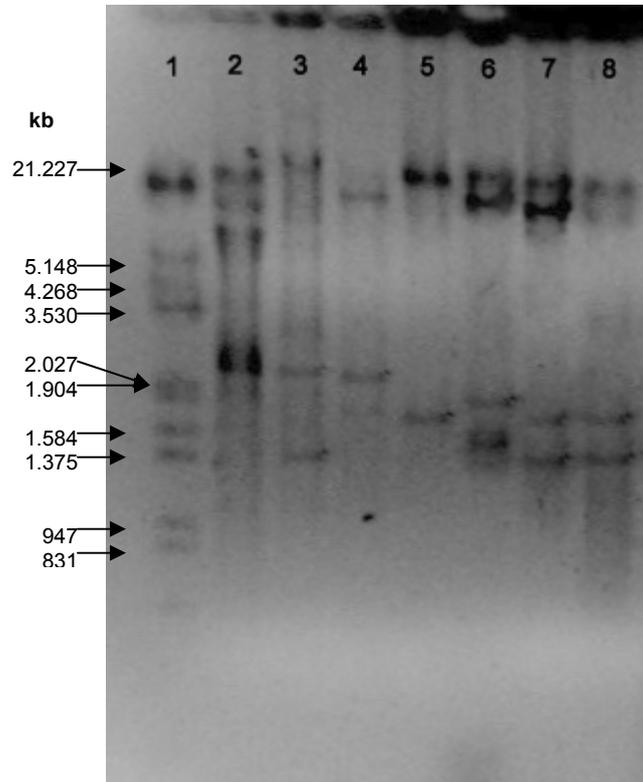


Figura 16. Registro fotográfico del patrón de restricción con las enzima *Bam*HI de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas de pacientes de la UCI. Carril 1: marcador de peso, Carril 2: AB3, Carril 3: AB4, Carril 4: AB7, Carril 5: AB11, carril 6: AB12, carril 7: AB15, carril 8: AB16.

En la figura 17, se muestra el patrón de digestión de los aislados plasmídicos del resto de las cepas aisladas de los pacientes de la UCI. En esta imagen se observa que los patrones de digestión son distintos entre algunos aislados, no obstante los aislados de los carriles 6, 7 y 8 (AB12, AB15 y AB16) presentan un mismo patrón de digestión con esta enzima (*Eco*RI), al igual que lo presentaron en la figura 16 con la enzima *Bam*HI. Esto nos indica que estas cepas comparten el mismo plásmido.

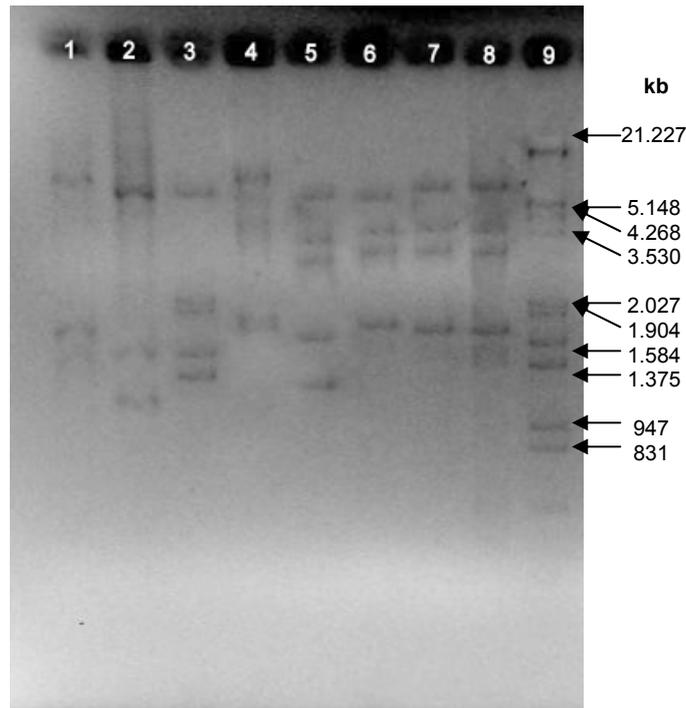


Figura 17. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *EcoRI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas de pacientes de la UCI. Carril 1: AB4, Carril 2: AB7, Carril 3: AB8, Carril 4: AB9, Carril 5: AB11, carril 6: AB12, carril 7: AB15, carril 8: AB16, carril 9: marcador de peso.

En la figura 18, se muestra el patrón de digestión con las dos enzimas de algunos aislados plasmídicos de las cepas aisladas del ambiente de la UCI. En esta figura se observa que los aislados presentan una patrón de restricción variable entre ellas, sin embargo en los carriles 2, 9 y 3, 10 (AU14, AU16 respectivamente) se observa el mismo patrón de bandas con ambas enzimas. Esto indica que estas cepas portan la misma molécula plasmídica.

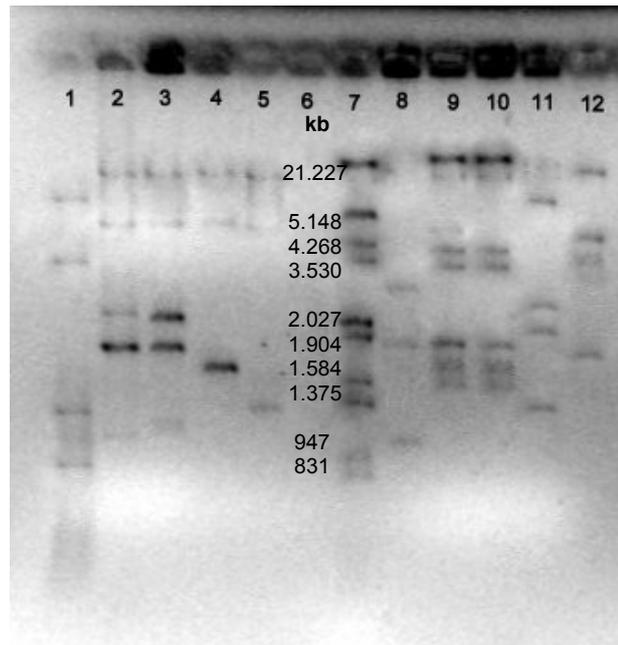


Figura 18. Registro fotográfico del patrón de restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas del ambiente de la UCI. Carril 1: AU13/*EcoRI*, Carril 2: AU14/*EcoRI*, Carril 3: AU16/*EcoRI*, Carril 4: AU21/*EcoRI*, Carril 5: AU29/*EcoRI*, carril 7 : marcador de peso, carril 8: AU13/*BamHI*, carril 9: AU14/*BamHI*, carril 10: AU16/*BamHI*, carril 11 : AU21/*BamHI*, carril 12 : AU29/*BamHI*.

En la figura 19, se muestra el patrón de digestión con la enzima *BamHI* de otros aislados plasmídicos de las cepas aisladas del ambiente de la UCI. En esta figura se observa que en los carriles 3 y 4 (AU34 y AU40, respectivamente), que estos aislados presentan un mismo patrón de digestión.

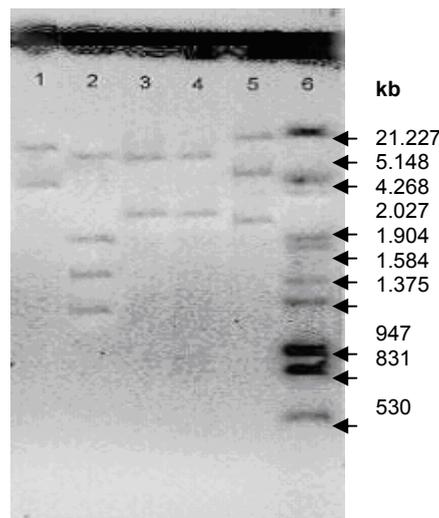


Figura 19. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *BamHI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas del ambiente de la UCI. Carril 1: AU32, Carril 2: AU33, Carril 3: AU34, Carril 4: AU40, Carril 5: AU41 carril 6: marcador de peso.

