



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

PLÁSMIDOS CONJUGATIVOS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A β -
LACTÁMICOS EN CEPAS DE ENTEROBACTERIAS
(Modalidad: Tesis de Grado)

LORIANNYS SAMIRA LASTRA LÁREZ

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

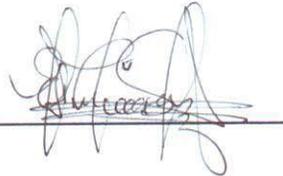
CUMANÁ, 2012

PLÁSMIDOS CONJUGATIVOS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A
 β -LACTÁMICOS EN CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

APROBADO POR:



Prof. Miliza Guzmán Lista
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 cepas	8
Confirmación de las cepas	8
Confirmación de la resistencia y de los determinantes de resistencia transferidos.....	9
Aislamiento de plásmidos empleando el método de lisis alcalina.....	11
Aislamiento de plásmidos mediante el estuche Wizard Plus SV Minipreps..	12
Perfil de restricción plasmídico en las cepas mediante cortes específicos con la enzima <i>EcoRI</i> , <i>NheI</i>	13
Detección de los genes <i>bla_{SHV}</i> y <i>bla_{TEM}</i> en plásmidos.	13
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	13
Electroforesis	14
Análisis estadístico	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES	29
RECOMENDACIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
HOJA DE METADATOS	38

DEDICATORIA

A:

Dios, por concebirme un temperamento perseverante, y permitir medir mi esfuerzo con el tiempo que resistí, sin desfallecer.

Mi madre Carmen Lárez, mi mayor orgullo, ejemplo, y motivo, este triunfo es tuyo. Te amo con todo mi ser, a ti te debo todo lo que soy.

Mi padre Freddy Lastra, por sembrar su semilla para darme la vida, gracias por regalarme la bendición de ser tu hija, espero ser toda tu vida un orgullo. Te Amo.

Mis hermanos Laurys y Samuel, y mi cuñada Alexa son parte de mi corazón, gracias por estar conmigo, creer en mí, y apoyarme siempre.

El terremoto de mi vida, Miguel Ángel, gracias por llenarme de tanta alegría, prometo ser un gran ejemplo para ti toda tu vida.

José Gregorio, tu amor y dedicación hacia a mí ha llegado justo cuando más lo necesito, gracias por estar a mi lado en este momento. Si el destino te puso en mi camino, no fue casualidad. Te amo

Mi prima Damarys Caraballo, tú, que moviste cielo y tierra para alistarme en el punto de partida de esta carrera, mi vocación. Gracias por creer en mí. Este es el resultado.

AGRADECIMIENTOS

A:

La Profesora Militza Guzmán, la mejor asesora, porque como una madre me guió, regañó, levantó en cada caída y acompañó en cada batalla, contigo siempre fue posible vencer toda adversidad, totalmente agradecida. Mi admiración y cariño.

La profesora Elsa Salazar, por brindarme la oportunidad de aprender de su capacidad y experiencia en un marco de confianza, afecto y gran amistad, me llevo una parte de usted.

Los profesores Yasmina Araque y José Gregorio Betancourt, y a todos los que intervinieron en mi formación, gracias por su aporte y ánimo. Mi aprecio y admiración más sincera.

La flor más bella del jardín, Diorelis González, y mi hermanito mayor, Eliosmar Rodríguez, fueron un gran apoyo, una gran ayuda, grandes consejeros, un ángel inmenso los ilumina, mil bendiciones.

Mis grandes amigas, Yuli y Nurexis, a la familia del LBM, Vicmaris, Aurinés, Carlos y Ana Karina, todos protagonistas de cada progreso, de cada tropiezo y cada alegría, muchísimas gracias por su ánimo y ayuda.

