



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS INACTIVANTES DE
AMINOGLUCÓSIDOS, PRESENTES EN CEPAS NOSOCOMIALES DE
Klebsiella pneumoniae
(Modalidad: investigación)

FLORANGEL DEL VALLE GUZMÁN PARRA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2009

DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS INACTIVANTES DE
AMINOGLUCÓSIDOS, PRESENTES EN CEPAS NOSOCOMIALES DE
Klebsiella pneumoniae

APROBADO POR:

Prof. Militza Guzmán
Asesora

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Muestras	8
Reactivación de cepas	8
Confirmación bacteriológica.....	8
Susceptibilidad antimicrobiana.....	9
Detección de genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	10
Análisis de los datos.....	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	25
RECOMENDACIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27
HOJA DE METADATOS	34

DEDICATORIA

A:

Elena Parra, mi madre, sin su esfuerzo y sacrificio jamás podría haber logrado este sueño.

Mis hermanos: Roddy, Mariela, Cruz Alejandro, Tivardy, Eudys y Elennys, quienes estuvieron apoyándome para alcanzar este triunfo.

Mis sobrinos: Francisco, Mirielys, Alejandro y Rodolfo, espero serviles de ejemplo para sus futuras metas.

Todos mis tíos, tías y primos, especialmente; Mirian Parra y su hijo Carlos Ramón, por su cariño, confianza y estímulo para lograr esta meta.

Enrique, por su comprensión, apoyo, cariño y amor.

Mis amigos: Bertinellys, Sophia, Mary Carmen, Eliosmar y Diana, de ustedes he recibido, entregado y compartido amor, cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTO

A:

Dios todopoderoso, por guiarme y acompañarme en todo momento, gracias Señor.

La Dra. Militza Guzmán, mi asesora, por su orientación, confianza y apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

La ilustre Universidad de Oriente, por darme la oportunidad de hacerme útil profesionalmente.

Todo el personal que trabaja en el laboratorio de Bacteriología Clínica y Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente Núcleo de Sucre.

Todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron para alcanzar este gran éxito.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipos de resistencia producidos por las diferentes enzimas aminoglucósidos acetiltransferasas (AAC).	4
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la detección de los genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos.	11
Tabla 3. Cepas de <i>K. pneumoniae</i> empleadas como control positivo de la PCR.....	12
Tabla 4. Fenotipos de susceptibilidad a los aminoglucósidos presentes en las cepas nosocomiales de <i>K. pneumoniae</i>	14
Tabla 5. Fenotipos y genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos encontrados en las cepas de <i>K. pneumoniae</i>	17

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Susceptibilidad antimicrobiana presentada por las cepas de *Klebsiella pneumoniae* a los aminoglucósidos ensayados. AN: amikacina, GM: gentamicina, Tob: tobramicina, Net: netilmicina, S: estreptomycin. 13
- Figura 2.** Productos de la amplificación de los genes codificadores de la enzima aminoglucósido adeniltransferasa ANT(3'')-Ia y ANT(2'')-Ia. A: Gen *aadA*. Línea 1 Cepa Kp24 (control positivo), líneas 2-5 cepas 02, 03, 04 y 05, líneas 6-11 cepas 07, 08, 09, 10, 11 y 12, líneas 12-13 cepa 19 y 20, línea 14 cepa *E. coli* J62-2 (control negativo). B: Gen *aadB*. Línea 1 a 8. Cepa KpM7 (control positivo), cepa 12, cepa 10, cepa 19, cepa 20, cepa 08, cepa 13 y cepa *E. coli* J62-2 (control negativo). M: marcador de peso molecular..... 14
- Figura 3.** Productos de la amplificación de los genes codificadores de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(3)-IIa y aminoglucósido fosfotransferasa APH(3')-Ia. A: Gen *aac(3)-IIa*. Línea 1 a 6. *E. coli* J62-2 (control negativo), cepa 01, cepa 12, cepa 13, cepa 14 y cepa Kp01A (control positivo). B: Gen *aph(3')-Ia* Línea 1 a 3. Cepa Kp28 (control positivo), *E. coli* J62-2 (control negativo) y cepa 14. M: marcador de peso molecular..... 15
- Figura 4.** Distribución de genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos (EIA) detectados en las cepas de *K. pneumoniae*. 16

RESUMEN

En el presente estudio se detectó la presencia de genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos en 20 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial e indicación de cultivo y antibiograma, los cuales fueron atendidos en las diferentes áreas del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en el período comprendido entre marzo 2003 y octubre 2004. A cada cepa se le determinó la susceptibilidad antimicrobiana, mediante el método de difusión del disco, siguiendo los lineamientos para enterobacterias, propuesto por el Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos. Para la detección de los genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las cepas fueron resistentes a los aminoglucósidos ensayados, el mayor porcentaje de resistencia se observó para tobramicina (100,0%), kanamicina, amikacina y gentamicina (95,0%), respectivamente, expresándose en la mayoría de las cepas los fenotipos de resistencia I o II, los cuales se caracterizan por ser resistentes a todos los aminoglucósidos (fenotipo I), a excepción de netilmicina (fenotipo II). En las cepas se encontraron la presencia de los genes *aadA* o *ant(3'')-Ia* (60,0%), *aadB* o *ant(2'')-Ia* (30,0%), *aac(3)-IIa* (20,0%) y *aph(3')-Ia* (5,0%). Siete cepas presentaron más de un gen. El alto porcentaje de resistencia a los aminoglucósidos, presentados por las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, representan un riesgo para el centro hospitalario, debido a que limita las opciones terapéuticas con este tipo de antimicrobiano.

Palabra y/o Frases Clave: *Klebsiella pneumoniae*; Enzimas Inactivantes de Aminoglucósidos (EIA); Aminoglucósidos.

INTRODUCCIÓN

El género *Klebsiella* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (aguas potables, residuales, vegetales, suelos, etc.), de allí que la especie *K. pneumoniae* sea un huésped saprófito del hombre y los animales. Normalmente, éste microorganismo se encuentra en las vías respiratorias altas, formando parte de la flora intestinal y, en ocasiones, de la piel (Gupta *et al.*, 2003).

Las bacterias del género *Klebsiella* son bacilos rectos, de 0,3 a 1,0 μm de diámetro y 0,6 a 6,0 μm de longitud. Las células se disponen individualmente, en parejas o cadenas cortas, son inmóviles, Gram negativas, capsuladas, son consideradas bacterias anaerobias facultativas, por presentar metabolismo tanto fermentativo como respiratorio, y crecen bien en casi todos los medios de cultivo (Koneman *et al.*, 2002). La temperatura óptima de crecimiento para todas las especies del género *Klebsiella* oscila entre 30 a 37°C; particularmente, *K. pneumoniae* no crece a 10°C, pero sí puede hacerlo hasta 44,5°C. Algunas cepas son lisogénicas y pueden producir bacteriocinas y/o enterotoxinas y exotoxinas (Ewing, 1986; Koo y Stein, 1986; Walia *et al.*, 1988).

K. pneumoniae no había sido considerado como una especie patógena para el hombre, sin embargo, en los últimos años, debido al uso indiscriminado de los antimicrobianos y al empleo de procedimientos diagnósticos agresivos, quizás, su papel como agente etiológico, responsable de patologías inespecíficas, ha ido en aumento, sobre todo en el ámbito nosocomial, representando una proporción significativa de las infecciones del tracto urinario, respiratorio, septicemias, meningitis e infecciones de tejidos blandos (Podschun y Ullmann, 1998; Byarugaba, 2004).

Las infecciones bacterianas causadas por *K. pneumoniae*, especialmente las cepas multiresistentes, son consideradas un problema creciente en los centros hospitalarios. La resistencia bacteriana presente en las diferentes cepas se debe, principalmente, a cambios estructurales y fisiológicos en las bacterias, los cuales, ocurren por mutaciones en un gen cromosómico o por la adquisición de un plásmido de resistencia (Gupta *et al.*, 2003).

Las cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*, generalmente, presentan variabilidad en sus patrones de resistencia, condición que es favorecida por la adquisición de genes de resistencia a los diferentes antimicrobianos de utilidad clínica. Los aminoglucósidos, son aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un aminociclitol, donde sus grupos amino, usualmente se presentan protonados y la existencia de estos sitios cargados positivamente son necesarios en la interacción que tienen con el ARN procariótico (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Kotra *et al.*, 2000).