En la figura 20 se observa el patrón de digestión con la enzima *EcoRI* de los aislados plasmídicos de las cepas aisladas del ambiente de la UCI. En esta figura se observa que ninguna de las cepas poseen plásmidos en común, debido a que no presentan un patrón similar con ninguna de las dos enzimas empleadas.

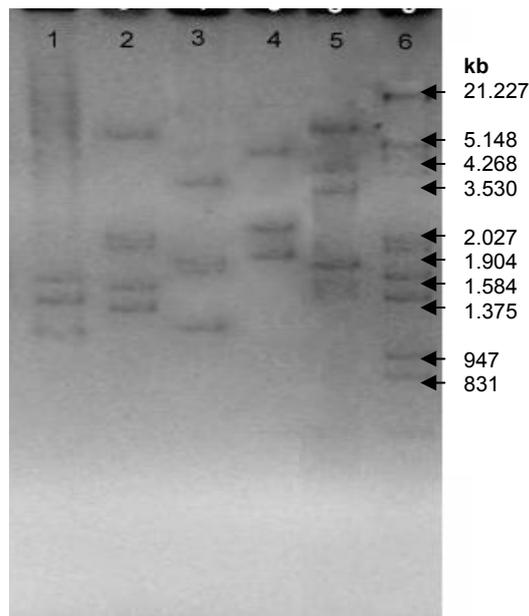


Figura 20. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *EcoRI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas del ambiente de la UCI. Carril 1: AU32, Carril 2: AU33, Carril 3: AU34, Carril 4: AU40, Carril 5: AU41 carril 6: marcador de peso.

En la figura 21 se muestra el patrón de digestión de los aislados plasmídicos de las cepas aisladas del servicio de Neonatología. En la figura se observa que ninguna de estas cepas poseen plásmidos en común debido a que su patrón de restricción es muy diverso.

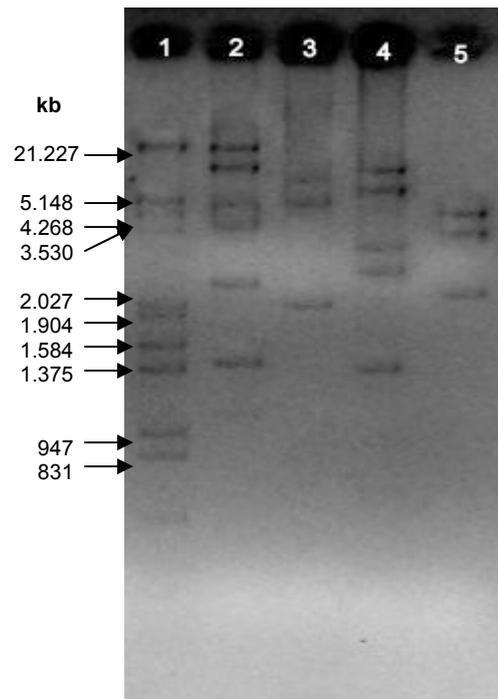


Figura 21. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *Bam*HI de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas del servicio de Neonatología. Carril 1: Marcador de peso molecular Lambda Hind III/EcoR1, Carril 2: AN2, Carril 3: AN3, Carril 4: AN5, Carril 5: AN17.

En la figura 22 se muestra el patrón de digestión con la enzima *Eco*RI de los aislados plasmídicos de las cepas aisladas del servicio de Neonatología. La figura muestra que estas cepas presentan un patrón de digestión muy diferente entre ellas, lo que nos indica que no poseen ningún plásmido en común, a pesar de que en algunos casos presentaban similitud en bandas con la digestión de la enzima *Bam*HI (figura 21). Al presentar diferencias en el patrón con las dos bandas se puede determinar que ninguna de estas cepas comparten un mismo plásmido.

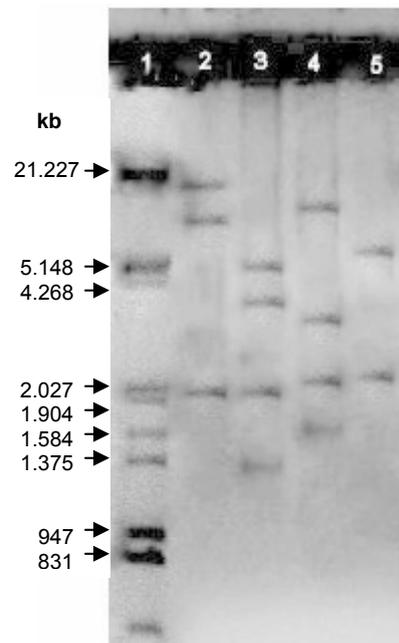


Figura 22. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *EcoRI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *A. baumannii*, aisladas del servicio de Neonatología. Carril 1: Marcador de peso, Carril 2: AN2, Carril 3: AN3, Carril 4: AN5, Carril 5: AN17.

7.5.2.- *Stenotrophomonas maltophilia*

En las siguientes figuras se mostrarán los patrones de digestión de cada uno de los aislados plasmídicos de las cepas de *S. maltophilia* aisladas de distintos lugares del HUC.

En la figura 23, se muestra el patrón de digestión con la enzima *EcoRI* de los aislados plasmídicos de las cepas aisladas del ambiente de la UCI. En esta figura se observa que los aislados poseen un patrón de digestión variable con esta enzima, sin embargo en los carriles 6, 7 y 8 (SU5, SU6 y SU7), se muestra que estas cepas podrían presentar un mismo plásmido debido a que su patrón de digestión con esta enzima es el mismo.

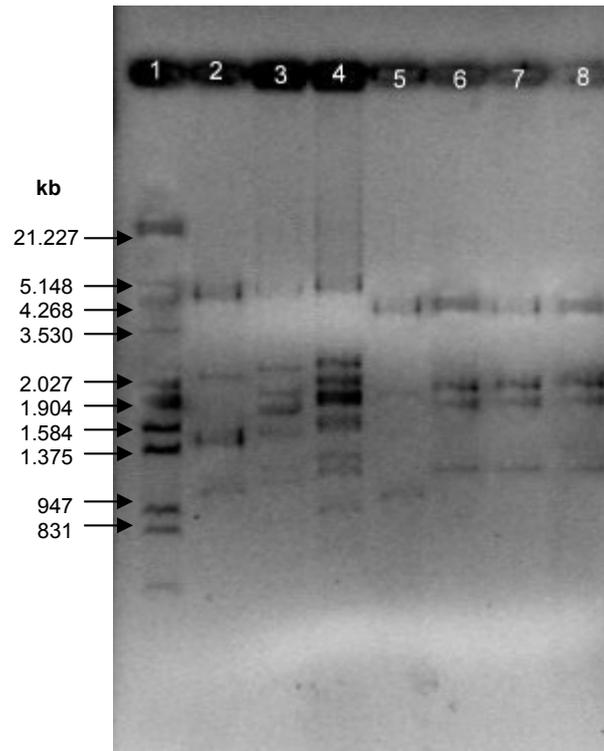


Figura 23. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *EcoRI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *S. maltophilia*, aisladas del ambiente de la UCI. carril 1: marcador de peso, Carril 2: SU1, Carril 3: SU2, Carril 4: SU3, Carril 5: SU4, Carril 6: SU5, carril 7: SU6, carril 8: SU7.

En la figura 24 se muestra el patrón de digestión con la enzima *BamHI* de los aislamientos plasmídicos de las cepas aisladas del ambiente de la UCI. Se observa que cada aislamiento presentan un patrón distinto, coincidiendo solo en una banda algunos de los aislados. Esto nos indica que ninguno de estos plásmidos están relacionados, y así descartando las posibles relaciones sugeridas por el patrón con *EcoRI*.