Completamente, todos mis amigos y compañeros de clases, porque su apoyo y ayuda fue necesaria e incondicional siempre en todos mis días, durante toda la carrera.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características epidemiológicas y fenotípicas de las cepas donantes de enterobacterias aisladas de pacientes con IIH en diferentes áreas del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”	9
Tabla 2. Características fenotípicas de las cepas transconjugantes obtenidas mediante el proceso de conjugación bacteriana (Silva, 2009)	11
Tabla 3. Caracterización de plásmidos bacterianos presentes en cepas de enterobacterias aisladas de pacientes con IIH del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Perfil plasmídico de las cepas donantes de enterobacterias aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá y de las cepas transconjugantes de <i>Escherichia coli</i> obtenidas por conjugación <i>in vitro</i>	16
Figura 2. Perfil plasmídico de cepas donantes de enterobacterias aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá y de cepas transconjugantes de <i>Escherichia coli</i> obtenidas por conjugación <i>in vitro</i>	17
Figura 3. Perfil de restricción plasmídico de cepas donantes y transconjugantes con enzimas <i>EcoRI</i> ó <i>NheI</i>	21
Figura 4. Producto de PCR obtenido de la amplificación del gen <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{SHV} en las cepas donantes de enterobacterias y en cepas transconjugantes a partir de ADN plasmídico.	24

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue analizar la presencia de plásmidos conjugativos que portan genes de resistencia a β -lactámicos en cepas de enterobacterias, aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias, del Hospital Universitario "Antonio Patricio Alcalá", Cumaná, estado Sucre, durante el período comprendido entre septiembre y noviembre de 2005. La extracción de los plásmidos conjugativos se realizó en ocho cepas de enterobacterias y sus respectivas transconjugantes, obtenidas previamente mediante conjugación bacteriana; para tal fin se empleó el método de lisis alcalina con fenol-cloroformo y el estuche Wizards Plus SV Minipreps (Promega). Para obtener el perfil de restricción de los plásmidos, el ADN plasmídico fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *NheI*. La presencia de los genes que codifican resistencia a β -lactámicos se realizó empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el uso de iniciadores específicos para los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*. Se logró aislar plásmidos, mediante el método de lisis alcalina con fenol cloroformo, en todas las cepas donantes, pero no se aisló en cuatro transconjugantes, mientras que con el método de extracción estuche Wizards Plus SV Minipreps (Promega) se obtuvo aislamiento plasmídico en las ocho cepas donantes y en seis transconjugantes. El análisis de restricción de los plásmidos no permitió definir ningún perfil en las cepas, ya que no se produjeron cortes con las enzimas empleadas. En seis aislamientos plasmídicos se logró obtener amplificación para el gen *bla_{SHV}*, y en dos la presencia del gen *bla_{TEM}*. Los resultados revelan la existencia de plásmidos conjugativos en cepas de enterobacterias que portan genes de resistencia a β -lactámicos.

INTRODUCCIÓN

La aparición de cepas resistentes es una respuesta evolutiva frente a los fuertes procesos de selección natural, inducidos por el uso de antimicrobianos elaborados por el hombre. La resistencia bacteriana se define como una condición microbiológica, caracterizada por la capacidad que tiene una bacteria de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antimicrobiano (Bruin, 1994).

Una bacteria puede adquirir resistencia debido a mutaciones en el cromosoma bacteriano o a la incorporación de genes o conjunto de genes, transferidos desde otras especies a través de elementos genéticos extracromosómicos conocidos como plásmidos (Gupta *et al.*, 2003; Narváez *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2009). Éstos son elementos extracromosómicos de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, que se replican de forma independiente del cromosoma de la célula hospedadora y presentan un tamaño que oscila entre menos de 10 a más de 400 kilobases (Alonso *et al.*, 2001; Carattoli, 2009).

Los plásmidos pueden clasificarse por su tamaño, en pares de bases (pb), por el número de copia en la bacteria, en unicopia o multicopia, por el tipo de genes que porta, en plásmidos de virulencia, de resistencia a antimicrobianos, entre otros. También pueden clasificarse en grupos de incompatibilidad; se informa que dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, cuando son incapaces de coexistir en la misma célula bacteriana (Alonso *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2001).

La gran mayoría de los plásmidos, en general los de mayor tamaño, suelen ser capaces de transferirse de una bacteria a otra mediante un proceso llamado conjugación, estos plásmidos conjugativos codifican todos los factores

necesarios para su transferencia (Carattoli, 2009).