Los aminoglucósidos constituyen un grupo de agentes antimicrobianos empleados con frecuencia en el tratamiento de las infecciones bacterianas, particularmente, en aquellas producidas por bacilos Gram negativos aeróbicos; los aminoglucósidos ejercen una acción bactericida, mediante la inhibición de la síntesis proteica (Davis, 1987; Gilbert, 2000; Kotra *et al.*, 2000), sin embargo, las bacterias pueden adquirir diversos mecanismos de resistencia contra estos, los cuales tienen como propósito alterar la proteína receptora presente en la subunidad 30S (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Kotra *et al.*, 2000).

La estreptomicina fue el primer aminoglucósido aislado, descubierta por Achatz y Waksman en 1944, a partir de una cepa de *Streptomyces griseus* (Damaso, 1990). La aparición posterior de la kanamicina y, más tarde, de la gentamicina y

tobramicina, constituyeron verdaderos avances en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram negativas (Palomino y Pachón, 2003)

En cuanto a su clasificación, los aminoglucósidos se dividen en dos grupos, según el componente aminociclitol. El grupo más numeroso lo constituye el aminoglucósido con aminociclitol, en este grupo se encuentran: estreptomina, amikacina, kanamicina, tobramicina, dibekacina, gentamicina, sisomicina, netilmicina, isepamicina, neomicina y paramomicina; el otro grupo, corresponde a el aminoglucósido sin aminociclitol, constituido hasta ahora por la espectinomicina (Palomino y Pachón, 2003).

Los procesos mediante los cuales una bacteria puede mostrar resistencia a los aminoglucósidos, incluyen, la disminución de la captación o impermeabilidad de la membrana, debido a cambios en las proteínas de membrana externa; la existencia de bombas de eflujos, que expulsan a los aminoglucósidos desde interior de la célula, antes de que éste pueda acceder a su sitio de acción; modificaciones del sitio activo, tales como, cambios mutacionales en las proteínas ribosomales o en la subunidad 16S del ARNr y metilación enzimática del ARNr, y la producción de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, el cual es el mecanismo más común de resistencia a los aminoglucósidos en enterobacterias, debido a que modifican los enlaces covalentes de los grupos aminos e hidroxilos, generando alteraciones químicas que llevan al compuesto a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos, afectando de esta manera su ingreso a la célula bacteriana (Shaw *et al.*, 1993; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Vakulenko y Mobashery, 2003; Mella *et al.*, 2004).

En las enzimas inactivantes de aminoglucósidos existen familias de enzimas cofactor-dependiente con actividad fosfotransferasa, acetiltransferasa y adeniltransferasa o nucleotidiltransferasa. La inactivación de los aminoglucósidos no

solo altera la capacidad antibacteriana, sino que también impide o retrasa la fase II de captación del aminoglucósido (Marcos, 2000; Vila y Marcos, 2002; Mella *et al.*, 2004; Shakil *et al.*, 2008).

Las EIA se dividen en tres grupos: las aminoglucósido-acetiltransferasas designadas como (AAC), las aminoglucósido-adeniltransferasas (AAD) y las aminoglucósido-fosfotransferasas (APH) (Shaw *et al.*, 1993). Las aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC) acetilan grupos aminos utilizando como cofactor la acetilcoenzima A. Entre los tipos de estas enzimas se encuentran la AAC(3)-II; AAC(6')-I; AAC(2') y AAC(3')-I. Todas ellas confieren un determinado fenotipo dependiendo de la resistencia a los aminoglucósidos (Tabla 1).

Tabla 1. Fenotipos de resistencia producidos por las diferentes enzimas aminoglucósidos acetiltransferasas (AAC).

Fenotipo	Tipo de enzima	Referencia
KTobGMNet	AAC(3)-II	Umezaba <i>et al.</i> , 1967; Ozanne <i>et al.</i> , 1969
KTobANNet	AAC(6')-I	Benveniste, 1971; Witchitz, 1972
GMTobNet	AAC(2') -Ia	Chevreau <i>et al.</i> , 1974; Le Goffie <i>et al.</i> , 1974
GM	AAC(3')-I	Del Solar <i>et al.</i> , 1995

K: kanamicina; Tob: tobramicina; GM: gentamicina; Net: netilmicina, AN: amikacina

Las aminoglucósido-adeniltransferasas (AAD), actualmente designadas como (ANT), adenilan los grupos hidroxilos del antimicrobiano. Entre estas enzimas adenilantes se encuentra la ANT (2'')-I, que confiere resistencia a kanamicina (K), tobramicina (Tob) y gentamicina (GM), expresando el fenotipo (KTobGM) y la ANT(3'') que proporciona resistencia a estreptomina (S) (Umezaba *et al.*, 1967; Ozanne *et al.*, 1969; Benveniste, 1971; Witchitz, 1972; Chevreau *et al.*, 1974; Le Goffie *et al.*, 1974; Shaw *et al.*, 1993; Del Solar *et al.*, 1995).

Las aminoglucósido-fosfotransferasas (APH) modifican los grupos hidroxilos mediante fosforilación y utilizan nucleósidos trifosfatos, especialmente ATP, como

cofactor, la enzima representativa de este grupo es la APH(3')-I, que confiere resistencia a kanamicina (K) (Umezaba *et al.*, 1967; Ozanne *et al.*, 1969; Benveniste, 1971; Witchitz, 1972; Chevereau *et al.*, 1974; Le Goffie *et al.*, 1974; Shaw *et al.*, 1993; Del Solar *et al.*, 1995).

En cada grupo de enzimas se incluyen diferentes formas de isoenzimas que difieren en la especificidad del sustrato por la región donde ejercen sus reacciones (Palomino y Pachón, 2003). Shaw *et al.* (1993) han propuesto una nomenclatura para representar a las 50 o más enzimas inactivantes de aminoglucósidos que han sido reportadas: AAC (acetiltransferasas), ANT (adeniltransferasas) y APH (fosfotransferasas), se aplica para indicar el tipo de actividad enzimática; (1), (2),...(2'), (3'),...(2''), (3''), representa el carbono que es modificado, específicamente por esa enzima; I, II, III, IV... indica el perfil de resistencia, es decir, el grupo de antibiótico para los cuales la enzima confiere resistencia; y a, b, c... indica el *locus* en donde se encuentra el gen, además de las características particulares de las enzimas, como la secuencia de los aminoácidos, su conformación tridimensional, punto isoeléctrico, entre otros.

Las EIA son normalmente codificadas por genes localizados en plásmidos, transposones e integrones, estos elementos genéticos son fundamentales en la diseminación de genes de resistencia hacia cepas susceptibles y pueden crear problemas epidemiológicos en la resistencia bacteriana (Shaw *et al.*, 1993; Del Solar *et al.*, 1995; Davies y Wright, 1997). La diseminación de los determinantes de resistencia a aminoglucósidos pueden originarse entre taxones iguales o diferentes, y está favorecida por la presión selectiva que se ejerce en el ambiente hospitalario, debido al constante uso de antimicrobianos (Bush y Miller, 1998; Zembower *et al.*, 1998).

La presencia de un fenotipo en particular, observado en un antibiograma, puede deducir el posible mecanismo enzimático, sin embargo, el mecanismo definitivo es generado por la aplicación de técnicas moleculares, sobre todo, cuando se realiza con propósitos epidemiológicos. *K. pneumoniae* no presenta resistencia natural a los aminoglucósidos, razón por la cual, la resistencia observada para éste grupo de antimicrobianos es de tipo adquirida (Struelens, 1998; Labarca, 2002).

Miller *et al.* (1997), en una investigación realizada en el Hospital Universitario de Grecia, encontraron un 85,9% de cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a aminoglucósidos. Entre las cepas aisladas, las más frecuentes fueron *Escherichia coli* (68,2%), *Klebsiella* spp (12,3%), *Enterobacter* spp (10,4%) y *Proteus* spp (9,1%).

En un estudio realizado por Vieira *et al.* (1999), en la unidad neonatal del Hospital Universitario Pedro Ernesto de Rio De Janeiro, encontraron en las heces de los recién nacidos, la presencia de cepas de *K. pneumoniae* productores de EIA con resistencia a gentamicina y a otros antimicrobianos.

