



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

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA A BETALACTÁMICOS Y
DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS EN BACTERIAS GRAM
NEGATIVAS NO FERMENTADORAS AISLADAS DEL RÍO
MANZANARES.

CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

ÁNGEL LUIS ALVAREZ PADILLA

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

CUMANÁ, 2011

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA A BETALACTÁMICOS Y DETECCIÓN
DE BETALACTAMASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO
FERMENTADORAS AISLADAS DEL RÍO MANZANARES.
CUMANÁ, ESTADO SUCRE

Aprobado por:

Profa. Dina Antón

Asesora

Jurado

Jurado

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	6
Población y muestra.....	6
Viabilidad de las cepas	6
Identificación bioquímica de BGNNF	6
Batería bioquímica primaria	7
Fermentación de azúcares	7
Oxidasa	7
Batería bioquímica definitiva	7
Motilidad	7
Oxidación de azúcares	8
Crecimiento a 42°C	8
Susceptibilidad a la polimixina B	8
Hidrólisis de la esculina	8
Descarboxilación de la lisina	9
Hidrólisis de la arginina	9
Hidrólisis de la gelatina.....	9
Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos.....	10
Caracterización fenotípica de la resistencia a los betalactámicos en BGNNF	11
Ubicación estratégica de los discos.....	11
Determinación de betalactamasa tipo BLEE.....	11
Determinación de betalactamasa tipo AmpC	11
Determinación de MBL.....	12

Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍAS	28
APÉNDICES.....	37
Hoja de Metadatos	38

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso que todo lo puede.

Mis abuelos José de Jesús Padilla, Carmen de Padilla a quien siempre llevo en mi mente, mi corazón y que me han enseñado muchas cosas de la vida.

Mis Padres Víctor y Dulce, quienes me trajeron al mundo, y que han sabido prestarme toda su comprensión, apoyo y amor, en momentos buenos o malos, los que siempre están pendientes de mi, los quiero con toda mi alma.

Mis hermanas/os Víctor José, Alba, Vilma, Víctor Guillermo que de una u otra forma me ayudaron a culminar esta carrera.

Mis tías/os Ana, Carmen, Luisa, Rubén, Nipio, Ramón y novia Migsay por haberme animado, a lo largo de esta carrera para lograr el éxito.

Mis primos/as Ángel, Marian, Christian, Jesús, Lisette, Lisbeth que me brindaron apoyo y animo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A

Dios primeramente que nos ha conservado con vida, con salud, que nos dio inteligencia, y nos ha guiado y cuidado hasta hoy, sin él nada de esto podría cumplirse.

La Universidad de Oriente (UDO). Núcleo de Sucre, profesores que impartieron las materias con mucha sapiencia, para obtener el máximo de mí en la carrera.

La Magister Dina Antón, por su asesoramiento, apoyo, paciencia, atención y conocimientos prestados, para lograr este éxito.

Las doctoras, Militza Guzmán y Elsa Salazar por su ayuda, sugerencias y cooperación.

Mis amigos Elio, Antonio y compañeros del laboratorio de investigación bacteriológica Aura, Samia, Olimar, María Victoria y demás compañeros que pusieron un granito para lograr este sueño.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bacilos Gram negativos no fermentadores, aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero-junio 2008	13
Tabla 2. Fenotipos de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero-junio 2008.....	23
Tabla 3. Fenotipos de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de sedimentos del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero-junio 2008.	24
Tabla 4. Fenotipos de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero - junio 2008.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resistencia antimicrobiana in vitro de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de aguas del río Manzanares. Febrero-junio 2008.....	15
Figura 2. Resistencia antimicrobiana in vitro de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de sedimentos del río Manzanares. Febrero - junio 2008	16
Figura 3. Resistencia antimicrobiana in vitro de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aisladas de aguas del río Manzanares. Febrero - junio 2008	18
Figura 4. Betalactamasas tipo AmpC basal detectadas en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de aguas y sedimentos del río Manzanares. Febrero - junio 2008.....	20
Figura 5. Betalactamasas detectadas en <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aisladas de aguas del río Manzanares.....	21
Apéndice 1. Detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC en aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Apéndice 2. Detección fenotípica de betalactamasas tipo MTBL en aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37
Apéndice 3. Detección fenotípica de betalactamasas tipo BLEE en aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . :.....	37

RESUMEN

Se evaluó la susceptibilidad a betalactámicos, en 66 cepas bacterianas, ya identificadas previamente como bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), provenientes de aguas y sedimentos del muestreo de 3 estaciones del río Manzanares en el 2008, de las cuales 54 cepas provienen de muestras de agua y 12 de sedimento. A las cuales se le realizaron la identificación, mediante pruebas bioquímicas convencionales. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas aisladas, mediante el método de difusión en agar, y la determinación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y metalobetalactamasas (MBL), se realizó mediante el método fenotípico de sinergia de doble disco y el método de doble disco con etilendiaminotetraacético, respectivamente. De 54 cepas de agua, 35 (64,81%) fueron identificadas como *P. aeruginosa*, 12 (22,22%) *S. maltophilia*, 2 (3,71%) *S. paucimobilis*, 2 (3,71%) *P. stutzeri*, 1 (1,85%) *P. mendocina*, 1 (1,85%) *P. oryzihabitans* y 1 (1,85%) *B. cepacia*; mientras las 12 (100,00%) cepas de sedimento se identificaron como *P. aeruginosa*. Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de aguas y sedimento, presentaron resistencia a los betalactámicos ensayados; en los aislados de agua el fenotipo A de resistencia fue el más común, presentando resistencia a aztreonam, cefotaxima, piperacilina/tazobactam, meropenem, mientras el fenotipo I más frecuente en los aislados de sedimento presentaron resistencia sólo a aztreonam y cefotaxima. Las cepas de *S. maltophilia* presentaron resistencia a casi todos los antibióticos probados, el fenotipo A de resistencia que se encontró en mayor proporción, presentó resistencia a todos los antibióticos, a excepción de piperacilina. 21 cepas de *P. aeruginosa*, aislados de agua, (60,00%) y 12 (100%) aisladas de sedimento, presentaron betalactamasa, tipo AmpC. Todas las cepas de *S. maltophilia* presentaron BLEE positivo y resistencia a imipenem y meropenem; 2 (16,67%) presentaron fenotipo compatible con MBL. Estos resultados permiten contribuir con el conocimiento de la epidemiología fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de aguas del río, permitiendo establecer un patrón de comportamiento de estas bacterias que pudieran afectar al humano.

Palabras o Frases Claves: BGNNF, cepas aisladas de el ambiente, resistencia antimicrobiana en cepas ambientales

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son utilizados para la prevención o tratamiento de las infecciones microbianas en medicina humana y veterinaria, en piscicultura y como promotores del crecimiento en granjas productoras de animales. Así, la aplicación de estos compuestos por más de 50 años ha provocado un gran impacto en las comunidades microbianas (Jorgensen y Halling-Sorensen, 2000; Alonso *et al.*, 2001).

En todas las bacterias, existe una resistencia natural a los antibióticos, también llamada intrínseca, la cual es codificada cromosómicamente y se transmite de forma vertical. Este tipo de resistencia, inherente a cada género o especie, se presenta como una necesidad de la bacteria de sobrevivir a un ambiente hostil, en el cual convive con otros organismos capaces de producir antibióticos. Tal es así, que está ampliamente aceptado que los determinantes de resistencia antibiótica se han originado en aquellos microorganismos productores de estos compuestos, en los cuales juegan un rol de autoprotección (Alonso *et al.*, 2001; Lipsitch y Samoret, 2002).

La mayoría de los compuestos químicos, como los antibióticos utilizados en las diferentes prácticas médicas, son eliminados directamente a los efluentes hospitalarios o a las redes municipales sin metabolizar o parcialmente metabolizados, impactando finalmente en las aguas subterráneas, los ambientes acuáticos y en los sedimentos (Watkinson *et al.*, 2007). El uso de una variedad de antimicrobianos, aseguran que los mismos permanecerán en el ambiente ejerciendo una presión selectiva durante prolongados períodos. Esta situación ha quedado demostrada al detectarse un incremento de resistencia en los patógenos de peces y en la alteración de la flora bacteriana de los sedimentos y del ambiente acuático (Cabello, 2006; Harakeh *et al.*, 2006).