Algunos plásmidos más pequeños, llamados no conjugativos, pueden ser movilizados debido a que poseen los genes necesarios para permitir su movilización, pero no codifican las proteínas necesarias para ser transferidos (Actis *et al.*, 2000; Betancour *et al.*, 2006).

Estas estructuras codifican funciones consideradas como no esenciales para la actividad fisiológica normal de las bacterias; sin embargo, estos elementos portan genes para una enorme variedad de funciones que les confieren a los organismos hospedadores ventajas competitivas frente a otros, en el proceso de colonización de nuevos ambientes. Los plásmidos estudiados con mayor frecuencia son aquellos capaces de conferir resistencia a una amplia variedad de antimicrobianos, metales pesados y otros inhibidores del crecimiento (Kado, 1998; Alonso *et al.*, 2002; Carattoli, 2009). Además de la resistencia a los antimicrobianos, pueden codificar para una amplia variedad de funciones. Kado (1998) propuso que las funciones de un plásmido pueden agruparse en cuatro categorías: resistencia, energía y metabolismo, virulencia, patogenicidad y simbiosis, y diseminación y perpetuación.

La resistencia a los agentes antimicrobianos es un problema de salud pública a nivel mundial. Tiene un alto impacto sobre las tasas de morbilidad y mortalidad, limita las opciones terapéuticas e incrementa los costos por concepto de terapia alternativa y estadía hospitalaria (Araque *et al.*, 2000; Redondo y Alonso, 2007).

Desde el punto de vista de salud pública, los determinantes genéticos de mayor importancia que pueden ser portados por plásmidos, son los que codifican para los factores de virulencia y aquellos asociados a la resistencia bacteriana. Los plásmidos portadores de determinantes de resistencia, con capacidad conjugativa o de movilización, son estructuras extracromosomales de relevancia

epidemiológica, debido a la capacidad que tienen de promover la diseminación horizontal de un gran número de genes que codifican resistencia contra los antimicrobianos empleados en el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias (IIH), hecho que contribuye al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y, además, promueven la aparición de cepas patógenas multirresistentes (Redondo y Alonso, 2007; Beatson *et al.*, 2009).

La conjugación es considerada un mecanismo complejo de transferencia de material genético, que juega un papel primordial en el flujo de genes entre bacterias, razón por la cual se considera una de las principales causas de la evolución y diversidad genética que existe entre los microorganismos bacterianos (Frost *et al.*, 2005; Redondo y Alonso, 2007). La conjugación ocurre mediante el contacto directo entre las células, el proceso es mediado por una serie de proteínas codificadas por genes presentes en el plásmido, que ocupan una porción de hasta 33 kilobases. El proceso de conjugación es una parte del ciclo de vida de un plásmido conjugativo, y es considerado un tipo de replicación especial, mediante el cual, una hebra de ADN es mantenida en la célula donante, mientras que la segunda hebra es transferida a una célula receptora en dirección 5' → 3' (Lawley *et al.*, 2002).

El intercambio de material genético, entre poblaciones bacterianas, permite la adquisición de características fenotípicas que originan la aparición de cepas bacterianas con nuevos fenotipos, lo que puede resultar ventajoso, especialmente cuando el ADN adquirido codifica resistencia a los agentes antimicrobianos (Ariffin *et al.*, 2004; Byarugaba, 2004). Los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles son de gran interés clínico y epidemiológico. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y, del mismo modo, un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos en diversas especies bacterianas.

Los β -lactámicos, por ser altamente eficaces, tener baja toxicidad y ser de amplio espectro, son la primera opción terapéutica a emplear en el tratamiento de las infecciones, tanto intrahospitalarias como comunitarias, causadas por bacilos Gram negativos; sin embargo, la efectividad de los mismos ha sido reducida por los distintos mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias (Giamanellou, 2005; Denton, 2007).

La producción de enzimas β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia presente en la mayoría de las enterobacterias; éstas son enzimas de carácter proteico, capaces de hidrolizar el anillo amida presente en los β -lactámicos, y pueden ser codificadas por genes localizados en el cromosoma bacteriano, en plásmidos o en transposones (Tafur *et al.*, 2008).