Hernández *et al.* (2002), en el Servicio de cirugía del Hospital Chiquinquirá de Maracaibo, en pacientes operados de la bilis, identificaron una frecuencia para *K. pneumoniae* de 19,0% y un 4,7% para otras nueve especies. En las cepas de *K. pneumoniae* no se detectó resistencia fenotípica a los aminoglucósidos.

Díaz *et al.* (2004), en una investigación realizada en hospitales de diferentes ciudades de Chile, entre los años 1997 y 2003, detectaron la presencia de genes codificadores de EIA en cepas de *K. pneumoniae*, y encontraron con mayor frecuencia los genes *aac(6`)-Ib* y *ant(3``)-Ia* y, en menor frecuencia, los genes *aph(3`)-Ia* y *aac(3`)-IIa*.

Briceño y Suárez (2006), en un trabajo realizado en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de los Andes de Venezuela, encontraron 66,1% de bacterias Gram negativas en pacientes hospitalizados. *K. pneumoniae* fue aislada en 9,7%, y fenotípicamente presentó resistencia para netilmicina, gentamicina y amikacina (NetGMAN).

En un estudio realizado por Guzmán (2006), en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” de Cumaná, se evaluó la presencia de genes codificadores de resistencia a aminoglucósidos presentes en integrones de clase I, donde se encontró la presencia de los genes *aac(6`)-Iq* y *aadA*.

Diversos estudios han estado orientados al descubrimiento de enzimas inactivadoras de antimicrobianos, con el propósito de modificar químicamente los antimicrobianos existentes y, de esta manera, obtener nuevas drogas que permanezcan inactivas ante la enzima, pero que al mismo tiempo conserven la actividad antibacteriana (Azucena y Mobashery, 2001).

La mayoría de los microorganismos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* están desarrollando resistencia a grupos de antimicrobianos, incluyendo los aminoglucósidos, los cuales son empleados de forma rutinaria como tratamiento de elección en las enfermedades bacterianas, razón por la cual se hace necesario la evaluación fenotípica y molecular de los determinantes de resistencia presentes en las cepas de *K. pneumoniae* ante los aminoglucósidos, ya que éstos son empleados en el tratamiento de las infecciones nosocomiales, causadas por dicha bacteria en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.

METODOLOGÍA

Muestras

Se estudiaron 20 cepas de *K. pneumoniae*, aisladas de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial e indicación de cultivo y antibiograma, atendidos en las diferentes áreas (cuidados intensivos, cirugía y retén) del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Las cepas fueron recolectadas durante el período comprendido entre marzo 2003 y octubre 2004.

Reactivación de cepas

A partir del medio conservación se procedió a inocular cada cepa bacteriana en 2 ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y se incubaron por 24 horas a 37°C, en ambiente de aerobiosis. Una vez transcurrido el tiempo y comprobado el crecimiento bacteriano, las cepas se sembraron en agar MacConkey (AMC) y se incubaron nuevamente, atendiendo a las condiciones anteriores (Koneman *et al.*, 2002, MacFaddin, 2003).

Confirmación bacteriológica

Las cepas fueron confirmadas mediante los protocolos convencionales para la identificación de bacterias Gram negativas fermentadoras (Koneman *et al.*, 2002). Las pruebas bioquímicas que se utilizaron incluyeron, prueba de la oxidasa, fermentación de azúcares (medio Kligler), utilización del citrato (Citrato Simmons), motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina (medio MIO), hidrólisis urea (agua peptonada) y vía de utilización de la glucosa (rojo de metilo).

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión del disco (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo los lineamientos para enterobacterias propuestos por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril al 0,85%, a partir de un crecimiento de 18 horas sembrado en agar tripticasa de soya (ATS), ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Una vez obtenida la turbidez respectiva, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton (Himedia). Se ensayaron los siguientes agentes antimicrobianos, todos marca OXOID, amikacina (30 μg), netilmicina (30 μg), gentamicina (30 μg), tobramicina (30 μg), estreptomicina (30 μg) y kanamicina (30 μg). Las placas se incubaron a 35°C, durante 18 horas en ambiente de aerobiosis y, posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición, empleando una regla milimetrada.

Los halos de inhibición presentados por cada antimicrobiano se interpretaron siguiendo los valores de referencia señalados en la tabla del CLSI como sensible, resistente intermedio y resistente (CLSI, 2008).

La calidad de los discos antimicrobianos fue verificada con las cepas controles *Escherichia coli* ATTC 25922.

Fenotipos de resistencia

Los diferentes fenotipos de resistencia se establecieron teniendo en consideración el tipo de aminoglucósido que no presentó actividad antimicrobiana *in vitro* para una cepa en particular. Estas designaciones se realizaron de forma

arbitraria, asignando a cada fenotipo con números romanos. La búsqueda de los diferentes fenotipos se realizó con el propósito de poder predecir el tipo de mecanismo enzimático.

Detección de genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la extracción del ADN total se utilizó el método de lisis propuesto por Levesqué *et al.* (1995). Se tomaron 200 µl de un cultivo bacteriano, el cual tenía un crecimiento previo de 18 horas, en caldo Luria-Bertani a 37°C, y se colocaron en un tubo eppendorf con 800 µl de agua estéril. Se puso a hervir durante 10 minutos para luego centrifugar a 12 000 g durante 3 minutos. El sobrenadante con el contenido de ADN total se guardó a -20°C hasta su uso.

Los genes codificadores de aminoglucósidos se determinaron utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación se emplearon oligonucleótidos específicos para detectar los genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos (Tabla 2).

Las condiciones de reacción para cada gen investigado fueron las siguientes:

Una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, un ciclo con una desnaturalización de 96°C por 30 segundos, hibridación 54°C por 1 minuto y extensión 72°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 30 segundos, hibridación a 52°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 3 minutos. Con una extensión final de 72°C por 5 minutos (Díaz *et al.*, 2004).

En cada caso se emplearon 12,5 µl de la polimerasa LPU (2X) de la casa comercial Fundaim, 4,0 µl de cada oligonucleótido, para una concentración final de 0,48 µmol.l⁻¹ y 4,5 µl del ADN total bacteriano, para obtener un volumen final

de reacción de 25 µl.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la detección de los genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos.

Gen amplificado	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Referencia
<i>aac(3)-IIa</i>	aaC2F	cgctaaactccgttacc	256	Melano <i>et al.</i> , 2003
	aacC2R	tagcactgagcaaagcc		
<i>aac(6`)-Ib</i>	aac(6`)-IbF	tatgagtggtctaaatcgat	395	Senda <i>et al.</i> , 1996
	aac(6`)-IbR	cccgccttctcgtagca		
<i>aadB</i>	aadBF	cgtcatggaggagttggact	303	Díaz <i>et al.</i> , 2004
	aadBR	cgcaagacctcaacctttc		
<i>aadA</i>	aadAF	atgaggaagcggatgatcgcc	742	Mazel <i>et al.</i> , 2000
	aadAR	tctccaactgatctgcgcgc		
<i>aph(3`)-Ia</i>	aphA1F	attcaacgggaaacgtcttg	399	Díaz <i>et al.</i> , 2004
	aphA1R	aacaggaatcgaatgcaacc		

Los productos de la PCR se observaron en un gel de agarosa al 1,5%, el cual se preparó disolviendo 1,5 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE1X (stock 10X: tris base 0,89 mol.l⁻¹, ácido bórico 0,89 mol.l⁻¹, EDTA 0,02 mol.l⁻¹). Este buffer además, se utilizó para realizar las migraciones electroforéticas (80 voltios durante una hora, aproximadamente) de los productos amplificados.

Para estimar el tamaño del fragmento de ADN amplificado, se utilizó el marcador de peso molecular ADN Ladder (GeneRuler™) de masa molecular 12 000 pb, el cual se colocó en el gel junto a las muestras y los controles de la PCR. Los geles se colorearon con solución de bromuro de etidio 0,5 µg. ml⁻¹, durante 10 minutos y el exceso se eliminó manteniendo el gel en agua durante 5 minutos. Los productos amplificados se detectaron en el gel, mediante la observación a través de un transluminador de luz ultravioleta, para finalmente ser fotografiados y analizados.