La adquisición y posterior diseminación de determinantes de resistencia antibiótica, en bacterias patógenas representa un problema importante para el tratamiento de enfermedades (Calvo *et al.*, 2002). La resistencia bacteriana es el resultado de la expresión de genes cromosómicos, los cuales son naturalmente intrínsecos de la bacteria, y/o genes extracromosómicos, que son adquiridos a través de intercambio genético con otras bacterias (Keith *et al.*, 2000).

Hay diversos mecanismos por los cuales las bacterias son resistentes a los antibióticos, entre los más relevantes se encuentran: la disminución de la permeabilidad de la membrana celular, lo cual dificulta el ingreso del antibiótico a las células bacterianas; alteración del sitio de acción del antibiótico, con la consecuente pérdida de afinidad de éste por su sitio de acción, sistema de bombas de eflujo, consiste en la expulsión por parte de la bacteria del antibiótico y la modificación o inactivación del antibiótico por enzimas, entre las que se encuentran las betalactamasas, siendo estas últimas, la forma más común de resistencia adquirida, (Burke, 2000; Bradford, 2001).

La producción de betalactamasas es el principal mecanismo de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos; constituyen un complejo grupo de enzimas con propiedades diferenciales en función al sustrato que hidrolizan o las inhibe (parámetros cinéticos), su localización (intra o extracelular), su codificación (cromosómica y/o extracromosómica), expresión genética (constitutiva o inducible) y otras propiedades físico-químicas utilizadas para clasificarlas. Actúan hidrolizando el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, lo que provoca que el antibiótico pierda la capacidad de unirse a las proteínas ligadoras de penicilina (Burke, 2000; Bradford, 2001).

En la última década han cobrado gran importancia los mecanismos de

resistencia a los carbapenemas, debido a la producción de enzimas carbapenemasas como las metalobetalactamas (MBL) (Tsakris *et al.*, 2003). Estas enzimas requieren zinc (Zn) para actuar y se inhiben por quelantes de metales, tales como etilendiaminotetraacético (EDTA) y compuestos tiol. Los genes responsables de la producción de MBL forman parte de una estructura, llamada integron y se transportan esencialmente en plásmidos. Por lo general, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL tienen resistencia a diferentes grupos de antibióticos y ésta puede transferirse a distintos tipos de bacterias (Pitout *et al.*, 2005).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) son un grupo de bacilos aerobios y no formadores de esporas, que no utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de vías metabólicas diferentes a la fermentación. Se puede sospechar que un bacilo Gram negativo desconocido es un miembro del grupo no fermentador, observando una o más de las siguientes características: ausencia de fermentación de glucosa y lactosa, reacción de citocromo oxidasa positiva y crecimiento en agar MacConkey. Muchos de ellos, actúan como patógenos oportunistas y pueden causar infecciones graves en el hombre, las más importantes, desde el punto de vista clínico, son *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Koneman *et al.*, 1999).

La resistencia de *P. aeruginosa* a los betalactámicos depende de la producción de betalactamasas cromosómicas y plasmídicas, de alteraciones de la permeabilidad y de bombas de expulsión activas, en especial MexAB-OprM. Los mecanismos de resistencia de *A. baumannii* se relacionan con la producción de betalactamasas y con alteraciones en proteínas fijadoras de penicilina. *S. maltophilia* presenta resistencia natural a carbapenemas y otros betalactámicos, por producción de dos betalactamasas, L-1 y L-2 (Vila y Marco, 2002).

Zarco *et al.* (2006) en un estudio realizado en muestras de agua del río Lerma-Chapala, México, identificaron géneros y especies de bacterias indicadoras de contaminación (coliformes totales, coliformes fecales, enterococos fecales). En el estudio también identificaron bacterias de interés clínico como *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia* y *Acinetobacter* spp., con resistencia a los antibióticos betalactámicos. Lösch *et al.* (2005) en un estudio realizado sobre la resistencia antimicrobiana 107 cepas de *P. aeruginosa*, provenientes de fuentes de agua de la provincia del Chaco en Argentina, señalaron resistencia a gentamicina (12,10%), meropenem (11,20%) e imipenem (0,90%) y sensibilidad a ceftazidima y ciprofloxacina. Ávila y Estupiñan (2006) evaluaron microbiológicamente 13 estaciones del humedal de Jaboque, Bogotá-Colombia, las bacterias de mayor abundancia en las aguas del humedal fueron coliformes totales, *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., también se identificaron pero en menos proporción, *Acinetobacter* spp, *Burkholderia cepacia*, *Serratia* spp., *Yersinia enterocolitica*, entre otras.

Piccini y Conde (2005) estudiaron la comunidad bacteriana de la laguna de Rocha en Argentina y reportaron predominio de *Sphingomonas* spp. y *S. maltophilia* en las aguas analizadas.

En Venezuela, Álvarez *et al.* (2004) realizaron un estudio desde marzo de 1999 a abril de 2000, en el que identificaron bacterioflora aerobia Gram negativa del intestino de las tilapias sanas provenientes del lago de Valencia y también de una granja comercial, de la región central del país, así como, del agua y sedimento del entorno; entre las cepas identificadas se reportan: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*.

El río Manzanares constituye una de las corrientes más importantes de agua superficial en la región nororiental de Venezuela, es por ello, que ha sido

objeto de numerosas investigaciones. Maloney (1966), describe su historia geológica; López y Fernández (1966) asocian la mortalidad de peces a problemas de contaminación; Mora *et al.* (1967) ponen de manifiesto el impacto de las descargas del río en las aguas costeras de Cumaná, estado Sucre. Okuda *et al.* (1970) y Ochoa (1971) asociaron los problemas de contaminación del río a los aportes del central azucarero de Cumanacoa, debido a las altas concentraciones de oxígeno y de materia orgánica que fueron encontradas en el río. Senior y Godoy (1991), describen el impacto causado sobre las características fisicoquímicas del agua fluvial por las fuertes descargas de materia orgánica; posteriormente, Iabichella (1993), confirma lo reportado por Senior y Godoy, en estudios realizados en las costas de Cumaná. Mata (2004), describe que las aguas de este río no tienen una calidad bacteriológica aceptable para su uso en actividades de recreación y consumo por parte del hombre, en su estudio identificó *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*, como bacterias predominantes y en menor frecuencia *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp.

El Manzanares es el principal río del estado Sucre, éste ha venido cursando con un deterioro fisicoquímico y microbiológico, gradual y sostenido, por lo que resulta prioritario estudiar las condiciones sanitarias que presentan sus aguas en la actualidad, con interés en la presencia de BGNNF, a fin de suministrar información sobre el patrón fenotípico de resistencia a agentes antimicrobianos betalactámicos y el tipo de betalactamasa prevalente en estas bacterias.

METODOLOGÍA

Población y muestra

En el presente estudio se analizaron 66 cepas bacterianas, identificadas previamente como BGNNF, suministradas por el laboratorio de investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, provenientes de aguas y sedimentos del muestreo en 3 estaciones (E₁: la fragua, E₂: los dos ríos y E₃: mercado municipal de Cumaná) del río Manzanares (febrero - junio en el 2008), de las cuales 54 cepas provienen de muestras de agua y 12 de sedimento.

Viabilidad de las cepas

Con el objeto de comprobar la viabilidad de las cepas, éstas se sembraron en caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C, durante 24 horas; posteriormente, se sembraron en agar nutritivo y MacConkey (AMC) con la finalidad de verificar su pureza y observar las características macroscópicas de las colonias.

Identificación bioquímica de BGNNF

A partir del crecimiento puro de las especies bacterianas en los medios empleados, se procedió a la identificación bioquímica, se empleó en primer lugar una galería bioquímica primaria que permitió la diferenciación de familias y géneros, posteriormente, una galería bioquímica definitiva para la diferenciación de especies, seguida por esquemas de diagnóstico específico para la identificación de BGNNF (Castillo, 2001).

Batería bioquímica primaria

Fermentación de azúcares

Se tomó una colonia del agar MacConkey, luego se procedió a sembrar por la técnica de punción y estrías en el agar Kligler y se incubaron a 32°C por 24 a 48 horas en aerobiosis.

Oxidasa

La producción de la enzima citocromo oxidasa es una prueba que permitió diferenciar familias de bacterias pertenecientes al grupo de los BGNNF. Se tomó con un palillo de madera una colonia procedente del agar nutritivo y se colocó sobre un trozo de papel de filtro, previamente impregnado con el reactivo tetrametilfenilendiamina, la ausencia de color en el lugar, indicó una reacción negativa y la presencia de color púrpura, indicó un resultado positivo.