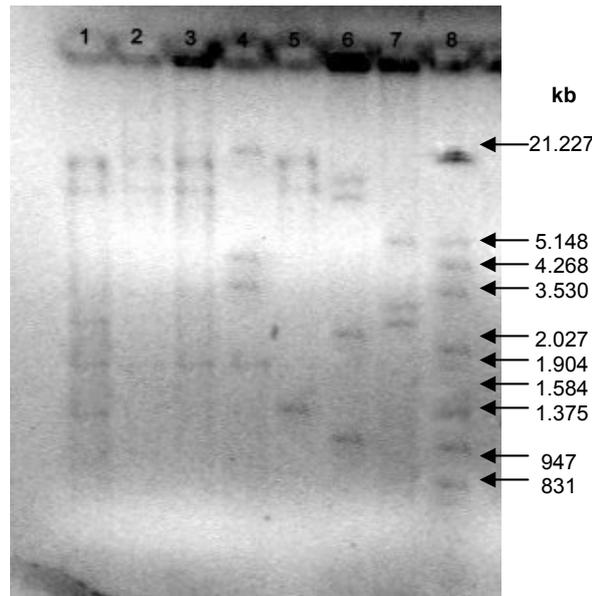


Figura 24. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *Bam*HI de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *S. maltophilia*, aisladas del ambiente de la UCI, Carril 1: SU1, Carril 2: SU2, Carril 3: SU3, Carril 4: SU4, Carril 5: SU5, carril 6: SU6, carril 7: SU7, carril 8: marcador de peso.

En la figura 25 se muestra el patrón de digestión con la enzima *Eco*RI obtenido para los aislamientos plasmídicos de las cepas aisladas de los pacientes de la UCI, además de un aislamiento plasmídico proveniente de una cepa aislada del Servicio de Neonatología (carril 7). En esta figura se observa que no todos los aislamientos plasmídicos pudieron ser digeridos con las enzimas restricción. Se realizaron varias digestiones pero no se obtuvo un resultado satisfactorio con estos aislados mostrados en los carriles 5, 6 y 7 (SB4, SB5 y SB7 respectivamente), esto pudo deberse a una degradación del ADN y no a que no ocurrió la digestión. La cepa SB6 fue excluida del estudio debido a complicaciones para su recuperación.

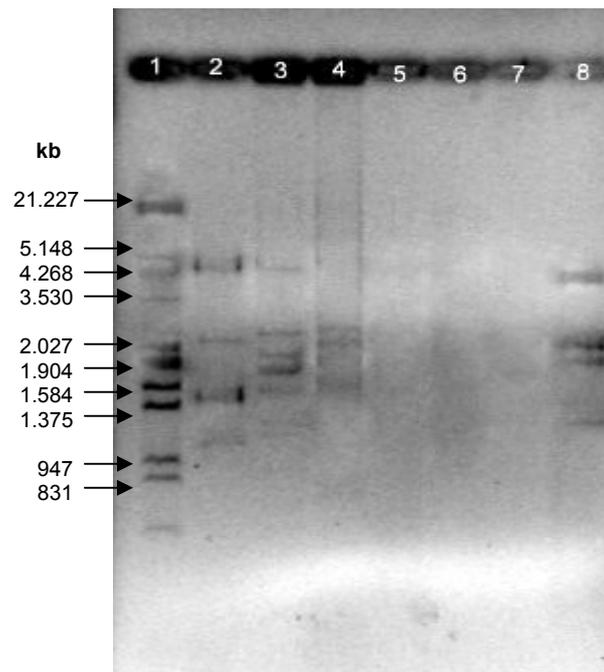


Figura 25. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *EcoRI* de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *S. maltophilia*, aisladas de pacientes de la UCI, y una cepa aislada del servicio de Neonatología (SN1). carril 1: marcador de peso, carril 2: SB1, carril 3: SB2, carril 4: SB3, carril 5: SB4, carril 6: SB5, carril 7: SB7, carril 8: SN1.

En la figura 26 se observa el patrón de digestión con la enzima *BamHI* de los aislados plasmídicos de las cepas provenientes de los pacientes de la UCI, y además un aislado plasmídico de una cepa proveniente del Servicio de Neonatología (carril 7). En esta figura se muestra al igual que en la figura 24, que los aislados de los carriles 4, 5 y 6 (SB4, SB5 y SB7) no pudieron ser digeridos tampoco por esta enzima. El resto de los aislados muestran un patrón de digestión diverso lo que nos indica que no comparten ninguna molécula plasmídica.

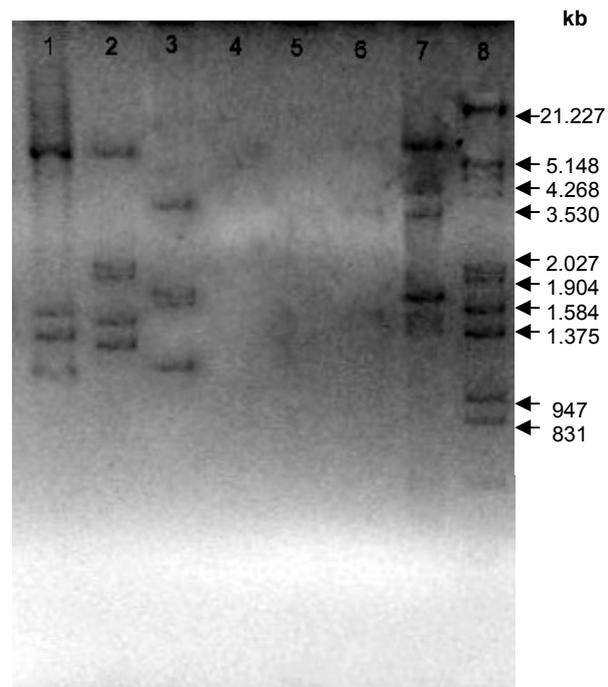


Figura 26. Registro fotográfico del patrón de restricción con la enzima *Bam*HI de las moléculas plasmídicas aisladas de las cepas donantes de *S. maltophilia*, aisladas de pacientes de la UCI, y una cepa aislada del servicio de Neonatología (SN1). carril 1: SB1, carril 2: SB2, carril 3: SB3, carril 4: SB4, carril 5: SB5, carril 6: SB7, carril 7: SN1, carril 8: marcador de peso.

8.-DISCUSIÓN

Las infecciones nosocomiales, son un problema de salud pública a nivel mundial en las diversas áreas de los hospitales, especialmente en las áreas de cuidados intensivos. La introducción constante de nuevos antibióticos, junto con la subsiguiente selección de nuevos mecanismos de resistencia, ocasiona un problema grave a la hora de tratar pacientes con infecciones nosocomiales.

Entre los factores que favorecen la colonización bacteriana en el hombre se destacan: el estado físico del individuo, la edad, la estancia hospitalaria y la administración de antimicrobianos. Existen otros factores propios del ambiente hospitalario, que deberían ser mas fáciles de controlar, tales como desinfección de las áreas de hospitalización, de catéter e instrumentos, limpieza de vestimenta y manos del personal, entre otros (Guzmán, 2006).

A. baumannii y *S. maltophilia* son patógenos nosocomiales emergentes importantes, especialmente en las áreas de Cuidados Intensivos, debido a su potencial de causar dificultades en el tratamiento de infecciones nosocomiales, en particular *A. baumannii*, organismo que cada vez se asocia mas como causa emergente de las infecciones. *S. maltophilia* fue considerado en el pasado como un patógeno oportunista, pero su tasa de aislamiento de pacientes ha aumentado y las infecciones que causa son en la actualidad difíciles de tratar, ya que presentan resistencia intrínseca a muchos antibióticos de amplio espectro (Barchitta y col., 2009).