Las enzimas β -lactamasas han sido clasificadas con base en su punto isoeléctrico, especificidad de sustrato y secuencia de aminoácidos; actualmente, la clasificación más utilizada para estas enzimas ha sido la propuesta por Bush *et al.* (1995), donde se emplean los criterios de funcionalidad clásicos con los aspectos moleculares. El grupo 2b de la clasificación Bush, Jacoby y Medeiros, incluye a las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, también conocidas como β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), presentes, generalmente, en bacilos Gram negativos, las cuales, debido a mutaciones puntuales ocurridas en su centro activo, han aumentado el espectro de su actividad hidrolítica y reducido la actividad de un amplio rango de β -lactámicos de espectro extendido, que incluyen a las cefalosporinas de tercera generación, cefepima y aztreonam, no siendo activas contra los carbapenemas (Bradford, 2001; Rice, 2001).

En un ambiente hospitalario, los pacientes tienen un alto riesgo de contraer infecciones, generalmente producidas por microorganismos que se han acumulado a través de un proceso de selección, y que presentan resistencia a

los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, reduciendo la eficiencia del tratamiento de las IIH (Calderón y Yagui, 2002; Narváez *et al.*, 2005; Bogaerts *et al.*, 2009).

Las IIH adquieren cada día más relevancia, por las consecuencias económicas, sociales y de salud que desencadenan en los individuos que las padecen. Su frecuencia en un periodo dado puede ser tomada como un indicador de la calidad de atención médica, conjuntamente con indicadores de mortalidad y morbilidad (Nodarse, 2002).

Ryoo *et al.* (2005) realizaron una investigación para determinar la diseminación de β -lactamasas en cepas intrahospitalarias de *E. coli* y *K. pneumoniae*, aisladas de 12 hospitales de Corea, tales investigaciones reportaron la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV-12} en plásmidos.

Muzachiodi y Ferrero (2005), en Argentina, determinaron la incidencia de enterobacterias productoras de BLEE en pacientes internados en el Hospital-Escuela “José Francisco de San Martín”, dicha investigación indicó que 31,10% de las cepas presentaban moléculas plasmídicas responsables de conferir resistencia a los β -lactámicos.

Sánchez *et al.* (2006) realizaron ensayos de conjugación bacteriana *in vitro* a 3 cepas de *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), aisladas de hospitales chilenos, y evidenciaron, tanto fenotípica como genotípicamente, la transferencia horizontal de genes de resistencia que codifican BLEE, así como genes que codificaban resistencia a otros grupos de antimicrobianos.

Subramaniam *et al.* (2006), en una investigación realizada, en Malasia, a 11 cepas de *E. coli*, encontraron que todas fueron fenotípicamente productoras

de BLEE y genotípicamente presentaban la enzima SHV-5, la cual estaba codificada en un plásmido conjugativo 12 000 pb.

En el ámbito nacional, Pedroza *et al.* (2001) investigaron sobre resistencia bacteriana en el Hospital Universitario de Caracas y demostraron que, un 80,00% de las cepas de bacilos Gram negativos de origen hospitalario eran multirresistentes y, de éstas, el 31,00% presentaban plásmidos conjugativos capaces de codificar resistencia a un número representativo de agentes antimicrobianos.

Alonso *et al.* (2005) determinaron la capacidad de diseminación plasmídica entre bacterias, y demostraron la presencia de diferentes plásmidos conjugativos en el Hospital Clínico Universitario de Caracas, mediante la comparación de las bandas obtenidas en el perfil de restricción del ADN plasmídico en los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.

Redondo y Alonso (2007) aislaron y caracterizaron plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes, provenientes de pacientes atendidos en cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas, demostrando la presencia de moléculas plasmídicas de gran tamaño en el 67,00% de las cepas estudiadas.

Guzmán y Alonso (2009) evaluaron la presencia de plásmidos transferibles en cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de pacientes atendidos en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA), y demostraron que el 80,00% de las cepas presentaron plásmidos de $\geq 12\ 000$ pb y, de acuerdo con los patrones de restricción obtenidos, detectaron tres tipos de plásmidos circulando en el centro hospitalario.