Como control positivo de la PCR se emplearon cepas de *K. pneumoniae* que contenían los genes a determinar (Tabla 3), como control negativo: se empleó la cepa de *E. coli* J62-2 (CVCM N° 131), la cual no presenta genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos.

Tabla 3. Cepas de *K. pneumoniae* empleadas como control positivo de la PCR

Cepa	Designación	Gen	Fenotipo
0 1A	Kp01A	<i>aac(3'')-IIa</i>	ANKGMTobNetS
24	Kp24	<i>aadA</i>	ANKGMTobNet
28	Kp28	<i>aac(6`)-I</i>	ANKGMTobNet
28	Kp28	<i>aph(3`)-Ia</i>	ANKGMTobNet
M7	KpM7	<i>aadB</i>	ANKGMTobNetS

AN: amikacina, K: kanamicina, GM: gentamicina, Tob: tobramicina, Net: netilmicina, S: estreptomina

Análisis de los datos

Para el análisis de los resultados se empleó la estadística descriptiva, las cuales se expresaron en tablas y figuras (Dawson y Robert, 1997).

RESULTADOS

En la figura 1, se muestra la susceptibilidad antimicrobiana que presentaron las cepas de *K. pneumoniae* frente a los aminoglucósidos ensayados, en ella se observa que el 100,0% fue resistente a tobramicina (Tob), 95,0% a kanamicina (K), amikacina (AN) y gentamicina (GM) y 85,0% a estreptomicina (S). La netilmicina (Net) fue el aminoglucósido que demostró tener mejor actividad antimicrobiana *in vitro*, aun cuando el 50,0% de las cepas fue resistente.

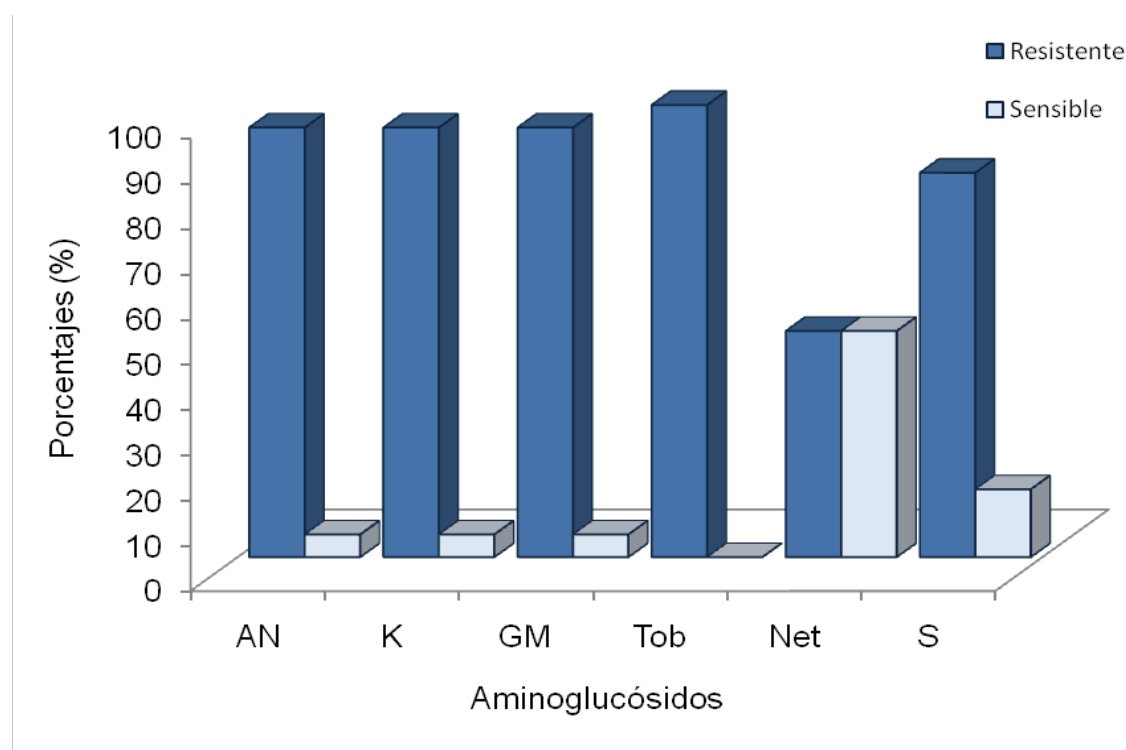


Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana presentada por las cepas de *Klebsiella pneumoniae* a los aminoglucósidos ensayados. AN: amikacina, GM: gentamicina, Tob: tobramicina, Net: netilmicina, S: estreptomicina.

Con el análisis de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana se obtuvieron cinco (5) fenotipos diferentes (Tabla 4). El mayor porcentaje de

frecuencia lo presentó el fenotipo I (KSNetGMANTob) y II (KSGMANTob) con un 40,0%. En menor frecuencia se encontraron los fenotipos III (KNetGMANTob), IV (TobGMS) y V (ANTobK).

Tabla 4. Fenotipos de susceptibilidad a los aminoglucósidos presentes en las cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*.

Fenotipos	Aminoglucósidos						Cepas	Porcentajes (%)
	AN	GM	Net	Tob	K	S		
I	R	R	R	R	R	R	8	40,0
II	R	R	S	R	R	R	8	40,0
III	R	R	R	R	R	S	2	10,0
IV	S	R	S	R	S	R	1	5,0
V	R	S	S	R	R	S	1	5,0
Total	95	95	50	100	95	85	20	100

AN: amikacina, K: kanamicina, GM: gentamicina, Tob: tobramicina, Net: netilmicina y S: estreptomycinina

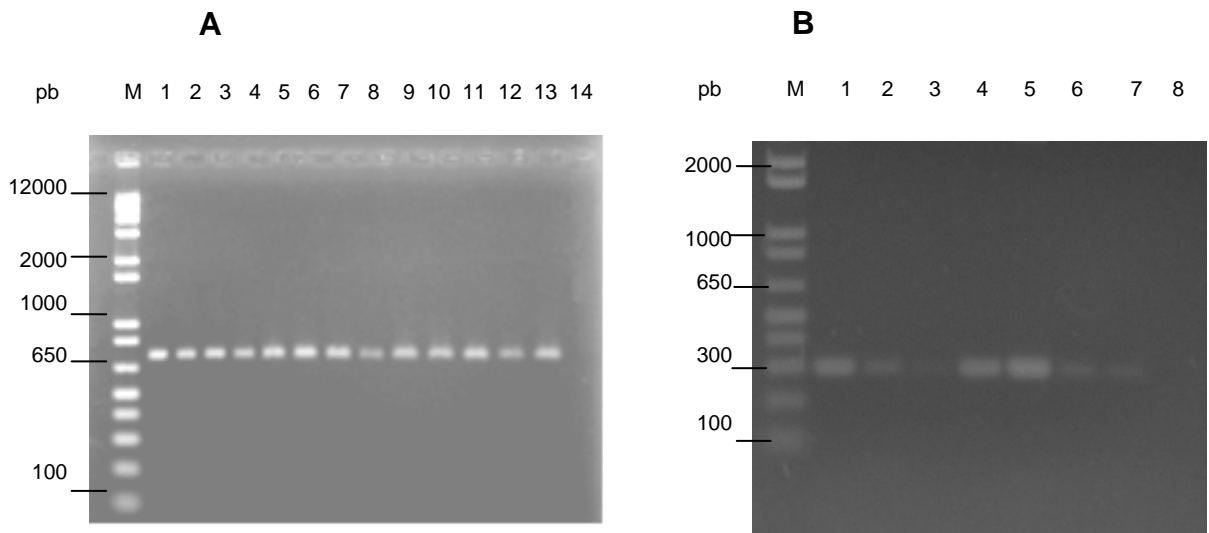


Figura 2. Productos de la amplificación de los genes codificadores de la enzima aminoglucósido adeniltransferasa ANT(3'')-Ia y ANT(2'')-Ia. A: Gen *aadA*. Línea 1 Cepa Kp24 (control positivo), líneas 2-5 cepas 02, 03, 04 y 05, líneas 6-11 cepas 07, 08, 09, 10, 11 y 12, líneas 12-13 cepa 19 y 20, línea 14 cepa *E. coli* J62-2 (control negativo). B: Gen *aadB*. Línea 1 a 8. Cepa KpM7 (control positivo), cepa 12, cepa 10, cepa 19, cepa 20, cepa 08, cepa 13 y cepa *E. coli* J62-2 (control negativo). M: marcador de peso molecular.

