



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

ENZIMAS INACTIVANTES DE AMINOGLUCÓSIDOS EN CEPAS CLÍNICAS Y
AMBIENTALES DE *Acinetobacter* sp. DE ORIGEN NOSOCOMIAL
(Modalidad: Investigación)

YNDIRA JOSÉ LÁREZ LÓPEZ

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

CUMANÁ, 2008

ENZIMAS INACTIVANTES DE AMINOGLUCÓSIDOS EN CEPAS CLÍNICAS Y
AMBIENTALES DE *Acinetobacter* sp. DE ORIGEN NOSOCOMIAL

APROBADO POR:

Prof. Elsa Zuleima Salazar de V.
Asesora Académica

Prof. Militza Gúzman
Jurado Principal

Prof. Yasmina Araque
Jurado Principal

INDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Cepas bacterianas	8
Subcultivo de cepas.....	8
Susceptibilidad antimicrobiana.....	9
Determinación de genes de enzimas inactivantes de aminoglucósidos por PCR	9
1) Crecimiento bacteriano y aislamiento del ADN genómico	10
2) Amplificación de los genes <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(6')-Ih</i> y <i>aph-(3')-VIa</i> :	10
3) Electroforesis de los productos de la amplificación	11
Análisis de los resultados	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

DEDICATORIA

A mis padres. Miladys y Carlos por toda su dedicación y apoyo.

A mis hermanos, Carol y Nicola por siempre estar a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a mis guías y protectores, por siempre atender a mi llamado cuando más lo necesitaba.

Por supuesto a la profesora Elsa Salazar, por ser la persona que me abrió su puerta cuando ya todas mis esperanzas se habían agotado y por todo el tiempo dedicado aún teniendo que atender múltiples compromisos. Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto de investigación individual aprobado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (N° CI-2-0404-1366/07).

A Cinthia, por toda la paciencia que me tuvo, Diorelis, por brindarme siempre su ayuda cuando más la necesitaba y, por supuesto, a mis amigas Maira, Yelitza, Dulce y Evelyn, las que estuvieron conmigo desde el principio de esta comprometida carrera compartiendo alegrías y tristezas.

A todas aquellas personas que de una manera u otra ayudaron a la realización de este trabajo...

De Verdad Muchas Gracias!!!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para detectar la presencia de genes que codifican para enzimas inactivantes de aminoglucósidos.....	11
Tabla 2. Cepas controles para la detección de genes de resistencia por PCR, en aislados de <i>Acinetobacter</i> sp.....	11
Tabla 3. Fenotipos de resistencia de cepas <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas en pacientes de la UCI-A y UARN, con infección nosocomial.....	16
Tabla 4. Fenotipos de resistencia de cepas <i>Acinetobacter</i> RUH 1139, aisladas en pacientes de la UCI-A y UARN, con infección nosocomial.....	16
Tabla 5. Distribución del gen <i>aph(3`)-VIa</i> según el fenotipo encontrado en las cepas de <i>A. baumannii</i>	19
Tabla 6. Distribución del gen <i>aph(3`)-VIa</i> según el fenotipo encontrado en las cepas de <i>Acinetobacter</i> RUH 1139.	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de las 20 cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA con infección nosocomial. Método de Kirby y Bauer.	14
Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de las 23 cepas de <i>Acinetobacter</i> RUH 1139 aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA con infección nosocomial. Método de Kirby y Bauer.	15
Figura 3. Detección del gen que codifica para la enzima 3-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa(aph(3`)-VIa), mediante PCR, en cepas clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> . Línea 1: cepa PIN 341-B; Línea 2: cepa PIN 404; Línea 3: cepa PIN 544-B; Línea 4: Control negativo; Línea 5: Marcador de peso molecular (100pb) Ladder (Introgen).....	17
Figura 4. Detección del gen que codifica para la enzima 3-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa(aph(3`)-VIa), mediante PCR, en cepas ambientales (A) y clínicas (B) de <i>Acinetobacter</i> RUH 1139. Línea 1: cepa PIN 12-SP.; Línea 2: cepas 14-SP.; Línea 3: cepa PIN 566; Línea 4: cepa PIN 567-2; Línea 5: cepa PIN 570-A2; Línea 6: cepa PIN 571-2; Línea 7: cepa PIN 616-2; Línea 8: cepa PIN 623-A; Línea 9: cepa PIN 624-A; Línea 10: cepa PIN 627; Línea 11: cepa PIN 631; Línea 12: cepa PIN 639; Línea 13: cepa PIN 649; Línea 14: cepa PIN 654-2; Línea 15: cepa PIN 661-2; Línea 16: cepa 664-2; Línea 17: Control positivo (<i>A. baumannii</i> F 14); Línea 18: Control negativo; Línea 19: Marcador de peso molecular (100pb) Ladder, (Invitrogen).	18

RESUMEN

Se evaluó la presencia de enzimas inactivantes de aminoglucósidos en cepas clínicas y ambientales de *Acinetobacter* sp., de origen nosocomial, para la cual se utilizaron 43 cepas de *Acinetobacter*, 20 correspondientes a la genoespecie de *A. baumannii* y 23 cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, dichas cepas fueron obtenidas de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCI-A) y de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), durante enero de 1998-abril de 1999, previamente identificadas bioquímica y molecularmente. Para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se probaron seis aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, dibekacina y neomicina), mediante la prueba de difusión en agar. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a la gentamicina, netilmicina, dibekacina y estreptomina. En el caso de las cepas identificadas como *Acinetobacter* RUH 1139, más del 90% de las cepas mostraron resistencia ante amikacina, gentamicina y tobramicina, y el 82,61% fue resistente netilmicina y dibekacina, respectivamente. Se detectó el gen que codifica para la enzima 3'-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa (aph(3`)-VIa) en 3 cepas de *A. baumannii* aisladas de la UCI-A, mientras que, para *Acinetobacter* RUH 1139 se detectó en 17 cepas aisladas de la UARN.

INTRODUCCIÓN

Los aminoglucósidos pueden ser antibióticos naturales (productos del metabolismo de hongos y bacterias) o semisintéticos de estructura heterocíclica, que se utilizan para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas aerobias; son agentes antimicrobianos de amplio espectro que actúan sobre las células bacterianas sensibles, en fase de crecimiento, inhibiendo la síntesis proteica (Damaso, 1990; Hardman *et al.*, 1996).

La estreptomicina fue el primer producto aislado del grupo de los aminoglucósidos, descubierta por Achatz *et al.* (1944), a partir de una cepa de *Streptomyces griseus* (Damaso, 1990). La aparición posterior de kanamicina (1957) y, más tarde, de gentamicina y tobramicina constituyeron verdaderos avances en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gramnegativas (Palomino y Pachón, 2003).

Desde el punto de vista de su estructura química, los aminoglucósidos están formados por dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos aminos (aminociclitol). Los grupos aminos usualmente se presentan cargados positivamente, lo cual constituye la alta afinidad que tienen estos agentes antimicrobianos por el ARNm procariótico (Chambers, 2003; Palomino y Pachón, 2003).

En cuanto a su clasificación, los aminoglucósidos se dividen en dos grupos según el componente aminociclitol, designándose el primero como aminoglucósidos con aminociclitol, constituyendo el grupo más grande, en el cual se incluyen: estreptomicina, amikacina (AN), kanamicina (K), tobramicina (NN), dibekacina (Dbk), gentamicina (GN), sisomicina (S), netilmicina (Net), isepamicina (I),

neomicina y paramomicina. El segundo grupo es denominado aminociclitol sin aminoglucósido, que incluye a la espectinomicina (Palomino y Pachón, 2003).

Los aminoglucósidos se utilizan para tratar una gran variedad enfermedades, causadas, principalmente, por bacilos gramnegativos, e indicados también en las infecciones producidas por bacterias sensibles grampositivas, resultando útiles en casos de tuberculosis, tratamiento de la gonorrea, septicemia, endocarditis, infecciones respiratorias, infecciones cutáneas, peritonitis, amibiasis, balantidiasis, conjuntivitis y úlceras, entre otras (Palomino y Pachón, 2003). Cabe destacar que estos antimicrobianos son totalmente inactivos contra microorganismos anaerobios y su actividad frente a bacterias grampositivas es limitada (Dámaso, 1990).

A excepción de la espectinomicina, que es un bacteriostático puro, los aminoglucósidos son principalmente bactericidas; estos se unen a una proteína constitutiva de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, provocando fallas en la lectura de algunos codones del ARNm, ocasionando la producción de proteínas defectuosas inútiles, lo cual conlleva a la muerte del microorganismo. Además, algunas evidencias sugieren que estos agentes antimicrobianos también son capaces de inhibir la translocación proteica, lo cual provoca acumulación de polipéptidos disfuncionales (Dámaso, 1990; Vannuffel y Cocito, 1996; Mingeot-Leclerq *et al.*, 1999).

El uso desmedido de los aminoglucósidos durante los años 60 y 70, junto con otros antimicrobianos, trajo como consecuencia la aparición de bacterias resistentes como es el caso de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a estreptomycin el cual era el tratamiento de primera elección para los pacientes con tuberculosis esa época. El primer artículo de enterobacterias patógenas resistentes a estreptomycin apareció en Japón (1956), y durante 1963-1964, se publica artículos sobre la resistencia a kanamicina y a neomicina (Rinehart, 1969) di

resistencia se diseminó por todo el mundo, como resultado de un mecanismo de transferencia genética (Noppe-Leclercq *et al.*, 1999).