Un aspecto esencial de la investigación epidemiológica de las IIH es la

búsqueda de la relación clonal entre cepas bacterianas y de los tipos de plásmidos que portan genes de resistencia circulantes en un centro hospitalario, por ello, en este estudio, se analizaron los distintos plásmidos conjugativos que confieren resistencia a β -lactámicos en cepas de enterobacterias aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias, en diferentes áreas del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá".

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Se emplearon ocho cepas de enterobacterias (donantes), aisladas de pacientes con IIH, atendidos en las áreas de cuidados intensivos, medicina, cirugía y retén del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el período comprendido entre septiembre y noviembre de 2005 (Tabla 1). También se incluyeron ocho cepas transconjugantes, obtenidas previamente, mediante el proceso de conjugación *in vitro* a partir de las cepas donantes nombradas anteriormente (Silva, 2009) (Tabla 2). Tanto las cepas donantes como las transconjugantes son resistentes a los β -lactámicos y productoras de BLEE. Estas cepas se encontraban preservadas en agar conservación en el Laboratorio de Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis.

Reactivación de cepas

A partir del medio conservación, se procedió a inocular cada una de las cepas bacterianas en caldo infusión cerebro corazón (BHI, Britania) y se incubaron a 37°C por 24 horas en aerobiosis; posteriormente, se sembraron en agar MacConkey (AMC, BBL) con la finalidad de verificar su pureza y observar las características macroscópicas de las colonias, así como los cambios producidos en el medio AMC que refleja la fermentación o no de la lactosa por parte de algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Confirmación de las cepas

El género y la especie se confirmó mediante el protocolo de identificación convencional para enterobacterias, incluyendo las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de azúcares (medio Kligler), utilización de citrato

(medio citrato Simmons), producción de la enzima ureasa (agua peptonada), vía de fermentación de la glucosa (caldo rojo metilo-Voges Proskauer), motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina (medio MIO) y descarboxilación de la lisina (caldo lisina) (Koneman *et al.*, 2008).

Tabla 1. Características epidemiológicas y fenotípicas de las cepas donantes de enterobacterias aisladas de pacientes con IIH en diferentes áreas del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Cepas	Estadía (días)	Muestra	Servicio	Resistencia	BLEE
Esp 06	7	Catéter	UCI	AMP CF FOX CAZ CTX SXT CL CIP	+
Kp 09	9	Secreción	Medicina A	AMP CF CAZ CTX GN	+
Esp 12	13	Secreción	Medicina C	AMP CF CAZ CTX AK GN CL	+
Esp 16	9	Secreción	UCI	AMP CF CAZ CTX AK GN CL	+
Kp 22	5	Secreción	UCI	AMP CF CAZ CTX SXT CL CIP GN AK	+
Esp 28	7	Secreción	UCI	AMP CF CAZ CTX AK GN CL	+
Esp 29	7	Secreción	UCI	AMP CF CAZ CTX AK GN	+
Kp 33	5	Heces	Retén	AMP CF CAZ CTX SXT CL	+

BLEE: β -lactamasas de espectro extendido, UCI: unidad de cuidados intensivos, Kp: *K. pneumoniae*, Ec: *E. coli*, Esp: *Enterobacter* sp, AMP: ampicilina FOX: cefoxitin CF: cefalotina CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, AMC, CL: cloranfenicol, SXT: trimetropin-sulfametoxazol, CIP: ciprofloxacina, GN: gentamicina, AK: amikacina.

Confirmación de la resistencia y de los determinantes de resistencia transferidos

La confirmación de la resistencia bacteriana se realizó mediante el método de

difusión del disco, descrito por Bauer *et al.* (1966), y siguiendo los lineamientos para enterobacterias, propuestos por el Instituto de estándares clínicos y laboratorios, del inglés: “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI, 2011). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa transconjugante en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas, sembrado en agar tripticasa de soya (ATS) (Himedia, India), ajustando al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

Una vez que se obtuvo la turbidez respectiva, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton (Himedia). Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: ampicilina (30 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg), imipenem (10 µg), amikacina (30 µg), gentamicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimetropin-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) y cloranfenicol (30 µg), todos de la marca OXOID. Las placas fueron incubadas a 35°C, durante 18 horas, en ambiente de aerobiosis y, posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición empleando una regla milimetrada.