La figura 2 muestra los resultados de la prueba de PCR para los genes que codifican las enzimas aminoglucósidos adeniltransferasas. Se encontró que doce cepas presentaban el gen *aadA* y seis el gen *aadB* (Tabla 5).

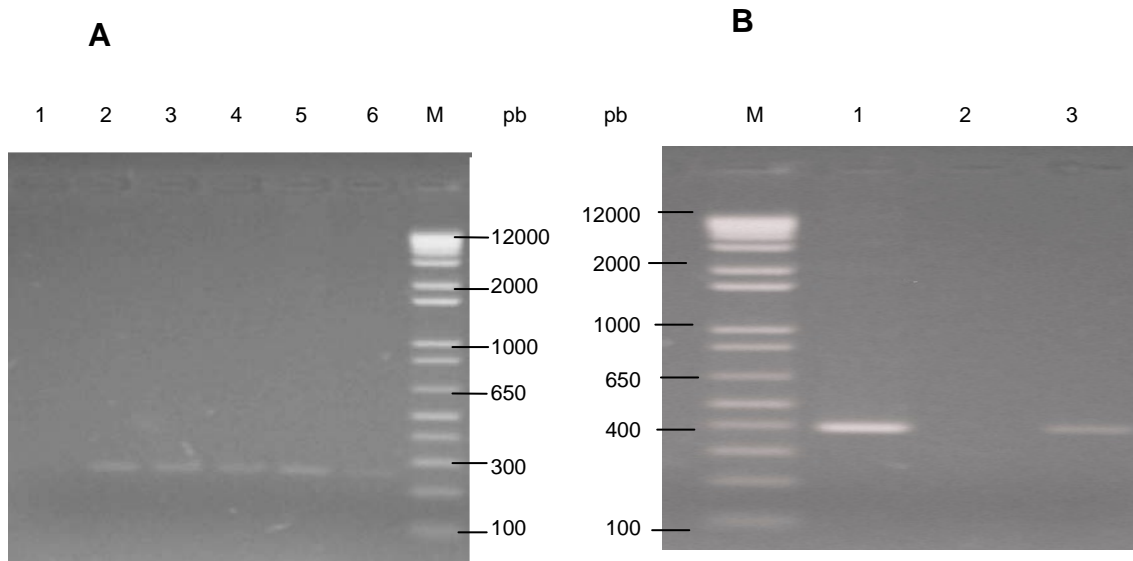


Figura 3. Productos de la amplificación de los genes codificadores de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(3)-IIa y aminoglucósido fosfotransferasa APH(3`)-Ia. A: Gen *aac(3)-IIa*. Línea 1 a 6. *E. coli* J62-2 (control negativo), cepa 01, cepa 12, cepa 13, cepa 14 y cepa Kp01A (control positivo). B: Gen *aph(3`)-Ia* Línea 1 a 3. Cepa Kp28 (control positivo), *E. coli* J62-2 (control negativo) y cepa 14. M: marcador de peso molecular.

La figura 3 muestra los resultados de la prueba de PCR para los genes que codifican las enzimas aminoglucósidos acetiltransferasas y aminoglucósidos fosfotransferasas. Se encontró que cuatro cepas presentaban el gen *aac(3)-IIa* y sólo la cepa 14 presentó el gen *aph(3`)-Ia* (Tabla 5).

Se identificaron cuatro tipos de genes que codifican enzimas inactivantes de aminoglucósidos. El gen más frecuente fue *aadA* o *ant(3'')-Ia* con un 60,0%, seguido del gen *aadB* o *ant(2'')-Ia* (30,0%). *aac(3)-IIa* se detectó en un 20,0% y en menor proporción se encontró el gen *aph(3`)-Ia* (5%). El gen *aac(6`)-Ib* no se encontró en las cepas estudiadas (figura 4).

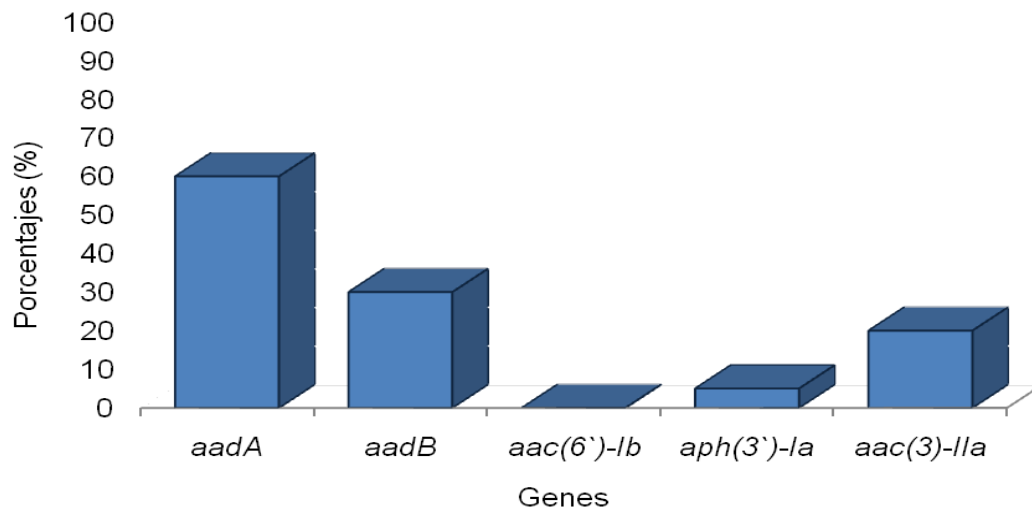


Figura 4. Distribución de genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos (EIA) detectados en las cepas de *K. pneumoniae*.

La tabla 5 muestra los diferentes fenotipos y genes detectados en las cepas de *K. pneumoniae*, en ella se observa la presencia de más de un gen, en siete (7) de las cepas que fueron resistente a casi todos los aminoglucósidos. La cepa *K. pneumoniae* 12 presentó los genes *aadA*, *aadB* y *aac(3)-IIa*; las cepas *K. pneumoniae* 08, 10, 19 y 20 expresaron los genes *aadA* y *aadB*, respectivamente. En la cepa *K. pneumoniae* 13 se detectó la presencia de los genes *aadB* y *aac(3)-IIa* y en la cepa *K. pneumoniae* 14 se encontraron los genes *aph(3`)-Ia* y *aac(3)-IIa*.

Tabla 5. Fenotipos y genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos encontrados en las cepas de *K. pneumoniae*.

Cepas	<i>aadA</i>	<i>aadB</i>	<i>aph(3['])-Ia</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	Fenotipos
01	-	-	-	+	KSNetGMANTob
02	+	-	-	-	KSNetGMANTob
03	+	-	-	-	KSNetGMANTob
04	+	-	-	-	KSNetGMANTob
05	+	-	-	-	KSGMANTob
06	-	-	-	-	KANTob
07	+	-	-	-	KSGMANTob
08	+	+	-	-	KSGMANTob
09	+	-	-	-	KSGMANTob
10	+	+	-	-	KSGMANTob
11	+	-	-	-	KSGMANTob
12	+	+	-	+	KNetGMANTob
13	-	+	-	+	TobGMS
14	-	-	+	+	KNetGMANTob
15	-	-	-	-	KSGMANTob
16	-	-	-	-	KSNetGMANTob
17	-	-	-	-	KSGMANTob
18	-	-	-	-	KSNetGMANTob
19	+	+	-	-	KSNetGMANTob
20	+	+	-	-	KSNetGMANTob

AN: amikacina, K: kanamicina, GM: gentamicina, Tob: tobramicina, Net: netilmicina y S: estreptomina

DISCUSIÓN

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de carácter mundial y un tema de preocupación para las instituciones responsables de la salud, siendo a su vez, uno de los más importantes problemas de la medicina moderna (Pedroza *et al.*, 2001). En los últimos años se ha observado un incremento en el porcentaje de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* en salas pediátricas, especialmente, en recién nacidos que presentan cuadros de septicemias y meningitis, hospitalizados en el área de cuidados intensivos, así mismo, se han reportado brotes de *K. pneumoniae* multiresistentes en diversas áreas hospitalarias.