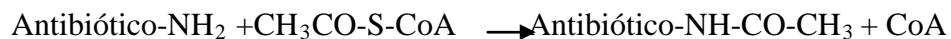
Los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos descritos hasta ahora son: modificación enzimática de los aminoglucósidos, alteración del sitio de unión del antibiótico al ribosoma y disminución de la acumulación del antimicrobiano en el interior de la célula bacteriana. Siendo la modificación enzimática el principal mecanismo descrito en bacterias resistente a estos agentes antimicrobianos (Davies y Wrigth, 1997; Noppe-Leclercq *et al.*, 1999; Azucena y Mobashery, 2001; Vila y Marcos, 2002).

Según Mingeot-Leclercq *et al.* (1999), existen tres tipos diferentes de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, cada tipo transfiere un grupo funcional a la estructura de este antibiótico, inactivándolo completamente, ellas son:

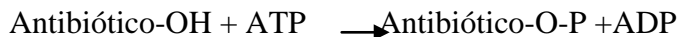
a) Aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas (ANT), que adenilan grupos hidroxilos. Catalizan la unión de un nucleótido monofosfato desde un nucleótido trifosfato, generalmente ATP, a un grupo hidroxilo del antibiótico:



b) Aminoglucósido N-acetiltransferasa (AAC), que acetila grupos aminos, al catalizar la transferencia de un grupo acetato, procedente del acetyl-CoA, al antibiótico:



c) Aminoglucósido O-fosfotransferasas (APH), que fosforilan grupos hidroxilos. Catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP al antibiótico:



En cada familia de enzimas se incluyen diferentes formas de isoenzimas que difieren en la especificidad del sustrato por la región donde ejercen sus reacciones. Se conocen, al menos 50 enzimas de este tipo descritas en bacterias (Shaw *et al.*, 1993; Palomino y Pachón, 2003).

Las funciones que son afectadas en los aminoglucósidos típicos son, principalmente, las de las posiciones 3, 2', 6,' en el caso de las enzimas AAC; las posiciones 4'y 2'', cuando actúan las ANT y las posiciones 2 y 3', si son las APH las que actúan (Mingeot-Leclerq *et al.*, 1999). Estas enzimas de resistencia se encuentran en plásmidos y también asociadas a transposones e integrones (elementos móviles que facilitan la transferencia entre bacterias) y, ocasionalmente, pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano (Hannecart-Pokorni *et al.*, 1997).

Cada grupo de enzimas inactiva sitios específicos, pero en cada lugar pueden actuar distintas isoenzimas con una particular especificidad por el sustrato. Los principales aminoglucósidos utilizados en la práctica clínica, que se ven afectados por estas enzimas son: AN, Dbk, GN, K, I, Net, S y NN. En estos aminoglucósidos ha sido detectada la resistencia *in vitro* (Mingeot-Leclerq *et al.*, 1999).

Después del descubrimiento de enzimas inactivadoras de antibióticos, continúan los esfuerzos para modificar químicamente los antimicrobianos existentes y de esta manera obtener nuevas drogas que permanezcan totalmente inmune a la inactivación, pero que al mismo tiempo conserven la actividad antibacteriana (Azucena y Mobashery, 2001).

En la década de los 70, aparecieron publicados los primeros reportes de resistencia bacteriana, debido principalmente, al uso inadecuado e indiscriminado de

la terapia antimicrobiana (Jackson *et al.*, 1998); esto trajo como consecuencia, el incremento de las infecciones nosocomiales causadas, tanto por bacterias grampositivas como por bacterias gramnegativas, entre estas últimas se destacan las infecciones originadas por *Acinetobacter* sp., que afectan a pacientes debilitados, hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, y otros pacientes graves, como en el caso de los quemados (Bergogne-Bèrèzin y Tower, 1996; Koneman *et al.*, 1998; Fernández, 2000; Salazar *et al.*, 2006).

Acinetobacter es un bacilo corto o cocobacilo gramnegativo (1,5 a 2,5 μ por 1,0 a 1,5 μ), generalmente dispuesto en pareja, es aerobio estricto, no fermentador de la glucosa, inmóvil, catalasa positiva, oxidasa negativa y no forma espora. Crece bien en todos los medios de cultivos utilizados de rutina y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35 °C (Koneman *et al.*, 1998).

El género *Acinetobacter* está conformado por organismos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se han aislado de diferentes focos y fuentes, incluyendo suelos, aguas superficiales, aguas negras, agua potable y variedad de alimentos primarios, así como también, en diferentes partes del cuerpo de individuos sanos (El-Mohandes *et al.*, 1993; Fang y Madinger, 1996; Salavert, 1999; Navarro *et al.*, 2001). Cabe destacar que *Acinetobacter baumannii* es la especie más comúnmente aislada de muestras clínicas humanas, e implicada en la colonización e infección hospitalaria de pacientes críticos o inmunosuprimidos (Bergogne-Bèrèzin y Tower, 1996). Sin embargo, recientemente se han reportado brotes ocasionados por especies distintas de *A. baumannii*, entre los que cabe mencionar, *Acinetobacter* genoespecie 3 y 13 TU, *Acinetobacter* cepa RUH 1139 y *Acinetobacter septicus* (Rivera *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2006; Kilic *et al.*, 2008).

El papel patógeno de *Acinetobacter* sp., en primer lugar, se relaciona con su capacidad oportunista, principalmente en el medio hospitalario, así como también,

con fenómenos de selección por el abuso de agentes antimicrobianos, estado de inmunosupresión del hospedero, existencia de portadores sanos y multiplicación de actos quirúrgicos y exploratorios, conformando todos estos, factores que predisponen a un paciente a padecer de una infección severa por este microorganismo (Echenique *et al.*, 1992; Bergogne-Bèrèzin y Tower, 1996).

Entre las infecciones nosocomiales y brotes hospitalarios causados por *Acinetobacter* sp. se incluyen: bacteremias, infecciones urinarias, meningitis secundaria y, principalmente, neumonías asociadas a ventilación mecánica, las cuales son difíciles de tratar debido a la amplia resistencia que se observa en esta bacteria ante la mayoría de los agentes antimicrobianos, lo cual afecta la selección de los mismos para el tratamiento adecuado de los pacientes (Vila *et al.*, 1993; Douboyas *et al.*, 1994; Kuah *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1996; Seifert *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 1999; Fernández, 2000; Navarro *et al.*, 2001); de esta manera se incrementa la oportunidad de transmisión de la bacteria, ya que este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir por largo tiempo, en reservorios humanos o materiales inanimados (Bergogne-Bèrèzin y Tower, 1996; Salavert, 1999).

Se ha demostrado que los porcentajes de cepas resistentes en *A. baumannii* aumentan de manera alarmante en las unidades de cuidados intensivos, en numerosos hospitales a nivel mundial (Gallego y Towner, 2001; Crespo, 2002; Spence *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2005; Prada, 2006). Chang *et al.* (1995) encontraron que el porcentaje de sensibilidad de *A. baumannii* con respecto a la gentamicina fue el más bajo (45,5 %) en comparación con tobramicina y amikacina (74,5 % y 86,6 %, respectivamente). Por su parte, Shi *et al.* (1996) reportaron una sensibilidad para amikacina de 72,2 %, mientras que, para gentamicina y netilmicina los porcentajes fueron más bajos (31,0 % y 58,9 %, respectivamente). Ling *et al.* (1996) investigaron cepas de *Acinetobacter* sp., las cuales mostraron total resistencia a los aminoglucosidos ensayados, a excepción de la amikacina. Recientemente, Pinzón *et*

al. (2006), en Colombia, reportaron que el 75 % y 78,5 % de las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a la amikacina y gentamicina, respectivamente.

Particularmente en Venezuela, la resistencia de las cepas estudiadas de *Acinetobacter* sp., ante los diferentes aminoglucosidos, se ubica en porcentajes que van desde 25 % hasta 60 % (Harris *et al.*, 2000; Pedroza *et al.*, 2002; Salazar, 2002).

Las infecciones producidas por *Acinetobacter* sp., en la última década, han aumentado progresivamente en los hospitales, a nivel mundial, observándose sobre todo en pacientes inmunosuprimidos y/o hospitalizados en las Unidades de Cuidados Intensivos. En nuestro país, son pocos los estudios respecto al papel que juega este microorganismo como patógeno nosocomial. Por su parte, Salazar *et al.* (2006), señalaron sobre un brote producido por un clón de *Acinetobacter* cepa RUH 1139, en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida. Dicha cepa epidémica mostró fenotipos de resistencia ante diferentes familias de agentes antimicrobianos, incluyendo a los aminoglucósidos, sin embargo, ninguno hace referencia sobre los mecanismos que median dicha resistencia, en las cepas aisladas de los centros hospitalarios. Por ello, con el propósito de aportar datos que permitan conocer sobre la presencia o no de ciertas enzimas inactivantes de aminoglucósidos, en cepas de *Acinetobacter* sp., circulantes en el IAHULA de la ciudad de Mérida, se propuso el desarrollo del presente trabajo.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Se utilizaron 43 cepas, 20 correspondientes a la geno especie de *A. baumannii* y 23 cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, dichas cepas fueron obtenidas de pacientes hospitalizados de la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCI-A) y de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), durante enero de 1998-abril de 1999, y previamente identificadas bioquímica y molecularmente (Salazar *et al.*, 2006). Las muestras estuvieron preservadas a -70 °C en caldo infusión cerebro corazón, con 50 % de glicerol, en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica Dr. Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida.

De las 20 cepas de *A. baumannii*, 19 se aislaron de pacientes y una de un humidificador. En lo que respecta a las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, 21 se obtuvieron de pacientes y dos de soluciones parenterales.

Subcultivo de cepas

Con el objeto de probar la viabilidad de los aislados, cada uno se colocó en caldo infusión cerebro corazón. Luego, los mismos se cultivaron en Agar Mac Conkey y, posteriormente, se observó el crecimiento bacteriano. En cada ocasión, el material fué incubado durante toda la noche a 35 °C. Con la finalidad de verificar que los cultivos correspondían a *Acinetobacter* sp., las colonias con características de no fermentador, se identificaron a nivel de género mediante el método bioquímico convencional, parte del mismo fue descrito por Bouvet y Grimont (1987), el cual

incluyó: características morfológicas, tintoriales y de colonias, motilidad, prueba de oxidasa, oxidación de la glucosa, xilosa, fructosa, maltosa, sacarosa, ornitina, arginina, lisina y crecimiento a 37, 42 y 44°C.