Batería bioquímica definitiva

Motilidad

Se realizó mediante la siembra por punción en agar motilidad con sal de tetrazolium (TTC) al 1,00%, donde se evidenció la positividad mediante la presencia de una turbidez rosada que difundió por todo el medio, y la negatividad de la prueba (sin motilidad) por la producción de una línea roja brillante limitada en la línea de siembra, en el cual se mantuvo el medio claro alrededor.

Oxidación de azúcares

La oxidación de azúcares como glucosa, manitol y maltosa, se evaluó mediante la inoculación por duplicado en tubos que contenían medio basal oxidación fermentación (O/F), con 1,00% de cada carbohidrato, esta prueba consistió en inocular por punción ambos tubos con el cultivo de la cepa a estudiar, uno de los tubos se dejó descubierto y el otro se selló con parafina líquida. Estos tubos se incubaron a 32°C durante 24 a 48 horas en aerobiosis.

Crecimiento a 42°C

Constituye una prueba diferencial entre las especies del género *Pseudomonas*, específicamente entre especies del grupo fluorescente, donde se verificó la capacidad de las bacterias de crecer a altas temperaturas, se realizó por medio de la siembra de las cepas de interés en agar tripticasa de soya, y posteriormente, se incubaron a 42°C durante 24 a 48 horas en aerobiosis.

Susceptibilidad a la polimixina B

Se realizó por el método de difusión en agar (medio Müller Hinton) descrito por Bauer *et al.* (1966), empleando un disco de polimixina B de 300 UL. Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis. La formación de un halo transparente alrededor del disco, mayor de 11 mm se consideró sensible.

Hidrólisis de la esculina

Esta prueba se realizó inoculando el microorganismo en estudio, por estrías en medio agar esculina y luego se incubó a 35°C por 24 a 48 horas. La esculina es un medio que fluoresce al incidir la luz ultravioleta a través de una

lámpara de Wood; cuando la esculina es hidrolizada, el medio se torna negro rojizo y desaparece la fluorescencia, esto indica una reacción positiva.

Descarboxilación de la lisina

Esta prueba permite medir la capacidad enzimática de un microorganismo para descarboxilar el aminoácido lisina y formar una amina. Se inoculó el medio caldo Moeller con lisina, con el microorganismo a estudiar, se incluyó un tubo control no inoculado y libre de aminoácidos para comparar las reacciones. se incluyó un tubo control positivo para comparar las reacciones. Luego, se cubrieron los tubos con aproximadamente, 1 ml de parafina líquida y se incubó a 35°C por 24-48 horas. La aparición de un color púrpura en el medio indicó que la prueba fue positiva.

Hidrólisis de la arginina

Se utilizó para demostrar si las bacterias en estudio son capaces de hidrolizar el aminoácido arginina; el medio caldo Moeller se inoculó, luego se selló con parafina líquida para proporcionar el ambiente anaerobio, se incubó a 35°C y se realizaron lecturas diarias durante 4 días.

Hidrólisis de la gelatina

Esta prueba se basa en la producción de la enzima gelatinasa por parte de la bacteria, la cual hidroliza la gelatina y forma un precipitado. Consiste en inocular el medio agar gelatina al 4%, con una suspensión bacteriana de la cepa a estudiar, luego se incubó las placas a 35°C durante 24 a 48 horas en condiciones de aerobiosis.

Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos

Para la realización de la prueba de susceptibilidad se empleó el método de difusión en agar descrito por Bauer *et al.* (1966), según los lineamientos establecidos por el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, 2011). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se inocularon de 4 a 5 colonias aisladas, de la bacteria identificada, en 4,5 ml de solución salina fisiológica, ajustándolo con un patrón 0,5 de la escala de MacFarland. Luego, se humedeció un hisopo de algodón estéril con la suspensión bacteriana, se diseminó sobre la superficie de la placa de agar Moeller Hinton. Se dejó secar de 3 a 5 minutos y luego, se colocaron los discos de antibióticos de elección: aztreonam (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) y piperacilina (100 µg). Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas en aerobiosis, al cabo de este tiempo se procedió a realizar la lectura de los halos de inhibición. Esto permitió, dependiendo del tamaño de los halos de inhibición, clasificarlos en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), según las categorías e interpretación establecidas por el CLSI (2011).

A las cepas que presentaron resistencia a aztreonam (ATM), cefepima (FEP), ceftazidima (CAZ), piperacilina/tazobactam (TZP), imipenem (IMP) y meropenem (MEM), se les realizó la prueba de detección de betalactamasas tipo espectro extendido (BLEE), a betalactamasa cromosómica inducible clase C (AmpC) y MBL.

Caracterización fenotípica de la resistencia a los betalactámicos en BGNNF

Ubicación estratégica de los discos

La sociedad argentina de bacteriología, asociación argentina de microbiología (SADEBAC-AAM, 2010) recomiendan colocar la siguiente ubicación de los discos y la incorporación de discos con quelantes como el EDTA y de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), para maximizar la información del antibiograma. Se colocó el disco EDTA al lado de un disco de imipenem (IMP) y al otro lado un disco de meropenem (MEM); separados a una distancia de 1,5 cm, al lado de este último se colocó el disco de piperacilina/tazobactam, seguido del disco de cefepima (FEP), (AMC) y un disco de ceftazidima (CAZ), estos cuatro últimos, se colocaron a 2 cm del borde de la placa y entre ellos.

Determinación de betalactamasa tipo BLEE

La detección fenotípica de BLEE se realizó por la técnica de sinergia de doble disco (Jarlier *et al.*, 1988). La producción o no de la enzima betalactamasa se observó, entre los discos de AMC, FEP y CAZ. Se consideró sinergia positiva, por tanto, presencia presuntiva de la enzima al observar una ampliación o distorsión del halo de inhibición adyacente al disco de AMC de alguna de las cefalosporinas.

Determinación de betalactamasa tipo AmpC

La betalactamasa tipo AmpC, se detectó al observar un achatamiento del halo de inhibición entre los discos de CAZ e IMP, fenómeno originado por

antagonismo entre los antibióticos (SADEBAC-AAM, 2010).

Determinación de MBL

La enzima se detectó mediante el método de doble disco, basado en la interacción del agente quelante, EDTA y los antibióticos MEM e IMP; la ampliación del halo de inhibición de los antibióticos en forma de campana, evidencia la producción de la enzima (SADEBAC-AAM, 2010).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis descriptivo y expresados a través de tablas y figuras (Morton *et al.*, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de aislados, 54 provienen de muestras de agua y 12 del sedimento del río Manzanares, *P. aeruginosa* fue la bacteria identificada en mayor proporción con 35 (65,81%) aislados, seguida de *S. maltophilia* con 12 (22,22%), la E₃, fue la estación con mayor número de bacterias aisladas respectivamente (tabla1).

Tabla 1. Bacilos Gram negativos no fermentadores, aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero-junio 2008

Bacteria	Número de cepas por estaciones			Total	Porcentaje (%)
	E ₁	E ₂	E ₃		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	4	28	35	65,81
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	0	0	12	12	22,22
<i>Sphingomonas</i> spp.	0	2	0	2	3,70
<i>P. stutzeri</i>	2	0	0	2	3,70
<i>P. oryzae</i>	1	0	0	1	1,85
<i>P. mendocina</i>	1	0	0	1	1,85
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0	0	1	1,85
Total	8	6	40	54	100,00

La evaluación de las cepas provenientes de muestras de sedimentos (12 cepas), dio como resultado que todos los aislados identificados fueron *P. aeruginosa* (7 (58,33%) de la E₃; 4 (33,33%) de la E₂ y 1 (8,34%) de la E₁. La mayor frecuencia de bacterias aisladas en la E₃ puede ser debido a los posibles problemas de contaminación que presentan las aguas, debido a la diversa materia orgánica desechada sobre las aguas por parte de la población que vive a sus alrededores, incrementando la flora bacteriana. La E₂ como la E₁, son ambientes naturales, que aparentemente se encuentran con una buena calidad de sus aguas, a pesar de que la E₂ es un balneario recreacional.