El uso constante e inadecuado de los antimicrobianos empleados en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, ha traído como consecuencia la aparición de cepas multiresistentes a diversos tipos de antimicrobianos, especialmente a los aminoglucósidos (Perozo *et al.*, 2007).

En el presente estudio, los resultados obtenidos de la susceptibilidad antimicrobiana ante los aminoglucósidos, muestran un elevado porcentaje de cepas resistentes, específicamente a tobramicina, gentamicina, kanamicina, amikacina y estreptomycin. Estos hallazgos reflejan que estas resistencias pueden deberse al empleo empírico, amplio y generalizado, de estos antibióticos en el centro hospitalario, lo que genera una presión selectiva, que favorece la supervivencia y selección de las bacterias que adquirieron los determinantes de resistencia. La aparición y persistencia de cepas resistentes a los antimicrobianos, constituye el principal factor que induce a fallas en el tratamiento. Al respecto, Palomino y Pachón (2003), señalan que el utilizar constantemente y de forma arbitraria a los aminoglucósidos en el tratamiento de las

infecciones causadas por *K. pneumoniae*, ha incidido en la aparición de cepas resistentes, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos, donde estos superan el 60%.

Diversos investigadores han reportado resultados similares a los encontrados en esta investigación (Rossi *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2004; Espinal *et al.*, 2004; Briceño y Suárez 2006). Jones *et al.* (2005), en un trabajo realizado con el propósito de detectar genes de resistencia asociados a integrones de clase I, en cepas de *K. pneumoniae*, encontraron porcentajes elevados de cepas resistentes a amikacina (47,1%), kanamicina (84,3%), tobramicina (82,4%) y gentamicina (72,5%). Así mismo, Perozo *et al.* (2007), en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Maracaibo, reportaron 59 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a diferentes antimicrobianos, incluyendo los aminoglucósidos.

En la presente investigación se encontraron cinco fenotipos de resistencia. El fenotipo I fue el más frecuente, éste se caracterizó, por presentar resistencia a todos los aminoglucósidos, en segundo lugar se encontró el fenotipo II, el cual presentó resistencia a todos los aminoglucósidos a excepción de netilmicina, el resto de los fenotipos (III, IV y V) se encontraron en menor porcentaje. De acuerdo con los resultados fenotípicos, la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* presentan patrones complejos, hallazgo que pone de manifiesto la posible presencia de mecanismos de resistencia combinados en una misma cepa. La presencia de fenotipos con resistencia a varios aminoglucósidos, sugiere la presencia de más de una enzima inactivante, las cuales en combinación, son capaces de producir un amplio espectro, que puede inactivar a todos los aminoglucósidos disponibles.

De acuerdo con los resultados encontrados en la presente investigación, es difícil deducir inequívocamente, a partir del perfil fenotípico, los mecanismos enzimáticos específicos involucrados en la resistencia a los aminoglucósidos, debido a la complejidad de los patrones, por lo que hay que recurrir a los métodos moleculares, para poder comprobar la existencia de los genes que codifican enzimas capaces de inactivar a este grupo de antimicrobianos.

A nivel mundial se han reportado la existencia de diversos patrones fenotípicos de susceptibilidad contra los aminoglucósidos. Neonakis *et al.* (2003), revelaron la presencia del fenotipo KNetANTob en cepas de *Klebsiella* spp, aisladas en diferentes hospitales de Grecia, y Shahid y Malik (2005) reportaron los fenotipos de resistencia KNetGMTobNeo y KNetANTobNeo en cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes hospitalizados en dos centros médicos de la India.

Guzmán (2006), realizó un estudio de susceptibilidad antimicrobiana a 29 cepas de *K. pneumoniae*, aisladas de diferentes áreas de hospitalización del SAHUAPA, durante los meses enero-diciembre del año 2003 y reportó el fenotipo KSNetGMANTob como el más frecuente. La presencia y permanencia de KSNetGMANTob durante el periodo 2003-2004, pone de manifiesto que éste fenotipo se encuentra circulando entre las cepas de *K. pneumoniae*, y lo más probable entre cepas pertenecientes a la misma familia. Por otra parte, Lárez (2008), reportó la presencia del fenotipo KSNetGMANTobDbkNeo pero en cepas de *Acinetobacter*.

La investigación de los genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, mediante la técnica de PCR, reveló la presencia de los genes *aadA*, *aadB*, *aac(3)-IIa* y *aph(3`)-Ia*. El gen que se encontró con mayor frecuencia fue *aadA*, el cual codifica para una enzima de tipo aminoglucósido adeniltransferasa, que confiere resistencia a estreptomicina y espectomicina, mediante un proceso de

adenilación que modifica la posición 3' del grupo hidróxilo de ambos compuestos (Guerra *et al.*, 2000; Vakulenko y Mobashery, 2003; Kim *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2008).

El gen *aadA* se ha encontrado asociado a integrones de clase I, lo cual ha permitido su diseminación entre bacilos Gram negativos, *Enterococcus* spp y *S. aureus*, condición que es favorecida por la presión selectiva que se ejerce en el ambiente hospitalario, debido al uso inadecuado de los antimicrobianos. Al comparar los fenotipos observados en las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas en este trabajo con la presencia de éste gen, se puede evidenciar que la resistencia a la estreptomicina en las diferentes cepas se debe en parte a la presencia de este gen, sin embargo, no pueden descartarse la presencia de otros mecanismos involucrados en la resistencia a estreptomicina.

El gen *aadB* se detectó en seis cepas de *K. pneumoniae*, este gen codifica para una enzima tipo aminoglucósido adeniltransferasa que confiere resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina (Guerra *et al.*, 2000; Vakulenko y Mobashery, 2003). Al correlacionar la presencia de éste gen con el fenotipo expresado por las cepas, se logró observar resistencia a los antimicrobianos antes señalados, razón por la cual es probable, que el gen *aadB* sea el responsable de dichas resistencias, sin embargo, hay que tener presente que otras enzimas (APH2''-Ia, Ib, Id, Ic; aac(6')-II; aac(3)-IIIa) no detectadas en este estudio, pueden de igual forma ser responsables de la resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina.

Los genes *aadA* y *aadB* están ampliamente diseminados entre diversas especies de la familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonaceae* y han sido localizados en distintos elementos genéticos, como plásmidos conjugativos, no conjugativos, integrones y transposones, condición que asegura la diseminación de dichos genes

entre bacterias de la misma o diferentes especies (Kim *et al.*, 2007)

En cuanto a los genes que codifican para las enzimas aminoglucósidos acetiltransferasas, en las cepas estudiadas solo se encontró el gen *aac(3)-IIa*, que codifica la enzima AAC(3)-IIa, la cual modifica la posición 6' del grupo amino de los antimicrobianos tobramicina, gentamicina y netilmicina. Los resultados encontrados en la presente investigación no concuerdan con los reportes hechos por diversos investigadores a nivel mundial quienes señalan que la enzima aminoglucósido acetiltransferasa aislada con mayor frecuencia en cepas de *Klebsiella* e incluso otras enterobacterias, es la AAC(6') (Shaw *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997 y Bellaaj *et al.*, 2003;).

En este trabajo también se detectó la presencia del gen *aph(3')-Ia*, en una cepa de *K. pneumoniae*, éste gen codifica una fosfotransferasa capaz de conferir resistencia a kanamicina, mediante modificación en la posición 3' del grupo hidróxilo. A nivel latinoamericano este gen es reportado con una elevada frecuencia en cepas de *K pneumoniae* (Díaz *et al.*, 2004). Tomando en consideración, los distintos genes presentes en las cepas estudiadas, existe una baja frecuencia de los mismos con respecto a los reportes emitidos por diversos investigadores (Vakulenko y Mobashery, 2003; Shahid y Malik, 2005).