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión en agar, siguiendo las recomendaciones descritas por Bauer *et al.* (1966) y por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI, 2006). Entre los agentes antimicrobianos utilizados se incluyeron: amikacina (30µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), netilmicina (10µg), dibekacina (10µg), neomicina (30µg). Para kanamicina y estreptomicina se prepararon placas de agar Mueller Hinton con una concentración de 30µg/ml de cada una de los antibióticos respectivamente, siguiendo el método de dilución en agar descrito por Murray *et al.* (1999). Para la designación de la resistencia, se utilizaron los puntos de corte recomendados para *Acinetobacter* sp. por la CLSI (2006). Las cepas utilizadas como control fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Determinación de genes de enzimas inactivantes de aminoglucósidos por PCR

La detección de los genes de las enzimas 6'-N-aminoglucósido-acetiltransferasa-Ib(aac(6')-Ib), 6'-N-aminoglucósido-acetiltransferasa-Ih (aac(6')-Ih), 3'-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa (aph(3')-VIa) se llevó a cabo por PCR, siguiendo los procedimientos descritos por Ploy *et al.* (1994) y Vila *et al.* (1999).

1) Crecimiento bacteriano y aislamiento del ADN genómico

Cada aislado bacteriano se cultivó en agar Luria Bertani, durante 18 - 24 h a 35°C. Luego, se tomó una colonia aislada y se resuspendió en 25% l de agua destilada estéril, la cual fue sometida a ebullición, durante 10 minutos, y luego se centrifugó a 14 000g, durante 30 segundos. Todo el sobrenadante fue empleado como molde para las reacciones de PCR.

2) Amplificación de los genes *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ih* y *aph-(3')-VIa*:

Se realizó un total de tres reacciones de amplificación por separado para cada una de las cepas incluidas en el estudio. Para el PCR de cada gen se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, la cual se desarrolló con un volumen final de 50% l. Específicamente, en cada tubo de PCR se colocó 25% l de la mezcla de reacción que contenía buffer de PCR más MgCl₂ 2X (Roche), dNTPs 400µmol/l (Invitrogen), cada oligonucleótido 1% mol/l (Roche), Taq polimerasa 2U (Roche) y agua bidestilada estéril, los otros 25% l correspondieron a la muestra de ADN (Tabla 1). Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes anteriormente citados, excepto el ADN. También se utilizaron cepas controles productoras de enzimas inactivantes de aminoglucósidos (Tabla 2).

La amplificación se realizó en un termociclador automatizado (Mini Cyclyer, MJ Research), el cual se programó para una temperatura de desnaturalización de 94°C, por 1 minuto, seguido por una temperatura de unión de 55°C, por 1 minuto, y extensión: 72°C, por 1 minuto, durante 30 ciclos; la temperatura de extensión final fue de 72°C, durante 10 minutos.

Para detectar la presencia de genes que codifican para enzimas inactivantes de aminoglucósidos, se utilizaron los oligonucleótidos presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para detectar la presencia de genes que codifican para enzimas inactivantes de aminoglucósidos.

Gen	Oligonucleótido	Amplificación (pb)	Referencia
<i>aac(6')-Ib</i>	BR: 5'-CCCGCTTTCTCGTAGCA-3'	395	Ploy <i>et al.</i> , 1994
	BL: 5'-TATGAGTGGCTAAATCGA-3'		
<i>aac(6')-Ih</i>	HR: 5'-CACACACGTTTCAGTTTC-3'	400	Ploy <i>et al.</i> , 1994
	HL: 5'-TCTGAATCACAATTATCA-3'		
<i>aph-(3')-VIa</i>	APH1: 5'-ATACAGAGACCACATACAGT-3'	235	Vila <i>et al.</i> , 1999
	APH2: 5'-GGACAATCAATAATAGCAAT-3'		

Tabla 2. Cepas controles para la detección de genes de resistencia por PCR, en aislados de *Acinetobacter* sp.

Cepa Control	Tipo de Enzima	Referencia
<i>A. baumannii</i> cepa F 14	<i>aph-3-VIa</i> ⁺	Vila <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> (HTM 235)	<i>aph (3')-VI</i>	Vila <i>et al.</i> , 1999
	<i>aac(6')-I</i>	

3) Electroforesis de los productos de la amplificación

Las muestras resultantes de la amplificación se colocaron en un gel de agarosa al 2%, el cual se tiñó con bromuro de etidio, en buffer TAE 1X (Tris base-Acido acético glacial-EDTA), y fue sometido a una corrida electroforética a 70V, durante 30 minutos. Para estimar el tamaño del fragmento de ADN resultante, se utilizó un marcador de peso molecular con bandas de concentración definidas (100pb Ladders. Invitrogen). Las bandas se detectaron por transiluminación con luz ultravioleta

(UVP_{INC}) y documentados fotográficamente (Polaroid Instantánea DS 34). La observación de un amplicón de aproximadamente 400pb (*aac(6')-Ih* y *aac(6')-Ib*) o entre 200 y 300 (*aph-(3')-VIa*), que concordó con el control positivo, se interpretó como positivo para la enzima respectiva (Ploy *et al.*, 1994; Vila *et al.*, 1999).

Conjugación

Las cepas que mostraron fenotipos de resistencia por lo menos a tres aminoglucósidos, fueron seleccionadas para realizar ensayos de conjugación.

Los ensayos de conjugación se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Araque *et al.* (2000), con algunas modificaciones:

Partiendo de un cultivo de 4-6 horas (fase logarítmica de crecimiento) en caldo Luria Bertani más el antibiótico respectivo (gentamicina, amikacina), de cada una de las cepas (donadora, receptora), se cultivó la cepa de *Acinetobacter* sp. (cepa donadora) junto con la cepa receptora *Escherichia coli* J53-2 (F-; pro; met; rit), en una proporción de 1:3, respectivamente. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche sin agitación y a 35 °C, seguidamente, el cultivo se sembró en placas de agar Mac Conkey con y sin los antibióticos respectivos, y fueron incubadas a 35°C, durante 18-24 horas. Para ello se utilizó por separado la mezcla de rifampicina (100µg/ml) más amikacina (16 µg/ml) y rifampicina (100µg/ml) más gentamicina (8 µg/ml).

El crecimiento de las colonias de *Escherichia coli* J53-2 en las placas de agar Mac Conkey con antibiótico indicó resultado positivo para la transferencia de genes de resistencia a los aminoglucósidos ensayados.

Análisis de los resultados

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos, los cuales se representaron en tablas y figuras (Jiménez, 2000).

RESULTADOS

La figura 1 muestra los patrones de susceptibilidad de las cepas de *A. baumannii* expuestas a diferentes aminoglucósidos, observándose que para los agentes antimicrobianos ensayados, dibekacina, estreptomicina, netilmicina y gentamicina las cepas presentaron 100% de resistencia, mientras que para amikacina y tobramicina se mostraron porcentajes de resistencia del 75% y 95%, respectivamente. La neomicina presentó mayor actividad antimicrobiana (58,33%).

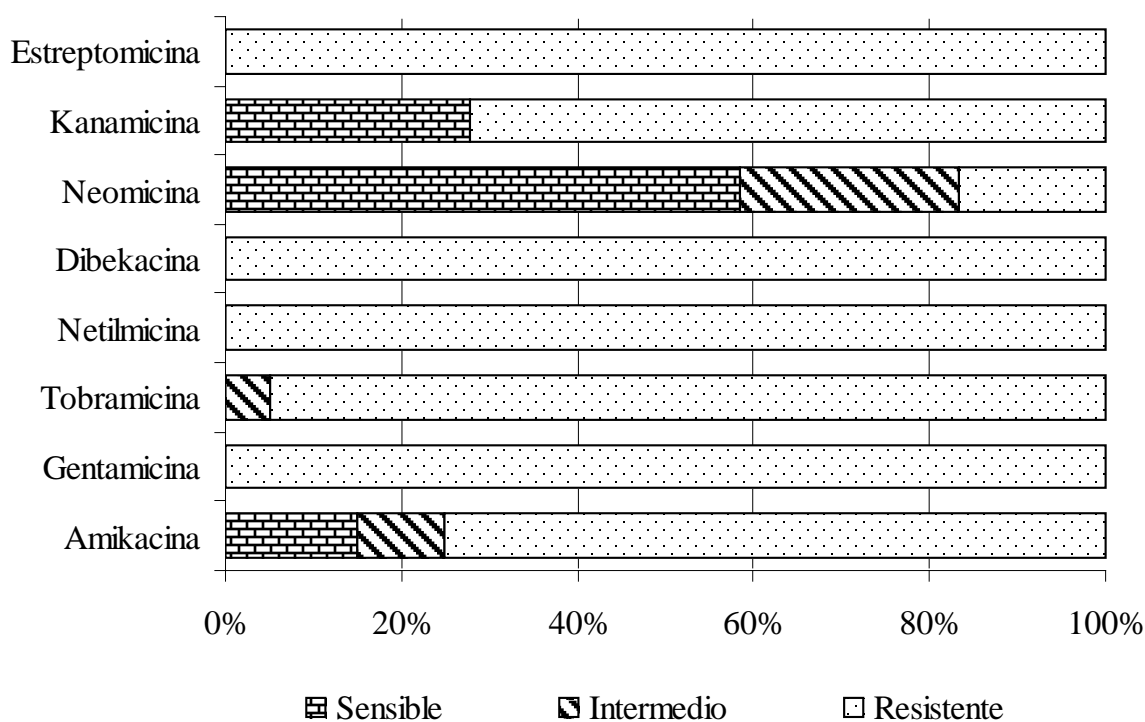


Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de las 20 cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA con infección nosocomial. Método de Kirby y Bauer.