Diversos estudios bacteriológicos se han realizado en ambientes naturales acuáticos y terrestres identificando una gran variedad de bacterias. Al

respecto, Negrete *et al.* (2003) en un estudio realizado en granjas piscícolas de Morelos, México, identificaron 60 cepas bacterianas de la familia *Pseudomonadaceae*, pertenecientes a seis especies diferentes. Hulla *et al.* (2006) describe que *P. aeruginosa* se encuentra en diferentes ambientes acuáticos, sin embargo, no hay informes sobre el aislamiento en aguas cerca de la cabecera de la fuente de un río. Por el contrario, Nonaka *et al.* (2010), estudiaron el río Shigenobu, Japón, donde aislaron cepas de *P. aeruginosa* en la cabecera del río, aunque de forma esporádica, se aislaron en mayor proporción en la parte media y baja, resultados que concuerdan con los obtenidos.

Altamirano y Pozzo (2000) identificaron *Pseudomonas* spp. y *Sphingomonas* spp, a partir de muestras de suelo provenientes de un terreno de 8 hectáreas durante un año, en las cercanías de la localidad de Catriel (Río Negro) en la Patagonia Argentina. Quinchía *et al.* (2006), estudiaron muestras de suelo del Oriente Antioqueño, México, en donde identificaron *Pseudomonas* spp. Albarado y Flores (2008) aislaron 24 cepas correspondientes al género *Pseudomonas* spp., de muestras de suelo provenientes de zonas agrícolas del estado Sucre, Venezuela.

Pseudomonas spp., es capaz de sobrevivir e incluso degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, como pesticidas, diversos compuestos halogenados e hidrocarburos derivados del petróleo, sobreviviendo así, a la presión selectiva del ambiente, volviéndose resistentes a las condiciones adversas donde conviven (Arraiz, 2001), además, tiene la capacidad de colonización, adherencia y producir biopelícula, lo cual representa una estrategia de supervivencia, que le confiere protección contra los mecanismos de erradicación microbiana. Este microorganismo crece en muy baja concentración de nutrientes en medio ambiente acuoso, y puede sobrevivir durante muchos meses en aguas a temperatura ambiente, es un importante

patógeno oportunista y causa una amplia variedad de infecciones, especialmente, de oídos, ojos y piel, y su control en aguas destinadas a la recreación es obligatorio en varios países del mundo (Moore *et al.*, 2002).

La presencia ubicua de los antimicrobianos incorporados en diferentes hábitats, ha perturbado el delicado balance de los microorganismos en el ambiente, llevando a que bacterias con variados grados de resistencia, tanto patógenos como no patógenos, hayan reemplazado a los microorganismos sensibles (Lösh y Merino, 2008).

En la figura 1, se observa la resistencia antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de agua, según la estación en que se encuentran.

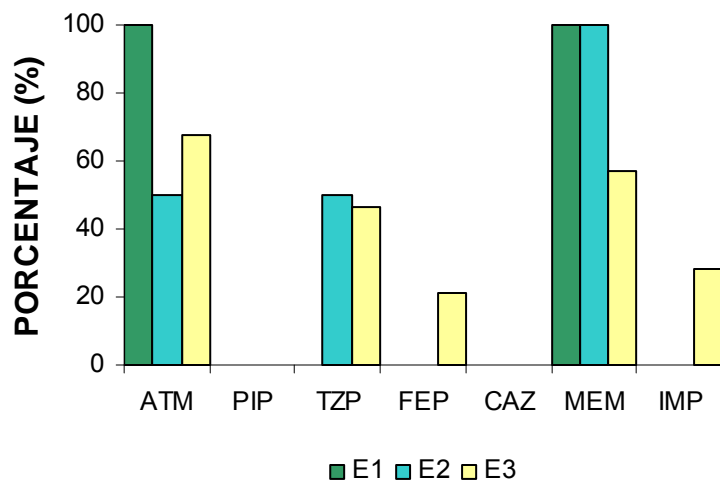


Figura 1. Resistencia antimicrobiana in vitro de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas del río Manzanares. Febrero-junio 2008. ATM: Aztreonam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, TZP: piperacilina/tazobactam, IMP: imipenem, MEM: meropenem y PIP: piperacilina. E: estación. E1: La fragua, E2: Los dos río y E3: Mercado municipal de Cumana

En todas las estaciones se encontraron cepas resistentes a ATM y MEM (mayor del 50,00%), piperacilina/tazobactam (TZP) presentó resistencia solo en la E2 y E3 (mayor del 40,00%), mientras IMP y FEP solo presentaron

resistencia en los aislados de la E3. En *P. aeruginosa* la resistencia a ATM, MEM, TZP, IMP y FEP es adquirida, se produce por selección natural a través de mutaciones al azar, pero también puede inducirse mediante el aumento de una presión selectiva, ocasionada por el ambiente hostil en la que se encuentran las bacterias. Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del sedimento de la E3, presentaron resistencia a ATM y a TZP, mientras que las cepas aisladas de la E2, solo presentaron resistencia a ATM (figura 2); estos resultados revelan que en las cepas aisladas de los sedimentos hay menos determinantes de resistencia. En comparación a los aislados de agua; puede ser debida, a que, al estar en el fondo del río, no entran en constante contacto con las demás bacterias, no adquiriendo genes de resistencia por intercambio genético con las mismas.

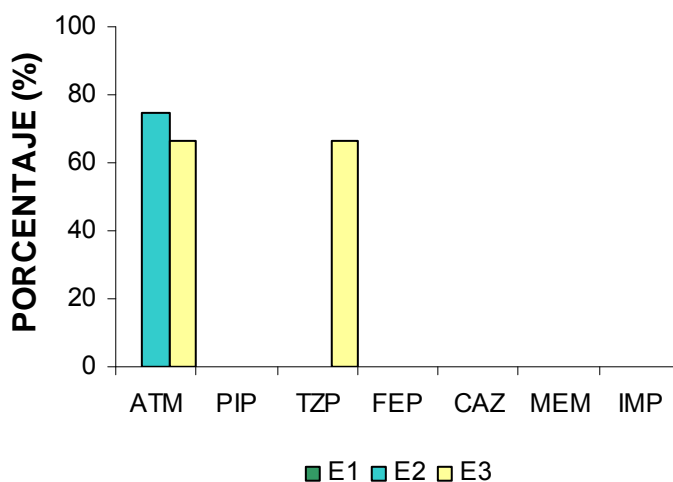


Figura 2. Resistencia antimicrobiana in vitro de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de sedimentos del río Manzanares. Febrero - junio 2008. ATM: Aztreonam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, TZP: piperacilina/tazobactam, IMP: imipenem, MEM: meropenem y PIP: piperacilina. E: estación. E1: La fragua, E2: Los dos ríos y E3: Mercado municipal de Cumana.

Lösch *et al.* (2005), describen que la adquisición de los determinantes de resistencia entre las poblaciones bacterianas, es consecuencia de la fuerte presión selectiva originada como resultado de la terapia antibiótica y de los antibióticos en el medio ambiente. El tratamiento de las infecciones graves

causadas por este microorganismo suele ser difícil, ya que éste es naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos y, además, pueden adquirir mecanismos de resistencia a prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento (Pagniez *et al.*, 2006).

Pseudomonas spp. constituye uno de los paradigmas en la resistencia bacteriana, ya que, en esta pueden confluir todos los mecanismos de resistencia e incluso potencializarse entre sí. A partir del año 2002, se dan a conocer datos importantes relacionados con la resistencia antimicrobiana en *Pseudomonas* spp. entre ellos: IMP: 10,00% a 25,00%; PIP: 5,00% a 30,00% y CAZ: 0,30% a 19,00% a CAZ (Crespo, 2002). Livermore (2002) asoció que el tratamiento con IMP provoca un mayor riesgo a desarrollar resistencia, comparado con otros antibióticos como CAZ y PIP.

Gad *et al.* (2007) aislaron 57 cepas de *Pseudomonas* de muestras ambientales en Minia, Egipto, de las cuales 39 fueron identificadas como *P. aeruginosa*, con un gran porcentaje de resistencia a MEM. Los reportes de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de ambientes naturales son escasos y la mayoría han estado dirigidas a aislamientos clínicos. Debido a la poca bibliografía sobre susceptibilidad antimicrobiana en estas cepas, se hace referencia a antecedentes de aislados clínicos.

Carvalho *et al.* (2005), estudiaron 35 cepas bacterianas de *P. aeruginosa* obtenidas del Instituto Oswaldo Cruz, Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, en donde señalan, que los aislados presentaron alto porcentaje de resistencia al ATM (42,00%). Mata (2002), en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, encontró 11,60% de resistencia a MEM en aislados de *P. aeruginosa*; de igual manera, Pérez *et al.* (2008), reportaron 15,30% de resistencia a IMP en cepas de *P. aeruginosa*, provenientes de muestras clínicas procesadas en el Laboratorio de

Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile, en Santiago. En 2009, Cabeza encontró un elevado porcentaje de resistencia para TZP (40,74%), en cepas suministradas por el laboratorio de Bacteriología del HUAPA, Cumaná. Martín et al. (2003), en un estudio realizado en la ciudad de Caracas, reportaron 32,00% de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* para el mismo antibiótico, comunitarias como intrahospitalarias.