En los últimos años se ha reportado un cambio significativo en la multirresistencia de estos patógenos, los cuales exhiben resistencia a la mayoría de los antibióticos de uso clínico actual.

En el ambiente de la UCI, se reportó que *A. baumannii* y *S. maltophilia* son el segundo y tercer patógeno mayormente encontrado en esta área, respectivamente (Chalbaud y Alonso, 2008).

A. baumannii fue aislado en mayor proporción del mesón, las jaboneras, y las varadas de las camas en la UCI del HUC (Moncada y Rahn, 2007). Estos resultados pueden deberse a que estos microorganismos poseen gran capacidad para fijarse y sobrevivir durante largos períodos de tiempo en diversas superficies. Estudios previos han revelado que *A. baumannii* puede ser hallado en múltiples medios animados e inanimados, como los que se encuentran en el ambiente hospitalario (Bergogne-Berezin y col., 1980). Estos antecedentes se relacionan con la frecuencia con la que se aisló este patógeno de los diferentes lugares de muestreo en este estudio.

Está ampliamente demostrado que el uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos ha ejercido un efecto selectivo sobre las poblaciones bacterianas resistentes, causando serias limitaciones en su aplicación para el control de las infecciones en las áreas de la UCI (Pedroza y col., 2002).

Diversos reportes demuestran que los focos de infecciones de estos microorganismos se encuentran en el medio ambiente hospitalario. Así mismo, se ha sugerido que las principales vías de diseminación son el personal de salud, el instrumental y/o los equipos empleados en las áreas del hospital.

En los centros hospitalarios nacionales, en especial en el Hospital Universitario de Caracas, se ha reportado que la Unidad de Cuidados Intensivos es el área con mayor incidencia de infecciones hospitalarias (30%), seguida de los servicios de Neonatal, Cirugía y Medicina Interna (Moncada y Rahn, 2007).

Cada vez más *A. baumannii* se encuentra asociada con mayor frecuencia a infecciones adquiridas en el hospital. En nuestro estudio, la mayor parte de las infecciones por *A. baumannii* ocurrieron en las Unidades de Cuidados Intensivos. Desde hace 22 años en el Hospital Universitario de Caracas, este bacilo sigue representando el principal problema en la sensibilidad antimicrobiana de las bacterias aisladas en el Hospital y continúa siendo un agente etiológico de relevancia en las infecciones nosocomiales de los servicios de Terapia Intensiva, Traumatología y Medicina. Este microorganismo no es considerado un patógeno emergente ni reemergente, sino una bacteria con gran resistencia antimicrobiana (Navarro y col., 2005).

En el 2007, Moncada y Rahn, realizaron un estudio con cepas tanto de *Pseudomonas aeruginosa* como de *Acinetobacter baumannii* procedentes de la UCI del Hospital Universitario de Caracas. Los resultados de este estudio demostraron que *A. baumannii* fue el segundo microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento en este Hospital.

Durante el año 2007, el mismo año en el cual se realizaron las diversas tomas de las cepas de este estudio, el Hospital Universitario publicó un informe en el Boletín de Infecciones Hospitalarias, en el cual se destaca que las cepas con mayor presencia en las diversas áreas del hospital eran *A. baumannii* y *S. maltophilia* (Pitteloud y col., 2007). Este boletín se enfatizó, en los altos

porcentajes de resistencia de las cepas de *A. baumannii* a todos los antibióticos de uso actual en este recinto hospitalario, lo que concuerda con nuestros resultados, en los cuales un 64% de las cepas de este género presentaron resistencia a los 15 antibióticos ensayados en este estudio.

En el 2008, Chalbaud y Alonso, estudiaron las posibles fuentes de transmisión de agentes causales de infecciones nosocomiales a partir de muestras de pacientes y de ambiente hospitalario, en la UCI y el servicio de Neonatología del Hospital Universitario de Caracas. Se encontró que el microorganismo con mayor presencia en estas áreas era *A. baumannii* seguida de *P. aeruginosa* y apareciendo por primera vez en un estudio en este hospital, cepas de *S. maltophilia*.

Diversas publicaciones sugieren el predominio de la resistencia antibiótica tanto de *A. baumannii* como de *S. maltophilia*. Una característica particular de la mayoría de las cepas aisladas en este trabajo, fue la multirresistencia a los antimicrobianos que se usan con fines terapéuticos (figura 8). La evaluación frente a 15 antibióticos de las cepas de *A. baumannii* reveló la presencia de patrones complejos de resistencia. Entre los grupos a los cuales las cepas presentaron mayor resistencia se encuentran los Beta-lactámicos, aminoglucósidos, cefalosporinas y quinolonas. En el 2008, Savov y colaboradores estudiaron aislados de *A. baumannii*, mostrando que presentaban un elevado nivel de resistencia a los diversos grupos de antibióticos utilizados en la actualidad. Al igual que en nuestro trabajo, se demostró un alto porcentaje de resistencia a beta-lactámicos, incluidas cefalosporinas de tercera generación, ceftazidima, cefotaxima y quinolonas, ya que más del 90% de las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a

ciprofloxacina y a ofloxacina, y además a los aminoglucósidos (Savov y col., 2008). Estos resultados concuerdan con los presentados por nosotros, en los cuales se establecen que de las 27 cepas de *A. baumannii* aisladas de diversas áreas del hospital, cerca del 90% presentaron multirresistencia a los diversos grupos de antibióticos utilizados actualmente en áreas clínicas. 18 de las 27 cepas aisladas presentaron resistencia a los 15 antibióticos utilizados, mientras que el resto de los aislados presentaron un patrón de resistencia de 3 a 9 de estos antibióticos.

Una característica importante de las cepas en estudio es que fueron aisladas de dos áreas del hospital. Las cepas aisladas de cada área muestran una diferencia significativa en cuanto al patrón de multirresistencia, como se muestra en la Tabla 4. Los aislados de Neonatología presentan resistencia de 3 a 5, mientras que los aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos muestran resistencia de 13 a 15 de los antibióticos probados. Estos resultados indican que no ha ocurrido la propagación de cepas multirresistentes hacia el Servicio de Neonatología del HUC.

Las cepas de *S. maltophilia*, presentan un amplio rango de sensibilidad ante Levofloxacina y SXT (Tabla 5), lo que coincide con los resultados obtenidos por Antón y colaboradores en el 2005, quienes trabajaron con cepas aisladas en la ciudad de Mérida y en el cual demostraron que las cepas de *S. maltophilia* presentaron susceptibilidad sólo a estos dos antibióticos, a pesar de los altos niveles de resistencia al resto de los antibióticos, debido a la resistencia intrínseca que muestran estas bacterias (Antón y col., 2005).

El uso continuo de los antibióticos en los hospitales y la falta de control para su uso a nivel poblacional, ha llevado a la selección de microorganismos

resistentes y, por consiguiente, a la desaparición de cepas sensibles, razón por la cual las bacterias que normalmente residen en los hospitales presentan un elevado patrón de resistencia a los diversos antibióticos. Dicha resistencia representa una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública, siendo un problema creciente en el mundo, que involucra cada día nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia (Guzmán, 2006).

Todas las cepas de nuestro estudio fueron resistentes tanto a imipenem como a meropenem (tabla 4). Estos antibióticos son utilizados en la actualidad de manera terapéutica para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *A. baumannii*. Así mismo, se debe resaltar que según los resultados de nuestro estudio, hay cepas aisladas del Servicio de Neonatología que permanecen sensibles a cefalosporinas, lo cual sugiere que pudieran tratarse dichos pacientes con estos antimicrobianos y reservar el imipenem solo para cepas que presenten resistencia a cefalosporinas.