La figura 2 muestra la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, donde el 95,65% de las cepas fueron resistentes a amikacina y gentamicina, mientras que el 91,3% fueron resistentes a tobramicina y

82,61% a netilmicina y dibekacina,

Con el análisis de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana se obtuvieron siete (7) patrones o fenotipos diferentes. El fenotipo I fue el más frecuentemente hallado (40%) entre las cepas de *A. baumannii*, el cual se caracterizó por mostrar resistencia a todos los aminoglucósidos ensayados (Tabla 3).

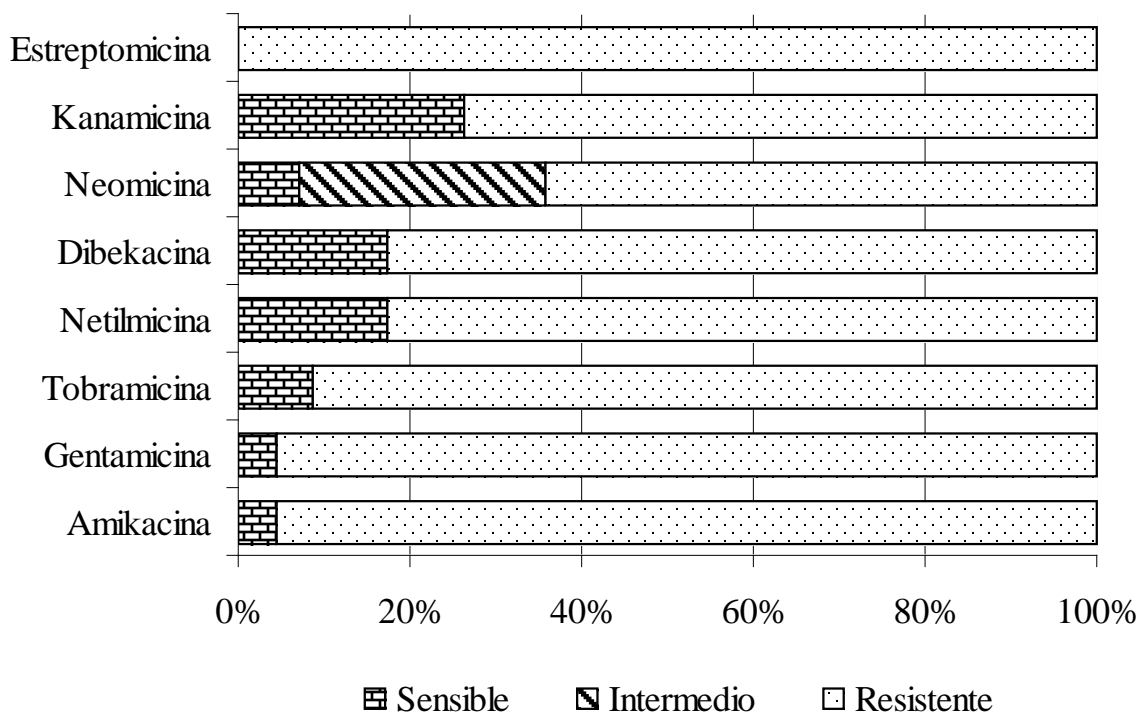


Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de las 23 cepas de *Acinetobacter* RUH 1139 aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA con infección nosocomial. Método de Kirby y Bauer.

Tabla 3. Fenotipos de resistencia de cepas *Acinetobacter baumannii*, aisladas en pacientes de la UCI-A y UARN, con infección nosocomial.

Patrones (Fenotipos)	Agentes antimicrobianos								Cepas (%)
	AN	GN	NN	Net	Dbk	K	S	Neo	
I	R	R	R	R	R	R	R	R	40
II	R	R	R	R	R	R	R	S	25
III	R	R	R	R	R	S	R	R	10
IV	S	R	R	R	R	R	R	I	5
V	S	R	R	R	R	S	R	I	10
VI	I	R	R	R	R	S	R	S	5
VII	S	R	R	R	R	R	R	S	5

AN: amikacina; GN: gentamicina; NN: tobramicina; Net: netilmicina; Dbk: dibekacina; K: kanamicina; S: estreptomycin; Neo: neomicina; R: resistente; I: intermedio; S: sensible.

En el caso de las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, se encontraron cinco (5) patrones de resistencia, siendo el fenotipo I el más frecuentemente observado (88,23%), representado por aquellas cepas que mostraron resistencia a todos los aminoglucósidos probados en este estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Fenotipos de resistencia de cepas *Acinetobacter* RUH 1139, aisladas en pacientes de la UCI-A y UARN, con infección nosocomial.

Patrones (Fenotipos)	Agentes antimicrobianos								Cepas (%)
	AN	GN	NN	Net	Dbk	K	S	Neo	
I	R	R	R	R	R	R	R	R	88,23
VIII	S	S	S	S	S	S	R	S	4,34
IX	R	R	R	S	S	S	R	S	4,34
X	R	R	R	S	S	S	R	R	4,34
XI	S	S	S	S	S	R	R	S	4,34

AN: amikacina; GN: gentamicina; NN: tobramicina; Net: netilmicina; Dbk: dibekacina; K: kanamicina; S: estreptomycin; Neo: neomicina; R: resistente; I: intermedio; S: sensible.

El gen *aph(3')-VIa* se detectó en 3 cepas de *A. baumannii* aisladas de la UCI-A (Figura 3) y en 17 cepas de *Acinetobacter* RUH1139 aisladas de la UARN (Figura 4).

No se encontraron genes *aac(6')-Ib* ni *aac(6')-Ih*, en las cepas estudiadas.

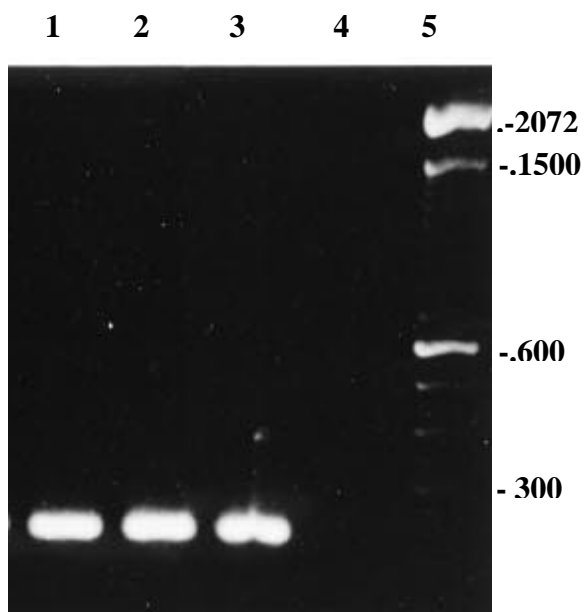


Figura 3. Detección del gen que codifica para la enzima 3-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa(*aph(3')-VIa*), mediante PCR, en cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*. Línea 1: cepa PIN 341-B; Línea 2: cepa PIN 404; Línea 3: cepa PIN 544-B; Línea 4: Control negativo; Línea 5: Marcador de peso molecular (100pb) Ladder (Introgen).

