



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

TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTES A AMINOGLUCÓSIDOS
(Modalidad: Investigación)

SOPHIA KARIBAY VARGAS SALAZAR

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

CUMANÁ, 2010

TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTES A AMINOGLUCÓSIDOS

APROBADO POR:

Profa. Elsa Zuleima Salazar de V.
Asesora

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Cepas bacterianas.....	8
Reactivación de las cepas	8
Susceptibilidad antimicrobiana.....	10
Determinación de la concentración de amikacina y rifampicina a emplear en la conjugación.....	11
Conjugación.....	11
Cálculo de la frecuencia de transferencia	12
Verificación de los determinantes transferidos.....	12
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES.....	23
RECOMENDACIONES.....	24
HOJA DE METADATOS	31

DEDICATORIA

A:

Dios Todopoderoso y los Santos, por guiar mi vida por el mejor rumbo y ser mi sostén para no decaer en los momentos difíciles.

Mis padres Pablo y Blanca, por ser mi mayor ejemplo de lucha, constancia, amor y dedicación. ¡Los admiro!

Mi hermana Karelym, por estar siempre a mi lado y ser más que mi hermana, mi mejor amiga, espero que sigas el camino del estudio y cumplas tus sueños.

Orlando, por ser mi apoyo, mi confidente, mi hombro donde llorar y mi compañía para celebrar. Gracias por ser mi otra mitad.

Toda mi familia, por estar a mi lado siempre pendientes de mí y preocupados por mí bienestar.

Mis amigas Mary, Yubi, Flor, Azurima, Bertinellys, Aurimar, Evegnis, Mariela, María Virginia, Nebruska y Dulce, compañía durante este tiempo de estudio, recorriendo el camino que nos trajo hasta aquí, durante los mejores años que siempre recordaremos.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi asesora, Dra. Elsa Salazar de Vegas, gracias por confiar en mí y brindarme el apoyo necesario para el desarrollo de este trabajo.

La Dra. Militza Guzmán, por ser fundamental para el desarrollo de este estudio, siempre dispuesta a ayudar de manera incondicional. Por todo su apoyo, comprensión y cariño, mil gracias.

Los laboratorios de Bacteriología Clínica y Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, por prestar sus instalaciones para el desarrollo de este estudio.

Mis compañeras durante el desarrollo de este estudio Suyín y Karol, gracias por estar allí, juntas reímos y lloramos, pero sobre todo nos unimos con un mismo fin. No sería igual sin ustedes.

Todos mis compañeros del laboratorio de bacteriología con quienes comparto el amor por la investigación. Los quiero mucho.

Todos los que de una u otra forma colaboraron con la realización de este estudio.
Muchas gracias

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> aisladas de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos de adultos (UCI-A) y la unidad de alto riesgo neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, durante el periodo enero 1998- abril 1999.....	9
Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para amikacina y condiciones de crecimiento en amikacina y rifampicina de las cepas donantes de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, estado Mérida (enero 1998- abril 1999) y cepa receptora.....	14
Tabla 3. Frecuencia de transferencia de las cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
Tabla 4. Perfil de resistencia en cepas donantes, receptora y transconjugantes	15

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de las 20 cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, estado Mérida. 13
- Figura 2.** Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas donante, transconjugante y receptora, frente a aminoglucósidos. A. Cepa donante 538-A; B. Cepa transconjugante 538-A; C. Cepa receptora *E. coli* k-12 J53-2..... 16

RESUMEN

Entre los principales mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos descritos en las cepas de *Acinetobacter baumannii*, se destaca la producción de enzimas modificantes de estos compuestos. Con el objeto de determinar la transferencia de plásmidos en cepas de *A. baumannii* resistentes a aminoglucósidos, se estudiaron 20 cepas correspondientes a la geno especie *A. baumannii*, las cuales se obtuvieron de pacientes recluidos en la unidad de cuidados intensivos de adultos y en la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), previamente identificadas bioquímica y molecularmente. La susceptibilidad ante los aminoglucósidos se determinó mediante la prueba de difusión del disco en agar, mientras que para la Concentración Inhibitoria Mínima se emplearon tiras Etest; por su parte, los ensayos de conjugación se realizaron empleando la técnica sobre filtro. Todas las cepas fueron resistentes a estreptomycin, netilmicina y gentamicina; el 95% resistente a tobramicina, 75% resistente a amikacina y 70% resistente a kanamicina y el 50% de las cepas presentó una CIM igual o superior a $32 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se demostró que el 19% de las cepas lograron conjugarse y transfirieron a la cepa receptora *Escherichia coli* k-12 J53-2 la resistencia a amikacina, con una frecuencia de transferencia de 10^{-3} (transconjugantes por células donantes). Además, se pudo determinar, mediante antibiogramas realizados a las transconjugantes, que también se transfirió la resistencia a estreptomycin. Se concluye que la resistencia a amikacina y estreptomycin, por parte de 3 cepas de *A. baumannii*, al parecer, se encuentra codificada en plásmidos transferibles.

Palabra y/o Frases Claves:

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Acinetobacter* son cocobacilos gramnegativos, no formadores de esporas, aerobios estrictos, inmóviles, no fermentadores de glucosa, catalasa positivo y oxidasa negativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35°C y son capaces de crecer en los cultivos habituales, sin requerimientos especiales (Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996; Salazar y Nieves, 2005).

Los microorganismos incluidos en el género *Acinetobacter* han sufrido numerosos cambios taxonómicos y se les ha denominado al menos con 15 nombres genéricos diferentes (Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996). En principio, este género fue incluido dentro de la familia *Neisseriaceae*, pero actualmente, se ubica en la familia *Moraxellaceae*, incluyendo al menos 32 genoespecies, de las cuales, sólo 20 han podido ser nombradas; así mismo, existen aislamientos que han sido incluidos dentro de este género, mas no se han adscrito aún dentro de una especie (Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996; Nemeč *et al.*, 2001; Garrity *et al.*, 2002; Carr *et al.*, 2003; Nemeč *et al.*, 2009).

Las especies de *Acinetobacter* se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza y en muchos tipos de ambientes, siendo sus principales hábitats el agua y el suelo; también se han aislado de numerosos focos y fuentes, entre los que se incluyen la leche y sus derivados, comidas congeladas y aves de corral; además de encontrarse en piel, conjuntiva, recto, nasofaringe, garganta, leche humana, vagina y uretra de sujetos sanos (El-Mohades *et al.*, 1993; Fang y Madinger, 1996). Aunque la flora normal de la piel humana está ampliamente dominada por bacterias grampositivas, *Acinetobacter* spp actúa como gramnegativo comensal (Seifert *et al.*, 1997; Berlau *et al.*, 1999; Karishma *et al.*, 2007).

En el ambiente hospitalario, los focos identificados que se han asociado con brotes de infecciones han sido los guantes de látex, el agua destilada, sueros intravenosos, agujas, monitores, mesas y otro mobiliario, así como, las manos del personal sanitario,

entre muchos otros (Fang y Madinger, 1996; Towner, 1997).

A. baumannii ha sido implicado en diversos tipos de infecciones, la mayoría de ellas nosocomiales (Bergogne-Bèrèzin *et al.*, 1987). Los múltiples factores identificados para la adquisición de infecciones por esta especie bacteriana incluyen enfermedad grave, infección o sepsis previa, ventilación mecánica prolongada, antibioticoterapia previa, colonización por este microorganismo y estadía prolongada en las unidades de cuidados intensivos (López y López-Brea, 2000; Mahgoub *et al.*, 2002; Diomedi, 2005).