Las cepas de *S. maltophilia* aisladas, expresaron resistencia natural a los antibióticos betalactámicos ensayados, obteniendo resultados por encima del 60,00%, excepto PIP con 100,00% de sensibilidad (figura 3). *S. maltophilia* es un patógeno emergente y oportunista, que presenta resistencia natural a los betalactámicos. Esta bacteria presenta un perfil de resistencia a nivel cromosómico, responsable de la resistencia a las cefalosporinas tradicionales (cefotaxime, ceftazidima y cefepima) y a la mayoría de los carbapenemas (Livermore, 2002).

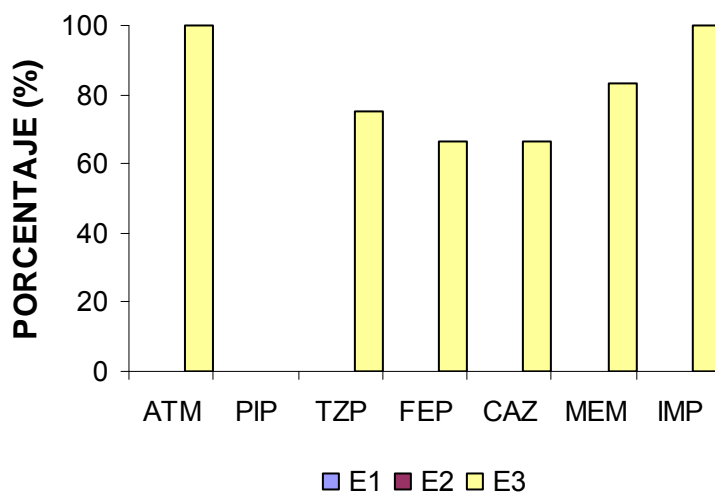


Figura 3. Resistencia antimicrobiana in vitro de *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de aguas del río Manzanares. Febrero - junio 2008 ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, TZP: piperacilina/tazobactam, IMP: imipenem, MEM: meropenem y PIP: piperacilina. E: estación. E1: La fragua, E2: Los dos río y E3: Mercado municipal de Cumana.

Este perfil típico, permite una orientación al tratamiento y ayuda a realizar

un control de calidad al laboratorio de microbiología, ya que en relación a la identificación bacteriana de *S. maltophilia* con un perfil de resistencia diferente, corresponde con otro tipo de bacteria y se debe realizar la verificación pertinente. Ante la identificación de esta bacteria, incluso se sugiere no informar antibiograma, ya que el tratamiento de elección debe ser trimetoprim/sulfametoxazol (Crespo, 2002).

El mecanismo de resistencia a los betalactámicos más frecuente es la producción de betalactamasas, enzimas que logran hidrolizar el anillo betalactámico de penicilinas y cefalosporinas. (Samaha y Araj, 2003).

En el presente estudio, se obtuvo que de las 47 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de agua y sedimento, 33 (70,21%) presentaron betalactamasa tipo AmpC, de las cuales 21 (63,63%) provienen de agua y 12 (100,00%) de sedimento, en la figura 4 se refleja la frecuencia de producción de AmpC por estación, se observa claramente que las cepas aisladas en la E3 tanto de agua como sedimento presentaron el gen en mayor porcentaje con respecto a las otras estaciones de muestreo; estos resultados indican la menor producción del gen AmpC en las cepas aisladas de agua, puede ser atribuido a que los genes en estas se encuentran desreprimido, algo que se observa en la disociación IMP sensible - CAZ resistente. (Vila y Marco, 2010).

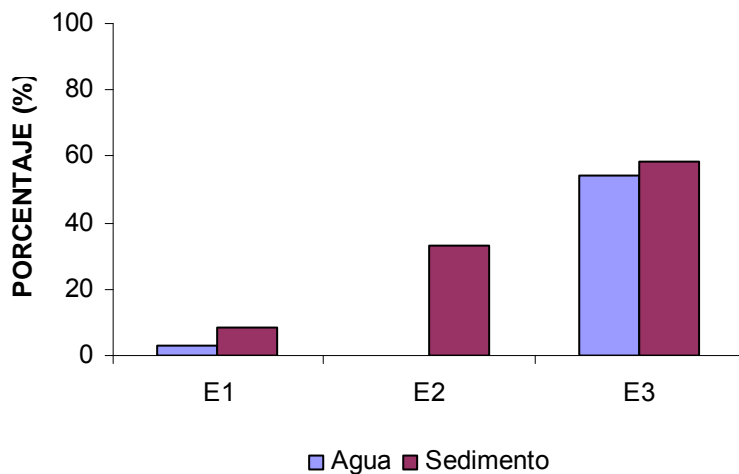


Figura 4. Betalactamasas tipo AmpC basal detectadas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas y sedimentos del río Manzanar. Febrero - junio 2008 E: estación. E1: La fragua, E2: Los dos río y E3: Mercado municipal de Cumaná.

La inducción de la producción de AmpC, está relacionada con las vías de reciclaje del peptidoglicano. Los antibióticos betalactámicos producen rupturas en la pared, al ser su sitio blanco, obligando a las bacterias a activar sus mecanismos de defensa, en este caso, expresión de AmpC. Las propuestas más estudiadas han postulado como el verdadero inductor de AmpC, a varias moléculas que se acumulan durante el proceso de reciclaje y rompimiento de la pared producido por los antibióticos betalactámicos, entre ellos el anhidroMurNAc-tripéptido o el GlcNAc-anhMurNAc-peptapéptido (Vila y Marco, 2010). La importancia de la inducción es que, particularmente, se ha observado que una vez, desarrollada la población de microorganismos desreprimidos estos son estables y se acumulan en la atmósfera hospitalaria, lo cual, hace que sean fácilmente diseminados (Crespo, 2002).

Los resultados de esta investigación coinciden con los reportados por Gómez *et al.* (2007), en un estudio sobre mecanismos de resistencia, realizado en el Hospital Universitario Miguel Oraá, del estado Portuguesa, Venezuela, donde encontraron que el 58,00% de los aislados de *P. aeruginosa* expresaron

fenotipo de betalactamasa tipo AmpC inducido basal.

Gad *et al.* (2007) obtuvieron que 37 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras ambientales, en Minia-Egipto, eran productoras de betalactamasas tipo AmpC. Bou y Martínez (2000) y Danes *et al.* (2002) al estudiar muestras clínicas sugieren que la sobreexpresión de AmpC en *P. aeruginosa* es un mecanismo frecuente de resistencia a betalactámicos y genera un fenotipo de resistencia caracterizado por resistencia a TZP y CAZ. Las betalactamasas tipo AmpC son responsables de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, ATM, inhibidores de betalactamasas. (Jacoby, 2009).

En la figura 5, se observa que las 12 (100,00%) cepas de *S. maltophilia* resultaron positivas a la detección BLEE y 2 (16,67%), presentaron fenotipo compatible con MBL; resultados que se esperaban ya que esta bacteria produce BLEE y MBL de forma natural. Hallazgos relacionados fueron reportados por Antón (2006), en un estudio realizado en 24 cepas clínicas de *S. maltophilia*, de las cuales, 15 (62,50%) resultaron positivas a la producción de BLEE. Esta bacteria presenta dos tipos de betalactamasas inducibles, L-1 y L-2. (Sevillano *et al.*, 2001). El centro activo de la betalactamasa cromosómica

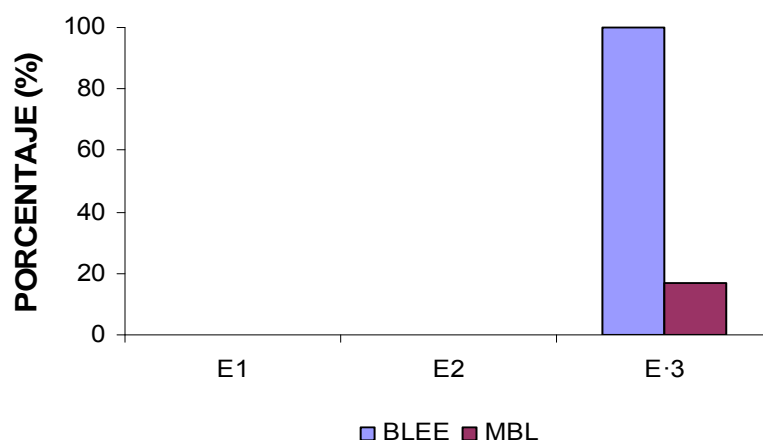


Figura 5. Betalactamasas detectadas en *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de aguas del río Manzanares. BLEE: Betalactamasa de espectro extendido y MBL: metalobetalactamasa.