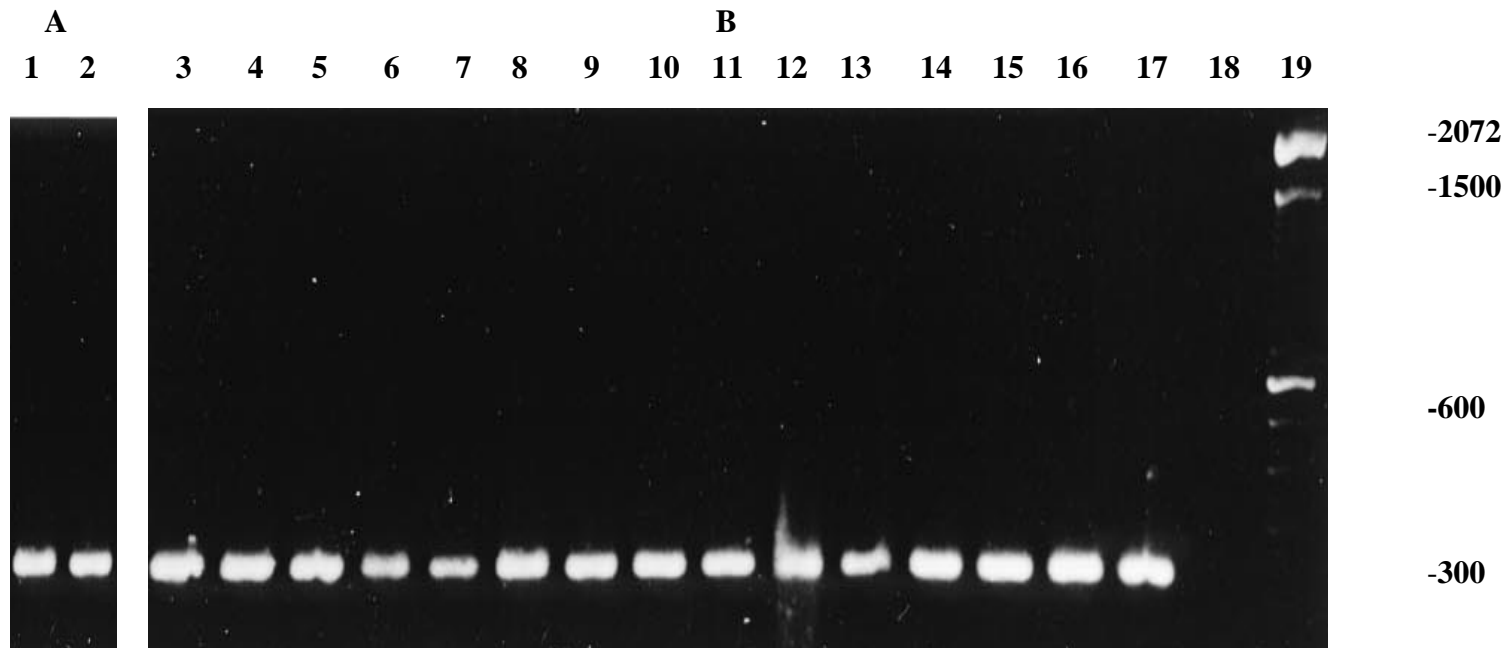


Figura 4. Detección del gen que codifica para la enzima 3-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa(aph(3`)-VIa), mediante PCR, en cepas ambientales (A) y clínicas (B) de *Acinetobacter* RUH 1139. Línea 1: cepa PIN 12-SP.; Línea 2: cepas 14-SP.; Línea 3: cepa PIN 566; Línea 4: cepa PIN 567-2; Línea 5: cepa PIN 570-A2; Línea 6: cepa PIN 571-2; Línea 7: cepa PIN 616-2; Línea 8: cepa PIN 623-A; Línea 9: cepa PIN 624-A; Línea 10: cepa PIN 627; Línea 11: cepa PIN 631; Línea 12: cepa PIN 639; Línea 13: cepa PIN 649; Línea 14: cepa PIN 654-2; Línea 15: cepa PIN 661-2; Línea 16: cepa 664-2; Línea 17: Control positivo (*A. baumannii* F 14); Línea 18: Control negativo; Línea 19: Marcador de peso molecular (100pb) Ladder, (Invitrogen).

Al relacionar los resultados de los fenotipos obtenidos tanto en las cepas de *A. baumannii* como en *Acinetobacter* RUH 1139 con la presencia del gen *aph(3`)-VIa*, se encontró que las cepas donde se detectó el gen que codifica para esta enzima muestran el mismo perfil de resistencia fenotipo I (Tabla 5) y (Tabla 6) respectivamente.

Tabla 5. Distribución del gen *aph(3`)-VIa* según el fenotipo encontrado en las cepas de *A. baumannii*.

Patrones (Fenotipos)	Cepas portadoras del gen <i>aph(3`)-VIa</i>	Número de cepas
I	3	8
II	–	5
III	–	2
IV	–	1
V	–	2
VI	–	1
VII	–	1

Tabla 6. Distribución del gen *aph(3`)-VIa* según el fenotipo encontrado en las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139.

Patrones (Fenotipos)	Cepas portadoras del gen <i>aph(3`)-VIa</i>	Número de cepas
I	17	19
VIII	–	1
IX	–	1
X	–	1
XI	–	1

No se obtuvieron transconjugantes bajo las condiciones ensayadas.

DISCUSIÓN

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de carácter mundial y un tema de preocupación permanente en los organismos responsable de la salud, siendo a su vez, uno de los más importantes problemas de la medicina moderna (Pedroza *et al.*, 2001). Por su parte, *A. baumannii* es considerada la especie de mayor importancia clínica dentro del género *Acinetobacter*, involucrada en la mayoría de las infecciones nosocomiales y brotes hospitalarios (Bergogne-Bèrènzin *et al.*, 1996; Seifert *et al.*, 1997), particularmente en las unidades de cuidados intensivos, donde el uso de antimicrobianos es mayor y el hospedador es más susceptible (Nuñez *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 1998). Este microorganismo es uno de los bacilos gramnegativos que presenta mayor resistencia ante los antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos (Sitirova *et al.*, 2000). Cabe destacar que, *A. baumannii* persiste en el ambiente por su versatilidad para utilizar diferentes fuentes de carbono y crecer en diferentes condiciones de temperatura, pH y humedad; esto lo hace capaz de subsistir en fómites, áreas inertes, superficies de equipos, soluciones de limpieza y pacientes críticos. La resistencia a múltiples antibióticos puede, a su vez, favorecer la persistencia en el ambiente hospitalario, ya que los pacientes infectados pueden actuar como reservorios (Pinzón *et al.*, 2006).

Los diagnósticos de laboratorios, basados en el cultivo y diferenciación de bacterias, por métodos convencionales, frecuentemente muestran dificultades en el momento de la identificación de aislamientos pertenecientes al género *Acinetobacter*, particularmente, por lo atípico de los resultados de las pruebas bioquímicas y perfiles enzimáticos. Unas de las pruebas fisiológicas consideradas como determinantes en la diferenciación de *A. baumannii* de las otras genoespecies es el crecimiento a 44°C (Bouvet y Grimont, 1987; Kämpfer *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1999), sin embargo, algunos investigadores han descrito excepciones, reportando que hay cepas de *Acinetobacter* genoespecie 3 que han crecido a esta temperatura (Gerner-Smidt *et al.*, 1991; Dijkshoorn *et al.*, 1993; Gerner-Smidt y Tjernberg, 1993; Rivera *et al.*, 2004). Tanto las cepas identificadas como *A. baumannii* y las que pertenecieron a *Acinetobacter* cepa RUH 1139, incluidas en este estudio, crecieron a 44°C; con este resultado se pone en evidencia que el crecimiento a dicha temperatura no es una

característica exclusiva de *A. baumannii* (Salazar *et al.*, 2006). Varios autores afirman que la expresión de caracteres fenotípicos puede variar y ser afectada por muchos factores ambientales, mientras que los métodos de identificación, basados en la determinación del genotipo de un aislado, son generalmente más estables, es por ello que en la actualidad se recomienda la identificación de la especie en *Acinetobacter* mediante métodos genéticos (Carr *et al.*, 2003; Nemeč *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2006; Kilic *et al.*, 2008).

El uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales factores predisponentes a infecciones bacterianas, ya que con ella se favorece la selección de bacterias resistentes, causando serias limitaciones en su aplicación para el control de las enfermedades infecciosas (Pedroza *et al.*, 2001). La aparición, cada vez más frecuente, de mecanismos de resistencia a nivel microbiano, sobre todo en aquellas bacterias oportunistas, ha traído como consecuencia aumento de las tasas de morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas millonarias (Crespo, 2002).

Particularmente, las infecciones causadas por *A. baumannii* representan un problema terapéutico difícil de abordar, debido a que muchos aislamientos clínicos muestran incremento progresivo de la resistencia a múltiples antibióticos (Ling *et al.*, 1996), por lo que, las infecciones nosocomiales causadas por este microorganismo han sido motivo de investigación en todo el mundo, ya que resulta interesante el hecho de que esta especie bacteriana tenga propensión a desarrollar resistencia antibiótica extremadamente rápida en respuesta a la introducción de estrategias terapéuticas modernas; tal como se demuestra en un estudio realizado por Pinzón *et al.* (2006), donde el mayor porcentaje de aislamientos de *A. baumannii* correspondió a fenotipos de múltirresistencia.

Los resultados obtenidos de susceptibilidad antimicrobiana ante los aminoglucósidos ensayados, en el presente estudio, muestran que el 100% de las cepas de *A. baumannii* presentó resistencia a gentamicina, netilmicina y dibekacina, mientras que, para la amikacina y tobramicina, los porcentajes de resistencia se ubicaron en el 75 y 95% de las cepas estudiadas. Diversos investigadores han reportado resultados similares a los aquí

encontrados, pero en cepas reportadas como *Acinetobacter* sp. (Comegma *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2000; Pedroza *et al.* 2001; Carmona *et al.*, 2003; Pinzón *et al.*, 2006; Prada, 2006). En cuanto a las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, se obtuvo que más del 90% fueron resistentes ante amikacina gentamicina y tobramicina, mientras que los porcentajes para netilmicina y dibekacina fueron menores. En la bibliografía consultada no se encontró reporte alguno sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *Acinetobacter* RUH 1139. Al comparar los resultados obtenidos de ambas especies, se observa que, las cepas pertenecientes a *Acinetobacter* RUH 1139 mostraron una susceptibilidad relativamente mayor, con respecto a las cepas de *A. baumannii*. En un estudio realizado por Pinzón *et al.* (2006) se muestran los resultados de 25 aislados identificados molecularmente como *A. baumannii*, donde el 66,6% de las cepas fueron resistentes a los aminoglucósidos, entre otros agentes antimicrobianos ensayados. Es de hacer notar que en varios estudios se han reportado altos porcentajes de cepas de *A. baumannii* resistentes a diversos agentes antimicrobianos, incluyendo a los aminoglucósidos (Bou *et al.*, 2000; Ruíz *et al.*, 2003., Huys *et al.*, 2004, Cookson *et al.*, 2005), de manera que cuando un aislado clínico es identificado fenotípicamente como *A. baumannii* y muestra buena sensibilidad ante distintas familias de antimicrobianos, se podría sospechar de que dicho aislamiento no pertenezca a esta especie.

En un estudio realizado a 23 soldados provenientes de la guerra en Irak, los cuales fueron sometidos a una terapia antimicrobiana rigurosa, por presentar infecciones ocasionadas por cepas pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, se encontró que las mismas mostraron resistencia a por lo menos, tres agentes antimicrobianos de diferentes familias, por lo que dichas cepas fueron clasificadas como multirresistentes (MDR). En general, el fenotipo predominante en las cepas de *A. baumannii*, incluidas en dicho estudio, fue de resistencia a todos los agentes antimicrobianos ensayados, excepto a colistina, imipenem y amikacina, cuyos porcentajes de sensibilidad fueron de 100%, 89% y 48%, respectivamente, mientras que ante la gentamicina y la tobramicina, la resistencia de las cepas se ubica en el 92% y 86% (Davis *et al.*, 2005).