El éxito de *A. baumannii* en la infección nosocomial se debe, por un lado, a la extraordinaria rapidez y capacidad que presenta para desarrollar resistencia a los antimicrobianos y, por otro, a su capacidad de crecimiento en el medio ambiente inanimado (Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996; Cisneros y Pachón, 2003). Diversos estudios han demostrado la resistencia a múltiples fármacos en cepas de *Acinetobacter* spp, lo cual representa una dificultad para tratar estas infecciones (Jain y Danzier, 2004; Karishma *et al.*, 2007).

La resistencia antimicrobiana representa una condición natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana, de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un agente antimicrobiano (Bush *et al.*, 2000). El origen de la resistencia se puede dar por la expresión de genes cromosómicos, los cuales son, naturalmente, intrínsecos de la bacteria, o genes extracromosómicos que son adquiridos, generalmente, a través de intercambio genético con otras bacterias (Keith *et al.*, 2000). La resistencia a múltiples antimicrobianos es un fenómeno frecuentemente asociado a la presencia de plásmidos transmisibles (Pedroza *et al.*, 2002).

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena doble, covalentemente enlazados, formando círculos que se replican de manera independiente del cromosoma de la célula hospedadora (Davies, 1992; Rodríguez-Lemonie *et al.*, 1998). Los plásmidos

constituyen sólo una pequeña parte del genoma celular, en general, entre 1 y 3%. Aún así, esa pequeña fracción de la información hereditaria determina rasgos genéticos accesorios, pero importantes. Los plásmidos le otorgan a un microorganismo funciones que favorecen la sobrevivencia en un medio ambiente adverso o proporcionan una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la misma o diferentes especies (Alonso *et al.*, 2002).

Entre los principales tipos de plásmidos se encuentran aquellos que codifican para un mecanismo de resistencia a los agentes antimicrobianos, a metales pesados, producción de bacteriocinas, toxinas y otros compuestos, así como la capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos complejos (Rodríguez-Lemonie *et al.*, 1998). Los plásmidos, al contener genes que codifican para características especiales, son una de las principales fuentes de la variabilidad en el mundo microbiano (Atlas, 1997; Alonso *et al.*, 2001).

Cada plásmido controla autónomamente el número de copias que debe haber en la célula hospedera. La diseminación de los plásmidos ocurre tanto de forma vertical (de célula madre a célula hija), como horizontal, esencialmente a través del proceso de conjugación; esta capacidad está determinada por la presencia de un grupo de genes que codifican para proteínas de transferencia (*tra*), sin las cuales no puede realizarse el proceso, ocupando dentro del plásmido una porción de hasta 33 kb. Este proceso permite que se pueda llevar el intercambio de plásmidos entre especies, e incluso géneros (Ayres *et al.*, 1995; Atlas, 1997).

En la naturaleza existen plásmidos que no presentan todos los genes necesarios para la transferencia, denominados plásmidos no conjugativos, y sólo pueden cotransferirse con los plásmidos conjugativos. La transferencia horizontal y la cotransferencia de los plásmidos entre las bacterias, son mecanismos que promueven la diseminación de un gran número de genes, entre ellos, los que codifican para

determinantes de resistencia a múltiples antibióticos, permitiendo su diseminación en el ambiente hospitalario y en la comunidad (Davies, 1996; Torres *et al.*, 2005).

La conjugación consiste en la transferencia de plásmidos desde una bacteria a otra, mediante el contacto directo entre las células. El proceso de conjugación es una parte del ciclo de vida de un plásmido conjugativo, y es considerado un tipo de replicación especial de ADN, mediante el cual una hebra del plásmido en replicación es mantenida en la célula donante, mientras que la segunda hebra es transferida a una célula receptora (Lawley *et al.*, 2002).

En el proceso de conjugación se dan dos grandes fases, siendo éstas: contacto entre células y transferencia de ADN. En la primera fase, las células donantes presentan en su superficie un apéndice en forma de cilindro (*pili*), constituido por unidades de la proteína pilina. El *pili* 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 receptora presente en las células receptoras. Luego de un proceso de despolimerización del *pili*, las células quedan en contacto pared-pared y se forma el poro conjugativo (Frost *et al.*, 2005). Por otra parte, el proceso de transferencia del ADN se inicia en una región del plásmido denominada origen de transferencia (*oriT*), y la transferencia de ADN está basada en un proceso de replicación y secreción (Llosa *et al.*, 2002).

Los plásmidos que presentan la mayor relevancia epidemiológica son aquellos que portan determinantes de resistencia y tienen capacidad conjugativa o de movilización, ya que pueden diseminar de forma horizontal un gran número de genes de resistencia, lo cual contribuye a la aparición de cepas patógenas multirresistentes, y esto implica un problema de salud pública a nivel mundial, limitando las opciones terapéuticas e incrementando los costos por concepto de terapia alternativa y estadía hospitalaria (Levy, 2005; Narváez *et al.*, 2005; Redondo y Alonso, 2007).

Varios trabajos se han publicado en Venezuela sobre la conjugación de plásmidos, pero realizados en cepas de enterobacterias (Araque *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2005; Redondo y Alonso, 2007).

En cuanto a estudios realizados sobre conjugación en bacterias gramnegativas no fermentadoras, González *et al.* (2003) determinaron la presencia de enzimas del tipo beta-lactamasas codificadas por plásmidos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico y demostraron que el 96% de ellas presentaron plásmidos y sus perfiles plasmídicos fueron extremadamente homogéneos; además, la resistencia a azocillin, cefuroxime y ceftazidime fue espontáneamente transferida de las cepas de *P. aeruginosa* a las *E. coli*.

En un estudio realizado por Karishma *et al.* (2007), sobre la distribución plasmídica y los patrones de resistencia a los antibióticos en aislados de *Acinetobacter* spp, procedentes de la piel de personas sanas de una tribu en Maharashtra, India, se reportó que el 98% de los aislados poseían plásmidos, la mayoría de los cuales presentó un único plásmido de 40 kb.

Por otra parte, Patwardhan *et al.* (2008) realizaron un estudio en cepas de *A. baumannii* multirresistentes, procedentes de la unidad de cuidados intensivos del Hospital King Edward Memorial, en India, donde se reportó la presencia de múltiples plásmidos en todas las cepas de *A. baumannii* (en un rango de 1 a 5 plásmidos), con un tamaño de 5 a 50 kb. También estos investigadores lograron la transferencia de plásmidos por transformación, con una frecuencia de $4,3 \times 10^4$ transformantes por μg de ADN plasmídico.

En Venezuela, Pedroza *et al.* (2002), realizaron el análisis de ADN plasmídico extraído de un grupo de cepas de *A. baumannii*, provenientes de tres centros hospitalarios de la ciudad de Caracas (Hospital Vargas, Hospital Universitario y Domingo Luciani); en este estudio encontraron la presencia de plásmidos de alto peso

molecular, observándose una banda común de, aproximadamente, 23 kb en todas las cepas. A pesar que en dicho trabajo se señala metodología para la conjugación de plásmidos, no se reportan resultados al respecto.

En estudios publicados por Salazar *et al.* (2006) y Salazar *et al.* (2007), se reportan aislamientos de cepas de *A. baumannii*, que muestran fenotipos de multirresistencia, donde se incluyen a los aminoglucósidos. Por otra parte, el 95,65% de las cepas albergaron plásmidos de más de 2kb; sin embargo, éstos no fueron transferidos por el método de conjugación empleado (conjugación en caldo).