El halo de inhibición observado en la cepa bacteriana ante cada antimicrobiano se interpretó siguiendo los valores de referencia señalados en la tabla de CLSI (2011) como sensible, resistente intermedio y resistente.

La presencia fenotípica de BLEE se determinó mediante la técnica de sinergismo de doble disco, descrita por Jarlier *et al.* (1988), siguiendo los lineamientos establecidos por CLSI (2011), M100-S20 (M2). En una placa de agar Mueller Hinton inoculado con una suspensión de cada cepa, preparada en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril y ajustada al patrón 0,5 de MacFarland, se procedió a colocar en el medio un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg); posteriormente, a cada lado se colocaron los discos de

cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg), a una distancia lineal de 15 mm del disco de ácido clavulánico. La presencia de un sinergismo entre alguna de las cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico se interpretó como producción de BLEE.

Para comprobar la calidad de los discos, así como de los medios de cultivo, se emplearon las cepas controles *Escherichia coli*, American Type Culture Collection (ATCC) 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Tabla 2. Características fenotípicas de las cepas transconjugantes obtenidas mediante el proceso de conjugación bacteriana (Silva, 2009)

Cepas	Resistencia	BLEE
TEsp 06	AMP CF CAZ CTX AMC CL	+
TKp 09	AMP CF CAZ CTX AMC GN	+
TEsp 12	AMP CF CAZ CTX AMC CL	+
TEsp 16	AMP CF CAZ CTX AMC	+
TKp 22	AMP CF CAZ CTX AMC AK GN CL	+
TEsp 28	AMP CF CAZ CTX AMC CL	+
TEsp 29	AMP CF CAZ CTX AMC	+
TKp 33	AMP CF CAZ CTX AMC GN CL	+

TEsp: Transconjugante *Enterobacter* sp, TKp: Transconjugante *klebsiella pneumoniae*, AMP: ampicilona CF: cefalotina CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, amoxicilina-ácido clavulánico, GN: gentamicina, AK: amikacina, BLEE: β-lactamasas de espectro extendido.

Aislamiento de plásmidos empleando el método de lisis alcalina

Para determinar la presencia de plásmidos se realizó la técnica de extracción modificada de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979). El aislamiento se inició a partir 20,0 ml de cultivo en medio LB crecido a 37°C, en una atmósfera de aerobiosis y con agitación constante durante 18 horas; a continuación, las células bacterianas se recolectaron por centrifugación a 4 000 g, durante 10 minutos, se recuperó el sedimento y se añadieron 200 µl de solución I (glucosa 50,0 mmol.l⁻¹, Tris-HCl 25,0 mmol.l⁻¹, EDTA 10,0 mmol.l⁻¹, pH 8,0). Posteriormente, se le colocaron 10,0 µl de lisozima, preparada en Tris-HCl 10,0 mmol.l⁻¹, y se incubó por 20 minutos a 37°C. Luego, se agregaron 400,0 µl de

solución de lisis (NaOH 0,2 mol.l⁻¹, SDS 1,0%, pH 11,0), se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos; al finalizar esta incubación, se le añadieron 300,0 µl de solución III (acetato de potasio 3,0 mol.l⁻¹, pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos, se centrifugó durante 15 minutos a 12 000 g y al sobrenadante se le agregó fenol-cloroformo (1:1). La solución se mezcló y se centrifugó a 13 500 g, durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo corex estéril, cuidando de no tomar suspensión cercana a la interfase, se le añadió 1,0 ml de etanol puro (100%), se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente; luego, se centrifugó por 10 minutos a 13 500 g, al precipitado se le agregó 1 ml de etanol al 70,0%, se mezcló y, posteriormente, se centrifugó a 13 500 g por 10 minutos, el sedimento se dejó secar a 37°C. El precipitado se resuspendió en 20,0 µl de agua purificada y, finalmente, se almacenó a -20°C.