Específicamente, los aminoglucósidos se utilizan para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo *A. baumannii*. Según Prada (2006), el hecho

de utilizar estos agentes antimicrobianos ampliamente en las últimas décadas, para el tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter*, ha incidido en el incremento de cepas altamente resistentes, de manera alarmante, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos, donde estos superan el 60%, aproximadamente.

Con el análisis de los resultados obtenidos se diferenciaron siete fenotipos entre las cepas de *A. baumannii*, los cuales se designaron arbitrariamente con números romanos (I hasta VII), siendo el fenotipo I el mayormente observado (40%), el cual se caracterizó por presentar resistencia a todos los aminoglucósidos probados; el 25% de las cepas mostró el fenotipo II, caracterizado por tener resistencia a todos los agentes antimicrobianos a excepción de la neomicina. En el caso de *Acinetobacter* RUH 1139 se obtuvieron cinco fenotipos de resistencia diferentes, también designados arbitrariamente con números romanos, siendo el más frecuente el fenotipo I (88,23%), y estuvo representado por aquellas cepas que mostraron resistencia a todos los aminoglucósidos ensayados. Cabe resaltar que una cepa presentó el fenotipo VIII (4,34%), la cual se caracterizó por ser sensible a todos los agentes antimicrobianos, excepto a la estreptomicina.

En el fenotipo I se concentró el mayor porcentaje de cepas, tanto en el caso de *A. baumannii* (40%) como de *Acinetobacter* RUH 1139 (88,23%); desde el punto de vista epidemiológico, es posible que los genes que codifiquen para la resistencia de las cepas aquí observadas puedan ser transferibles, entre sí, mediante conjugación, lo cual explicaría que cepas de especies distintas muestren un fenotipo similar, en otras palabras, posiblemente hay un plásmido que alberga genes de resistencia antimicrobiana circulando entre estas dos especies. También podría ser que las cepas de cada especie, por separado, se hayan originado de un clón, no relacionado epidemiológicamente, que casualmente muestra fenotipo similar, lo cual no fue objetivo propuesto para analizar en el presente trabajo.

La inactivación de los compuestos por la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos, es el mecanismo de resistencia más frecuente y el más ampliamente investigado en cepas de *Acinetobacter* resistentes a aminoglucósidos (Marcos, 2000; Vila y Marcos, 2002; Mella *et al.*, 2004; Shakil *et al.*, 2008). Según Labarca (2002), en la

actualidad se puede deducir el posible mecanismo enzimático involucrado, a partir de la presencia de un fenotipo de resistencia observado en un antibiograma, los cuales pueden ser identificados mediante técnicas moleculares. Al respecto, en este estudio se obtuvieron diferentes patrones o fenotipos de resistencia tanto para *A. baumannii* como para *Acinetobacter* RUH 1139, donde el fenotipo predominante en ambas genoespecies fue el de resistencia a todos los aminoglucósidos ensayados (fenotipo I), estos hallazgos pudieran indicar que estas cepas producen más de una enzima, como es la presencia de las enzimas aminoglucósidos-acetiltransferasas (AAC), dentro de las que se encuentra la AAC (3)-II, la cual confiere resistencia a kanamicina, tobramicina, gentamicina y netilmicina; la AAC (6)-I proporciona resistencia para kanamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina; la AAC (2) inactiva gentamicina, tobramicina y netilmicina y la AAC (3)-I confiere resistencia a gentamicina. Schowoko *et al.* (1995) encontraron que la gentamicina en *A. baumannii* suele ser inactivada por la producción de la enzima acetil transferasa. En el caso de las enzimas adeniltransferasas, la ANT (2)-I confiere resistencia a kanamicina, tobramicina y gentamicina y la ANT (3) a estreptomina. Las aminoglucósido-fosfotransferasa (APH), particularmente, la APH (2) inactiva gentamicina, kanamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina y la APH (3) confiere resistencia a kanamicina y amikacina (Le Goffie *et al.*, 1974; Shaw *et al.*, 1993; Del Solar *et al.*, 1995; Zarrilli *et al.*, 2005). La presencia de *aph(3)-VIa* confiere resistencia, principalmente, a amikacina; pero también a kanamicina, neomicina, paromomicina, ribostamicina, butirocina, gentamicina B, isepamicina (Vila *et al.*, 1999; Vila y Marco, 2002).

En el presente estudio, se encontró que tres cepas de *A. baumannii* resultaron portadoras del gen que codifica para la enzima *aph(3)-VIa*. Por su parte, Vila *et al.* (1999), utilizando la misma secuencia de oligonucleótidos en aislados de *A. baumannii*, también encontraron el gen que codifica para esta enzima. En el caso de las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, se encontró que 17 fueron productoras de la enzima *aph(3)-VIa*, lo cual explica, en buena parte, la resistencia observada ante los aminoglucósidos ensayados. No haber encontrado los genes *aac(6)-Ib* y *aac(6)-Ih*, permite inferir que la resistencia mostrada por las cepas aquí estudiadas, ante los aminoglucósidos, sea debido a la producción de otras enzimas no probadas en este estudio, y/o tal vez, a la disminución de la

permeabilidad de la membrana a estos antimicrobianos o, en su defecto, a un sistema de expulsión activa, por lo que se recomienda, la búsqueda de otras enzimas, así como de otros mecanismos de resistencia ya mencionados (Vila y Marco, 2002).

Es de hacer notar que quince de estas cepas fueron de origen clínico y las otras dos cepas de origen ambiental. Lo cual hace pensar sobre la posible contaminación de los pacientes con cepas circulantes en el ambiente hospitalario. Gallego y Towner (2001), en un estudio realizado a aislados clínicos de *A. baumannii*, en el norte de España, donde hicieron un análisis de los fenotipos de resistencia ante aminoglucósidos, reportaron que muchos de los perfiles de resistencia se debía a la producción de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, específicamente la APH(3`)-VI, que a su vez, es responsable de la resistencia mostrada a amikacina.

El espectro de la actividad antimicrobiana de la amikacina es el más amplio de todo el grupo de aminoglucósidos, además tiene peculiar resistencia ante las enzimas inactivantes de aminoglucósidos; este antimicrobiano es especialmente útil en hospitales donde prevalecen microorganismos resistentes a gentamicina y tobramicina (Hardman *et al.*, 1996; Shakil *et al.*, 2008).

Según la bibliografía consultada, la presencia de la enzima aph (3`)-VIa se ha detectado sólo en cepas de *A. baumannii*, mientras que, en otras bacterias se ha identificado la presencia de enzimas similares, como es el caso de la aph (3`)-Ia, en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, así como la presencia de la enzima aph (3`) en cepas de *Enterococcus spp* (Díaz *et al.*, 2004; Shakil *et al.*; 2008).

Al comparar los fenotipos de resistencia encontrados, tanto en las cepas de *A. baumannii* como en las de *Acinetobacter* RUH 1139, con la presencia del gen *aph(3`)-VIa*, se encontró que, las cepas donde se detectó el gen que codifica para esta enzima muestran el mismo perfil de resistencia (fenotipo I), este hallazgo hace pensar que gran parte de la resistencia observada en ambos grupos de cepas se deba a mecanismos de transferencia genética, por elementos extracromosomales, tales como plásmidos, integrones y/o

transposones, los cuales son fundamentales para potenciar la diseminación de estos genes de resistencia hacia cepas susceptibles (Gallego y Towner, 2001; Mella *et al.*, 2004). Por su parte, Bennett (1999), detectó la presencia de nuevos elementos genéticos que participan en la resistencia bacteriana, se trata de casetes genéticos que albergan genes que codifican resistencia a antibacterianos, los cuales se encuentran asociados a integrones capaces de captar estos determinantes de resistencia, gracias a la acción de una recombinasa específica de sitio (integrasa) que le proporcionan el o los promotores necesarios para su expresión. Según Salazar *et al.* (2006) y Salazar *et al.* (2007), más del 90% de las cepas, incluidas en este estudio, albergaron plásmidos, sin embargo, los mismos no fueron transferibles “*in Vitro*” por conjugación a la cepa de *E. coli* J53-2. Posiblemente, los plásmidos encontrados por dichos autores, tanto en las cepas de *A. baumannii* como de *Acinetobacter* RUH 1139, requieran de otros plásmidos para poderse transferir de una célula a otra (plásmidos movilizables), en el cual, probablemente los transposones jueguen un papel importante en conjunto con los integrones, estableciéndose en un conjunto de genes, y por ende, en un plásmido vector inestable (Towner, 1991; Seward y Towner, 1999). Por otro lado, es posible que la cepa de *E. coli* J53-2 no sea el receptor adecuado para la transferencia genética a partir de *Acinetobacter* sp. Pedroza *et al.* (2001), en un estudio publicado en Venezuela, acerca de la multirresistencia mediada por plásmidos en bacterias gramnegativas, incluida *A. baumannii*, comprobaron la presencia de plásmidos de alto peso molecular (>20kb), sin embargo, no dejan clara evidencia de resultados positivos para la conjugación entre las cepas estudiadas y *E. coli* (cepa utilizada como receptora).

En un estudio realizado por González (2002), en 486 cepas de *A. baumannii*, aisladas entre 1998 y 1999, en diferentes hospitales de Chile, reveló que la mayoría de ellas eran resistente a los aminoglucósidos, en el mismo no se realizó la búsqueda de genes codificantes de enzimas inactivantes de aminoglucósidos, pero en su análisis sugieren la presencia de varios genes que codifican para la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos, específicamente la combinación AAC (6`)-I+APH (3`), según los fenotipos obtenidos por ellos, ya que mediante experimentos de curación de plásmidos en 13 de las cepas, se detectó la pérdida de un plásmido de más de 30kb y este se asoció en la mayoría de los casos con la recuperación de susceptibilidad ante amikacina, kanamicina y

neomicina, sugiriendo que en este plásmido se ubicarían los genes que codifican para las enzimas ya mencionadas.