Los aminoglucósidos constituyen un grupo de agentes antimicrobianos con interesantes propiedades para el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente, aquellas producidas por bacilos gramnegativos aeróbicos (Gilbert, 2000). Estos antimicrobianos despliegan una potente acción bactericida, reconociendo a la inhibición de la síntesis de proteínas como el mecanismo de acción de estos compuestos (Kotra *et al.*, 2000; Mella *et al.*, 2004). Los principales mecanismos que se han encontrado involucrados en la resistencia a los aminoglucósidos son: alteración del sitio blanco, reducida acumulación intracelular del compuesto, inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de los aminoglucósidos (EMA); siendo este último el más frecuente hallado entre las cepas de *Acinetobacter* spp. Entre estas enzimas inactivantes se encuentran: aminoglucósido - acetiltransferasa, aminoglucósido adeniltransferasa y aminoglucósido-fosfotransferasa (Del Solar *et al.*, 1995; Reyes *et al.*, 2003; Mella *et al.*, 2004). Además de estos mecanismos, se ha descrito la metilación postranscripcional de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) (Galimand *et al.*, 2003).

Las enzimas modificantes de aminoglucósidos son normalmente codificadas en elementos extracromosomales, tales como plásmidos y transposones (Davis y Wright, 1997; González *et al.*, 2000; Mella *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que la resistencia a aminoglucósidos frecuentemente se encuentra codificada en plásmidos (Vila *et al.*, 1999; González *et al.*, 2000); sin embargo, en la bibliografía consultada no

se encontraron experiencias sobre conjugación exitosa de plásmidos a partir de cepas de *Acinetobacter*. Por tal motivo, con la finalidad de aportar conocimientos sobre el proceso de conjugación en esta bacteria, se propuso utilizar la técnica de conjugación sobre filtro para investigar la presencia de plásmidos conjugativos en cepas de *A. baumannii* resistentes a amimoglucósidos.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Clínicas: El presente estudio se realizó con 20 cepas bacterianas correspondientes a la genoespecie *A. baumannii*, las cuales 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 el periodo comprendido entre enero de 1998 y abril de 1999; previamente identificadas bioquímicamente y molecularmente (Salazar et al., 2006) (Tabla 1). 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; las mismas se trasladaron al laboratorio de Bacteriología Clínica del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, de la Universidad de Oriente y, posteriormente, utilizadas en el presente trabajo de investigación.

Receptora: Se empleó como receptora de plásmidos la cepa *Escherichia coli* K-12 J53-2, la cual presenta como fenotipo carecer de pili de conjugación y ser resistente a prolina, metionina y rifampicina (F-, pror, metr, rifr). Esta cepa se encuentra preservada en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM128).

Reactivación de las cepas

Con la finalidad de probar la viabilidad de las cepas de *A. baumannii*, a partir del medio de conservación, se inoculó cada cepa en 2 ml de caldo Luria Bertani (LB) (Sigma, USA), durante 18 horas a 37°C . Luego, se sembraron en agar Mac Conkey (AMC) (Himedia, India), con la finalidad de verificar la pureza y las características macroscópicas de las colonias, así como los cambios producidos en dicho medio, que

refleja la fermentación o no de la lactosa.

Tabla 1. Características de las cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos de adultos (UCI-A) y la unidad de alto riesgo neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, durante el periodo enero 1998- abril 1999.

Cepas Nº de laboratorio	Servicio médico	Tipo de muestra	Terapia previa
PIN 082-C1	UCI-A	Asp. bronquial	Cloaforam, Amp/sulb
PIN 085-B1	UCI-A	Sec. herida	Cloaforam, Amp/sulb
PIN 274-2	UARN	Sangre	AM, CTX
PIN 296-2	UARN	L.C.R.	CEP, AMK
PIN 341-B	UCI-A	Asp. bronquial	CTX, PEF
PIN 390-2	UCI-A	Asp. bronquial	CLI, CAZ, CIP
PIN 404	UCI-A	Asp. bronquial	-----
PIN 428-B1	UARN	Sec. herida	AM, GM, VAN
PIN 434-B2	UCI-A	Asp. bronquial	CTX, OXA, MTR, Fluc
PIN 538-A	UCI-A	Asp. bronquial	CEP, AMK
PIN 544-B	UCI-A	Sec. herida	MAN
PIN 544-C	UCI-A	Sec. herida	MAN
PIN 550-B	UCI-A	Asp. bronquial	IMP, AMK
PIN 562	UCI-A	Asp. bronquial	IMP, PEF
PIN 596-D2	UCI-A	Asp. bronquial	CTX, Amp/sulb
PIN 597-1	UCI-A	Asp. bronquial	CAZ, AMK
PIN 653-A	UCI-A	Sangre	AMK, OXA, MTR
PIN 653-B1	UCI-A	Sec. herida	AMK, OXA, MTR
PIN 682	UARN	L.C.R.	AM, AMK
PIN 7-HU	UARN	Humidif.	-----

PIN: Proyecto Infección Nosocomial; UCI-A: Unidad de cuidados intensivos de adultos; UARN: Unidad de alto riesgo neonatal; Asp. Bronquial: Aspirado bronquial; Sec. Herida: secreción de herida; L.C.R.: Líquido Cefalorraquídeo; Humidif.: Humidificador; AM: Ampicilina; AMK: Amikacina; Amp/sulb: Ampicilina/sulbactam; CAZ: Ceftazidima; CEP: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CLI: Clindamicina; CTX: Cefotaxima; Fluc: Fluconazol; GM: Gentamicina; IMP: Imipenem; MAN: Cefamandol; MTR: Metronidazol; OXA: Oxacilina; PEF: Plefoxacina; VAN: Vancomicina.

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión del disco en agar, descrita por Bauer *et al.* (1966) y siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (del inglés: Clinical Laboratory Standard Institute) (CLSI, 2009). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas, ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a un estimado de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Una vez obtenida la turbidez requerida, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión, rotándolo varias veces y ejerciendo presión sobre las paredes interiores del tubo con el fin de eliminar el exceso de líquido. La suspensión bacteriana se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Müeller Hinton contenido en placas de Petri, dejando secar, para luego proceder a colocar los discos de los antibióticos seleccionados: amikacina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$), gentamicina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), estreptomycin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), netilmicina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), kanamicina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) y tobramicina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), todos de la casa comercial Oxoid.

Las placas se incubaron a 35°C durante 18 horas, en aerobiosis, y luego 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 (2009) como sensible, resistente intermedio o resistente.

Para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la amikacina ante las cepas estudiadas, se utilizaron tiras Etest (AB Boidisk, Solna, Swden), siguiendo las recomendaciones del CLSI (2009), para el método de difusión del disco en agar.

La calidad de los discos empleados en el antibiograma fue verificada empleando las cepas controles *E. coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Determinación de la concentración de amikacina y rifampicina a emplear en la conjugación.

Para seleccionar la concentración de cada agente antimicrobiano a utilizar en la conjugación, se prepararon soluciones patrones de amikacina (50 mg ml^{-1}) (GalaxoSmithKline's) y rifampicina (60 mg ml^{-1}) (GalaxoSmithKline's). A partir de estas concentraciones se prepararon placas de AMC suplementadas con amikacina a las concentraciones de 10 , 15 y $20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, y placas del mismo agar con rifampicina a 50 , 80 y $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Las cepas donantes y receptoras se cultivaron en 2 ml de caldo LB a 37°C , durante toda la noche, luego se sembraron en las placas de AMC suplementadas con el antimicrobiano respectivo, antes descrito. Estas placas se incubaron a 37°C , en aerobiosis, durante 18 horas.