L-1 es el Zn, la presentan la mayoría de cepas y posee, fundamentalmente actividad frente a IMP y MEM. La betalactamasa cromosómica L-2 posee actividad cefalosporinasa, adicionalmente, hidroliza al ATM (Vila y Marco, 2002).

Con el análisis de los resultados obtenidos en la tabla 2, se diferenciaron 12 fenotipos entre las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de agua, los cuales se designaron con números romanos (I hasta XII), presentándose el fenotipo A en 6 (17,14%) aislados, siendo el mayormente observado, el cual sólo presentó resistencia a MEM, pudiendo ser un sistema de eflujo el mecanismo responsable de la resistencia. El fenotipo II y III agrupa 5 aislados (14,29%) cada uno, resultando resistentes a ATM y MEM respectivamente pudiendo estar implicada una BLEE, el fenotipo IV con 4 (11,43%) aislados, se caracterizó por ser resistente a ATM, MEM y TZP, se puede inferir que el mecanismo involucrado es un sistema de eflujo o BLEE.

El fenotipo V con 3 (8,57%) aislados fue el que presentó mayor determinantes de resistencia (ATM, MEM, TZP, IMP y FEP); pudiendo converger varios mecanismos de resistencia como sistemas de flujo, producción de BLEE e impermeabilidad de la membrana, el fenotipo VI presentó 3 (8,57%) aislados mostrando resistencia a ATM, TZP y IMP el mecanismo implicado en este tipo de resistencia sería un sistema de eflujo e impermeabilidad de la membrana (Vila y Marco 2010). El fenotipo VII no presentó resistencia a ningún antibiótico, infiriendo que es un fenotipo silvestre, el resto de fenotipos (VIII, IX, X y XI) sólo presentaron entre 2 (5,71%) y 1 (2,86%) aislado teniendo perfiles muy parecidos, al encontrar FEP y MEM resistentes, se presume que el mecanismo de resistencia es un sistema de bomba de eflujo Mexcd-OprJ o una betalactamasa tipo oxa clásica que expresan un espectro de actividad hidrolítica extendido.

Tabla 2. Fenotipos de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero-junio 2008.

Fenotipo	N	Resistente	Sensible
I	6	MEM	CAZ, TZP, IMP, PIP, FEP, ATM
II	5	ATM	CAZ, TZP, IMP, PIP, FEP, MEM
III	5	ATM, MEM	CAZ, TZP, IMP, PIP, FEP
IV	4	ATM, TZP, MEM	CAZ, IMP, PIP, FEP
V	3	ATM, MEM, TZP, IMP, FEP	CAZ, PIP
VI	3	ATM, TZP, IMP	CAZ, MEM, PIP, FEP
VII	2	_____	CAZ, TZP, IMP, MEM, PIP, FEP, ATM
VIII	2	TZP, MEM	CAZ, TZP, IMP, PIP, ATM
IX	2	ATM, MEM, IMP	CAZ, PIP, FEP, TZP
X	2	ATM, TZP, FEP	CAZ, PIP, MEM, IMP
XI	1	TZP, MEM, FEP	CAZ, PIP, ATM, IMP

En los aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes del sedimento (tabla 3), se diferenciaron 4 fenotipos, los cuales se designaron con números romanos (I hasta VI), el fenotipo I se observó 4 (33,33%) aislados, sólo resistentes a ATM, el posible mecanismo de resistencia involucrado es una BLEE, el fenotipo II con 4 (33,33,00%) aislados no presentó resistencia a ningún antibiótico, infiriendo que son fenotipos silvestres., el fenotipo III con 2 (25,00%) aislados presentó resistencia a ATM y TZP, el fenotipo IV presentó 1 (8,33%) aislado fue resistente a TZP, el mecanismo responsable de la resistencia podría ser desrepresión parcial o total AmpC (Vila y Marco, 2010).

Crespo (2002), señala la presencia de 5 perfiles fenotípicos diferentes de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa*. Este refiere que *P. aeruginosa*

tiene una fácil adaptación al ambiente y rapidez en adquirir resistencia antibiótica, confluyendo en ella, muchos mecanismos de resistencia. No obstante, se pueden diferenciar algunos perfiles determinando su posible origen genético.

Tabla 3. Fenotipos de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de sedimentos del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero-junio 2008.

Fenotipo	N	Resistente	Sensible
I	4	ATM	PIP, FEP, MEM, IMP, TZP, CAZ
II	4	_____	PIP, FEP CAZ, MEM, IMP, TZP, ATM
III	3	ATM, TZP	CAZ, FEP, IMP, MEM, PIP
IV	1	TZP	PIP, FEP, IMP, MEM, ATM, CAZ

Los mecanismos de resistencia naturales presentes en este microorganismo, determinan que su fenotipo silvestre sea sensible sólo a las carboxipenicilinas, CAZ, FEP y carbapenemas. Sin embargo, presenta una resistencia adquirida causante de la mayoría de las fallas terapéuticas (Crespo, 2002).

Todos los fenotipos encontrados en los aislados de *S. maltophilia* son silvestres, debido a la resistencia natural a los betalactámicos, sin embargo en la tabla 4, se puede observar cepas con sensibilidad inusual a ciertos antimicrobianos. Las cepas presentaron 6 fenotipos de resistencia (tabla 4), representados con letras del alfabeto (A hasta F), siendo el más frecuente el fenotipo A con 5 (41,67%) aislados y B con 2 (16,67%) aislados presentando un perfil de resistencia típico de la bacteria, el fenotipo C con 2 (16,67%) aislados, presenta cierto grado de sensibilidad algo que no es común en esta bacteria, por lo tanto se puede decir que este es un perfil silvestre, el fenotipo D y E con 1 (8,33%) aislado cada uno se observa claramente el perfil de resistencia típico en esta bacteria, mientras el fenotipo F con un aislado (8,33%) al igual

que el fenotipo C presenta sensibilidad a varios antibióticos lo que infiere que sea un fenotipo silvestre.

Tabla 4. Fenotipos de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre. Febrero - junio 2008.

Fenotipo	N	Resistente	Sensible
A	5	ATM, CAZ, FEP, TZP, IPM, MEM	PIP
B	2	ATM, FEP, TZP, IPM, MEM	PIP, CAZ
C	2	ATM, IPM	CAZ, FEP, TZP, MEM, PIP
D	1	ATM, CAZ, TZP, IPM, MEM	PIP, FEP
E	1	ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM	PIP, TZP
F	1	ATM, MEM, IMP	PIP, FEP, CAZ, TZP

A pesar de que las bacterias estudiadas son aisladas del ambiente, la mayoría de ellas presentaron resistencia natural a los antibióticos, pocas cepas presentaron resistencia adquirida, que puede ser debida, a causa de la calidad del agua, ya que la misma ha tenido un deterioro gradual y sostenido los últimos años, la población existente alrededores del río y las empresas que se han establecido cerca del mismo, todos estos factores pueden conllevar a la contaminación del río, llevando a que el ambiente se convierta en un ambiente hostil para las bacterias que convivan ahí, solo sobreviviendo adquiriendo resistencia.

El ambiente juega un papel importante en la presión selectiva, llevando a que bacterias sensibles sean desplazadas por otras, con diversos grados de resistencia. Los ambientes naturales se deberían monitorear y vigilar de manera periódica, ya que juegan un rol subestimado en la transmisión de la resistencia.

CONCLUSIONES

La estación del mercado (E₃) fue donde se encontraron mayor números de bacterias, siendo aislada en mayor frecuencia *P. aeruginosa*.

Las cepas de *P. aeruginosa* presentaron resistencia adquirida a MEM, ATM y TZP (> 40,00%)

S. maltophilia presento un fenotipo de resistencia natural de su especie.

P. aeruginosa presentó betalactamasa tipo AmpC basal en todos los aislados de sedimento y en un 60,00% en aislados de agua. En estas cepas no se observo la presencia de BLEE

S. maltophilia presento betalactamasa de espectro extendido y metabelactamasa en menor proporción, algo natural de las especies.