La predominancia de la resistencia a antibióticos específicos es muy variable en diferentes países y en distintas poblaciones. Los porcentajes de las resistencias a los antibióticos muestran valores más elevados en América del Sur, España y Turquía, mientras que en Estados Unidos y Europa Central los valores suelen ser más bajos (Erb y col., 2007).

La resistencia antimicrobiana generalmente está codificada en plásmidos, los cuales tiene la potencialidad de mediar una transmisión horizontal de la resistencia, ocasionando graves problemas epidemiológicos a nivel mundial, tanto en ambientes hospitalarios como en la comunidad en general. La presencia de estos plásmidos transmisibles confiere a las bacterias propiedades que aumentan su capacidad para colonizar ambientes adversos,

favorece el intercambio genético intracelular y garantiza la diseminación horizontal de genes de resistencia a antibióticos, y de otras funciones; entre géneros distintos (Narváez y col., 2005). Se han realizado innumerables estudios a nivel nacional e internacional para el análisis de cepas bacterianas aisladas de ambientes hospitalarios que presentan plásmidos, los cuales exhiben determinantes de resistencia a diversos antibióticos. En Venezuela se han realizado algunos estudios, sobre este tema. En nuestro laboratorio en el año 2008, se analizaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de 4 recintos hospitalarios de Caracas. En este estudio se determinó que la mayoría de las cepas aisladas presentaban plásmidos de alto peso molecular, transferibles y que además presentaban resistencia a diversos antibióticos (Redondo y Alonso, 2007).

Los plásmidos son los elementos claves en la transmisión horizontal de la información genética. Son capaces de propagar rápidamente las resistencias a los antibióticos entre los miembros de una misma o diferentes especies. La transferencia de genes entre especies bacterianas relacionadas filogenéticamente es un proceso generalizado en el mundo microbiano. Además, este proceso se trata de uno de los mecanismos más importantes relacionados con la evolución de los genomas y, la aparición de nuevos caracteres dentro de una especie (Bryan, 1989).

Con el fin de documentar la presencia y tipos de plásmidos en las cepas nosocomiales de *A. baumannii* y *S. maltophilia*, realizamos el estudio de las moléculas plasmídicas presentes en las cepas analizadas en este trabajo.

El estudio del perfil plasmídico muestra que todas las cepas presentaron moléculas plasmídicas. El 100% de los aislados bacterianos presentaron, al

menos, un plásmido de elevado peso molecular y el 73 % presentó más de una molécula plasmídica (Figura 9, 10, 11 y 12). En el año 2006, Pardesi y colaboradores realizaron una investigación, para estudiar la distribución y tamaño de plásmidos, y el perfil de la resistencia a los antibióticos de genoespecies de *Acinetobacter* sp. Todos los aislados, mostraron un máximo de tres plásmidos con peso molecular de 1.5 a 40 kb. Cinco diversos tipos de plásmidos fueron reportados. Solamente ocho cepas tenían uno o dos plásmidos de bajo peso molecular, estables, además del plásmido de 40 kb encontrado en la mayoría de las cepas. Este resultado coincide con los presentados por nosotros, en los cuales se demuestra que las cepas de *Acinetobacter* presentan plásmidos de elevado peso molecular y además más de una molécula plasmídica de peso variable.

Para determinar las propiedades de movilización, se realizaron ensayos de conjugación, tanto en medio líquido como en medio sólido, y ensayos de transformación con las distintas cepas, a fin de determinar si estos plásmidos presentes en estos aislados eran transferibles por alguno de estos procesos. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que los plásmidos presentes en las cepas tanto de *A. baumannii* como *S. maltophilia*, fueron incapaces de transferir la información genética a una cepa receptora *E. coli*, ni mediante conjugación ni mediante transformación, utilizando dos marcadores distintos para cada proceso, bajo las condiciones ensayadas en el laboratorio.

En el 2000, Chu y colaboradores presentaron un trabajo en el cual identificaron una metalo-betalactamasa producida por aislados hospitalarios de *Acinetobacter* sp. Estos autores realizaron ensayos de conjugación utilizando como cepa receptora a *E. coli* K12, y los autores reportan que no hubo

transferencia de ningún tipo de resistencia a las cepas de *E. coli* K12, bajo las condiciones ensayadas por ellos. Este resultado concuerda con los obtenidos en este estudio en el cual los plásmidos presentes en las cepas de *A. baumannii* fueron incapaces de transferirse hacia la cepa receptora *E. coli*, bajo las condiciones ensayadas.

Entre los distintos problemas que pueden encontrarse en el momento de realizar ensayos de transferencia horizontal mediante técnicas tradicionales, está el hecho que éstos se basan en la capacidad de cultivar las poblaciones bacterianas (donante, receptora, transconjugante y transformante). Se sabe que la fracción cultivable de bacterias en el ambiente es menor al 1%. Es por esto que las frecuencias obtenidas mediante estudios de transferencia de genes en ambientes naturales, que se realicen con tecnologías basadas en el cultivo, pueden estar subestimadas, y probablemente sean mayores (Sorensen y col., 2005). En este estudio si se trabaja con bacterias cultivables, y aunque no se logró la transferencia plasmídica ni en los ensayos de conjugación ni en los de transformación, no podemos asegurar que estos plásmidos no son transferibles, sino que simplemente no se pudo determinar, mediante el sistema utilizado, y que tal vez se requiera de cepas receptoras y marcadores adecuados que garanticen el éxito de los experimentos.

En 1985, Chopade y colaboradores evaluaron la transferencia de plásmidos en *Acinetobacter calcoaceticus*. Estos autores demostraron la transferencia de plásmidos de cepas de *E. coli* K12 a cepas de *A. calcoaceticus*, los cuales se mantenían por poco tiempo estables en las cepas de *Acinetobacter*, y además que necesitaban la presencia de plásmidos movilizables para volver a transferirse a las cepas de *E. coli* (Chopade y col.,

1985). En nuestro estudio, no contamos con cepas de *Acinetobacter* sp. que presenten simultáneamente plásmidos tipificados provenientes de *E. coli*.

Sin embargo, en 1993, Deshpande y Chopade publicaron un trabajo en el cual establecieron como era la capacidad plasmídica de mediar la resistencia a plata en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Determinaron que las cepas de *A. baumannii* fueron capaces de transferir, como mínimo, un gen de resistencia a *E. coli* K12 mediante conjugación, con una frecuencia de 1×10^{-6} . Esta transferencia de resistencia fue mediada por un plásmido de 54 kb presente en la cepa de *A. baumannii* aislada. Este plásmido también fue transformado en cepas de *E. coli* DH5 α , pero a una baja frecuencia (Deshpande y Chopade, 1993).

En el año 2003, Jacoby y colaboradores publicaron un trabajo en el cual realizaron ensayos de conjugación utilizando cepas de *A. baumannii* como donante y como receptora cepas de *E. coli* DH5 α . Los ensayos de conjugación se realizaron en medio sólido utilizando filtros millipore. Todos las transconjugantes obtenidos de *A. baumannii* demostraron el mismo perfil plasmídico, generalmente similar al plásmido presentado por la cepa donante inicial, un plásmido de aproximadamente 66 kb. Estos autores reportaron que la transferencia del material genético de la cepa donante a la receptora se realizó a una frecuencia aproximada de $3,2 \times 10^{-4}$ (Jacoby y col., 2003).

En el año 2007, en el estado Mérida, Salazar y colaboradores publicaron un estudio molecular en el cual caracterizaron los mecanismos de resistencia a diversos antibióticos de cepas de *A. baumannii* aisladas de Unidades de Cuidados Intensivos. Demostraron que el gen para la resistencia a betalactámicos, en todos los casos, estaba situado en un integrón clase 1,

dentro de un plásmido no conjugativo de 30 kb. Los análisis de conjugación realizados por estos autores fallaron en varias ocasiones, sugiriendo su naturaleza no conjugativa (Salazar y col., 2007).