Se consideraron sensibles aquellas cepas que no crecieron en ninguna de las placas con antimicrobiano y resistentes a las que crecieron.

Conjugación

El proceso de conjugación se realizó mediante el empleo de la técnica sobre filtro en medio sólido, diseñada por Pedroza *et al.* (2001), con algunas modificaciones. Partiendo del hecho de que todas las cepas clínicas utilizadas en este estudio tienen resistencia a amikacina, pero son sensibles a rifampicina, ya que la cepa de *E.coli* K-12 J53-2 es resistente sólo a rifampicina, la amikacina conjuntamente con la rifampicina se emplearon para la confirmación de transferencia plasmídica. Cada cepa clínica se hizo crecer en 2 ml caldo LB con amikacina ($10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), y la receptora, *E. coli* J53-2, en 2 ml de caldo LB con rifampicina ($100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), durante toda la noche. Luego se inoculó $0,1 \text{ ml}$ del cultivo respectivo en 5 ml de medio LB y se permitió el crecimiento durante cuatro horas (fase de crecimiento logarítmica).

Luego se mezclaron $0,5 \text{ ml}$ de la cepa donante con $2,5 \text{ ml}$ de la cepa receptora, seguidamente se centrifugó la mezcla durante 1 minuto a $6\ 000 \text{ g}$ y el sedimento se

colocó sobre un filtro Millipore estéril de 0,22 μm , previamente colocado sobre una placa de AMC. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se resuspendió la mezcla de conjugación, contenida en el filtro, en 1 ml de NaCl 0,85% y se sembraron por rastrilleo, tanto directamente de la mezcla como en diluciones desde 10^{-1} a 10^{-7} en AMC suplementadas con amikacina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) y rifampicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Se consideraron cepas transconjugantes las colonias lactosa positivas crecidas en las placas de AMC suplementadas con amikacina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) más rifampicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Cálculo de la frecuencia de transferencia

La frecuencia de transferencia (FT) de los plásmidos se determinó mediante la siguiente relación: $FT=T/DV$ donde, T: es el título de transconjugantes obtenidas en las placas de selección y DV: es el título de células donantes viables en la mezcla de conjugación.

DV se calculó sembrando 50 μl de diluciones seriadas (desde 10^{-1} a 10^{-7}) de la cepa donante al momento de realizar la mezcla de conjugación. El título de donantes viables y de las transconjugantes se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$DV=N^{\circ} \text{ colonias} \times \text{factor de dilución} / \text{volumen de siembra}$$

Verificación de los determinantes transferidos

Para confirmar cuales determinantes de resistencia se transfirieron a la cepa receptora, se realizaron antibiogramas, como se describió anteriormente, en la sección de susceptibilidad antimicrobiana, pero en este caso se incluyeron las cepas transconjugantes y receptora.

Análisis de los resultados

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

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra que el 100% de las cepas de *A. baumannii* ensayadas mostró resistencia frente a estreptomocina, netilmicina y gentamicina. A la vez que, frente a amikacina y tobramicina mostraron porcentajes de resistencia de 80 y 95%, respectivamente. Por su parte, la kanamicina presentó actividad antimicrobiana ante el 30% de las cepas estudiadas.

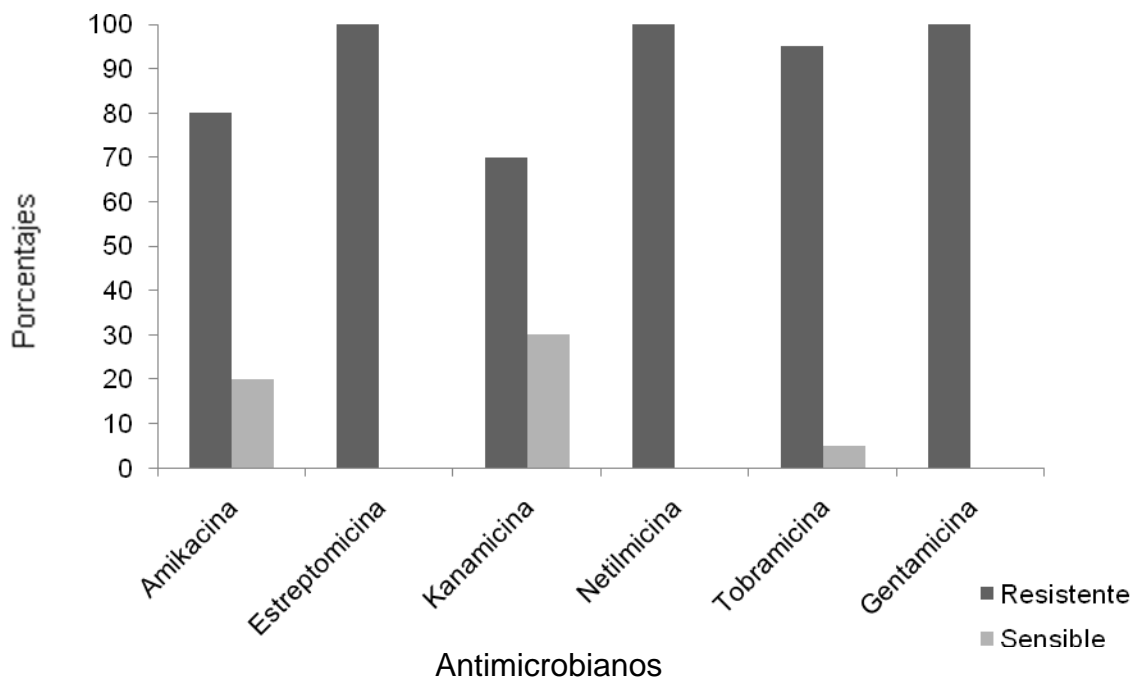


Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los aminoglucósidos ensayados de las 20 cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, estado Mérida.

En la tabla 2 se muestran las CIM que presentaron las cepas de *A. baumannii* ante amikacina, las cuales oscilaron entre 8 y 256 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Además, se muestra el fenotipo de susceptibilidad ante las concentraciones de antimicrobianos elegidos para el proceso de conjugación, tanto de las cepas donantes de *A. baumannii* como de la cepa receptora *E. coli* k-12 J53-2.

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para amikacina y condiciones de crecimiento en amikacina y rifampicina de las cepas donantes de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, estado Mérida (enero 1998- abril 1999) y cepa receptora.

Cepa	Amikacina ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Amikacina (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	Rifampicina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>E. coli</i> k-12 J53-2	S	S	R
PIN 082-C1	8	S	S
PIN 085-B1	48	R	S
PIN 274-2	48	R	S
PIN 296-2	24	R	S
PIN 341-B	128	R	S
PIN 390-2	128	R	S
PIN 404	>256	R	S
PIN 428-B1	8	S	S
PIN 434-B2	128	R	S
PIN 538-A	64	R	S
PIN 544-B	>256	R	S
PIN 544-C	24	R	S
PIN 550-B	24	R	S
PIN 562	64	R	S
PIN 596-D2	192	R	S
PIN 597-1	24	R	S
PIN 653-A	24	R	S
PIN 653-B1	8	S	S
PIN 682	8	S	S
PIN 7-HU	32	R	S

PIN: Proyecto Infección Nosocomial; S: Sensible; R: Resistente

De las 20 cepas de *A. baumannii* ensayadas, cuatro resultaron sensibles a la amikacina, las cuales fueron descartadas, quedando un total de 16 cepas de *A. baumannii*

aptas para los ensayos de conjugación.