RECOMENDACIONES

Implementar redes de vigilancia sanitaria sobre el río Manzanares a fin de monitorear y controlar su condición bacteriológica.

Hacer campañas sobre el uso racional de los antibióticos, sólo utilizarlos en caso justificado, en especial en pacientes que se encuentren en la unidad de cuidados intensivos.

Realizar concentración mínima inhibitoria (CMI) a las cepas *S. maltophilia* aisladas, para tener mayor información sobre su resistencia ante ceftazidima..

Investigar los genes de resistencia responsables de la producción de BLEE mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

BIBLIOGRAFÍAS

Albarado, L. y Flores, E. 2008. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo. [Kasmera](#), 36 (1): 17-27.

Alonso, A.; Sánchez, P. y Martínez, J. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Minireview. *Environmental Microbiology*, 3(1): 1- 9.

Altamirano, M. y Pozzo, M. 2000. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburohílicas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. *Asociación Brasileira de Emergencia Sanitaria y Ambiental*.

Álvarez, J.; Agurto, C.; Álvarez, A. y Obregón, J. 2004. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. *Revista Científica*, 14(6): 4-5.

Antón, D. 2006. Aislamiento y caracterización de plásmidos de resistencia en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* provenientes de muestras clínicas de pacientes recluidos en Unidades de Cuidados Críticos. Trabajo para optar al título de *Magíster Scientiarum* en *Biología Aplicada* Mención Microbiología Aplicada. Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Cumaná.

Ávila, S. y Estupiñán, S. 2006. Calidad bacteriológica del agua del humedal de Jaboque, Bogotá, Colombia. *Programa bacteriología y laboratorio clínico*, 28(1): 67-78.

Arraiz, N. 2001. "Quorum sensing" y virulencia en *Pseudomonas*

aeruginosa. *Kasmera*, 29(1): 97-118

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.

Bou, G. y Martínez, B. 2000. Cloning nucleotide sequencing and analysis of the gene encoding an AmpC betalactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2): 428-432.

Bradford, A. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4): 933-951.

Burke, A. 2000. Antibiotic resistance. *Medical Clinics of North America*, 84(6): 1407-1429.

Cabello, F. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1137-44.

Cabeza, R. 2009. Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados de muestras clínicas. Trabajo para optar al título de licenciado en Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Calvo, A.; Rodríguez, C.; Andrade, O.; Márquez, N.; Bertuglia, F. y Peña, C. 2002. Incidencia de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo atípico de resistencia atribuible a pérdida de la porina OprD. *Act Infectious*, 9: 21-26.

Carvalho, C.; Naziozeno, Y.; Pereira, L. y Dutra, M. 2005. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Memoria do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5): 541-548.

Castillo, E. 2001. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa. *Manual del centro de referencia bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo*.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement*. Document. M100-S18, 28(1).

Crespo, M. 2002. La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica*, 33(4): 179-193.

Danes, C.; Navia, M.; Ruiz, J.; Marco, F.; Jurado, A.; Jiménez, M. y Vila, J. 2002. Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of syn 2190 (AmpC inhibitor) in the MICs of different betalactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(2): 261-264.

Gad, G.; Zaki, S. y Ashour, M. 2007. Caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas y ambientales en Minia, Egipto, antibiograma y la resistencia a los mecanismos de prevalencia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5): 1010-1017.

Gómez, G.; Thanya, L.; Maurera, R.; Disney, M. y Rosales, B. 2007. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en el Hospital Universitario Dr. Miguel Oroá de Guanare, estado Portuguesa, Venezuela.

Revista Médica de la Extensión Portuguesa ULA.

Harakeh, S.; Yassine, H. y EL-Fadel M. 2006. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. *Environmental Pollution*, 143(2): 269-277.

Hullar, M.; Kaplan, L. and Stahl, D. (2006). Recurring seasonal dynamics of microbial communities in stream habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 713-722.

Iabichella, M. 1993. Evaluación bacteriológica del sector Marino – Costero San Luís – Guabo, Cubana – Venezuela, según los criterios para agua del contacto humano total y parcial. Tesis de Maestría en Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente.

Jacoby, G. 2009. AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 161-182.

Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G y Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamase conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4): 867-878.

Jorgensen, S. y Halling-Sorensen, B. 2000. Drugs in the environment. *Chemospher*, 40: 691- 699.

Keith, S.; Henry, S. y Elias, A. 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(2): 293-319.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 1999. *Diagnóstico microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lipsitch, M. y Samoret, M. 2002. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: population perspective. *Emerging Infectious Disease*, 8(4): 347-354.

Livermore, D. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare. *Clinical Infectious Diseases*, 34(5): 634-640.

López, M. y Fernández, E. 1966. Informe sobre mortalidad de peces en el río Manzanares ocurrida los días siete y ocho de abril de 1966, para el Mac y el IFPA. 1-5.

Lösch, L. y Merino, L. 2008. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de ambientes acuáticos. Instituto de medicina regional, área de bacteriología. Universidad Nacional del Nordeste.

Lösch, L.; Merino, L. y Alonso, J. 2005. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia de Chaco (Argentina). *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Campus resistencia. Universidad Nacional del Nordeste. Resumen M-020.

Maloney, A. 1966. El delta del río Manzanares. Pasado, presente y futuro. *Lacena*, 10: 3-6.

Mata, G. 2002. Frecuencia de cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infección intrahospitalaria en la unidad de cuidados intensivos del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de

Alcalá”, Cumaná, estado Sucre. Trabajo de Grado. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Oriente.

Mata, F. 2004. Determinación del grado de contaminación del río Manzanares (Cumaná, estado Sucre), mediante el análisis físico, químico y bacteriológico de sus aguas. Trabajo de Grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná.

Martín, G.; Carmona, O. y Comegna, M. 2003. Tendencia de la resistencia a betalactámicos y otros antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de Venezuela. Resistencia nosocomial y comunitaria. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1): 21-29.

Moore E.; Heaney, N.; Millar, C.; Crowe, M. y Elborn, J. 2002. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Community Diseases*, 5(1): 23-26.

Mora, C.; López, M. y Okuda, T. 1967. Observaciones hidrobiológicas en la costa de Cumaná. *Boletín Instituto Oceanográfico UDO*, 6(2): 303 - 327.

Morton, R.; Hebel, J. y Mc Carter, R. 1993. *Bioestadística y epidemiología*. Tercera edición. Editorial Mac Graw Hill. México.

Negrete, P.; Romero, J.; Villegas, G. y Vázquez, V. 2003. Presencia de plásmidos en *Pseudomonas* aisladas de peces de ornato. *Veterinaria México*, 34(3): 289 - 295.

Nonaka, L.; Inubushi, A.; Shinomiya, H.; Murase, M. y Suzuki, S. 2010. Differences of genetic diversity and antibiotics susceptibility of *Pseudomonas*

aeruginosa isolated from hospital, river and coastal seawater. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3): 465–472.

Ochoa, J. 1971. Contaminación del río Manzanares y laguna de oxidación del Central Cumanacoa. Informe N° 55 del Servicio de Hidrología y Riego. IFPA. Barquisimeto. 21.

Okuda, T.; Fernández, C. y Bonilla, J. 1970. Informe técnico enviado al Azucarero de Cumanacoa. 5 .

Pérez, A.; García, P.; Poggi, H.; Braun, S.; Castillo, C.; Román, J.; Lagos, M.; Romeo, E.; Porte, T.; Labarca, J. y González, G. 2008. Presencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem. *Revista Médica de Chile*, 136(4): 423-432.

Piccini, C. y Conde, D. 2005. Cambios drásticos en la comunidad bacteriana de la laguna de Rocha y sus posibles implicaciones ambientales. *Revista Agrociencia*, 9(1-2): 269-275.

Pitout, J.; Gregson D. y Poirel, L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a Large Centralized Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7): 3129-3135.

Quinchía, A.; Gómez, F.; Palencia, K. y Giraldo, C. 2006. Evaluación de la resistencia de un aislado bacteriano nativo compatible con *Pseudomonas* spp. al insecticida lorsban 4 ec. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237, 101-108.

Samaha, J. y Araj, G. 2003. Recent Developments in beta-lactamases and Extended Spectrum β Lactamases. *Bagó*, 327(7425):1209-1213.