Para los ensayos de transformación en los cuales no se puede lograr la transferencia de material genético a la cepa receptora, Vílchez en el 2002 plantea que pueden existir tres posibles explicaciones a este fenómeno. En primer lugar, que los plásmidos de gran tamaño sufran durante el proceso de transformación, rupturas al azar generadas por la manipulación del material biológico. La consecuencia directa de esta ruptura pudiera ser la incapacidad del plásmido para establecerse en la célula. Aunque en un principio, cualquier plásmido es sensible a este tipo de sucesos, los plásmidos con elevado peso molecular se hacen particularmente sensibles a ruptura mecánica, por lo cual, la hipótesis planteada resulta probable. Vílchez apoyó sus hipótesis citando los reportes realizados por Shizuya y colaboradores en 1992. Estos autores encontraron que los procedimientos de transformación son menos eficientes a medida que el tamaño de la molécula plasmídica a introducir es mayor. Adicionalmente estos autores señalan que solo unas pocas cepas de *E. coli* son apropiadas para internalizar e incorporar moléculas de alto peso molecular (Shizuya y col., 1992). Se desconoce hasta el momento las características genéticas o la naturaleza de competencia para recibir por transformación ADN de alto peso molecular (Vílchez, 2002). Cabe la posibilidad que la cepa escogida para recibir los plásmidos de las cepas de *A. baumannii*, sea deficiente en esta capacidad.

Otra explicación al fenómeno de incapacidad de transformación se relaciona con la necesidad de ciertos productos proteicos para la estabilización

del plásmido en la bacteria. En muchas ocasiones, la expresión de estas proteínas se encuentran acopladas al proceso de conjugación. Está ampliamente documentado que los plásmidos conjugativos codifican sistemas de antirestricción indispensable en muchos casos para el éxito de la transferencia por conjugación. Los genes involucrados en esta función de protección se encuentran en una unidad transcripcional muy cercana al *oriT* y, cuya expresión es inducida transitoriamente durante el proceso de transferencia (Belogurov, 1993). No obstante, la cepa utilizada en este estudio para introducir los plásmidos (*E. coli* DH10), presenta mutaciones en los sistemas de restricción reportados en *E. coli*. En dicha cepa, la posibilidad de estabilización de los plásmidos debería ser mayor, ya que podría prescindir de las proteínas de protección del ADN. Sin embargo, también en el caso de las transformaciones en dicha cepa los resultados fueron negativos. Por esta razón se presume que la necesidad de productos proteicos para la protección del ADN no es la principal causa del fenotipo de incapacidad de transformación.

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, se tiene conocimiento de diversos reportes en los cuales las cepas de *S. maltophilia* y *A. baumannii* lograron la transferencia de su material genético a partir de ensayos de transformación, utilizando como cepa receptora a *E. coli*.

Entre estos reportes tenemos que en el año 2008, Patwardhan y colaboradores estudiaron patógenos nosocomiales de UCI, haciendo hincapié en *A. baumannii*. Estos autores determinaron que las cepas presentaban resistencia a más de 23 antibióticos y además fueron capaces de transferir sus plásmidos, los cuales presentaban alto peso molecular, hacia una cepa de *E.*

coli HB101, con una frecuencia de $4,3 \times 10^{-4}$ transformantes/ μg de ADN plasmídico (Patwardhan y col., 2008).

En el año 2000, Avison y colaboradores demostraron que cepas de *S. maltophilia* provenientes de aislados clínicos, tenían la capacidad de transferir plásmidos de alto peso molecular mediante ensayos de conjugación exitosos, utilizando como cepa receptora *E. coli* (Avison y col, 2000).

La caracterización de los plásmidos presentes en cepas aisladas de ambientes clínicos es un punto de particular interés en medicina, ya que este conocimiento puede contribuir al desarrollo de una quimioterapia más racional.

Para caracterizar las moléculas plasmídicas presentes en estas cepas, y determinar si se trata de la misma molécula o plásmidos diferentes, relacionados o no, se analizó el patrón de restricción de las moléculas aisladas de las cepas donantes tanto de *A. baumannii* como de *S. maltophilia*.

Entre los métodos empleados para determinar la relación existente entre diferentes moléculas de DNA, se encuentra la digestión del DNA por enzimas de restricción. Una enzima de restricción o endonucleasa de restricción, es una enzima que reconoce y corta secuencias específicas de DNA, generando fragmentos con extremos romos o extremos sobresalientes de cada cadena sencilla (Madigan y col., 1997). Una característica individual de cada molécula de DNA es su patrón de restricción, producto de la acción de una enzima de restricción. Es una característica individual, porque el patrón generado por una enzima de restricción pertenece a una y solo a una molécula de DNA, ya que las enzimas de restricción reconocen un número definido de nucleótidos específicos, que se repiten en número limitado a lo largo de la molécula de DNA. Así, se producen fragmentos de diferentes tamaños que al

separarse y visualizarse por electroforesis en geles de agarosa, produce un patrón de bandas específico que identifica a cada molécula de DNA (Madigan y col., 1997). El análisis del patrón nos permitirá observar posibles similitudes y establecer relaciones entre plásmidos de diferente origen (Toba, 2000).

Los plásmidos presentes en las cepas tanto de *A. baumannii* como *S. maltophilia* parecen no encontrarse relacionados entre sí, ya que se obtuvieron patrones de restricción diferentes entre las cepas. Sin embargo, tres cepas de *A. baumannii* (AB12, AB15 y AB16) presentaron similitud en sus patrones de digestión con ambas enzimas (figuras 16 y 17), lo que sugiere que podría tratarse de un mismo plásmido, que se encuentra diseminado en el área de la UCI. Los pacientes de los cuales se aislaron dichas cepas se encontraban en camas separadas dentro de la unidad, y además las muestras se tomaron en meses distintos, lo que nos indica que el plásmido está persistiendo en el tiempo y diseminándose en esta área. No obstante estos resultados, los datos obtenidos con el resto de las cepas sugieren que existe una gran diversidad de moléculas plasmídicas diferentes circulando en las cepas tanto de *A. baumannii* como de *S. maltophilia* responsables de infecciones nosocomiales en el Hospital Universitario de Caracas.

Cabe destacar que todos los aislados provenientes tanto de pacientes como de ambiente de la UCI, no presentaron ningún tipo de relación plasmídica, esto fue corroborado al realizar las digestiones correspondientes, en las cuales no se evidenció ninguna similitud, lo que sugiere que estas cepas provenientes de la UCI no comparten ninguna molécula plasmídica.

Nuestros resultados parecen indicar que no existe una relación entre los diferentes perfiles de restricción (diferentes plásmidos) y los patrones de resistencia a los agentes antimicrobianos.

La presencia de cepas con plásmidos con diferentes patrones de restricción en las diversas áreas del hospital, sugiere que estos plásmidos que codifican resistencia múltiple se encuentran diseminados en las diferentes secciones hospitalarias, lo que representa un problema epidemiológico grave para este recinto hospitalario.

Una característica compartida por la mayoría de las cepas tanto de *S. maltophilia* como de *A. baumannii* provenientes del Servicio de Neonatología, es que presentan un número reducido de moléculas plasmídicas, y además muestran un patrón de resistencia bajo a los diversos antibióticos ensayados en este estudio, mostrando la mayoría resistencia solo a cefalosporinas. Estas características las diferencian con las aisladas de la UCI, las cuales muestran un patrón de resistencia elevado a los antibióticos ensayados como se ha dicho anteriormente, contrario al patrón de resistencia presentado por las cepas provenientes del Servicio de Neonatología. Esto nos sugiere que aún en este hospital no ha habido una diseminación de determinantes de resistencia entre las diversas áreas, ya que los sitios seleccionados para la toma de muestras como lo son el Servicio de Neonatología y la UCI se encuentran en pisos y alas distintas del hospital.