Tres de dieciséis cepas de *A. baumannii*, fueron capaces de transferir plásmidos a la cepa receptora *E. coli* K-12 J53-2 bajo las condiciones ensayadas. La frecuencia de transferencia del ADN plasmídico durante el proceso de conjugación se muestra en la tabla 3. Se encontró una frecuencia de transferencia de 10^{-3} transconjugantes por células donantes.

Tabla 3. Frecuencia de transferencia de las cepas de *Acinetobacter baumannii*.

Cepas transconjugantes	Frecuencia de conjugación (transconjugantes/ células donantes)
T. PIN 538-A	$2,1 \times 10^{-3}$
T. PIN 434-B2	$1,7 \times 10^{-3}$
T. PIN 274-2	$3,0 \times 10^{-3}$

T: Transconjugante; PIN: Proyecto Infección Nosocomial

En la tabla 4 se muestra que los determinantes de resistencia a los antimicrobianos amikacina y estreptomycin fueron transferidos en todas las transconjugantes.

Tabla 4. Perfil de resistencia en cepas donantes, receptora y transconjugantes

Cepas	Resistencia antimicrobiana
R. <i>E. coli</i> J53-2	AN ^s ST ^s GM ^s TB ^s NET ^s KN ^s RIF ^r
D. PIN 274-2	AN ^r ST ^r GM ^r TB ^r NET ^r KN ^r RIF ^s
T. PIN 274-2	AN ^r ST ^r GM ^s TB ^s NET ^s KN ^s RIF ^r
D. PIN 434-B2	AN ^r ST ^r GM ^r TB ^r NET ^r KN ^r RIF ^s
T. PIN 434-B2	AN ^r ST ^r GM ^s TB ^s NET ^s KN ^s RIF ^r
D. PIN 538-A	AN ^r ST ^r GM ^r TB ^r NET ^r KN ^r RIF ^s
T. PIN 538-A	AN ^r ST ^r GM ^s TB ^s NET ^s KN ^s RIF ^r

D: Donante; T: Transconjugante; R: Receptora; PIN: Proyecto Infección Nosocomial; s: Sensible; r: Resistente; AN: Amikacina; ST: Estreptomycin; GM: Gentamicina; TB: Tobramicina; RIF: Rifampicina(100 µg ml⁻¹)

En la figura 2 se muestran los antibiogramas realizados a las cepas donante (A) resistente a todos los aminoglucósidos, transconjugante (B) resistente a amikacina y esreptomicina, y receptora (C) sensible a todos los aminoglucósidos ensayados.

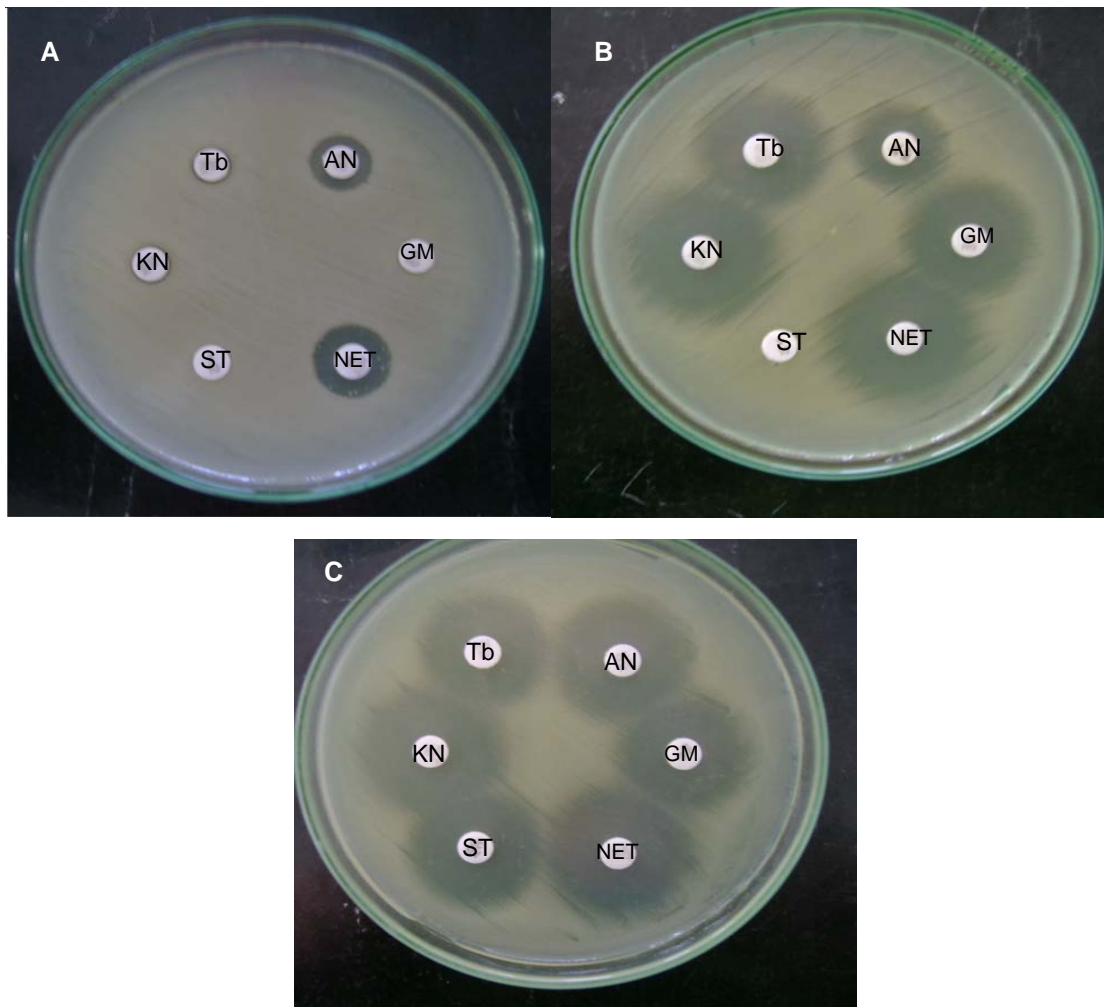


Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas donante, transconjugante y receptora, frente a aminoglucósidos. A. Cepa donante 538-A; B. Cepa transconjugante 538-A; C. Cepa receptora *E. coli* k-12 J53-2.

DISCUSIÓN

La sobreexposición y uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos constituyen un factor de riesgo que predispone a las infecciones bacterianas al aportar una ventaja selectiva a un patógeno sobre la flora microbiana competente. La resistencia bacteriana es uno de los serios problemas que se deben enfrentar cuando hay que aplicar tratamiento a las enfermedades infecciosas (Salavert, 1999; Williams, 2000).

Durante los últimos 20 años se ha observado un aumento progresivo de la resistencia en *A. baumannii*, de manera que las infecciones producidas por este microorganismo resultan muy difíciles de tratar (López y López-Brea, 2000). La mayoría de los miembros de este género bacteriano presentan resistencia a una amplia gama de antimicrobianos, incluidos penicilina, cefalosporinas, aminoglucósidos y fluorquinolonas (Richards *et al.*, 1999; López y López-Brea, 2000; Diomedí, 2005).