Neonakis *et al.* (2003), en el Hospital Universitario de Grecia, determinaron la presencia de genes codificadores de diversas enzimas inactivantes de aminoglucósidos en cepas de enterobacterias, entre ellas, *Klebsiella* spp. El gen que detectaron con mayor frecuencia fue *aac(6')-Ib* en un 66,7% y *aadB* en %. Los resultados obtenidos en la presente investigación solo coincide en el reporte de los genes *aadB*, ya que en las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas no se encontró genes *aac(6')-Ib*. Por otra parte, Gallardo *et al.* (2003), en un trabajo realizado en cepas de

S. typhimurium encontraron con mayor frecuencia los genes *aadA1a* y *aadA2*, resultados similares a los encontrados en las cepas de *K. pneumoniae* empleadas en este estudio.

En Venezuela son escasas las investigaciones realizadas donde se hayan evaluados los determinantes genéticos que codifican enzimas inactivantes de aminoglucósidos. Al respecto, Pedroza *et al.* (2001), encontraron la presencia del gen *aac(6)I-c* en cepas de bacilos Gram negativos de origen hospitalario. Guzmán (2006), detectó mediante secuenciación, la presencia de los genes *aac(6)-Iq*, *aadA1* y *aadB* en cepas de *K. pneumoniae*, como parte de la región variable en integrones de la clase I. Lárez (2008), demostró la presencia del gen *aph(3')-IV* en cepas de *A. baumannii*.

En esta investigación no se encontró una correlación entre el fenotipo expresado y la presencia de los genes detectados, ya que en muchos casos, cepas con fenotipos iguales presentaron genes diferentes o no amplificaron ningún gen. Este hecho es de gran interés, debido a que permite inferir que las diferentes resistencias observadas, pueden deberse a la presencia de otros mecanismos no enzimáticos, como disminución en la permeabilidad, mutación a nivel ribosomal e incluso, a la presencia de otras enzimas no detectadas en este estudio. También se pudo observar un caso (cepa 12) donde se detectó el gen *aadA*, pero la cepa no expresó el fenotipo de resistencia a estreptomina. Al respecto, se puede considerar como posible causa a este hallazgo, la represión del gen o a una posible localización al final de la región variable de un integron clase I, donde se ha confirmado la presencia de promotores débiles, que no logran expresar los últimos casetes integrados en esta región.

Los genes que codifican las enzimas inactivantes de aminoglucosidos están generalmente localizados en elementos genéticos móviles, como plásmidos conjugativos y transposones, lo que garantiza la diseminación de los genes entre

bacterias de una misma especie o especies diferentes, sin embargo, en las últimas décadas, la resistencia a aminoglucósidos se ha asociado a la presencia de ciertas estructuras genéticas conocidas como integrones (Guessous *et al.*, 1996; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2008).

Debido al auge epidémico que ha venido tomando *Klebsiella* a nivel hospitalario, se hace necesario el uso racional de antibióticos como parte fundamental de las medidas de prevención contra el surgimiento de infecciones causadas por estos microorganismos, además de la realización de estudios microbiológicos periódicos, para la determinación de agentes causales existentes en un área determinada y su resistencia antibiótica, ya que esto podría ser útil en la optimización de la terapia empírica aplicada.

CONCLUSIONES

Se encontró un elevado porcentaje de cepas resistentes a los aminoglucósidos, siendo netilmicina el aminoglucósido con mejor actividad antimicrobiana.

Los fenotipos de resistencia mayormente expresado por las cepas de *Klebsiella pneumoniae* fueron los fenotipos I (ANGMTobSNetK) y II (KSGMANTob).

La resistencia a los aminoglucósidos detectada en las cepas de *K. pneumoniae* utilizadas en la presente investigación, se debe en parte a la presencia aislada o combinada de los genes *aadA*, *aadB*, *aac(3)-IIa*, y *aph(3`)-Ia*.

RECOMENDACIONES

Rotar periódicamente los agentes antimicrobianos utilizados en cada área hospitalaria, limitando el uso de los antimicrobianos de amplio espectro, para evitar la diseminación de cepas multirresistentes.

Continuar con la búsqueda de otros posibles mecanismos de resistencia antimicrobiana que pudieran estar presentes en las cepas incluidas en este estudio, con el fin de aportar datos que puedan ayudar al avance de las investigaciones.

Determinar los diferentes elementos genéticos involucrados en la diseminación de la resistencia, con el fin de conocer la ubicación específica de los genes y sus posibles mecanismos de transferencia.

BIBLIOGRAFÍA

Achat, A. y Waksman, S. 1994. Streptomycin, a substance exhibiting activity against Gram positive and Gram negative bacteria. *Process Sociology Experimental Biology Medical*, 55: 66-69.

Azucena, E. y Mobashery, S. 2001. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drugged Respected Upped*, 4: 106-117.

Alonzo, G.; Malaver, E.; Guzmán, M. y Rodríguez V. 2005. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multiresistentes aisladas en diferentes ambientes en Venezuela. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 4: 81-84.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

Bellaaj, A.; Bollet, C. y Ben-Mahrez, K. 2003. Characterization of the 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(3)-IIa* of a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 53: 211-217.

Benveniste, D. 1971. Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R factor. *Biochemistry*, 10: 1787-1796.

Briceño, I. y Suárez, M. 2006. Resistencia bacteriana en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de los Andes. *Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica*, 3(2): 30-40.

Byarugaba, D. 2004. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 105-110.

Bush, K. y Miller, G. 1998. Bacterial enzymatic resistance: β -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 509-15.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement M100-S18. Wayne: National Committee Clinical Laboratory Standards.

Chevereau, M.; Daniels, P.; Davies, J. y Le Goffie, F. 1974. Aminoglycoside resistance in bacteria mediated by gentamicin acetyltransferase II, an enzyme modifying the 2'-aminogroup of aminoglycoside antibiotics. *Biochemistry*, 13: 598-603.

Dámaso, D. 1990. *Antimicrobianos-Aminoglucósidos*. Editorial Marketing Pa S. A. Madrid.

Davis, B. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Clinical Microbiology Reviews*, 51: 341-350.

Davies, J. y Wright, G. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiology*, 5: 234-240.

Dawson, S. y Robert, G. 1997. *Bioestadística médica*. Primera edición. Editorial el Manual Moderno. México.

Del Solar, E.; García, A.; Bello, H.; Domínguez, M.; González, G. y Zemelman, R. 1995. Mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos en bacilos Gram negativos de Hospitales Chilenos. *Revista Médica de Chile*, 123: 293-297.

Díaz, P.; Bello, H.; Domínguez, M.; Trabal, N.; Mella, S.; Zemelman, R. y González, G. 2004. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofoxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Revista Médica de Chile*, 132: 1173- 1178.

Espinal, P.; Mantilla, J.; Saavedra, C.; Leal, A.; Alpuche, C. y Valenzuela, E. 2004. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*, 24(3): 120-136.

Ewing, W. 1986. The genus *Klebsiella*. In Edwards PR, Ewing WH, editors. Identification of Enterobacteriaceae. Cuarta Edition. New York: Elsevier Science publishing. Pags. 365-380.

Gallardo, F.; Ruíz, J.; Soto, S.; Jiménez, M. y Vila, J. 2003. Distintos mecanismos de Resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 398-402.

Gilbert, D. 2000. Aminoglycosides. En: Principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE y Dolin R. (eds). fourth edition. Churchill Livingstone, New York. Págs. 307-335.

Guerra, B.; Sot, S.; Cal, S. y Mendoza, M. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 2166-2169.

Guessous, M.; Ben-Mahrez, K.; Belhadj, C. y Belhadj, O. 1996. Characterization of the drug resistance plasmid R2418: restriction map and role of insertion and deletion in its evolution. *Journal of Microbiology*, 42: 12-18.

Gupta, A.; Ampolo, K.; Rubenstein, D. y Saiman, L. 2003. Extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *Journal of Perinatology*, 23: 439-443.

Guzmán, M. 2006. Caracterización de los determinantes que codifican β -lactamasas de Espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae* (Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”). Tesis Doctoral para optar al Título de Doctora en Ciencias Mención Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Hernández, J.; Díaz, F. y Osorio, S. 2002. Identificación de flora bacteriana en cultivos de bilis de pacientes sometidos a cirugía biliar. *Kasmera*, 30(1): 63- 73.

Ishikawa, J.; Sunada, A.; Oyama, R. y Hotta, K. 2000. Identification and characterization of the point mutation which affects the transcription level of the chromosomal 3-N-acetyltransferase gene of *Streptomyces griseus* SS-1198. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 437-440.