En los ambientes hospitalarios es importante conocer las causas de la aparición de cepas resistentes a los antibióticos así como el modo de dispersión de estos agentes, para establecer medidas racionales de prevención.

Por lo anteriormente establecido, se requiere la aplicación de medidas para prevenir la presión selectiva producida por el uso excesivo de antimicrobianos, así como también, se sugiere la vigilancia epidemiológica, las recomendaciones habituales de higiene y desinfección, como lavado de manos, esterilización, uso adecuado de los desinfectantes, etc. Y la posible rotación de antimicrobianos como estrategia imprescindible.

9.- CONCLUSIONES

- 1) 18 de las 26 cepas (66 %) de *A. baumannii* aisladas en la UCI y el Servicio de Neonatología del Hospital Universitario de Caracas, presentaron resistencia a todos los antibióticos ensayados en este estudio, con mayores porcentajes de resistencia a Ampicilina, Tetraciclina y Meropenem.
- 2) 14 de las 15 cepas (93 %) de *S. maltophilia* aisladas en la UCI y el Servicio de Neonatología, presentaron un patrón de sensibilidad elevado a SXT y a Levofloxacina, y además, las 15 (100 %) cepas mostraron resistencia a la Amikacina.
- 3) Todas las cepas analizadas en este estudio, fueron incapaces de realizar la transferencia estable de su material genético a la cepa receptora (*E. coli*) ni mediante ensayos de conjugación ni mediante transformación, bajo las condiciones ensayadas en nuestro laboratorio.
- 4) Todas las cepas analizadas en este estudio contenían, al menos, una molécula plasmídica de elevado peso molecular.
- 5) La mayoría de los plásmidos presentes en las cepas estudiadas, mostraron diferentes patrones al ser tratados con enzimas de restricción, por lo que no parece existir relación entre los plásmidos.

10.- RECOMENDACIONES

-)} Proseguir con estudios de resistencia a antimicrobianos en este centro hospitalario.
-)} Plantear un programa de vigilancia epidemiológica, para establecer políticas que favorezcan la cooperación entre las autoridades y el personal en general del recinto hospitalario, y los laboratorios de investigación, para mantener medidas de control sanitario que permitan disminuir las fallas terapéuticas.
-)} Establecer un uso racional de los antibióticos en la atención primaria de una infección, empleando tratamientos empíricos únicamente cuando sea necesario y no se disponga del antibiograma.
-)} Establecer medidas de lavado y limpieza de la UCI y del personal, así como de todo el material que se encuentra dentro del mismo, para evitar la diseminación bacteriana hacia otras áreas.

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso G., Narváez P., Toba F., Gomes C., Pedroza R., Rodríguez-L V. 2001. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. Mem. Inst. Biol. Exp. **3**:93-96.
2. Alonso G., Malaver E., Guzmán M., Rodríguez-L V. 2005a. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multiresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. Mem. Inst. Biol. Exp. **4**:81-84.
3. Alonso G., Baptista K., Ngo T., Taylor D. 2005b. Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27. Microbiology. **151**: 3563-3573.
4. Amábile C., Chicurel M. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. Cell. **70**:189-199.
5. Anadiotis L., Maskell J.P., Sefton A.M 2002. Comparative in-vitro activity of penicillin alone and combined with gentamicin against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibility to penicillin. J Antimicrob Agents. **19**: 173–181.
6. Antón, D., Araque Y., De Donato M., Medina B., Marcano M. 2005. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. Kasmera. **2**: 109 -118.
7. Atlas, R. 1997. Principles of Microbiology. Wem Brown Publishers. 2nd Edition.
8. Avison, M., Heldreich, C., Higgins, C., Bennett, P., Walsh, T. 2000. A TEM-2 Betalactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of

- a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. **46**: 879- 884.
9. Barchitta M., Cipresso R., Gianquitta L., Romeo M., Denaro C., Pennisi C., Agodi A. 2009. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. Int. J Hyg. Environ Health. **212**: 330-337.
10. Belogurov, A., Delver, E., Rodzevich, O. 1993. Plasmid KM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA y ArdB) whose expresión is controlled by homologous regulatory sequences. J. Bacteriol. **175**: 4843-4850.
11. Bergogne_Berezin, E., Vieu, F., Joly M. 1980. Epidemiologie d'Acinetobacter calcoaceticus. Nouv. Press Med. **9**: 3551-3552.
12. Bradley, D., Taylor, D., Cohen, D. 1980. Specification of surface mating system among conjugative drug resistance plasmid in E. coli K-12. J. Bacteriol. **143**: 1466-1470.
13. Bryan, L. 1989. General mechanisms of resistance to antibiotic. J Antimicrob. Chemother. **22**: 1-15.
14. Brock T., Madigan M. 1993. Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Sexta edición. México.
15. Cabrera R., Ruiz J., Marco F., Oliveira I., Arroyo M., Aladueña A., Usera M.A., Jiménez De Anta M., Gascón J., Vila J. 2004. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. J Antimicrob Chemother. **48**: 3934–3939.

16. Calvo J., Martínez L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27**: 44-52.
17. Coello N., Guevara L., Rojas V. (2003). *Microbiología General: Guía de trabajos prácticos.* Unidad Docente de Genética. Facultad de Ciencias, UCV.
18. Couturier M., Bex F., Bergquist P., Mass W. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiology.* **52**:375-395
19. Cuellar L., Fernández E., Rosenthal V., Castañeda A., Rosales R., Mayorga M., Camacho L., Castillo L., Gamio Y., Arroyo A. 2008. Índices de infección y mortalidad asociados, en las unidades de cuidado intensivo de hospitales peruanos. *Pan Am J Public Health.* **38**: 1-11.
20. Chalbaud A., Alonso G. 2008. Identificación de microorganismos potencialmente patógenos en el Hospital Clínico Universitario de Caracas. *Mem. Inst. Biol. Exp.* **5**:113-116.
21. Chen, C., Liu, P., Ke, S., Wu, H., Wu, L. 2009. Investigation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a district hospital in Taiwan. *J Microbiol Infect Dis.* **63**: 394-397.
22. Chopade, B., Wise, P., Towner, K. 1985. Plasmid Transfer and Behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J Microbiol.* **131**: 2805-2811.
23. Chu, Yiu-Wai., Afzal-Shah, M., Houang, E., Palepou, M., Lyon, D., Woodford, D., Livermore, D. 2000. IMP-4, a Novel Metallo- β -Lactamase from Nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *J Antimicrob Chemother.* **45**: 710-714.

24. Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*. **42**: 73-91.
25. Deshpande L., Chopade, B. 1993. Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *BioMetals*. **7**: 49-56
26. Del Pozo L., Silva N., Valencia A., Soto J., Riveros J. C., Sacsquispe R., Calderón R., Suarez V 2001. Estudio de un brote intrahospitalario por *Salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5. *An Fac Med Univ Nac Mayor San Marcos*. 318-326. disponible en línea: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/anales/v67n4/pdf/a06v67n4.pdf> (consulta Octubre 2008).
27. Dzidic S., Bedekovic V. 2003. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin*. **6**: 519-526.
28. Eng Hwa, W., Subramaniam, G., Navaratnam, P., Sekaran, S. 2008. detection and characterization of class 1 integrons among carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. In Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect*. **42**: 54-62.
29. Erb A., Stürmer T., Marre R., Brenner H. 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal and methodological variations. *Europe J Microbiol Infect Dis*. **26**:83-90.
30. Fajardo, A., Colombet, M., Herrera, A., Verde, J., Miranda, Z. 2000. Resistencia Antimicrobiana de bacterias gram negativas en la UCI. *Med. Crit. Venez*. **16**: 22-25.