En el presente estudio se detectaron elevados porcentajes de cepas resistentes ante los aminoglucósidos ensayados. El 100% de las cepas de *A. baumannii* mostró resistencia ante estreptomicina, netilmicina y gentamicina. Por su parte, frente a amikacina y tobramicina, el porcentaje de cepas resistentes oscilaron entre 80 y 95%, respectivamente. Estos altos porcentajes de resistencia representan un problema clínico de gran relevancia, ya que limita el espectro terapéutico al momento de colocar tratamiento antimicrobiano a los pacientes infectados con esta especie bacteriana, especialmente, tomando en cuenta que entre las alternativas terapéuticas sugeridas para las infecciones por *A. baumannii* se encuentra el imipenem, el cual puede ser asociado a un aminoglucósido, generalmente, amikacina o tobramicina; otra alternativa terapéutica es la asociación ticarcilina- ácido clavulánico más tobramicina (Marques *et al.*, 1997; García *et al.*, 2006).

En lo que respecta a la CIM de las cepas de *A. baumannii*, éstas mostraron resultados variados, los cuales van desde $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ hasta $256 \mu\text{g ml}^{-1}$, resaltando que el

50% de las cepas presentan una CIM igual o superior a $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ (P_{50}); demostrando que a pesar de que la amikacina es uno de los antimicrobianos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii*, en la mayoría de los casos podría no ser efectivo.

El uso recurrente de aminoglucósidos en el tratamiento contra infecciones producidas por *Acinetobacter*, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos, ha provocado un incremento en la resistencia ante este grupo de antimicrobianos, llegando a niveles superiores al 60% de resistencia (Prada, 2006). Al respecto, Pinzón *et al.* (2006), realizaron estudios en aislados de *A. baumannii*, de los cuales, un 67% mostró resistencia ante los aminoglucósidos. De igual manera, otros estudios han reportado resultados similares a los encontrados en el presente ensayo (López y López-Brea, 2000; Pedroza *et al.*, 2001; Pinzón *et al.*, 2006; Prada, 2006).

Los agentes antimicrobianos ejercen una fuerte presión selectiva sobre las comunidades bacterianas que comparten un nicho particular, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia, dando origen al fenómeno conocido como resistencia a múltiples antibióticos, que se encuentra afectando a una gran variedad de especies bacterianas (Narváez *et al.*, 2005).

Ningún antimicrobiano actúa sin el riesgo futuro de que los microorganismos desarrollen resistencia frente a ellos. Los plásmidos pueden diseminarse rápidamente entre diferentes especies bacterianas y pueden conferir resistencia a varios antibióticos a la vez (Alonso *et al.*, 2002; Narváez *et al.*, 2005). Se considera que *A. baumannii* tiene alta capacidad para acumular determinantes de resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos, convirtiéndolo en un microorganismo difícil de controlar (Towner, 1997).

Towner (1991) sugirió que la resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter* sp. está probablemente asociada a plásmidos, pertenecientes a grupos de incompatibilidad, además de la posible presencia de transposones e integrones en dichos plásmidos.

Los ensayos de conjugación en este estudio se realizaron empleando la concentración de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ para la amikacina, ya que las cepas de *A. baumannii* seleccionadas mostraron resistencia empleando esta concentración; además, se ha comprobado que los ensayos de conjugación resultan más exitosos empleando bajas concentraciones de los antimicrobianos. En cuanto a la rifampicina se empleó la concentración de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, con la finalidad de mantener una constante presión selectiva y una adecuada selección de las cepas transconjugantes.

La resistencia a los aminoglucósidos ha sido descrita en diversas partes del mundo. Desde 1983 se demostró que la resistencia a los aminoglucósidos en *Acinetobacter* sp. estaba mediada por las enzimas Aminoglucósido O-fosfotransferasas (APH) (3'5'')I y Aminoglucósido O- nucleotidil- transferasa (AAD), incluidas en el mismo plásmido de resistencia, que a su vez codificaba para la betalactamasa TEM-1 (Goldstein *et al.*, 1983). De igual manera, Towner (1997), sugirió que las enzimas modificantes de aminoglucósidos, tales como APH, AAD y N- acetiltransferasa, están mediadas primariamente por plásmidos y transposones que pueden jugar un importante rol en la diseminación de transferencia.

Los resultados de conjugación aquí obtenidos muestran que, el 19% de las cepas de *A. baumannii* lograron transferir plásmidos de manera exitosa; es decir, tres de 16 cepas donantes otorgaron a la cepa receptora *E. coli* K-12 J53-2 resistencia a amikacina. En la literatura revisada sobre este tema, a nivel nacional, se encontró que otros investigadores han realizado ensayos de conjugación en cepas de *A. baumannii*, sin lograr resultados satisfactorios (Pedroza *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2006).

Al respecto, en este estudio se pudo observar que la transferencia de plásmidos, por conjugación, a la cepa *E. coli* K-12 J53-2 se dió con una frecuencia de 10^{-3} transconjugantes por células donantes, la cual es alta; esto quiere decir que 1 de cada 1 000 donantes logró transferir sus plásmidos a la cepa receptora. Cabe destacar que la transferencia de genes fue posible entre dos géneros bacterianos distintos, lo cual es un

reflejo *in vitro* de lo que ocurre en el mundo bacteriano, representando este hecho un gran problema epidemiológico, ya que microorganismos multirresistentes pueden diseminar genes de resistencia a bacterias susceptibles a la mayoría de los agentes antimicrobianos, por lo que se hace cuesta arriba poder eliminar a dichas bacterias (Hall y Stokes, 1993; Alonso *et al.*, 2001).

Patwardha *et al.* (2008) estudiaron cepas multirresistentes de *A. baumannii* albergantes de múltiples plásmidos (1 a 5 plásmidos) aisladas de la UCI del Hospital King Edward Memorial, en India, donde realizaron ensayos de transferencia plasmídica mediante transformación empleando el método de choque térmico, logrando transferir con éxito el plásmido pUPI281 (Am^r , Gm^r , Km^r), proveniente de una cepa de *A. baumannii*, hasta la cepa receptora *E. coli* HB101. Además, obtuvieron una frecuencia de transferencia plasmídica de 10^{-4} transformantes por μg de ADN plasmídico, lo cual representa una frecuencia de transferencia baja.

La no conjugación de la mayoría de las cepas de *A. baumannii* pudo deberse a diferentes causas, entre ellas, la presencia de plásmidos termosensibles, ya que este estudio se realizó a 37°C ; sin embargo, se ha descrito que la transferencia de algunos tipos de plásmidos (grupo IncHI1) puede ser inhibida a esta temperatura, bien sea por represión de los genes de transferencia, no formación del *pili* o por alteración de las proteínas implicadas en el acoplamiento de las células para la conjugación, siendo transferibles estos plásmidos a una temperatura de 27°C (Sherburne *et al.*, 2000). Además existe la posibilidad de la presencia de plásmidos no conjugativos en estas cepas.

En cuanto a la verificación de los determinantes de resistencia transferidos a la cepa receptora *E. coli* K-12 J53-2, se pudo observar que las tres cepas conjugadas (D.PIN538-A, D.PIN434-B2 y D.PIN274-2) lograron transferir genes que codifican para la producción de enzimas que confieren resistencia, además de amikacina, a estreptomicina; este resultado permite inferir que la resistencia a estos dos

antimicrobianos podría estar codificada en el mismo plásmido, el cual es capaz de llevar esta información a otros géneros bacterianos, logrando capacitar a la célula receptora de funciones de resistencia ante estos antimicrobianos. Según estudios previos, realizados por Salazar *et al.* (2007), todas las cepas empleadas para este estudio poseen plásmidos y, las tres cepas que lograron conjugar, al parecer, presentan un mismo perfil plasmídico (datos no mostrados), por lo que es necesario realizar estudios de restricción plasmídica donde se aislen y caractericen los plásmidos, tanto de las cepas donantes, como de las transconjugantes para verificar si se trata del mismo plásmido y comprobar si epidemiológicamente dicho plásmido está diseminado en el IAHULA.