Debido al auge epidémico que ha venido tomando *Acinetobacter* 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, especialmente a los pacientes inmunocomprometidos.

Particularmente, los aminoglucósidos no deben ser seleccionados como alternativas terapéuticas de primera elección para el tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii*. Estos se deben resguardar para aquellos casos donde el tratamiento con otros antimicrobianos no ha dado resultados satisfactorios y cuando los estudios microbiológicos demuestren su actividad frente al agente causal, ya que, el uso indiscriminado de los mismos puede ser perjudicial para un paciente por su nefrotoxicidad y citotoxicidad (González y Saltiferal, 1996; Palomino y Pachón, 2003; Shakil *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Todas las cepas de *A. baumannii* mostraron resistencia ante gentamicina, netilmicina y dibekacina, mientras que, más de 80% resultó resistente a los otros aminoglucósidos ensayados, a su vez, más del 90% de las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139 fueron resistentes a los agentes antimicrobianos probados.

El gen que codifica para la enzima 3`-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa se detectó en tres cepas de *A. baumannii* en diecisiete cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, todas con el mismo fenotipo de resistencia (patrón I).

No hubo transferencia de genes de resistencia de las cepas de *A. baumannii* ni *Acinetobacter* RUH 1139 a la cepa de *E. coli* J53-2.

RECOMENDACIONES

Debido a que la expresión de la multirresistencia a los antimicrobianos representa uno de los principales peligros de la salud en la actualidad, se recomienda y se hace indispensable que desde el propio diseño de cada régimen terapéutico, se cumplan la medida de rotar periódicamente los agentes antimicrobianos utilizados en cada unidad de cuidado, limitando el uso de los antimicrobianos de amplio espectro, para no continuar generando y seleccionando cepas resistentes.

Ensayar con otras enzimas inactivantes de aminoglucósidos, así como 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.

Continuar con los estudios de conjugación donde se incluyan ensayos de diferentes metodologías para la detección, caracterización y transferencia genética de plásmidos.

BIBLIOGRAFÍA

Achatz, A. y Waksman, S. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting activity against Gram positive and gram negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55: 66-69.

Araque, M.; Nieves, B.; Lauretti, L.; Rossolini, G.M. 2000. Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 15: 37-42.

Azucena, E. y Mobashery, S. 2001. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug. Res. Upd.*, 4: 106-117.

Bauer, A.; Kirby, M.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *J. Clin. Pathol.*, 9(45): 436-496.

Bennett, P.M. 1999. Integrons and gene cassette: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43: 1-4.

Bergogne-Bèrèzin, E. y Tower, K. 1996. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbil. Rev.*, 9(2): 148-165.

Bou, G.; Cervero, G.; Domínguez, M.A.; Quereda, C. y Martínez-Beltrán, J. 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3299-3305.

Bouvet, P. y Grimont, P. 1987. Identification and biotyping of clinical isolate of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 138: 569-578.

Carmona, O.; Guzmán, M.; Comegna, M.; Castro, J. y Grupo Venezolano de Vigilancia de Resistencia Bacteriana. 2003. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Periodo Julio 2001-Diciembre 2002. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.*, 23(1): 89-97.

Carr, E.; Kämpfer, P.; Patel, B.; Gürtler, V. y Seviour, R. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int. J. Evol. Microbiol.*, 53: 953-963.

Cookson, B. 2005. Interim working party guidance on the control of multi-resistant-*Acinetobacter* outbreaks.
<http://hopking-heic.org/infectious_diseases/acinetobacter.html> (05/09/2007).

Comegna, M.; Guzmán, M.; Carmona, O.; Molina, M. y Grupo Colaborativo del Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana. 2000. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela-Nuevos hallazgos. *Bol. Soc. Venez. Microbiol.*, 20: 58-63.

Chambers, H. 2003. Aminoglucósidos. En: *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Hardman, J. y Limbird, L. Décima edición, México. Pags. 1237-1256.

Chang, S-C.; Chen, Y-C.; Luh, K-T. y Hsieh, W-C. 1995. In vitro activities of antimicrobial agents, alone and in combination, against *Acinetobacter baumannii* isolated from blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 105-110.

Chu, Y.W.; Leung, C.M.; Houang, E.T.; Cheng, K.C.; Leung, C.B.; Leung, H.Y. y Cheng, A.F. 1999. Skin carriage of *Acinetobacter* in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.*, 37(7): 2962-2967.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. Disk diffusion. M100-S16. CLSI, 26(3): 44-50.

Crespo, M. 2002. La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colomb. Med.*, 33: 179-193.

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

Davies, J. y Wright, G. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics, *Trend. Microbiol.*, 11: 234-240.

Davis, K.; Moran, K.; McAllister, K. y Gray, P. 2005. Multidrug resistant *Acinetobacter* extremity infectious in soldiers. *Emerging. Infect. Dis.*, 11(8): 1218-1224.

Del Solar, E.; Garcia, A.; Bello, H.; Domínguez, M.; González, G. y Zemelman, M. 1995. mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos aminoglucósidos en bacilos gramnegativos de hospitales chilenos. *Rev. Med. Chil.*, 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. *Rev. Méd. Chil.*, 132: 1173- 1178.

Dijkshoorn, L.; Van Dalen, R.; Van Ooyen, A.; Bijil, D.; Tjernberg, I.; Michel, M. F. y Horrevorts, A. M. 1993. Endemic *Acinetobacter* in intensive care units: epidemiology and clinical impac. *J. Clin. Pathol.*, 46: 533-536.

Douboyas, J.; Tzouvelekis, L. y Tsakris, A. 1994. In-vitro activity of ampicillin/sulbactam against multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Anitratus* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 34: 298-300.

Echenique, J.; Arienti, H.; Tolmasky, M.; Read, R.; Staneloni, R.; Crosa, J. y Actis, L. 1992. Characterization of a high-afinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *J.*

Bacteriol., 174(23): 7670-7679.

El-Mohandes, A; Schatz, V.; Keiser, J. y Jackson, B. 1993. Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in a intensive care nursery. *Am. J. Infect. Control*, 21: 226-230.

Fang, F. y Mandiger, E. 1996. Resistant nosocomial gram-negative bacillary pathogens: *Acinetobacter baumannii*, *Xanthomonas maltophilia* and *Pseudomonas cepacia*. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.*, 16: 52-83.

Fernández, F. 2000. Actividad de inhibidores de betalactamasas frente a *Acinetobacter baumannii*. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 13(1): 31-36.

Gallego, L. y Towner, K. 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. *J. Med. Microbiol.*, 50: 71-77.

García, H.; Patiño, N.; Morillo, M.; Márquez, C.; Velásquez, F.; Piña, J.; Fuentes, M.; Serbanescu, R. y Silva H. 1999. Neumonías en pacientes conectados a ventilación mecánica. *Antib. e Inf.*, 7(2): 19-23.

Gerner-Smidt, P.; Tjernberg, I. y Ursing, J. 1991. Reability of phenotypic test for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 29(2): 277-282.

Gerner-Smidt, P. y Tjernberg, I. 1993. *Acinetobacter* in Denmark: II Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *AP MIS.*, 101: 826-832.

González, G. 2002. Rol de integrones y *cassettes* genéticos en la resistencia de *Acinetobacter baumannii* a antibióticos aminoglucósidos. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Escuela de Graduados Universidad de Concepción. Chile.

González, N. y Saltigeral, P. 1996. *Guía de Antimicrobianos, Antivirales, Antiparasitarios y Antimicóticos*. Tercera edición. Interamericana McGraw-Hill.

Hannecart-Pokorni, E.; Depuydt, F.; De Wit, L.; Van Bossuyt, E.; Content, J. y Vanhoof, R. 1997. Characterization of the 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase Gene *aac* (6')- II Associated with a *sulI*-Type Integron. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 41(2): 314-318.

Hardman, J.; Limbird, L.; Molinoff, P.; Ruddon, R. y Goodman, G. 1996. Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena edición. Mc Graw- Hill Interamericana. Tomo II: 1016- 1996 pp.

Harris, B.; Martínez, A.; Rincón, G.; Romero, S.; Galué, N. y Valero, K. 2000. Resistencia a los aminoglucósidos y fluoroquinolonas de 102 cepas de *Acinetobacter* aisladas durante los años 1996-2000. VII Congreso Venezolano de Microbiología "Elsa La Corte Anselmi". Abstract. Pág. 56. Maracaibo. Venezuela.

Huys, G.; Cnockaert, M. y Vanechoutte, M. 2004. Distribution of tetracycline resistance

genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res. Microbiol.*, 156: 348-355.

Jackson, L.; Machado, L. y Hamilton, M. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Act. Med.*, 8(1): 13-27.

Jiménez, J. 2000. *Bioestadística. Métodos descriptivos*. Universidad de los Andes. Facultad de Medicina. Mérida. Venezuela.

Kämpfer, P.; Tjernberg, I. y Ursing, J. 1993. Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J. App. Bacteriol.*, 75: 259-268.

Kilic, A.; Li, H.; Mellmann, A.; Basustaoglu, A.; Kul, M.; Senses, Z.; Aydogan, H.; Stratton, C.; Harmsen, D. y Tang, Y. 2008. *Acinetobacter septicus* sp. Nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in neonatal intensive care unit. *Clin. Microbiol.*, 46(3): 902-8.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. and Winn, W. 1998. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Quinta edición. Philadelphia-New York.

Kuah, B.; Kumarasinghe, G.; Doran, J. y Chang, H. 1994. antimicrobial susceptibilities of clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from singapore. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 38: 2502-2503.

Labarca, J. 2002. Utilización del antibiótico como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev. Chil. Infect.*, 19: 157-160.