31. Gaddy J., Actis L. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*. **4**: 273-278. disponible en línea: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.09.5?journalCode=fmb>
32. Giordano, A., Varesi, P., Bertini, A., Villa, I., Dionisi, A., Venditti, M., Carfagna, P., Luzzi, I., Mancini, C., Carattol, A. 2007. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* Producing the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microbial Drug Resistance*. **13**: 38-42.
33. Guariglia V. 2006. Estudio de las propiedades conjugativas de los plásmidos presentes en aislados bacterianos de embalses venezolanos. Trabajo Especial de Grado. Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, UCV.
34. Gulcan, H., Kuzucu, C., Durmaz, R. 2004. Nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* cross-infection: Three cases in newborns. *Am. J. Infect Control*. **32**: 365-368.
35. Guzmán, M. 2006. Caracterización de los determinantes que codifican β -lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae* del servicio autónomo Hospital Universitario Antonio de Alcalá. Tesis Doctoral. Postgrado en Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
36. Guzmán M., Hugo E., López D., Redondo C., Alonso G. 2008. Epidemiología molecular de los determinantes de resistencia a los antibióticos presentes en cepas bacterianas aisladas en Venezuela. *Mem. Inst. Biol. Exp.* **5**:97-100.

37. Jacoby, G., Chow, N., Waites, K. 2003. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *J Antimicrob Chemother.* **47**: 559-562.
38. Jehl F., Chomarar M., Weber M., Gérard A., Baquero F., Cantón R. 2004. Del antibiograma a la prescripción. Éditions bioMérieux, S.A. Segunda edición. Francia.
39. Joshi, S., Litake, G., Ghole, V., Niphadkar, K. 2003. Plasmid- borne extended-spectrum β -lactamase in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol.* **52**: 1125-1127.
40. Juliet C., Fernández A. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Rev Chil Infect.* **23**: 247-248.
41. Kado, C.I. 1998. Origin and evolution of plasmid. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**: 117-126.
42. Kei-Siu L. 2002. Antibiotic: action and resistance in Gram negative bacteria. *J Microbiol Immunol Infect.* **35**: 1-11.
43. Llosa, M., Gomis, F., Coll, M., Cruz, F. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiol.* **45**: 1-8.
44. Looney W., Narita M., Mühlemann K. 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis.* **9**: 312-23.
45. Madigan M., Martinko J., Parker J. 1997. *Biology of microorganism.* Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Octava edición. México.
46. Markogiannakis H., Pachylaki N., Samara E., Kalderi M., Minettou M., Toutouza M., Toutozas K., Theodorou D., Katsaragakis S. 2009. Infections in a surgical intensive care unit of a university hospital in Greece. *Inter J Infect Dis.* **13**: 145-153

47. Muñoz-Price L., Weinstein R. 2008. Infecciones por *Acinetobacter*. N Engl J Med **358**: 1271-81.
48. Narváez P., Pedroza R., Alonso G., Rodríguez V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. **25**:29-34.
49. Navarro, P., Montero, Y., Mora, T., Villarroel, E., Rodríguez, Y., Quintero, G. 2005. Vigilancia bacteriológica de infecciones por *Acinetobacter baumannii* en un hospital universitario. Disponible en línea en: www.caibco.ucv.ve.
50. Pardesi, K., Yavankar, S., Chopade B. 2006. Plasmid distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter* genospecies from healthy skin of a tribal population in western India. Indian J Med Res. **125**: 79-88
51. Parra E., Cabrera J. 2005. Meningitis nosocomial por *Acinetobacter baumannii* en paciente con hidrocefalia obstructiva. Reporte de caso y revision. Disponible en línea: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeVeinticinco/JornadaMicrobiologia/ArchivosHTML/BC-004.pdf>.
52. Patwardhan, R., Dhakephalkar, P., Niphadkar, K., Chopade, B. 2008. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. Indian J Med Res. **128**: 178-187.
53. Pedroza R., Cuotto W., Velásquez O., Torres L., Rodríguez Lemoine V. 2002. Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* en tres centros hospitalarios. RFM. **1**: 80-82.

54. Pitteloud, J., Villarroel, E., Figueredo, A., Silva, M. 2007. Boletín de Infecciones Hospitalarias. Hospital Universitario de Caracas-Subcomisión de Infecciones Vol.19 N° 2. Enero –Marzo 2007.
55. Prescott, L.M., Harley, J.P., y Klein, D.A. 1999. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana. 4ta edición.
56. Ramos V, Y. 2006. Estudio de la incidencia de los determinantes de resistencia a los desinfectantes presentes en aislados bacterianos venezolanos. Trabajo Especial de Grado. Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, UCV.
57. Redondo C., Alonso G. 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. **27**:100-107.
58. Redondo C., Angiolillo G., Fernandes A., Fernandez S., Alonso G. 2008. Caracterización fenotípica y molecular de los plásmidos presentes en cepas bacterianas aisladas en ambientes clínicos. Mem. Inst. Biol. Exp. **5**:109-112.
59. Rivas J., Guzmán M., Redondo C., Moncada L., Rahn K., Machiste M. A., Fernández S., Alonso G. 2008. Genotipificación de cepas bacterianas aisladas de diferentes centros de salud de Venezuela. Mem. Inst. Biol. Exp. **5**:105-108.
60. Rizzolo R. K. 2006. Epidemiología molecular de los mecanismos de resistencia a telurito presentes en aislados bacterianos venezolanos. Trabajo Especial de Grado. Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, UCV.

61. Saéñz Y., Briñas L., Domínguez E., Ruiz J., Zarazaga M., Vila J., Torres C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *J Antimicrob Chemother.* **48**: 3996–4001.
62. Salazar, E., Nieves, B., Ruiz, M., Ruiz, J., Vila, J., Araque, M., Velázco E. 2007. Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isolated in Mérida, Venezuela. *Med Sci Monit.* **13**: 89-94.
63. Sambrook J., Russell D. W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition. USA.
64. Savov E., Michaylova G., Borisova M. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a major concern in the hospital setting. *Trakia J Sci.* **6**: 10-13.
65. Sorensen S., Bailey M., Hansen L., Kroer N., Wuertz S. 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature.* **3**: 700-710.
66. Shizuya, H., Birren, B., Kim, U., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 8794-8797.
67. Takahashi, A., Yomoda, S., Kobayashi, I., Okubo, T., Tsunoda, M., Iyobe, S. 2000. Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Hospital. *J Clin. Microbiol.* **38**: 526–529.
68. Toba F. (2000). Caracterización de plásmidos bacterianos de cepas aisladas del embalse Pao-Cachinche. Trabajo Especial de Grado. Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, UCV.

69. Toleran M., Bennett P., Bennett D., Jones R., Walsh R. 2007. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg Infect Dis.* **13**: 559-65.
70. Torres, L., Gagliotta, V., Torres, O., Benítez, M., Domínguez, M., Pedroza, R. 2006. β -Lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **26**: 80-88.
71. Vílchez G. (2002). Caracterización física y genética de los plásmidos prototipos del complejo de incompatibilidad H. Tesis Doctoral en Biología. Facultad de Ciencias, UCV.
72. Walker S. 2000. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. Tercera Edición. México.

Consultas en línea:

www.wikipedia.bacterial_conjugation.com (Consulta 26 de Octubre 2008)

www.wikipedia.bacterial_conjugation.com . (Consulta 4 de Noviembre 2008)

www.biotech.bioetica.org/clase29.jpg. (Consulta 6 Noviembre 2008)