Además de los aminoglucósidos, se realizaron antibiogramas incluyendo antimicrobianos pertenecientes a otras familias, mas no se observó variación significativa en los halos de inhibición de las transconjugantes que indicaran la transferencia de otros genes de resistencia.

En un estudio realizado por Pedroza *et al.* (2001), sobre la multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos, en bacilos gramnegativos aislados del Hospital Universitario de Caracas, demostraron que *Acinetobacter* sp. es uno de los microorganismos que presenta mayor porcentaje de resistencia frente a amikacina, además de encontrar plásmidos de alta masa molar (>20 kb), los cuales probablemente portan genes que codifican para las proteínas responsables de la resistencia ante antimicrobianos utilizados dentro de ese centro hospitalario.

Otro estudio, realizado por González (2002) en cepas de *A. baumannii* aisladas de diferentes hospitales de Chile, reveló que la mayoría de dichas cepas eran resistentes a aminoglucósidos. Trece de las cepas fueron sometidas a experimentos de cura de plásmidos, donde se destacó la pérdida de un plásmido de más de 30 kb; dicho plásmido se asoció, en la mayoría de los casos, con la recuperación de susceptibilidad a amikacina, kanamicina y neomicina, sugiriendo que en este plásmido se encuentran genes que codifican para enzimas modificantes de aminoglucósidos.

La presencia de plásmidos mediadores de resistencia a los antibióticos, los cuales, de manera preocupante, han demostrado su capacidad para transferirse entre bacterias sin importar el género, aunado a la deficiente política venezolana para el control en el uso de antimicrobianos, ha contribuido a la aparición de una alta proporción de microorganismos multirresistentes, por lo que se hace necesario la utilización racional de la terapia antimicrobiana, a fin de frenar el fenómeno de la multirresistencia bacteriana.

Son escasos los estudios sobre el proceso de conjugación a partir de cepas de *A. baumannii*, de allí la importancia de los resultados aquí obtenidos, ya que demuestran que este proceso es posible en esta especie bacteriana, y que a través de la conjugación se pueden diseminar genes de resistencia que pueden contribuir a limitar aún más el espectro terapéutico. Por tal motivo, se hace necesario profundizar en este tipo de estudios, ya que contribuyen a ampliar los conocimientos sobre el tipo de genes que pueden estar circulando en determinadas áreas de los hospitales y con ello poder diseñar mejores estrategias terapéuticas y controlar el aumento de la resistencia bacteriana.

CONCLUSIONES

Se logró transferir plásmidos a partir de las cepas de *A. baumannii*, mediante conjugación, encontrándose que la frecuencia de transferencia del material genético a la cepa de *E. coli* K-12 J53-2 es alta (10^{-3} transconjugantes por células donantes).

En las células transconjugantes se detectó resistencia a los antimicrobianos amikacina y estreptomicina.

RECOMENDACIONES

Continuar con estudios que permitan aislar y caracterizar los plásmidos transferidos en el presente trabajo.

Divulgar estos hallazgos, con el objeto de incentivar a las autoridades correspondientes a mantener una constante vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales, y para que se lleve mejor control y manejo de una adecuada terapia antimicrobiana, y así evitar el surgimiento de cepas bacterianas con multirresistencia.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, G.; Narváez, P.; Toba, F.; Gomes, C.; Pedroza, R. y Rodríguez-Lemonie, V. 2001. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *M.I.B.E.*, 3: 93-96.

Alonso, G.; Vilches, G.; Bruzual, I. y Rodríguez-Lemonie, V. 2002. Characterization of plasmid MIP233 (IncHI3) of the H complex. *Res. Microbiol.*, 153: 149-153.

Araque, M.; Nieves, B.; Ruíz, O. y Dagert, M. 1997. Caracterización de plásmidos que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gramnegativas de origen nosocomial. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 15: 299-305.

Atlas, R. 1997. *Principles of microbiology*. Wc. M. Brown Publishers. Second Edition, Saint Louis.

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

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45(4): 493-496.

Bergogne-Bèrèzin, E.; Joly-Guillou, M. y Vieu, J. 1987. Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Hosp. Infect.*, 10: 105-113.

Bergogne-Bèrèzin, E. y Towner, K. 1996. *Acinetobacter* sp., as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Res.*, 9: 148-165.

Berlau, J.; Aucken, H.; Malnick, H. y Pitt, T. 1999. Distribution of *Acinetobacter* spp on healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 18: 179-183.

Bush, K.; Jacoby, G. y Madeiros, A. 2000. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211-1233.

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

Cisneros, J. y Pachón, J. 2003. *Acinetobacter baumannii*: un patógeno nosocomial de difícil control. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21: 221-223.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. M100-19. Vol.29. N° 3.

Davies, J. 1992. Another look at antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1553-1559.

Davies, J. 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Sem.*, 12: 9-16.

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

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

Diomedi, A. 2005. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev. Chil. Infect.*, 22(4): 298-320.

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

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

Forns, N. 2006. Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació global de l'expressió gènica a *Escherichia coli* paper en la conjugació plasmídica. Tesis para optar al título de doctor en ciencias biológicas. Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. España.

Frost, L.; Leplae, R.; Summer, A. y Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Rev. Microbiol.*, 3: 722-362.

Galimand, M.; Courvalin, P. y Lambert, T. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47: 2565-2571.

García, E.; Aznar, E.; Alarcón, T. y López-Brea, M. 2006. Patrón de sensibilidad de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* en Madrid vs. Hong Kong. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 19(1): 45-50.

Garrity, G.; Winters, M.; Kou, A. y Searles, D. 2002. *Taxonomic outline of the prokaryotic Bergey's manual of systematic bacteriology*. Second Edition. **Springer Verlag, New York**.

Gilbert, D. 2000. *Aminoglycosides. Principles and practice of infections diseases*. Mandell, Douglas and Bennett eds. 4th edition. Churchill Livingstone, New York.

Goldstein, F.; Labigne, A.; Gerbaud, G.; Carlier, C.; Collatz, E. y Courvalin, P. 1983. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid*, 10: 138-147.

González, G.; Ramírez, C.; Muñoz, M.; Ocampo, X.; Bello, H.; Domínguez, M.; Zemelman, R.; Mella, S.; Young, H. y Amyes, S. 2000. Actividad de aminoglucósidos sobre cepas hospitalarias de *Acinetobacter baumannii* aisladas entre 1990 y 1998. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 13(4): 75-80.

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

González, A.; Salazar, D.; Rojas, N. y Hernández, Y. 2003. Resistencia a beta-lactámicos por plásmidos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico. *Lat. Am. J. Pharm.*, 22(3): 231-238.

Hall, R. y Stokes, H. 1993. Integrons: novel DNA which capture genes by site-specific recombination. *Genética*, 90: 115-132.

Jain, R. y Danziger, L. 2004. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Am. Pharm.*, 38: 1449-1459.

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

Karishma, P.; Supriya, Y. y Balu, C. 2007. Plasmid distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter* genospecies from healthy skin of a tribal population in western India. *Indian J. Med. Res.*, 125: 79-88.

Keith, S.; Henry, S. y Elias, A. 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 12(2): 293-319.

Kotra, L.; Haddad, J. y Mobashery, S. 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanism of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 3249-3256.

Lawley, T.; Gordon, S; Wright, A. y Taylor, D. 2002. Bacterial conjugative transfer: Visualization of successful matching pairs and plasmid establishment in live *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 44: 947-956.

Levy, S. 2005. Antibiotic resistance. The problem intensifies. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57(1): 1446-1450.

Llosa, M.; Gomis-Ruth, F., Colf, M. y De la Cruz, I. 2002. Bacterial conjugation: a two steps mechanism for ADN transport. *Mol. Microbiol.*, 15: 1-8.

López, S. y López-Brea, M. 2000. ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*?. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 18: 153-156.

Mahgoub, S.; Ahmed J. y Glatt, A. 2002. Underlying characteristics of patients harboring highly resistant to *Acinetobacter baumannii*. *Am. J. Infect. Control*, 30: 386-90.

Marques, M.; Brookings, E. y Moser, S. 1997. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 881-885.

Mella, S.; Sepúlveda, M.; González, G.; Bellot, H.; Domínguez, M.; Zemelman, R. y Ramírez, C. 2004. Aminoglucósidos- aminociclitoles: características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev. Chil. Infect.*, 21(4): 330-338.

Narváez, P.; Pedroza, R.; Alonso, G. y Rodríguez-Lemonie, V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *R.S.V.M.*, 25: 29-34.

Nemec, A.; De Baere, T.; Tjernberg, I.; Vanechoutte, M.; van der Reijden, T.; Dijkshoorn, L. 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.*, 51(5): 1891-1899.

Nemec, A.; Musilek, M.; Sedo, O.; De Baere, T.; Maixnerová, M.; van der Reijden, T.; Zdráhal, Z.; Vanechoutte, M. y Dijkshoorn, L. 2009. *Acinetobacter berezinae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate, respectively, *Acinetobacter* genomic species 10 and *Acinetobacter* genomic species 11. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59(9): 1345-1349.

Patwardhan, R.; Dhakephalkar, P.; Niphadkar, K. y Chopade, B. 2008. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian J. Med. Res.*, 128: 178-187.

Pedroza, R.; Torres, L.; Narváez, P.; Alonso, G. y Rodríguez-Lemonie, V. 2001. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram negativos de origen hospitalario. *M.I.B.E.*, 3: 97-100.

Pedroza, R.; Cuotto, W.; Velásquez, O.; Torres, L. y Rodríguez-Lemonie, V. 2002. Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* en tres centros hospitalarios. *R.F.M.*, 25: 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.

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

Redondo, C. y Alonso, G. 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *R.V.S.M.*, 27(2): 100-107.

Reyes, A.; Bello, H.; Domínguez, M.; Mella, S.; Zemelman, R. y González, G. 2003. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51: 317-21.

Richards, M.; Edwards, J.; Culver, D. y Gaynes, R. 1999. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.*, 27: 887-892.

Rodríguez-Lemonie, V.; Pedroza, R. y Alonzo, G. 1998. Multiresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos del complejo de incompatibilidad H. *M.I.B.E.*, 1: 69-72.

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

Salazar, E. y Nieves, B. 2005. *Acinetobacter* sp., aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *R.S.V.M.*, 25: 64-71.

Salazar, E.; Nieves, B.; Araque, M.; Velasco, E.; Ruiz, J. y 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.; Ruíz, 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* isolated in Mérida, Venezuela. *Med. Sci. Monit.*, 13(4): 89-94.

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

Sherburne, C.; Lawley, T.; Gilmour, M.; Blattner, F.; Burland, V.; Grotbeck, E.; Rose, D. y Taylor, D. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.*, 28(10):2177-2186.

Torres, L.; Benítez, M.; Domínguez, M.; Torres, O.; Gagliotta, V.; Calvo, A.; Rodríguez, N.; Ardila, J. y Pedroza, R. 2005. "Detección de integrones clase I en cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro expandido tipo SHV y CTX-M grupo-2". "VITAE Academia Biomédica Digital". <<http://www.bioline.org.br/abstract?id=va05018&lang=es>> (10/03/2008).

Towner, K. J. 1991. Plasmid and transposon behaviour in *Acinetobacter*. En: Towner K, Bergogne-Bérézin E, Fewson CA, Eds. *The biology of Acinetobacter*. New York: Plenum Publishing Corp. Pág. 149-167.

Towner, K. 1997. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *J. Med. Microbiol.*, 46: 721-746.

Vila, J.; Ruiz, J.; Navia, M.; Becerril, B.; Garcia, I.; Perea, S.; López, I.; Planes A.; Alamo, I.; Ballester, F.; Martínez, J. y Jiménez, M. 1999. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 758-761.

Williams, R. 2000. Resistencia a los aminoglucósidos: Los hechos. Boletín de Medicamentos esenciales. O.M.S., 28 y 29.

HOJA DE METADATOS

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

Título	Transferencia De Plásmidos En Cepas De <i>Acinetobacter baumannii</i> Resistentes A Aminoglucósidos
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Vargas S. Sohia K.	CVLAC
e-mail		skaribay@gmail.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Acinetobacter</i>
Plásmido
Conjugación

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Microbiología	Bacteriología

Resumen (abstract):

Entre los principales mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos descritos en las cepas de *Acinetobacter baumannii*, se destaca la producción de enzimas modificantes de estos compuestos. Con el objeto de determinar la transferencia de plásmidos en cepas de *A. baumannii* resistentes a aminoglucósidos, se estudiaron 20 cepas correspondientes a la genoespecie *A. baumannii*, las cuales se obtuvieron de pacientes recluidos en la unidad de cuidados intensivos de adultos y en la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), previamente identificadas bioquímica y molecularmente. La susceptibilidad ante los aminoglucósidos se determinó mediante la prueba de difusión del disco en agar, mientras que para la Concentración Inhibitoria Mínima se emplearon tiras Etest; por su parte, los ensayos de conjugación se realizaron empleando la técnica sobre filtro. Todas las cepas fueron resistentes a estreptomycin, netilmicina y gentamicina; el 95% resistente a tobramicina, 75% resistente a amikacina y 70% resistente a kanamicina y el 50% de las cepas presentó una CIM igual o superior a $32 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se demostró que el 19% de las cepas lograron conjugar y transfirieron a la cepa receptora *Escherichia coli* k-12 J53-2 la resistencia a amikacina, con una frecuencia de transferencia de 10^{-3} (transconjugantes por células donantes). Además, se pudo determinar, mediante antibiogramas realizados a las transconjugantes, que también se transfirió la resistencia a estreptomycin. Se concluye que la resistencia a amikacina y estreptomycin, por parte de 3 cepas de *A. baumannii*, al parecer, se encuentra codificada en plásmidos transferibles.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Salazar, Elsa	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"/>
	CVLA	
	C	
	e-mail	elsazul2003@yahoo.com
	e-mail	
Guzmán, Militza	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
	CVLA	
	C	
	e-mail	miltzaguz@yahoo.com
	e-mail	
Antón, Dina	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
	CVLA	
	C	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	01	22

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_SKVS	Aplication/ 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

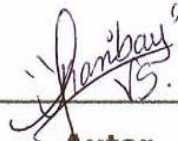
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

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.



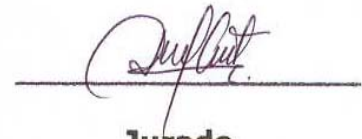
Autor
Vargas. S, Sophia. K



Asesora
Salazar, Elsa



Jurado
Guzmán, Militza



Jurado
Antón, Dina

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