Jones, L.; Mcler, C.; Kim, M.; Rawlinson, W. y White, P. 2005. The *aadB* Gene is associated with *bla_{shv}* Genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 794-797.

Kim, T.; Jeong, Y.; Cho, S.; Kim, S. y Kwon, H. 2007. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korea avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10): 3309-3315.

Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Jonda, W.; Sommers, H. y Winn, W. 2002. *Diagnóstico microbiológico*. Cuarta Edición. Editorial Panamericana.

Koo, F. y Stein, M. 1986. Detection of an extracellular toxin produced by burn isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Current Microbiology*, 13: 23-27.

Kotra, L.; Hadda, J. y Mobashery, S. 2000. Aminoglycosides: Perspectives on

mechanism of action and resistance end strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 3249-3256.

Labarca, J. 2002. Utilización del antibiótico como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Revista Chilena de Infectología*, 19: 157-160.

Lárez, Y. 2008. Enzimas inactivantes de aminoglucósidos en cepas clínicas y ambientales de *Acinetobacter* sp. De origen nosocomial. Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciada en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Lesvesqué, C.; Pichel, L.; Larose, C. y Roy, P. 1995. PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 185-191.

Le Goffie, F.; Martel, A. y Witchitz, J. 1974. 3N enzymatic acetylation of gentamicin, tobramicin and kanamycin by *Escherichia coli* carrying R factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6: 680-684.

MacFaddin, J. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana.

Marcos, M. 2000. Epidemiología de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 11: 29-33.

Mazel, D.; Dychinco, B.; Webb, V.; y Davies, J. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1568-1574.

Melano, R.; Corso, A.; Petroni, A.; Centron, D.; Orman, B. y Pereyra, A. 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 36-42.

Mella, S.; Sepúlveda, M.; González, R.; Bellot, H.; Domínguez, M.; Zemelman, R. y Ramírez C. 2004. Aminoglucósidos-aminociclitolos: características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Médica de Chile*, 12(4): 330-338.

Miller, G.; Sabatelli, F.; Hare, R.; Glupezynski, Y.; Mackey, P. y Shlaes, D. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns?. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 46-62.

Mingeot-Leclercq, M.; Glupczynski, Y. y Tulkens, P. 1999. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 727-737.

Neonakis, I.; Gikas, A.; Scoulica, E.; Manios, A.; Georgiladakis Y. y Tselentis, T. 2003. Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. *International Journal of antimicrobial Agents*. 22: 526-531.

Ozanne, B.; Benveniste, R.; Tipper, D. y Davies, J. 1969. Aminoglycoside antibiotics: inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factors. *Journal of Bacteriology*, 100: 1144-1146.

Palomino, J. y Pachón, J. 2003. Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 21(2): 105-115.

Pedroza, R.; Torres, L.; Narváez, P.; Alonzo, G. y Rodríguez, V. 2001. Multiresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram negativos de origen Hospitalario. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 3: 97-100.

Perozo, A.; Castellano, M.; Ginestre, M. y Harris, B. 2007. Caracterización Molecular y Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en las unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera*, 35(2): 1-17.

Podschun, R. y Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 589-603.

Rao, S.; Maddox, C.; Hoiem-Dalen, P.; Lanka, S. y Weigel R. 2008. Diagnostic accuracy of class I integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems. *Journal Clinical of Microbiology*, 46(3): 916-920.

Rodríguez, C.; Juárez, J.; De Mier, C.; Pugliese, L.; Blanco, G.; Vay, C. y Famiglietti, A. 2003. Resistencia a antibioticos de bacilos Gram negativos aislados en unidades de cuidados intensivos: Análisis comparativo de dos períodos (1998-2001). *MEDICINA (Buenos Aires)*, 63: 21-27.

Rossi, A.; Tokumoto, M.; Galas, M.; Soloaga, R. y Corso, A. 1999. Vigilancia de la Resistencia a los antibacterianos en Argentina. Programa WHONET, 1995-1996. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 6(4): 234-241.

Shahid, M. y Malik, A. 2005. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in pseudomonas aeruginosa isolates from burns patients. *Indian Journal Medical Resistance*, 122: 324-329.

Shakil, S.; Khan, R.; Zarrilli, R. y Khan. U. 2008. Aminoglycosides versus bacteria description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal Biomedicine Science*, 15: 5-14.

Shaw, K.; Rather, P.; Hare, R. y Miller, G. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Clinical Microbiology Reviews*, 57: 138-163.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H. y Ohsuka, S.; 1996. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in Gram-negative rods resistance to broad-spectrum β -lactams. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2904 - 2913.

Struelens, M. 1998. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*. 93: 581-585.

Umezaba, H.; Okanishi, M.; Kondo, S.; Utahara, R.; Hamana, K. y Maeda, K. 1967. Phosphorylative inactivation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factors. *Science*, 157: 1559-1561.

Vakulenko, S. y Mobashery, S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3): 430-450.

Vieira, L.; Castro, E.; Duarte, J.; Pinheiro, S.; Suassuna, I. y Pereira, J. 1999. Colonização intestinal de recém-natos por enterobacterias multiresistentes a antimicrobianos em unidade neonatal. *Jornada de Pediatria*, 75: 83-90.

Vila, J. y Marcos, F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 20(6): 304-312.

Walia, S.; Madhavan, T.; Reuman, P.; Tewari, R. y Duckworth, D. 1988. Plasmid profiles and klabocin types in epidemiologic studies of infections by *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 279-284.

Witchitz, J. 1972. Plasmid-mediated gentamicin resistance not associated with kanamycin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antibiotics*, 25: 622-624.

Zembower, T.; Noskin, G.; Postelnick, M.; Nguyen, C. y Peterson L. 1998. The utility of aminoglycoside in an era of emerging drug resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10: 95-105.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS INACTIVANTES DE AMINOGLUCÓSIDOS, PRESENTES EN CEPAS NOSOCOMIALES DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
FLORANGEL DEL VALLE GUZMÁN	CVLAC	16 142 743
PARRA	e-mail	florangelgp@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Enzimas Inactivantes de Aminoglucósidos (EIA)
Aminoglucósidos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En el presente estudio se detectó la presencia de genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos en 20 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial e indicación de cultivo y antibiograma, los cuales fueron atendidos en las diferentes áreas del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en el período comprendido entre marzo 2003 y octubre 2004. A cada cepa se le determinó la susceptibilidad antimicrobiana, mediante el método de difusión del disco, siguiendo los lineamientos para enterobacterias, propuesto por el Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos. Para la detección de los genes codificadores de enzimas inactivantes de aminoglucósidos se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las cepas fueron resistentes a los aminoglucósidos ensayados, el mayor porcentaje de resistencia se observó para tobramicina (100,0%), kanamicina, amikacina y gentamicina (95,0%), respectivamente, expresándose en la mayoría de las cepas los fenotipos de resistencia I o II, los cuales se caracterizan por ser resistentes a todos los aminoglucósidos (fenotipo I), a excepción de netilmicina (fenotipo II). En las cepas se encontraron la presencia de los genes *aadA* o *ant(3'')-Ia* (60,0%), *aadB* o *ant(2'')-Ia* (30,0%), *aac(3)-IIa* (20,0%) y *aph(3')-Ia* (5,0%). Siete cepas presentaron más de un gen. El alto porcentaje de resistencia a los aminoglucósidos, presentados por las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, representan un riesgo para el centro hospitalario, debido a que limita las opciones terapéuticas con este tipo de antimicrobiano.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
MILITZA GUZMÁN	CVLAC	8 954 225
	e-mail	militzaguz@cantv.net
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
MARCOS DE DONATO	CVLAC	7 259 805
	e-mail	marcosdedonato@yahoo.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
ELSA SALAZAR	CVLAC	10 460 717
	e-mail	Elsazul2003@cantv.net
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	10	19

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_FDVG.P.doc	Application/word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir solo el resumen de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente Científicos y Educativos.



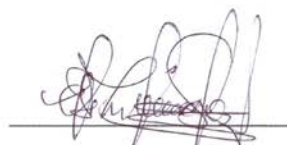
FLORANGEL DEL VALLE GUZMÁN PARRA



Prof. MILITZA GUZMÁN



Prof. MARCOS DE DONATO



Prof. ELSA SALAZAR

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