Senior, W. y Godoy, G. 1991. Estudio Físicoquímico del Río Manzanares, Cumaná, Venezuela. *Boletín Instituto Oceanográfico UDO*, 29(1 - 2): 160-172.

Sevillano, D; Valdezate, S. y Gómez-Lus, M. 2001. Estado actual de la sensibilidad de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista Española de Quimioterapia*, 14(2):138-154.

Sociedad Argentina de Bacteriología, Asociación Argentina de Microbiología. 2010. "Caracterización fenotípica de la resistencia a los betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp". "SADEBACAAM"<http://www.amm.ar/novedades/consenso%20BNNF%20anexo.pdf>. (25/07/2008).

Tsakris, A.; Tassios, P.; Polydorou, F.; Papa, A. Malaka, E.; Antoniadis, A. y

Legakis, N. 2003. Infrequent detection of acquired metallo- β -lactamase among carbapenem-resistant *Pseudomonas* isolates in a Greek hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8): 846-851.

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

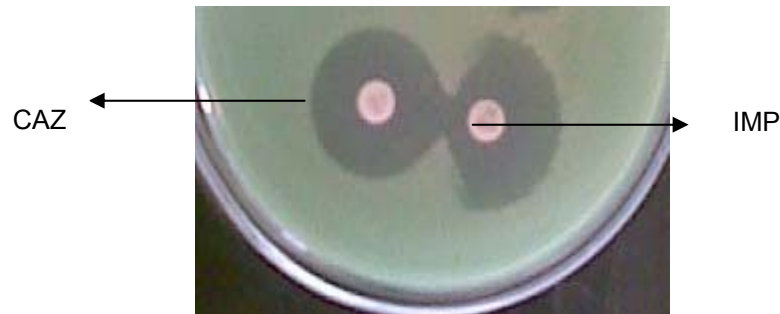
Vila, J. y Marco, F. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos Gram negativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10): 726-736

Watkinson, A.; Micalizzi, G.; Graham, G.; Bates, J. y Costanzo, S. 2007. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and

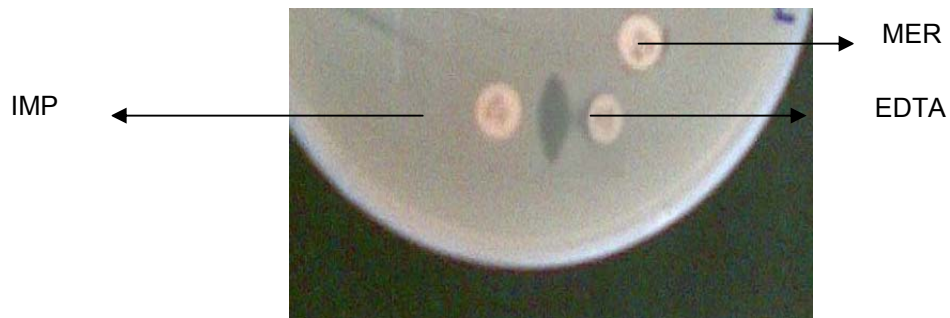
oysters from an urban riverine system. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17): 5667-5670.

Zarco, A; Lima, A; López, Y. y Mazari, M. 2006. Calidad microbiológica del agua. Atlas de la Cuenca Lerma-Chapala: construyendo una visión conjunta. Editorial SEMARNAT, INE, UNAM. 130-138.

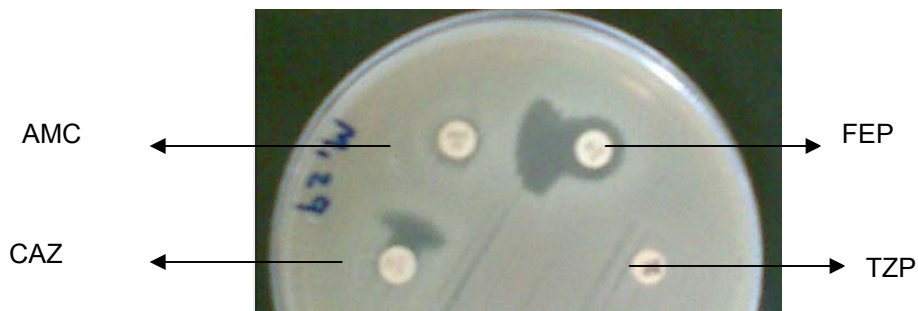
APÉNDICES



Apéndice 1. Detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC en aislados de *Pseudomonas aeruginosa*. CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem.



Apéndice 2. Detección fenotípica de betalactamasas tipo MTBL en aislados de *Stenotrophomonas maltophilia*. IMP: Imipinem, MER: meropenem y EDTA.



Apéndice 3. Detección fenotípica de betalactamasas tipo BLEE en aislados de *Stenotrophomonas maltophilia*. AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima y TZP: piperacilina/tazobactam.

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA A BETALACTÁMICOS Y DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO FERMENTADORAS AISLADAS DEL RÍO MANZANARES. CUMANÁ, ESTADO SUCRE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Alvarez P. Angel Luis	C	16505106
	VLAC	
	e-mail	lic_angalv@hotmail.com
	C	
	VLAC	
	e-mail	
	C	
	VLAC	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

BGNNF aislados de cepas ambientales
Susceptibilidad antimicrobiana en aislados ambientales

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó la susceptibilidad a betalactámicos, en 66 cepas bacterianas, ya identificadas previamente como bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), provenientes de aguas y sedimentos del muestreo de 3 estaciones del río Manzanares en el 2008, de las cuales 54 cepas provienen de muestras de agua y 12 de sedimento. A las cuales se le realizaron la identificación, mediante pruebas bioquímicas convencionales. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas aisladas, mediante el método de difusión en agar, y la determinación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y metalobetalactamasas (MBL), se realizó mediante el método fenotípico de sinergia de doble disco y el método de doble disco con etilendiaminotetraacético, respectivamente. De 54 cepas de agua, 35 (64,81%) fueron identificadas como *P. aeruginosa*, 12 (22,22%) *S. maltophilia*, 2 (3,71%) *S. paucimobilis*, 2 (3,71%) *P. stutzeri*, 1 (1,85%) *P. mendocina*, 1 (1,85%) *P. oryzihabitans* y 1 (1,85%) *B. cepacia*; mientras las 12 (100,00%) cepas de sedimento se identificaron como *P. aeruginosa*. Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de aguas y sedimento, presentaron resistencia a los betalactámicos ensayados; en los aislados de agua el fenotipo A de resistencia fue el más común, presentando resistencia a aztreonam, cefotaxima, piperacilina/tazobactam, meropenem, mientras el fenotipo I más frecuente en los aislados de sedimento presentaron resistencia sólo a aztreonam y cefotaxima. Las cepas de *S. maltophilia* presentaron resistencia a casi todos los antibióticos probados, el fenotipo A de resistencia que se encontró en mayor proporción, presentó resistencia a todos los antibióticos, a excepción de piperacilina. 21 cepas de *P. aeruginosa*, aislados de agua, (60,00%) y 12 (100%) aisladas de sedimento, presentaron betalactamasa, tipo AmpC. Todas las cepas de *S. maltophilia* presentaron BLEE positivo y resistencia a imipenem y meropenem; 2 (16,67%) presentaron fenotipo compatible con MBL. Estos resultados permiten contribuir con el conocimiento de la epidemiología fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de aguas del río, permitiendo establecer un patrón de comportamiento de estas bacterias que pudieran afectar al humano.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail					
Anton Dina	ROL	c	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	CVLA	8647499				
	e-	dinacar@yahoo.com				
	e-mail					
Guzman Militza	ROL	c	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	CVLA	8954225				
	e-mail	militzaguz@yahoo.com				
	e-mail					
Albarado Luzmila	ROL	c	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	CVLA	9278774				
	e-mail	luzalv@hotmail.com				
	e-mail					

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2011	7	7
------	---	---

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-alvareza.doc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial : **Nacional** (Opcional)

Temporal: **Temporal** (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioáñalisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Bioáñalisis

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

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

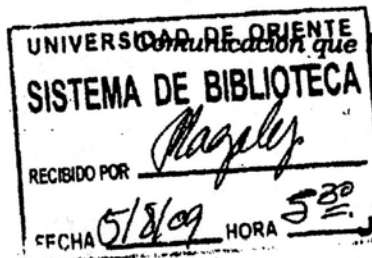
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNPEL
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.


Álvarez Ángel
Autor


Antón Dina
Asesor

POR LA COMISIÓN DE TESIS:



