



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

PERFIL PLASMÍDICO EN AISLADOS INTRAHOSPITALARIOS DE  
*Klebsiella* spp  
(Modalidad: Investigación)

JHONILYS ROSMAR NAVARRO MOREY

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

CUMANÁ, 2010

PERFIL PLASMÍDICO EN AISLADOS INTRAHOSPITALARIOS DE  
*Klebsiella* spp

APROBADO POR:




---

Prof. Dra. Miliza Guzmán Lista  
Asesora Académica



---



---

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	9
Cepas bacterianas.....	9
Reactivación de las cepas.....	9
Confirmación de las cepas .....	9
Confirmación de la resistencia bacteriana.....	10
Aislamiento de ADN plasmídico (pequeña escala) .....	12
Electroforesis.....	13
Estimación del tamaño del ADN plasmídico .....	13
Control de calidad .....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
CONCLUSIONES .....	27
RECOMENDACIONES .....	28
BIBLIOGRAFÍA .....	29
HOJA DE METADATOS .....	35

## **DEDICATORIA**

A:

Ti, que eres todo para mí AMADO DIOS. Nunca tendré las palabras exactas para mostrarte todo mi agradecimiento, todo lo que soy te pertenece a ti mi Rey, has sido mi compañía y mis ganas de seguir, esto es por ti y para ti, Te Amo.

Mis padres Jhony y Amarilys, este esfuerzo es para ustedes, quienes han hecho de mi lo que soy y han dado todo por mi, siempre quiero darles lo mejor como hija, los amo con mi vida.

Mis hermanos Jhony, Jhoamlys y Jhosmarly, son parte de mi corazón, espero ser siempre un ejemplo de constancia y dedicación.

Mis Abuelos Rosa, Jesús y María, sus oraciones y ejemplos de vida han sido mi inspiración para seguir adelante.

Darío y Zadaís, mis segundos padres. Su amor y dedicación hacia a mi en todo momento han llegado justo cuando más lo he necesitado, esto también es de ustedes.

José Darío, mi apoyo, mi fuerza y mi alegría. Sin ti, muchas veces hubiese desmayado. Eres mi vida y esto también te pertenece, Te amo.

Mis tíos Gamaliel, Daniel, Midelis, José Félix, Geanny, Grissell, Luz, Ruselys y Ángel, gracias por siempre estar pendiente de mi, les amo.

Mis amigas Eudys y Annibelis, nunca olvidaré lo que han hecho por mí. Gracias por su amistad sincera y verdadera.

Ustedes mis amigos Eliú Jiménez, Zuryangelys Alcalá, Evelyn Carreño, Zeny Nasser, Eliel Pérez, Moisés Sánchez, Jesús Ramón Cabrera, Albert Contreras y muchos más; su amistad fue, es y será un apoyo, un tesoro invaluable que siempre tendré, son los mejores les amo.

“El temor del Señor es el principio del conocimiento...”

Proverbios 1:7 (Nueva Versión Internacional)

## **AGRADECIMIENTOS**

A:

Militza Guzmán, excelente y dedicada profesora, humilde persona, mi madre y asesora académica. Siempre le agradeceré la oportunidad de haberme escogido, enseñarme sus conocimientos y hacer todo lo posible por realizar esta meta. Mi Admiración y Cariño, me llevo una parte de usted.

Al Laboratorio de Bacteriología Clínica del Departamento de Bioanálisis y sus profesores Elsa Salazar, Yasmina Araque y José Gregorio Betancourt. Aquí me formé como profesional y al mismo tiempo me dieron la oportunidad de ejecutar este trabajo. Mi sincera gratitud y admiración.

Al Laboratorio de plásmidos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, a la Dra. Guillermina Alonso y la Lic. Laynet Puentes, por abrirme las puertas de este reconocido centro del saber y hacerme sentir como en casa.

Al Laboratorio de Genética Molecular del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, al Profesor Marcos de Donato y su equipo de trabajo, por su valiosa colaboración.

Al Laboratorio de Especialidades Parasitológicas del Departamento de Bioanálisis y a las profesoras Del Valle Guilarte y Leonor Mora, por su aporte y ánimo, con personas como ustedes vale la pena sonreír y decir: Sí se puede. Mis cariños.

Mis amigos Eliosmar Rodríguez, Diorelys González, Suyín Silva, Sophia Vargas, Liomer Bermúdez, Sulamy Salazar, Jeniré Barrios, Patricia Pérez, Olymar Marchán, Dulce Trujillo y a la Señora Luiguina y Carmen Luisa, su ayuda fue necesaria e incondicional siempre en todos mis días. Vale la pena ayudar siempre a los demás, sin esperar nada a cambio. Mi aprecio más sincero.

La Señora Celina de Medina y su familia, por brindarme un espacio en su hogar, y por toda su atención. Mil gracias a ustedes.

La familia Maza, siempre los recordaré con mucho aprecio, Gracias.

La familia Sánchez Marcano, son muy especiales para mí. Gracias por acogerme en su hogar como uno de sus hijos. Mil bendiciones y mi afecto más sincero.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características epidemiológicas de las cepas de <i>Klebsiella</i> spp, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” Cumaná, Estado Sucre. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Características fenotípicas de las cepas de <i>Klebsiella</i> spp, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” Cumaná, Estado Sucre. ....	16
<b>Tabla 3.</b> Caracterización fenotípica de las cepas de <i>Klebsiella</i> spp, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá” Cumaná, Estado Sucre. ....	22



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características funcionales de los plásmidos según Kado. <i>Kill</i> : gen de letalidad; <i>kor</i> : gen regulador de la letalidad; <i>kik</i> : gen letal en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	2
<b>Figura 2.</b> Etapas del proceso de conjugación bacteriana .....	4
<b>Figura 3.</b> Distribución porcentual de las de cepas de <i>Klebsiella</i> spp, según la resistencia asociada. ....	14
<b>Figura 4.</b> Perfil plasmídico de las cepas de <i>Klebsiella</i> spp, aisladas de pacientes atendidos en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”. ....	19

## RESUMEN

Los plásmidos que codifican para la resistencia a antibióticos son los candidatos ideales para explicar el flujo de genes entre cepas bacterianas. El propósito de este trabajo fue determinar la presencia de plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp. El estudio estuvo conformado por 12 cepas aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, Cumaná, Estado Sucre, durante el periodo de septiembre - noviembre de 2005. A las cepas se les realizó un antibiograma para determinar la resistencia a diversos antimicrobianos, y la extracción plasmídica, esta última, mediante el método modificado de lisis alcalina. Todas las cepas fueron resistentes a los betalactámicos, así como, productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido. El 91,66% de las cepas de *Klebsiella* spp fue resistente a dos o más familias de antimicrobianos. Se demostró la presencia de plásmidos en todas las cepas. El 58,33% presentó una banda plasmídica de alto peso molecular, el resto de las cepas presentó más de una molécula plasmídica. La presencia de plásmidos sugiere la posibilidad de que estas moléculas conjuntamente con otros elementos genéticos, sean los principales responsable de la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos, principalmente a los betalactámicos, en las cepas de *Klebsiella* spp estudiadas.

Palabra y/o Frases Claves: *Klebsiella*, Plásmidos, Intrahospitalarios

## INTRODUCCIÓN

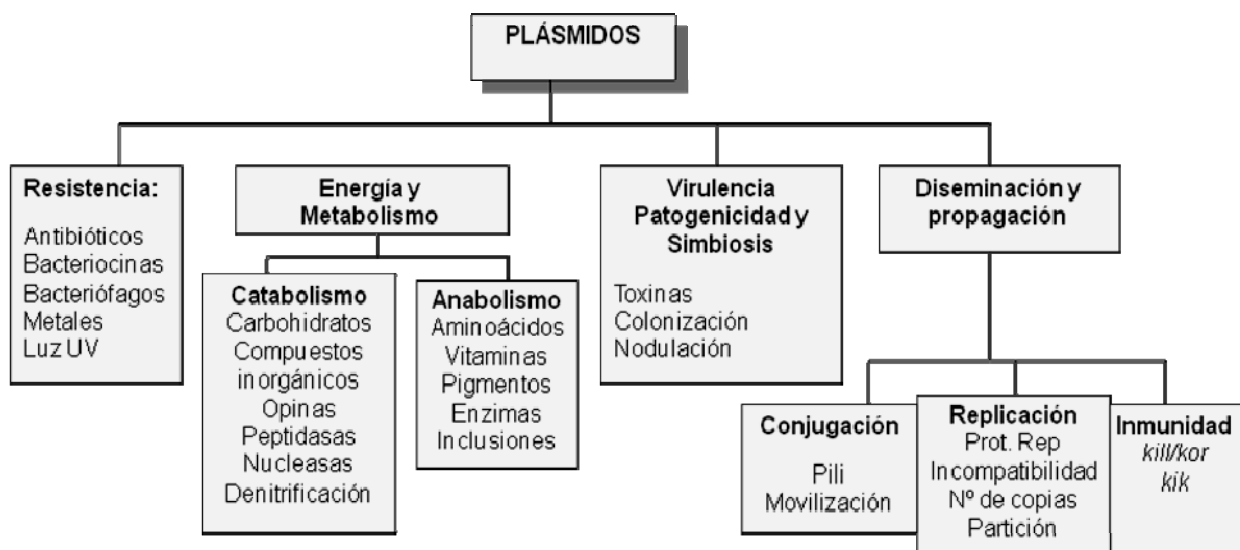
*Klebsiella pneumoniae* es uno de los bacilos Gram negativos más frecuentemente aislados de episodios infecciosos a nivel hospitalario. Las cepas pertenecientes a esta especie presentan elevados porcentajes de resistencia, en especial a los antibióticos de amplio espectro como las cefalosporinas de tercera generación (C3G), aminoglucósidos, entre otros (Babini y Livermore, 2000; Díaz *et al.*, 2004).

La multiresistencia es consecuencia de la variación genética, la cual es esencial para que ocurra la evolución bacteriana. Una de las aplicaciones prácticas más interesante de los avances realizados, en las últimas décadas, en el campo de la genética bacteriana, ha sido comprender los mecanismos genético-moleculares de la resistencia a los antimicrobianos. Los cuales proporcionan una fuerte presión de selección sobre las poblaciones bacterianas, favoreciendo a aquellas bacterias que son capaces de resistir su efecto. Las variaciones génicas pueden dar origen a poblaciones bacterianas resistentes a los agentes antimicrobianos, a través de mutaciones espontáneas y/o por la adquisición de elementos genéticos como plásmidos que codifican determinantes de resistencia (Gupta *et al.*, 2003). La adquisición de elementos genéticos es considerado uno de los principales problemas a nivel hospitalario, debido a su fácil diseminación en cepas bacterianas (Facinelli *et al.*, 1985).

Los plásmidos son elementos extracromosómicos de ADN de doble cadena, circulares, covalentemente cerrados, genéticamente autónomos e independientes del cromosoma de la célula hospedadora. De acuerdo a su tamaño los plásmidos pueden clasificarse como: megaplásmidos (>100KDalton) o miniplásmidos (menos de 100 pb), aunque generalmente, estos presentan un tamaño variable que oscila entre menos de 10 000 a más de 400 000 pb (Kolsto, 1997; Kado, 1998; Alonso *et al.*, 2001b). Los plásmidos con tamaños moleculares entre 30 y 40 pb son moléculas que solo presentan un origen de replicación y no poseen marcos abiertos de lectura (Kado, 1998).

El conocimiento de los diferentes mecanismos de transferencia horizontal permite deducir que los plásmidos son los elementos que mayoritariamente contribuyen al proceso de evolución bacteriana, ejemplo de esto lo constituye el rápido incremento en la diseminación de la resistencia a un antimicrobiano dentro de una especie o entre especies, cuando a menudo las poblaciones bacterianas están sometidas a la fuerte presión selectiva ejercida por los antimicrobianos empleados en diversos centros hospitalarios (Kado, 1998; Frost *et al.*, 2005).

Además de la resistencia a los antimicrobianos, los plásmidos pueden codificar para una amplia variedad de funciones. Kado (1998) propuso que las funciones plasmídicas pueden resumirse en cuatro grupos principales: resistencia; energía y metabolismo; virulencia, patogenicidad y simbiosis; y diseminación y perpetuación (figura 1).



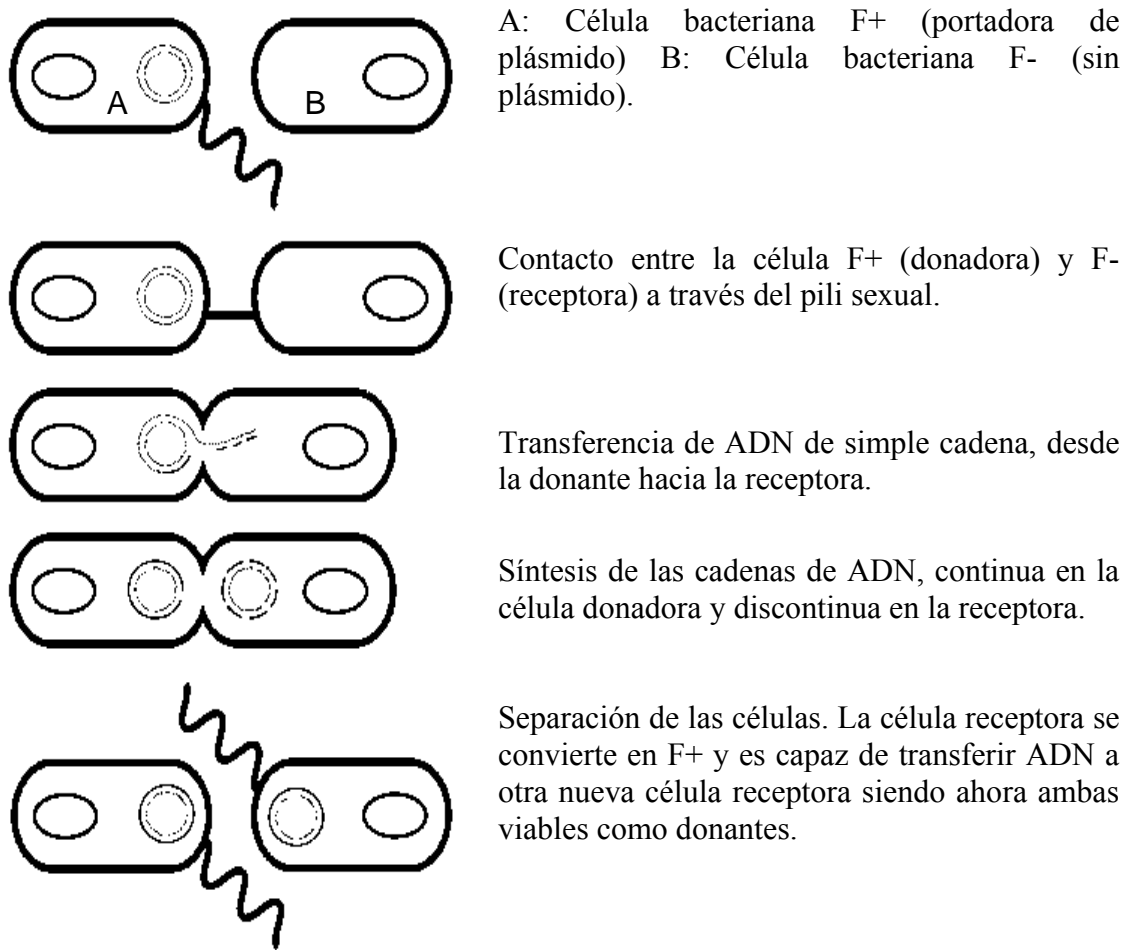
**Figura 1.** Características funcionales de los plásmidos según Kado. *Kill*: gen de letalidad; *kor*: gen regulador de la letalidad; *kik*: gen letal en *Klebsiella pneumoniae* (Tomado de Kado, 1998).

En una célula bacteriana pueden encontrarse múltiples copias de plásmidos. Los plásmidos muy relacionados, con frecuencia no pueden coexistir en la misma célula, lo que ha llevado a establecer un esquema de clasificación de plásmidos basado en grupos de incompatibilidad. La base molecular para la clasificación de los plásmidos en grupos de incompatibilidad reside en las características y regulación de los orígenes de replicación de la molécula (Alonso *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2000a; Alonso *et al.*, 2001b). Hasta ahora se conocen más de 30 grupos de incompatibilidad (Inc) en enterobacterias, que son identificados con las letras del alfabeto (Alonso, 2005).

Los plásmidos del complejo de incompatibilidad H (IncH) son de gran interés epidemiológico, ya que poseen una enorme capacidad de albergar determinantes de resistencia contra los agentes antimicrobianos. Estos plásmidos se encuentran ampliamente diseminados entre bacterias Gram negativas causantes de importantes patologías (Rodríguez *et al.*, 1998).

La transferencia de un plásmido entre especies bacterianas es un proceso complejo, basado en esta propiedad los plásmidos se han clasificado en conjugativos, no conjugativos y movilizables. Los plásmidos conjugativos codifican toda la maquinaria necesaria para la conjugación, mediada por una serie de proteínas codificadas por más de 30 genes (*tra*) organizados en tres operones: *traM*, *traJ* y *traS*, que ocupan una porción de hasta 33 kilobases de la molécula plasmídica, razón por la cual, éstos tienden a ser más grandes que los restantes (Alonso *et al.*, 2005). Los plásmidos no conjugativos no presentan genes que codifiquen las proteínas necesarias para la transferencia, sin embargo, algunos plásmidos no conjugativos pueden ser movilizables, ya que tienen como máximo dos genes (*mob*), que ocupan una zona de, aproximadamente, 2 kilobases. Los plásmidos no conjugativos sólo pueden cotransferirse con los plásmidos conjugativos (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992; Actis *et al.*, 1999 y Pedroza *et al.*, 2001).

La conjugación es la principal vía de disseminación de genes entre las poblaciones bacterianas y consiste en la transferencia de plásmidos desde una bacteria a otra (figura 2), este mecanismo es responsable de la evolución y diversidad entre las diferentes especies (Redondo y Alonso, 2007).



**Figura 2.** Etapas del proceso de conjugación bacteriana (Tomado de [www.microbiología.com](http://www.microbiología.com), con modificaciones)

En el proceso de conjugación se distinguen dos grandes fases, que aun cuando estas se enumeran separadamente, ambas ocurren en paralelo. La primera es el contacto entre la célula donante y receptora. La célula donante presenta en su superficie un *pilus*, el cual se forma por los productos de expresión de determinados genes. Los *pili* son apéndices en forma de cilindro, constituidos por unidades de la proteína pilina, son

específicos para cada tipo de plásmido, y en muchas oportunidades sirven para agruparlos. Usualmente se encuentran de 1-3 *pilus* por célula. Cada *pilus* se origina en la membrana interna de la célula donante y se extiende a través de su pared celular hasta el ambiente extracelular e interacciona, específicamente, con una proteína de la membrana externa presente en la célula receptora. Cuando esto sucede, el *pilus* se va despolimerizando desde su base, dando una apariencia de que se está contrayendo, en este proceso de despolimerización la célula receptora se va acercando a la célula donante, hasta que quedan en contacto pared-pared, inmediatamente las células quedan estabilizadas y se forma el poro conjugativo (Frost *et al.*, 2005).

La segunda fase es conocida como transferencia del ADN, se inicia en una región del plásmido conocida como origen de transferencia (*oriT*). Según Llosa *et al.* (2002), la transferencia del ADN está basada en un esquema de replicación y secreción. La replicación es de tipo círculo rodante (RCR), en este proceso primero se corta una de las hebras del plásmido, en el extremo 5' libre de la hebra cortada se une por medio de uniones covalentes a una relaxasa. Este complejo núcleo-proteico es transferido hacia un sistema de secreción tipo IV, presente en la membrana externa de la célula donante, el cual es el responsable de la transferencia del ADN a la célula receptora.

Desde el punto de vista de salud pública, los determinantes genéticos de mayor importancia presentes en plásmidos son los que codifican para factores de virulencia y los asociados a la resistencia bacteriana, debido a la capacidad que tienen para promover la diseminación horizontal de un gran número de genes, que contribuyen al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y a la aparición de cepas patógenas multirresistentes (Narváez *et al.*, 2005).

El estudio epidemiológico de los plásmidos está basado en la investigación del perfil plasmídico, el cual es un método ampliamente aplicado, y muchas veces ofrece información diferente y complementaria a la obtenida en el análisis de diversidad (Calderón y Yagui, 2002). La tipificación plasmídica, junto a los experimentos de

conjugación y pruebas fenotípicas de susceptibilidad antimicrobiana, han sido utilizadas en algunos estudios epidemiológicos con el fin de evaluar la presencia de plásmidos transferibles, portadores de determinantes de resistencia (Araque *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2001b; Alonso *et al.*, 2005; Narváez *et al.*, 2005).

En general, se asume que la identificación y clasificación de los plásmidos presentes en bacterias aisladas de ambientes hospitalarios es de gran interés epidemiológico, ya que estas moléculas extracromosomales pueden portar genes que codifican para factores de virulencia, así como para diversos determinantes de resistencia a drogas, a metales pesados, entre otros (Narváez *et al.*, 2005).

La elevada transmisibilidad de plásmidos, que portan genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar ciertos antimicrobianos como  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos, puede permitir la diseminación de la resistencia a otros patógenos, hecho que se ha demostrado al encontrar enzimas inactivantes de antimicrobianos en cepas intrahospitalarias de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes* (Paterson *et al.*, 2001; Melano *et al.*, 2003; Pitout *et al.*, 2003).

En *K. pneumoniae* se han aislado una gran variedad de plásmidos que codifican determinantes de patogenicidad y resistencia a antimicrobianos y a otras sustancias. Araque *et al.* (2000), en la ciudad de Mérida, realizaron un estudio en 12 cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de la unidad de cuidados intensivos neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Los resultados revelaron la presencia de un plásmido de 87 000 pb que portaba genes que codificaban  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

Pedroza *et al.* (2001), realizaron un estudio de resistencia bacteriana en el Hospital Universitario de Caracas y demostraron que un 80,00% de las cepas de bacilos Gram negativos de origen intrahospitalario eran multirresistentes, y de éstas, el 31,00%



presentaban plásmidos conjugativos capaces de codificar resistencia a un número representativo de agentes antimicrobianos.

Espinal *et al.* (2004), en un estudio epidemiológico molecular realizado a 15 aislados de *K. pneumoniae*, provenientes de un hospital de tercer nivel en Bogotá Colombia, demostraron la presencia de un plásmido transferible de 23 000 pb, responsable de conferir resistencia antimicrobiana a las cepas.

Guzmán (2006) evaluó la presencia de plásmidos transferibles en 29 cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de pacientes atendidos en los diferentes servicios médicos del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, y demostró que el 83,00% de las cepas presentaron plásmidos de elevado peso molecular, que conferían resistencia principalmente a las cefalosporinas de tercera generación.

Sánchez *et al.* (2006) detectaron, mediante ensayos moleculares, la presencia de genes codificantes para enzimas  $\beta$ -lactamasas, los cuales se encontraban en plásmidos conjugativos, en todas las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, aisladas de diversos cuadros patológicos en centros hospitalarios chilenos.

Redondo y Alonso (2007) caracterizaron plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes, aisladas de pacientes hospitalizados en cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas, evidenciando la presencia de moléculas plasmídicas de alto peso molecular en el 67,00% de las cepas estudiadas.

La resistencia a los antimicrobianos, codificada por estos elementos genéticos, genera un grave problema a la salud pública en los centros hospitalarios, que cada día se incrementa, involucrando diversos géneros bacterianos. Debido a que *Klebsiella* es uno de los géneros bacterianos asociados frecuentemente con

infecciones intrahospitalarias, se hace necesario demostrar la presencia de plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp multirresistentes, aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias, asistidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá” de Cumaná, Estado Sucre.

## METODOLOGÍA

### **Cepas bacterianas**

El estudio estuvo conformado por 12 cepas de *Klebsiella* spp (tabla 1), recolectadas de pacientes con diagnóstico de infección intrahospitalaria e indicación de cultivo y antibiograma, atendidos en las áreas de unidad de cuidados intensivos, medicina, cirugía y retén del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá” de Cumaná, Estado Sucre, durante el período comprendido entre septiembre y noviembre del 2005 (considerándose multirresistentes aquellas cepas que presentaron resistencia a más de dos familias de antimicrobianos). Estas cepas se encontraban preservadas en agar conservación en el laboratorio de Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis.

### **Reactivación de las cepas**

A partir del medio de conservación, se procedió a inocular las cepas bacterianas en 2 ml caldo Luria-Bertani (LB) (Himedia) a 35°C, durante 18 horas en aerobiosis, posteriormente las cepas se sembraron en agar Mac Conkey (AMC) (Himedia) y se incubaron nuevamente, atendiendo las condiciones anteriores, con la finalidad de verificar su pureza y observar las características macroscópicas de las colonias, así como los cambios producidos en el medio AMC que refleja la fermentación o no de la lactosa.

### **Confirmación de las cepas**

El género y la especie se confirmó mediante el protocolo de identificación convencional para enterobacterias (Koneman *et al.*, 2008), incluyendo las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de azúcares (medio Kligler), utilización de citrato (medio citrato Simmons), producción de la enzima ureasa (agua peptonada), vía de fermentación de la glucosa (caldo rojo metilo-Voges Proskauer), motilidad, producción

de indol, descarboxilación de la ornitina (medio MIO) y descarboxilación de la lisina (caldo lisina).

**Tabla 1.** Características epidemiológicas de las cepas de *Klebsiella* spp, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” Cumaná, Estado Sucre.

Cepas	Estadía (días)	Muestra	Servicio	Terapia previa
04*	5	Sangre	Retén	AMS,GEN
05*	8	Secreción	Retén	CAZ,AK
07*	7	Catéter	UCI	CAZ,OXA
08*	9	Secreción	Medicina A	-
09*	9	Secreción	Medicina A	-
14**	30	Catéter	Pediatría A	MER
20*	8	Catéter	Medicina C	-
22*	5	Secreción	UCI	CTX,VAN
24*	9	Secreción	UCI	VAN,AK
27*	6	LCR	Retén	GEN
33*	5	Heces	Retén	GEN
34*	9	Secreción	UCI	AK,AZT

LCR: Líquido Cefalorraquídeo, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, CAZ: Cefotaxima, CTX: Cefotaxima, GEN: Gentamicina, AK: Amikacina. AMS: Amoxicilina/sulbactam, OXA: Oxacilina, MER: Meropenem, VAN: Vancomicina, AZT: Aztreonam, \* *K. pneumoniae*, \*\* *K. oxytoca*, (-): Ninguna.

## **Confirmación de la resistencia bacteriana**

La confirmación de la resistencia bacteriana se realizó mediante el método de difusión del disco (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo los lineamientos para enterobacterias, propuestos por el Instituto para Estándares de Laboratorios Clínicos, del inglés: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008). Para ello, se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,50 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas, sembrado en agar tripticada de soya (ATS), ajustando al patrón de 0,5 en la escala de Macfarland, correspondiente a  $1,50 \times 10^8$  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: amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu\text{g}$ ), cefotaxima (30  $\mu\text{g}$ ), ceftazidima (30  $\mu\text{g}$ ), amikacina (30  $\mu\text{g}$ ), gentamicina (30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacina (5  $\mu\text{g}$ ), trimetopim-sulfametoxazol (1,25/23,75  $\mu\text{g}$ ) y cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ), todos de marca OXOID. 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 presencia fenotípica de BLEE en las cepas se determinó mediante la técnica de sinergismo de doble disco (Jarlier *et al.*, 1988) y siguiendo los lineamientos establecidos por CLSI (2008), M100-S18 (M2). En una placa de agar Mueller Hinton inoculado con una suspensión de la cepa bacteriana, preparada en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril y ajustada al patrón 0,5 en la escala de MacFarland, se procedió a colocar en el medio un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10  $\mu\text{g}$ ), posteriormente, se colocaron los discos de cefotaxima (30  $\mu\text{g}$ ) y ceftazidima (30  $\mu\text{g}$ ), a una distancia lineal de 15 mm del disco de ácido clavulánico. La presencia de un sinergismo entre alguna de

las cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico se interpretó como producción de  $\beta$ -lactamasa de espectro expandido (BLEE).

La calidad de los discos antimicrobianos fue verificada con la cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **Aislamiento de ADN plasmídico (pequeña escala)**

Para determinar la presencia de plásmidos se realizó una extracción, empleando la técnica modificada de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979). El aislamiento se inició a partir de un cultivo en medio Luria-Bertani (LB) crecido a 37°C, durante 24 horas en aerobiosis, suplementado con ampicilina. A 6 ml de caldo LB se le añadió un inóculo de 10  $\mu$ l de cultivo en fase estacionaria de la cepa de interés. Este se incubó durante 16 horas a 37°C, posteriormente, las células bacterianas se recolectaron en dos tubos ependorff por centrifugación a 13 400 g durante 5 minutos (dos tubos por cada cepa), el sedimento se resuspendió en 1 ml de solución salina fisiológica estéril, y se centrifugó a 13 400 g durante 5 minutos. Al sedimento se le colocó 100  $\mu$ l de solución I fría (glucosa 50,00 mmol l<sup>-1</sup>, Tris-HCl 25,00 mmol l<sup>-1</sup>, pH 8, EDTA 10,00 mmol l<sup>-1</sup> pH 8,0) y 10  $\mu$ l de Lisozima (10,00 mg ml<sup>-1</sup>) recién preparada, se mezcló en vórtex y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Luego se agregaron 200  $\mu$ l de solución de lisis (NaOH 0,20 equ l<sup>-1</sup>, SDS 1,00%, pH 11,0), se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Al finalizar esta incubación, se añadió 150  $\mu$ l de solución III fría (acetato de potasio 3,00 mol l<sup>-1</sup>, pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos, se centrifugó durante 15 minutos y el sobrenadante se colocó en tubos limpios. Se le agregó fenol-cloroformo (1:1). La solución se mezcló con vórtex y se centrifugó a 13 400 g durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a tubos ependorff estériles, cuidando de no tomar suspensión cercana a la interfase, se le agregó 2 volúmenes de etanol al 100,00%, se mezcló por inversión y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 13 400 g por 10 minutos y se lavó con 1 ml de etanol al 70,00% se mezcló por inversión, se centrifugó 5 minutos y el sedimento se dejó secar a 37°C. El

sedimento se resuspendió en 12  $\mu\text{l}$  de agua purificada para luego hacer una mezcla de ambos tubos, la extracción se dejó a 37°C toda la noche para su hidratación.

## **Electroforesis**

Las muestras de ADN plasmídico se observaron en un gel de agarosa 0,80%, que se preparó disolviendo 0,80 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1X (Stock 10X: tris base 0,80 mol l<sup>-1</sup>, ácido bórico 0,80 mol l<sup>-1</sup>, EDTA 0,02 mol l<sup>-1</sup>). Este buffer se utilizó además para realizar las migraciones electroforéticas.

Para las corridas electroforéticas se empleó un buffer de carga (azul de bromofenol 0,20% y sacarosa 0,20%), se mezclaron 3  $\mu\text{l}$  de este buffer con 8  $\mu\text{l}$  de la muestra, la mezcla se colocó en el gel, y se corrieron entre 60 a 80 voltios, durante una hora y media, aproximadamente. Para luego ser coloreados con solución de bromuro de etidio 0,50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , durante 5 minutos, el exceso de bromuro se eliminó al mantener el gel en agua durante 5 minutos. Las bandas plasmídicas se observaron en un trasiluminador de luz ultravioleta para finalmente ser fotografiadas y analizadas.

## **Estimación del tamaño del ADN plasmídico**

El tamaño del ADN plasmídico se estimó mediante la comparación de las distintas bandas observadas en las muestras con los diferentes tamaños de ADN contenidos en el marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder (GeneRuler<sup>TM</sup>).

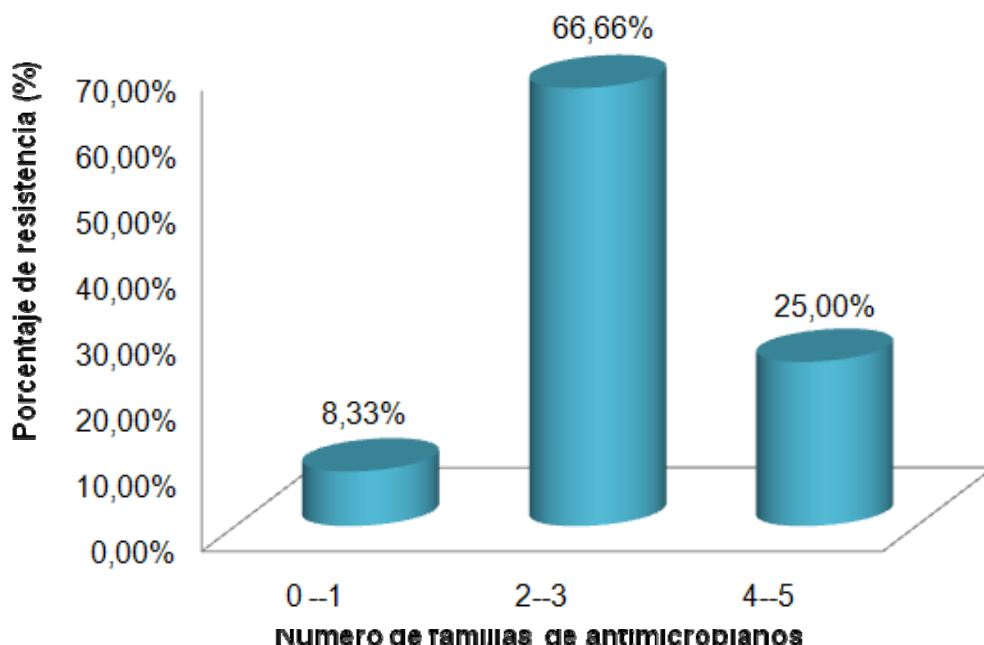
## **Control de calidad**

Como control positivo de la extracción de ADN plasmídico se utilizó la cepa transconjugante *E. coli* (T12), la cual contiene un plásmido de 45 Kb.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública a nivel mundial, que adquiere mayores complicaciones en el ambiente hospitalario, debido a la presión selectiva ejercida por el uso de estos compuestos, los cuales promueven la selección y acumulación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas residentes en dicho ambiente, dando origen al fenómeno conocido como resistencia múltiple a los antimicrobianos (Levy y Marshall, 2004; Alonso *et al.*, 2005; Narváez *et al.*, 2005).

En este trabajo se obtuvo que el 91,66% de las cepas analizadas presentaron multirresistencia. El mayor porcentaje de las cepas (66,66%) mostró resistencia a dos y tres familias de antimicrobianos, hecho que refleja un patrón complejo de resistencia en las cepas aisladas del centro hospitalario (figura 3).



**Figura 3.** Distribución porcentual de las de cepas de *Klebsiella* spp, según la resistencia asociada.

El género *Klebsiella* no había sido considerado como una especie patógena



para el hombre, sin embargo, en los últimos años, quizás debido al mal uso de antibióticos y al empleo de procedimientos diagnósticos más agresivos, su papel como agente etiológico responsable de patologías inespecíficas ha ido en aumento, sobre todo en el ámbito intrahospitalario (Byarugaba, 2004). El Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana, para el año 2005, registró un significativo aumento en los porcentajes de resistencia frente a varias clases de antimicrobianos en este género, sobre todo, en los aislados de origen intrahospitalario (Valenzuela *et al.*, 2005).

Existen diversos factores que contribuyen al aumento de la resistencia bacteriana contra los antimicrobianos, entre los más comunes se encuentran el uso indiscriminado de los mismos, el mal uso de sustancias antisépticas, la hospitalización prolongada, la utilización de procedimientos y dispositivos invasivos permanentes, aumento de la población de alto riesgo, la aparición de cepas resistentes en los hospitales y la falta de monitoreo de brotes ocasionados por dichas cepas (Crespo, 2005).

García *et al.* (2009) demostraron en su investigación, susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de enterobacterias intrahospitalarias aisladas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, que *K. pneumoniae* ocupó el primer lugar de aislamiento con un 51,85%. La resistencia observada *in vitro* en las cepas reveló la existencia de patrones de resistencia complejos.

El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana reveló patrones variados de resistencia (tabla 2). Los fenotipos se establecieron teniendo en cuenta la resistencia asociada a los diferentes tipos de antimicrobianos por parte de cada una de las cepas, los cuales se designaron forma arbitraria, con letras del alfabeto. Allí se observa que todos los fenotipos mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

**Tabla 2.** Características fenotípicas de las cepas de *Klebsiella* spp, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” Cumaná, Estado Sucre.

<b>Cepas</b>	<b>Resistencia</b>	<b>BLEE</b>	<b>Fenotipo de resistencia</b>
04*	CAZ CTX GEN SXT	+	A
05*	CAZ CTX SXT CL	+	B
07*	CAZ CTX CL	+	C
08*	CAZ CTX SXT CL CIP GEN	+	D
09*	CAZ CTX GEN	+	E
14**	CAZ CTX SXT CL	+	B
20*	CAZ CTX CL	+	C
22*	CAZ CTX SXT CL CIP GEN AK	+	F
24*	CAZ CTX	+	G
27*	CAZ CTX CL	+	C
33*	CAZ CTX SXT CL GEN	+	H
34*	CAZ CTX SXT CL	+	B

CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, GEN: Gentamicina, AK: Amikacina. STX: Trimetoprim-sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol, CIP: Ciprofloxacina. BLEE: Beta-lactamasas de espectro expandido. \* *K. pneumoniae*, \*\* *K. oxytoca*.

Al asociar la resistencia presentada por cada cepa con los antecedentes epidemiológicos y clínicos de la tabla 1, se encontró que las cepas presentaron resistencia a algunos de los antimicrobianos que estaban siendo empleados como opción terapéutica, hecho que pone de manifiesto que la presión selectiva generada por el uso

de antimicrobianos trae como consecuencia un fracaso terapéutico, debido a la selección de mecanismos de resistencia.

En el estudio también se observaron cepas que presentaron multirresistencia, pero los pacientes de donde se aislaron no estaban recibiendo tratamiento antimicrobiano y tenían poco tiempo de hospitalización, tal es el caso de las cepas 08, 09 y 20. Al respecto, se puede inferir que los pacientes pudieron adquirir las cepas del ambiente hospitalario, ya que la presión selectiva generada en el centro hospitalario es constante y siempre está presente por el uso de los antimicrobianos como tratamiento.

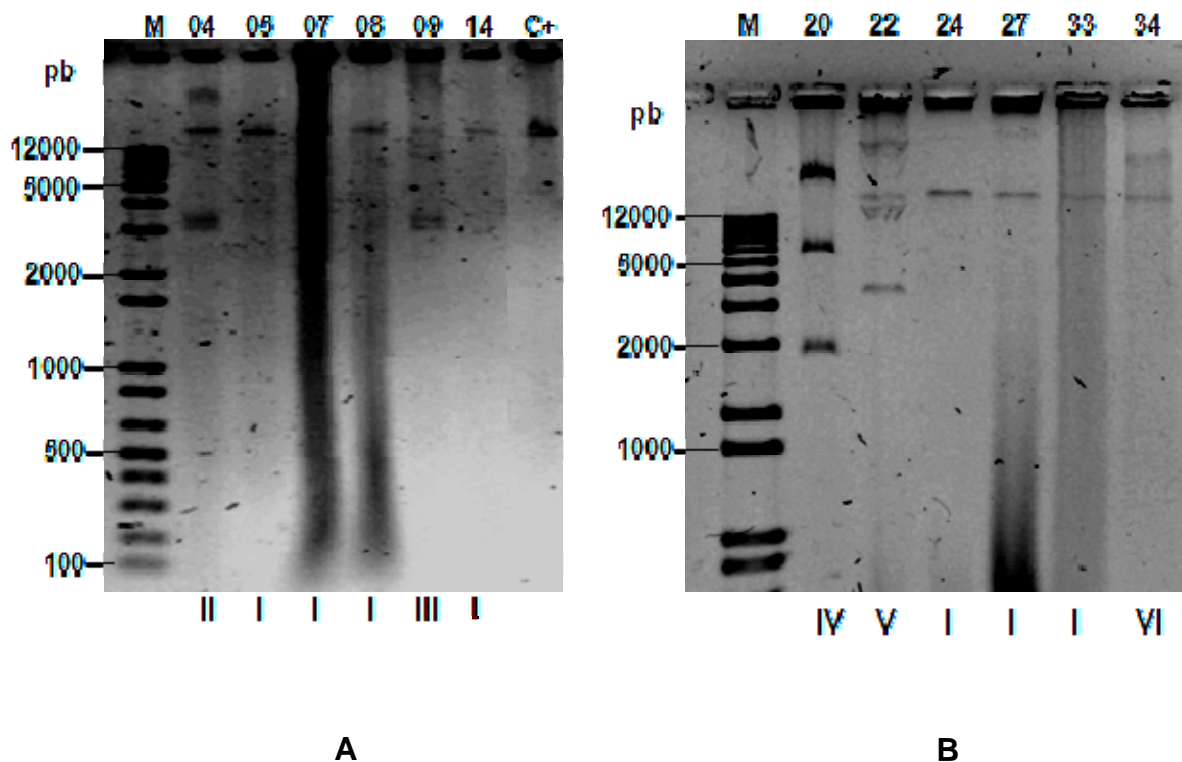
Los antibióticos a los cuales el mayor porcentaje de resistencia las cepas mostraron fueron los  $\beta$ -lactámicos, resultando el 100% de éstas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (BLEE). Las infecciones causadas por cepas productoras de BLEE constituyen un importante problema de salud pública, debido a la multirresistencia usualmente asociada, sus implicaciones en brotes intrahospitalarios y su tendencia a incrementarse y diseminarse rápidamente (Podschun y Ullmann, 1998; Bradford, 2001; Silva *et al.*, 2001). Los altos índices de BLEE son marcadores clínicos importantes, y el conocimiento de su incidencia puede conducir a la toma de decisiones para intervenir y prevenir las altas tasas de morbimortalidad que dichas cepas pueden ocasionar en los pacientes hospitalizados (Medeiros, 1997).

Las bacterias productoras de BLEE han conducido a cambios en los perfiles de resistencia antimicrobiana de los ambientes hospitalarios y representan uno de los mecanismos de resistencia de mayor impacto clínico asociado a plásmidos. Los plásmidos que transportan BLEE son megaplásmidos que frecuentemente codifican resistencia a otros antimicrobianos, tales como aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol (Cormican *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2001). Al respecto, en el presente estudio se observó que las cepas, además de producir BLEE, algunas presentaban resistencia a CL, STX, CIP y/o aminoglucósidos, lo cual hace pensar en la posibilidad que alberguen plásmidos.

Los plásmidos que codifican para la resistencia a antibióticos son los candidatos ideales para explicar el flujo de genes entre cepas bacterianas, y comprender la multirresistencia de las bacterias a los diversos antibióticos de uso frecuente en la clínica (Narváez *et al.*, 2005).

En todas las cepas de *Klebsiella* spp fue posible detectar la presencia de plásmidos (figura 4). Cabe destacar que, en este trabajo no se pudo obtener un buen rendimiento de ADN plasmídico utilizando los protocolos estandarizados por Guzmán (2006), quien empleó CTAB (Hexadecyltrimetyl–amonium bromide) al 10,00%, para degradar la cápsula polisacárida presente en las cepas de *Klebsiella* spp, razón por la cual se agregó lisozima (10,00 mg ml<sup>-1</sup>) (Sigma) como paso adicional al protocolo establecido, junto con la solución I, con el propósito de aumentar el rendimiento y la calidad del ADN plasmídico.

El perfil plasmídico de cada una de las cepas se asignó arbitrariamente en números romanos, tomando en cuenta el número y tamaño de las bandas plasmídicas presentes en las mismas. Los resultados del análisis, revelaron que todas las cepas presentaron una banda común de más de 12 000 pb, aproximadamente. Considerando que cada banda corresponde a una molécula plasmídica o plásmido, se encontró que el 58,33% de las cepas (05, 07, 08, 14, 24, 27 y 33) presentaron una banda, así como el mismo perfil plasmídico (I), mientras que el 41,66% de las cepas restantes (04, 09, 20, 22 y 34), presentaron más de una banda, en un rango de dos hasta cinco moléculas plasmídicas y diferentes perfiles plasmídicos (II, III, IV, VI). De igual forma, se puede apreciar la presencia de bandas de bajo peso molecular, que oscilan desde 6 000 pb hasta 2 000 pb, aproximadamente.



**Figura 4.** Perfil plasmídico de las cepas de *Klebsiella* spp, aisladas de pacientes atendidos en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”. A. Carriles del 1 al 8: M: marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, 2:cepa 04, 3:cepa 05, 4:cepa 07, 5:cepa 08, 6:cepa 09, 7:cepa 14, 8:control positivo. B. Carriles del 1 al 7: M: marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, 2:cepa 20, 3:cepa 22, 4:cepa 24, 5:cepa 27, 6:cepa 33, 7:cepa 34.

Los resultados del análisis sugieren la presencia de plásmidos de alto peso molecular en las cepas estudiadas, e indican la posibilidad de que exista un plásmido en común circulando entre las cepas de *Klebsiella* spp aisladas de las diferentes áreas del hospital, sin embargo, hay que considerar el hecho de que en una electroforesis convencional, el poder de migración de los plásmidos se encuentra limitado en moléculas de elevado peso molecular. Esta explicación justifica que en los geles de agarosa las bandas, con diferente peso molecular, migren hasta una distancia determinada, las cuales, al ser observadas, parecieran ser las mismas, aspecto que debe ser considerado al analizar el perfil plasmídico.

El análisis sugiere que los plásmidos observados en las cepas 05, 07, 08, 14, 24, 27 y 33, pudieran tratarse de un mismo plásmido, de plásmidos diferentes que comparten tamaño, o de cepas relacionadas clonalmente, exceptuando la cepa 14 quien comparte banda plasmídica, pero es una *K. oxytoca*. De todos los aspectos mencionados, el último es el menos probable, ya que cepas relacionadas clonalmente no necesariamente deben poseer los mismos plásmidos.

Los plásmidos presentes en las cepas 05, 07, 08, 14, 24, 27 y 33, son los candidatos para considerarse plásmidos conjugativos, quienes, tienen mayor probabilidad de portar los genes *tra*, los cuales son los responsables de la transferencia plasmídica. Al respecto, Silva (2009), demostró la transferencia plasmídica *in vitro* en la cepa 33.

En cuanto a los plásmidos de bajo peso molecular presentes en las cepas, posiblemente por su tamaño, sean plásmidos movilizables que puedan transferirse conjuntamente con plásmidos conjugativos presentes en las cepas residentes de ambiente hospitalario.

El hallazgo de plásmidos representa un problema clínico importante en el centro hospitalario, ya que es conocido que los plásmidos son los principales responsables de la diseminación de los determinantes de resistencia bacteriana. En el área clínica, es de interés epidemiológico conocer el análisis del perfil plasmídico y perfil de restricción en bacterias aisladas de diferentes ambientes, ya que estas moléculas extracromosomales de elevado peso molecular pueden portar genes que codifican para diversos determinantes de resistencia. Conjuntamente con una evaluación epidemiológica y molecular de las enfermedades infecciosas intrahospitalarias, se puede determinar la relación que existe entre cepas. Toda la información obtenida del estudio plasmídico es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permiten identificar la fuente de contaminación o reservorio, los vehículos de

transmisión y evaluar la eficacia de las medidas de control, así como diferenciar entre una infección y/o recidiva en el ambiente hospitalario (Iáñez, 1997; Torres *et al.*, 1999; Calderón y Yagui, 2002; Torres *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2005; Narváez *et al.*, 2005).

Narváez *et al.* (2005) realizaron un estudio con la finalidad de caracterizar plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados intrahospitalarios del Hospital Universitario de Caracas. El género *Klebsiella* fue el microorganismo que se aisló con mayor frecuencia (56,60%). En todas las cepas se logró detectar la presencia de plásmidos de elevado peso molecular de diferentes tamaños.

Torres *et al.* (2006) realizaron un estudio con el propósito de determinar la frecuencia de los distintos tipos de BLEE, en ocho centros de salud del área Metropolitana de Caracas, allí encontraron que el 47,30% de las cepas aisladas pertenecían al género *Klebsiella* y poseían un perfil de resistencia complejo. En estas cepas se demostró que los genes que codificaban a las BLEE estaban asociados a plásmidos conjugativos de elevado peso molecular. Por su parte, Redondo y Alonso (2007), en Caracas, demostraron la presencia de moléculas plasmídicas de alto peso molecular en cepas de *K. pneumoniae*, además comprobaron la diseminación de los plásmidos en las mismas.

Por su parte, Redondo y Alonso (2007), en su estudio caracterización de plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes, aisladas de pacientes hospitalizados en cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas, demostraron la presencia de moléculas plasmídicas de alto peso molecular en 15 cepas de *K. pneumoniae* seleccionadas para dicho estudio, además, comprobaron la diseminación de los plásmidos en las mismas.

En la tabla 3 se muestra el perfil plasmídico, los fenotipos de resistencia y las áreas de donde fueron aisladas las cepas, en ella se puede observar que las cepas 04, 09 y 22, procedentes de retén, medicina A y UCI, presentaron una banda de 3 500 pb, la cual se

visualizó asociada a una banda de 10 000 pb, aproximadamente, presente en las cepas 09 y 22.

**Tabla 3.** Caracterización fenotípica de las cepas de *Klebsiella* spp, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá” Cumaná, Estado Sucre.

<b>Cepa</b>	<b>Área</b>	<b>Fenotipo de resistencia</b>	<b>BLEE</b>	<b>Perfil plasmídico</b>
04*	Retén	A	+	II
05*	Retén	B	+	I
07*	UCI	C	+	I
08*	Medicina A	D	+	I
09*	Medicina A	E	+	III
14**	Pediatría A	B	+	I
20*	Medicina C	C	+	IV
22*	UCI	F	+	V
24*	UCI	G	+	I
27*	Retén	C	+	I
33*	Retén	H	+	I
34*	UCI	B	+	VI

\**K. pneumoniae*, \*\**K. oxytoca*. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos. BLEE: Beta-lactamasas de espectro expandido.

Los resultados revelaron que las cepas aisladas de los diferentes servicios médicos comparten bandas plasmídicas lo que podría indicar la permanencia y diseminación de plásmidos entre las diferentes áreas del mismo centro hospitalario.

La capacidad de transferencia plasmídica en las cepas 09 y 22 fue demostrada por



Silva (2009), hallazgo que soporta la hipótesis, de que los plásmidos de elevado peso molecular son los elementos ideales para asegurar la diseminación plasmídica, sin embargo, debido a que aún no se ha realizado el aislamiento de los plásmidos en las cepas transconjugantes 09 y 22, no se puede corroborar que existe movilización de los plásmidos de bajo peso molecular entre las cepas, no obstante, hay que tener presente que los acontecimientos que ocurren *in vivo* no son siempre los que ocurren *in vitro*, debido a que muchos factores como el pH de los medios, condiciones de incubación, entre otros, juegan un papel fundamental en el proceso de conjugación.

Andrade *et al.* (2004) caracterizaron molecularmente aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, obtenidos de pacientes pediátricos y personal de salud, en la unidad de cuidados intensivos de un hospital de tercer nivel de atención en la Ciudad de México. En dicho estudio se identificaron diferentes tipos de plásmidos en cepas relacionadas clonalmente. Por su parte, Damjanova *et al.* (2007), en un estudio epidemiológico molecular, realizado en cinco unidades de cuidados intensivos neonatales de hospitales húngaros, demostraron la existencia de brotes epidémicos producidos por cepas de *Klebsiella* spp multirresistentes, las cuales albergaban plásmidos de diferentes tamaños moleculares que oscilaban entre los 2 200 pb y 228 000 pb.

Es notoria la variabilidad en la resistencia presentada por los distintos aislamientos, sólo se observó en tres casos, el fenotipo de resistencia C (CAZ, CTX, CL), y B (CAZ, CTX, STX, CL), respectivamente. También se puede denotar que la gran mayoría de las cepas no comparten fenotipos, pero sí en su totalidad, determinantes de resistencia para los betalactámicos, específicamente, para las cefalosporinas de tercera generación CAZ y CTX, resistencia que puede deberse a la producción de BLEE observada en las cepas.

Cuando se compara el perfil de resistencia con el perfil plasmídico de cada cepa, se visualizó que las cepas 07 y 27 presentan el mismo fenotipo de resistencia (C), y el

mismo perfil plasmídico (I), en este caso pudiera tratarse de un mismo plásmido, sin embargo, la cepa 20 presenta el mismo patrón fenotípico que 07 y 27, pero sólo comparte la molécula de más 12 000 pb. Por otra parte, las cepa 05, 14 y 34, presentaron el mismo fenotipo de resistencia (B), sin embargo, la cepa 34 no comparte el mismo perfil plasmídico (VI) que 05 y 14. Los resultados planteados, inducen a concluir que no existe una relación entre el perfil plasmídico y el perfil de resistencia de las cepas, debido a la variabilidad observada, desde el punto de vista epidemiológico, con los resultados obtenidos no se podría concluir sobre la relación clonal entre las cepas estudiadas mediante antibiograma y perfil plasmídico, ya que estos métodos tienen bajo poder de discriminación. Cabe destacar que resultados similares de antibiograma no necesariamente indica que se trate de la misma cepa o viceversa.

Todas las cepas presentaban determinantes de resistencia para CAZ y CTX, eran productoras de BLEE y compartían la banda plasmídica de más de 12 000 pb. Este aspecto es muy importante, debido a que generalmente las enzimas tipo BLEE están codificadas en plásmidos de elevado peso molecular, los cuales tienen la potencialidad de provocar una transmisión horizontal de la resistencia, creando problemas epidemiológicos importantes en los ambientes hospitalarios (Paterson *et al.*, 2001).

Al respecto, hay que tener en cuenta de que no todos los plásmidos presentes en las cepas bacterianas son plásmidos de resistencia, también pueden encontrarse plásmidos que portan determinantes de patogenicidad, factores de virulencia, relacionados con el metabolismo o plásmidos sin genes bacterianos (Kado, 1998; Alonso *et al.*, 2000b).

En *K. pneumoniae*, la multirresistencia suele asociarse con mayor frecuencia a la expresión de genes presentes en plásmidos, en transposones o en integrones, con varios genes de resistencia simultáneamente en el mismo elemento genético (Moland *et al.*, 2002). Los plásmidos son los elementos claves en la transmisión horizontal de la información genética. Son capaces de propagar rápidamente las resistencias a los antibióticos entre los miembros de una misma o diferente especie (Bryan, 1989; Ayres

*et al.*, 1995). La transferencia de genes entre especies bacterianas relacionadas filogenéticamente es un proceso generalizado en el mundo microbiano, además, se trata de uno de los mecanismos más importantes relacionados con la evolución de los genomas y, la aparición de nuevos caracteres dentro de una especie (Yoneyama y Katsumata, 2006; Portale y Silva, 2008).

La presencia de plásmidos conjugativos que portan genes que codificantes de BLEE, pueden permitir la diseminación de la resistencia a otros patógenos, la cual se ha demostrado, debido a que se han encontrado enzimas tipo BLEE en cepas intrahospitalarias de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes* (Paterson *et al.*, 2001; Melano *et al.*, 2003; Pitout *et al.*, 2003).

Al respecto, la transferencia de determinantes de resistencia en las cepas 09, 22 y 33 fue comprobada por Silva (2009), quién reportó una frecuencia de conjugación de  $10^{-4}$  transconjugantes por célula donante, y producción de BLEE en las cepas transconjugantes. Así mismo, Sánchez *et al.* (2006), en Chile, demostraron la transferencia horizontal de determinantes de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y aztreonam en cepas de *K. pneumoniae*. También, Portale y Silva (2008), reportaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes productoras de BLEE, en el Hospital Universitario de Caracas, cuyos determinantes de resistencia fueron detectados en plásmidos conjugativos.

A nivel local, Guzmán (2006), demostró la presencia de plásmidos conjugativos en cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de las diferentes áreas de hospitalización del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, el 83,00% de éstas, presentó plásmidos conjugativos de elevado peso molecular, los cuales eran portadores de genes de resistencia para  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y cloranfenicol.

La presencia de plásmidos en el mencionado centro hospitalario sugiere que estos

elementos, portadores de genes que codifican para resistencia a varios antimicrobianos, se encuentran presentes en las diferentes áreas del HUAPA, lo que representa un problema epidemiológico importante, ya que poblaciones sensibles, relacionadas o no filogenéticamente, puedan convertirse rápidamente en cepas multirresistentes.

## CONCLUSIONES

Las cepas de *Klebsiella* spp, aisladas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, reflejaron un patrón complejo de resistencia, involucrando al menos dos o más familias de antimicrobianos.

Todas las cepas fueron resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, específicamente a las cefalosporinas de tercera generación, cuya resistencia está mediada, al menos, por la producción de betalactamasas de espectro expandido.

En todas las cepas de *Klebsiella* spp, se aislaron plásmidos, presentando la mayoría una banda plasmídica de más de 12 000 pb, aproximadamente, la cual fue común en todas las cepas.

## **RECOMENDACIONES**

Fomentar el uso y selección adecuada de los agentes antimicrobianos, debido a que es el recurso más eficaz para combatir las infecciones intrahospitalarias.

Concientizar al personal de salud para que aplique normas higiénicas antes y después de examinar a los pacientes.

Continuar con estudios dirigidos a realizar el perfil de restricción plasmídico a las cepas, ya que es un método eficaz y confiable para poder diferenciar a las moléculas plasmídicas.

Identificar en las moléculas plasmídicas genes codificadores de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, entre otros.

## BIBLIOGRAFÍA

Actis, L.; Tolmasky, M. y Crosa, J. 1999. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Bioscience*, 4: 43-62.

Alonso, G. 2005. Biología de plásmidos: Estudios Moleculares y Epidemiológicos. Trabajo para ascender a la categoría de Profesor Titular. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Alonso, G.; Bruzual, I.; Campos, J. y Rodríguez, V. 1999. Cloning and characterization of a replicon region of the IncHII plasmid pHH1457. *FEMS Microbiology*, 179: 361-366.

Alonso, G.; Bruzual, I.; Campos, J. y Rodríguez, V. 2000a. Construction of a cassette for cloning and analysis of replicons. *Acta Científica Venezolana*, 51: 4-9.

Alonso, G.; Bruzual, I.; Campos, J.; Rodríguez, V. y Vilchez, G. 2001a. Caracterización física y genética de plásmidos del complejo de Incompatibilidad H. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 3: 89-92.

Alonso, G.; Gomes, C.; González, C. y Rodríguez, V. 2000b. On the mechanism of resistance to channel forming colicins (PacB) and tellurite encoded by plasmid Mip233 (IncHII). *FEMS Microbiology Letters*, 192: 257-261.

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

Alonso, G.; Narváez, P.; Toba, F.; Gomes, C.; Pedroza, R. y Rodríguez, V. 2001b. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *Memoria del Instituto de Biología Experimental*, 3: 93-96.

Amábille-Cuevas, C. y Chicurel, M. 1992. Bacterial plasmid and gene flux. *Cell*, 70: 189-199.

Andrade, V.; Silva, J.; Espinosa, L.; Jiménez, V. y Cervantes, C. 2004. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Pública de México*, 46(6): 524-528.

Araque, M.; Nieves, B.; Lauretti, L. y Rossolini, G. 2000. Molecular basis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15: 37-42.

Araque, M.; Nieves, B.; Ruiz, O. y Dagert, M. 1997. Characterization of plasmids which mediate resistance to multiple antibiotics in gram-negative bacteria of nosocomial origin. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 15: 299-305.

Ayres, E.; Kuehner, D. y Figurski, D. 1995. Mechanism of retrotransfer in conjugation: Prior transfer of the conjugative plasmid is required. *Journal of Bacteriology*, 178: 1457-1464.

Babini, G. y Livermore, D. 2000. Antimicrobial resistance among *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *Journal Antimicrobial Chemother*, 45: 183-189.

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.

Birboim, H. y Doly, A. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acid Research*, 7: 1511-1523.

Bradford, P. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detección of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 933-951.

Bryan, L. 1989. General mechanism of resistance to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22: 1-15.

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

Calderón, R. y Yagui, M. 2002. "Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular". "Instituto Nacional de Salud Lima, Perú". <http://www.ins.sld.pe>. (04/06/2008).

Carter, M.; Oakton, K.; Warner, M. y Livermore, D. 2000. Detección of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method. *Journal Clinical Microbiology*, 38: 4228-4232.

Crespo, M. 2005. La resistencia bacteriana ¿estamos preparados para detectarla?. *Asociación Colombiana de Infectología*, 9: 32-45.

Cormican, M.; Marshall, S. y Jones, R. 1996. Detección of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by the E-test ESBL screen. *Journal Clinical Microbiology*, 34: 1880-1884.



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.

Damjanova, I.; Tóth, A.; Pászti, J.; Jakab, M.; Milch, H.; Bauernfeind, A. y Füzi, M. 2007. Epidemiology of SHV-type  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* spp. From outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: 665–671.

Díaz, P.; Bello, H.; Domínguez, M.; Trabal, N.; Mella, S. y Zemelman, R. 2004. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Revista Médica Chilena*, 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 beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*, 24: 252-261.

Facinelli, B.; Montanari, M. y Calegari, L. 1985. Plasmid-specified aminoglycoside-modifying enzymes clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Epidemiology*, 1: 48-53.

Frost, L.; Leplae, R.; Summer, A. y Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: The agent of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 722-732.

García, J.; Rodríguez, E.; Carpio, C.; Albarado, L.; Salazar, E.; Flores, E.; Betancourt, J.; Araque, Y. y Guzmán, M. 2009. Susceptibilidad Antimicrobiana *in vitro* de enterobacterias nosocomiales productoras de betalactamasas de espectro expandido. Cumaná, estado Sucre, *Kasmera*, 37(1): 38-50.

Gupta, A.; Ampolo, K.; Rubenstein, D. y Saiman, L. 2003. Extended spectrum  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamasas de Espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae* (Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”). Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Mención Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Iáñez, E. 1997. “Cuerpos nucleares el tenóforo bacteriano”. “Curso de Microbiología general de Enrique Iáñez” [\(http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/09\\_micro.htm\)](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/09_micro.htm).(31/05/2009).

Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G. y Philippon, A. 1988. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectology Diseases*, 10: 867-878.

Kado, C. 1998. Origen and evolution of plasmid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 117-126.

Kolsto, A. 1997. Dinamic bacteria genome organization. *Molecular Microbiology*, 24: 241-248.

Koneman, E.; Allen, S.; Procop, G.; Jonda, W.; Schrenckenberger, P.; Woods, G. y Winn, W. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. México.

Levy, S. y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10: 122-129.

Llosa, M.; Gomis-Ruth, F.; Colf, M. y De la Cruz, I. 2002. Bacterial Conjugation: a two sep mechanism for ADN Transfport. *Molecular Microbiology*, 15: 1-8.

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 beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *Journal Antimicrobial Chemother*, 52: 36-42.

Medeiros, A. 1997. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by eneraitions of  $\beta$ -lactam antibiocs. *Clinical Infectology Disease*, 24(1): 19-45.

Moland, E.; Black, J.; Ourada, M.; Reisbig, N.; Hanson, D. y Thomson, K. 2002. Ocurrance of newer  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 3842-3847.

Narváez, P.; Pedroza, R.; Alonso, G. y Rodríguez, V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1): 29-34.

Paterson, D.; Ko, W.; Von, A.; Casellas, J.; Mulazimoglu, L. y Klugman, K. 2001. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 2206-2212.

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

Pitout, J.; Reisbig, M.; Venter, E.; Church, D. y Hanson, N. 2003. Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Journal Clinical Microbiology*, 41: 3933-3935.

Portale, P. y Silva, M. 2008. Estudio de los plásmidos conjugativos causantes de multirresistencia, en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en el Hospital Universitario de Caracas. Tesis de pregrado para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

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

Redondo, C. y Alonso, G. 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2): 100-107.

Rodríguez, V.; Pedroza, R. y Alonso, G. 1998. Multiresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos del complejo de incompatibilidad H. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 1: 69-72.

Sánchez, M.; Bello, H.; Domínguez, M.; Mella, S.; Zemelman, R. y González, G. 2006. Transferencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias. *Revista Médica Chilena*, 134: 415-420.

Silva, J.; Gatica, R.; Aguilar, C.; Becerra, Z.; Garza, U. y Velásquez, M. 2001. Outbreak of infection with extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 3193-3196.

Silva R., S. 2009. Transferencia plasmídica en aislados nosocomiales de enterobacterias resistentes a  $\beta$ -lactámicos. Tesis de pregrado para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Torres, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Benítez, M.; Domínguez, M. y Pedroza, R. 2006.  $\beta$ -Lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26: 80-88.

Torres, L.; Marcano, D.; Ramírez, A.; Rivero, N. y Pedroza, R. 2002. Detección de b-lactamasas de espectro expandido en cepas de enterobacterias aisladas de pacientes del Hospital Universitario de Caracas. XVIII Jornadas Venezolanas de Microbiología, Barquisimeto, Venezuela.

Torres, L.; Velázquez, O.; Pedroza, R. y Rodríguez, V. 1999. Transferencia plasmídica de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (ESBL) en enterobacterias aisladas de infecciones nosocomiales. XXV Jornadas Venezolanas de Microbiología, Valencia, Venezuela.

Valenzuela, P.; Santos, J.; Guzmán, M. y Comegna, M. 2005. Evolución de la susceptibilidad a los antimicrobianos de bacilos Gram Negativos en Venezuela: Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana, 1988-2004. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología, Caracas, Venezuela.

Yoneyama, H. y Katsumata, R. 2006. Antibioctic resistance en bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnonology and Biochemistry*, 70(5): 1060-1075.

## **HOJA DE METADATOS**

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

<b>Título</b>	Perfil Plasmídico en Aislados Intrahospitalarios de Klebsiella spp
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Navarro M. Jhonilys R.</b>	<b>CVLAC</b>	17 779 226
	<b>e-mail</b>	jhonilysrnm@hotmail.com
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

Palabras o frases claves:

Klebsiella
Plásmidos
Intrahospitalarios

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Microbiología	Bacteriología

### Resumen (abstract):

---

Los plásmidos que codifican para la resistencia a antibióticos son los candidatos ideales para explicar el flujo de genes entre cepas bacterianas. El propósito de este trabajo fue determinar la presencia de plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp. El estudio estuvo conformado por 12 cepas aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, Cumaná, Estado Sucre, durante el periodo de septiembre - noviembre de 2005. A las cepas se les realizó un antibiograma para determinar la resistencia a diversos antimicrobianos, y la extracción plasmídica, esta última, mediante el método modificado de lisis alcalina. Todas las cepas fueron resistentes a los betalactámicos, así como, productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido. El 91,66% de las cepas de *Klebsiella* spp fue resistente a dos o más familias de antimicrobianos. Se demostró la presencia de plásmidos en todas las cepas. El 58,33% presentó una banda plasmídica de alto peso molecular, el resto de las cepas presentó más de una molécula plasmídica. La presencia de plásmidos sugiere la posibilidad de que estas moléculas conjuntamente con otros elementos genéticos, sean los principales responsable de la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos, principalmente a los betalactámicos, en las cepas de *Klebsiella* spp estudiadas.

---

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

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Guzmán, Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	miltzaguz@yahoo.com
	e-mail	
Salazar, Elsa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> X
	CVLAC	
	e-mail	elsazul2003@yahoo.com
	e-mail	
De Donato, Marcos	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> X
	CVLAC	
	e-mail	marcosdedonato@hotmail.com
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	06	30

Lenguaje: spa



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

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_JRNM.doc	Application/ Word.doc

### Alcance:

**Espacial:** Universal

**Temporal:** Intemporal

**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:

El autor garantiza en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar a la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. El autor se reserva los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.




**Autor**  
Navarro M., Jhonilys R.



**Asesora**  
Guzmán, Militza



**Jurado**  
Salazar, Elsa



**Jurado**  
De Donato, Marcos

**POR LA COMISIÓN DE TESIS:**