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

Ling, J.; Cheng, K.; Cheng, A. y Norrby, R. 1996. Susceptibilities to 23 antimicrobial agents and β -lactamase production of blood culture isolate of *Acinetobacter* sp in Hong Kong. *Scand J. Infect. Dis. Suppl.*, 101: 21-25.

Marcos, M. 2000. Epidemiología de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. *Enf. Inf. Microbiol. Clin.*, 11: 29-33.

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. *Rev. Chil. Infect.*, 12(4): 330-338.

Mingeot-Leclarq, M.; Glupezynski, Y. y Tulkens, P. 1999. Aminoglycoside: activity and resistance. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 43: 727-737.

Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. y Tenover, R. H. 1999. *Manual*

of *Clinical Microbiology*. Séptima edición. American Society for Microbiology Washinton, D. C.

Navarro, P.; Andrade, E.; Villarroel, E.; Sánchez, C. y Montes, J. 2001 Infecciones por *Acinetobacter baumannii*: procedencia hospitalaria y susceptibilidad antimicrobiana. *Antib. e Inf.*, 9(4): 161-164.

Nemec, A.; Dijkshoorn, L.; Cleenwerck, I.; De Baere, T.; Janssens, D.; Van der Reijden, T.; Jezek, P. y Venechoutte, M. 2003. *Acinetobacter parvus* sp. Nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1563-1567.

Noppe-Leclercq, I.; Wallet, F.; Haentjens, S.; Courcol, R. y Simonet, M. 1999. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res. Microbiol.*, 150: 317-322.

Núñez, M.; Martínez-Toldos, M.; Bru, M.; Simarro, E.; Segovia, M. y Ruíz, J. 1998. Appearance of resistance to meropenem during the treatment of a patient with meningitis by *Acinetobacter*. *Scand. J. Dis.*, 30: 421-423.

Palomino, J. y Pachón, J. 2003. Aminoglucósidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21(2): 105-115.

Pandey, a.; Kapil, A.; Sood, S.; Goel, V.; Das, V. y Seth, P. 1998. In vitro activities of ampicilin-sulbactam and amoxicilim-clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, 36(11): 3415-3416.

Pedroza, R.; Torres, L.; Narváez, P.; Alonzo, G. y Rodríguez, V. 2001. Multiresistencia a agentes antimicrobianos medida por plásmidos en bacilos gramnegativos de origen hospitalario. *M.I.B.E.*, 3: 97-100.

Pedroza, R.; Cuotto, W.; Torres, O. y Rodríguez, L. 2002. Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* en tres centros hospitalarios. *Rev. Facul. Med.*, 25(1): 80-82.

Pinzón, J.; Mantilla, J.; Valenzuela, E.; Fernández, F.; Alvarez, C. y Osorio, E. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio.*, 10(2): 71-78.

Ploy, M.; Giamarellou, H.; Bourlioux, P.; Courvalin, P. y Lambert, T. 1994. Detection of *aac(6')*-I genes in amikacin-resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 38: 2925-2928.

Prada, G. 2006. *Acinetobacter baumannii*: problemático además de multirresistente. *Asoc. Colom. Infect.*, 10(2): 61-63.

Rinehart, KL. 1969. Comparative chemistry of the aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 119: 345-50.

Rivera, A.; Fernández-Cuenca, F.; Becerro, A.; Bou, G.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Cisnero, J.M.; Rodríguez-Baño, J.; Pachón, J.; Vila, J. y Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH). 2004. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and β -lactam antibiotics in *Acinetobacter* genospecies 3. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 48(4): 1430-1432.

Ruíz, J.; Navia, M.; Casals, C.; Sierra, J.M.; Jiménez de Anta, M.T. y Vila, J. 2003. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 907-911.

Salavert, M. 1999. *Acinetobacter*: ¿Multiresistencia o supervivencia? *Rev. Esp. Quimioterap.*, 12(4): 290-293. .

Salazar, E. 2002. Susceptibilidad “*in vitro*” de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. Trabajo de ascenso. Universidad de Oriente.

Salazar, E. y Nieves, B. 2005. *Acinetobacter* sp., aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.*, 25: 64-71.

Salazar, E.; Nieves, B.; Araque, M.; Velázco, E.; Ruíz, J. and Vila, J. 2006. Outbreak caused by *Acinetobacter sterain* RUH 1139 in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 27(4): 397-403.

Salazar, E.; Nieves, B.; Ruiz, M.; Ruiz, J.; Vila, J.; Araque, M. y Velázco, E. 2007. Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isilated in Mérida Venezuela. *Med. Sci. Monit.*, 13(4): 89-94.

Schowcho, L.R.; Schanffner, C.P.; Miller, G.H. Hare, R.S. y Shaw, K.J. 1995. Cloning and Characterization of a 3-n-aminoglycoside acetyl transferase gene, *aac (3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 39(8): 1790-1796.

Seifert, H.; Dikshoorn, L.; Gerner-Smidt, P.; Pelzer, N.; Tjernberg, I. y Vancechoutte, M. 1997. Distribution of *Acinetobater* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods, *J. Clin. Microbiol.*, 35 (11): 2819-2825.

Seward, R.J. y Towner, K.J. 1999. Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.*, 5: 308-318.

Shakil, S.; Khan, R.; Zarrilli, R. y Khan. U. 2008. Aminoglycosides versus bacteria-a description of the acton, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J. Biomed. Scienc.*, 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. *Microb. Rev.*, 57:138-163.

- Shi, W.; Jiang, J. y Mi, Z. 2005. relationship between antimicrobial resistance and aminoglycoside-modifying enzyme gene expressions in *Acinetobacter baumannii*. *Chin. Med. J.*, 118(2): 141-145.
- Shi, Z-Y.; Liu, P.; Lau, Y-J.; Lin, Y-H.; Hu, B-S. y Shir, J-M. 1996. Antimicrobial susceptibility of clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 24: 81-85.
- Sitirova, P.; Djeneva, H. y Ratchova, K. 2000. Antibacterial at the nosocomial pathogens in Thracian University Hospital. *Spanish. J. Chemother.*, 13(2): 88-96.
- Spence, R.; Towner, K.; Henwood, C.; James, D.; Woodford, N. y Livermore, D. 2002. Population structure and antibiotic resistance of *Acinetobacter* DNA group 2 and 13TU isolates from hospitals in the UK. *J. Med. Microbiol.*, 41: 1107-1112.
- Towner, K. J. 1991. Plasmid and transposon behaviour in *Acinetobacter*. En: Towner kj, Bergogne-Bérénzin E, Fewson CA, Eds. *The biology of Acinetobacter*. New York: Plenum Publishing Corp. Pag. 149-167.
- Vannuffel, P. y Cocito, C. 1996. Mechanism of action of streptogamins and macrolides, *Drugs.*, 51: 20-30.
- Vila, J.; Marcos, A.; Marcos, F.; Abdalla, S.; Vergara, Y.; Reig, R.; Gómez-Luz, R. y Jimenez, T. 1993. *In vitro* antimicrobial production of β -lactamases aminoglycoside modifying enzymes, and chloranphenicol acetyltransferase by an susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 37: 138-141.
- Vila, J.; Ruíz, J. y Navia, M. 1999. Spred of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemia strain. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 758-761.
- Vila, J. y Marcos, F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 20(6): 304-312.
- Zarrilli, R.; Tripodi, M. y Popolo, A. 2005. Molecular epidemiology of high-level amino glycoside-resistant in southern Italy. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 827-835.

Hoja de Metadatos

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

Título	Enzimas inactivantes de aminoglucósidos en cepas clínicas y ambientales de <i>Acinetobacter</i> sp. de origen nosocomial
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Lárez López Yndira José	CVLAC	15 741 884
	e-mail	yndiralarez@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Aminoglucósidos
Enzimas inactivantes
<i>Acinetobacter</i> sp

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó la presencia de enzimas inactivantes de aminoglucósidos en cepas clínicas y ambientales de *Acinetobacter* sp., de origen nosocomial, para la cual se utilizaron 43 cepas de *Acinetobacter*, 20 correspondientes a la genoespecie de *A. baumannii* y 23 cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, dichas cepas fueron obtenidas de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCI-A) y de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), durante enero de 1998-abril de 1999, previamente identificadas bioquímica y molecularmente. Para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se probaron seis aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, dibekacina y neomicina), mediante la prueba de difusión en agar. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a la gentamicina, netilmicina, dibekacina y estreptomina. En el caso de las cepas identificadas como *Acinetobacter* RUH 1139, más del 90% de las cepas mostraron resistencia ante amikacina, gentamicina y tobramicina, y el 82,61% fue resistente netilmicina y dibekacina, respectivamente. Se detectó el gen que codifica para la enzima 3'-O-aminoglucósido-fosfotransferasa-VIa (aph(3')-VIa) en 3 cepas de *A. baumannii* aisladas de la UCI-A, mientras que, para *Acinetobacter* RUH 1139 se detectó en 17 cepas aisladas de la UARN.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Salazar de V. Elsa Zuleima	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	10 460 717
	e-mail	elsazul2003@yahoo.es
	e-mail	
Guzmán Militza	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8 954 225
	e-mail	miltzaguz@cantv.net
	e-mail	
Araque Yasmina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8 000 717
	e-mail	Yamasi40@gmail.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	07	01

Lenguaje: Spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_YJLL.doc	application/word

Alcance:

Espacial : universal (Opcional)

Temporal: intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio:

Bioanálisis

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

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

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

Derechos:

Se garantiza a la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre el derecho a archivar y difundir sólo el título y resumen de este trabajo. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos.

Yndira Lárez
AUTOR 1

Prof. Elsa Salazar de V.
TUTOR

Prof. Militza Guzmán
JURADO 1

Prof. Yasmina Araque
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