Aislamiento de plásmidos mediante el estuche Wizard Plus SV Minipreps

Con el fin de obtener mayor rendimiento, y pureza de ADN plasmidico se empleó el estuche de extracción Wizard Plus SV Minipreps (promega). Para esto, se partió de 10,0 ml de un cultivo de la cepa crecida en una atmósfera de aerobiosis a 37°C, con agitación constante, durante 18 horas, la cual se centrifugó a 10 000 g, durante 10 minutos. Se resuspendió el sedimento con 250 µl de la solución de resuspensión celular, luego se agregaron 250,0 µl de solución de lisis celular, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 10,0 µl de la solución proteasa alcalina, se mezcló por inversión, y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 350,0 µl de la solución de neutralización y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13 000 g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se recolectó en una columna (Wizard SV Minicolumn), se centrifugó a 13 000 g, durante 2 minutos, a temperatura ambiente. Se retiró la columna y se descartó el filtrado del tubo de recolección, se volvió a insertar la columna y se

agregaron 750,0 µl de solución de lavado; luego se centrifugó a 13 000 g, por 2 minutos. Se desechó nuevamente el filtrado y se repitió este último paso, esta vez con 250,0 µl de solución de lavado y se centrifugó a 13 000 g, por 2 minutos, a temperatura ambiente, la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril y se agregaron 100,0 µl de agua libre de nucleasa; a continuación, se centrifugó a 13 000 g, durante 2 minutos, a temperatura ambiente. Se desechó la columna y el ADN se almacenó a -2°C.

Perfil de restricción plasmídico en las cepas mediante cortes específicos con la enzima *EcoRI*, *NheI*

Para obtener el perfil de restricción de los plásmidos, se mezcló 16 µl del ADN plasmídico aislado con 2,0 µl de agua bidestilada estéril, 2,0 µl buffer óptimo para la enzima de restricción, 1,0 µl ARNasa y 2,0 µl de la enzima *EcoRI* ó *NheI*, a la temperatura de 37°C en una hora, la digestión se dejó durante toda la noche.

Detección de los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}* en plásmidos.

Los genes se determinaron mediante la técnica de PCR, empleando oligonucleótidos específicos que hibridan en regiones conservadas para todos los genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*.

Los oligonucleótidos SHV-F: 5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3' y SHV-R: 5'-CGT TTC CCA GCG GTC AAG G-3', permitieron amplificar un producto de 840 pb (Brisse y Verhoef, 2001), y TEM-F: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC.CG-3' y TEM-R: 5'-CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG-3 un producto de 867 pb (Eckert *et al.*, 2004).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los genes se determinaron mediante la técnica de PCR, empleando oligonucleótidos específicos que hibridan en regiones conservadas para todos los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}.

Los oligonucleótidos SHV-F: 5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3' y SHV-R: 5'-CGT TTC CCA GCG GTC AAG G-3', permitieron amplificar un producto de 840 pb (Brisse y Verhoef, 2001), y TEM-F: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC.CG-3' y TEM-R: 5'-CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG-3, un producto de 867 pb (Eckert *et al.*, 2004).

Electroforesis

Las muestras de ADN y los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2,00% preparado con buffer TBE 1X (Stock 10X: tris base 0,89 mmol.l⁻¹, EDTA 0,02 mmol.l⁻¹). Este buffer se utilizó además para realizar las migraciones electroforéticas.

Para las corridas electroforéticas se empleó un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25% y sacarosa 0,25%). Este buffer se mezcló con la muestra. Las muestras en el gel se corrieron entre 80 a 100 voltios, durante 1 hora, aproximadamente.

Los geles fueron coloreados con solución de bromuro de etidio 0,50 µg.ml⁻¹, durante 5 minutos, y el exceso se eliminará al mantener el gel en agua durante 5 minutos. Las bandas plasmídicas se observaron en un transiluminador de la luz ultravioleta y finalmente fueron fotografiadas y analizadas.

Análisis estadístico

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La resistencia a los antimicrobianos constituye un importante problema de salud pública, sobre todo cuando los genes que codifican la resistencia se encuentran en plásmidos conjugativos, ya que su propagación puede acelerarse considerablemente (Blanc, 2007).

La extracción de plásmidos con el método de lisis alcalina reveló la existencia de una molécula de $\geq 12\ 000$ pb en todas las cepas donantes, mientras que en las transconjugantes, en el 50,00% de las cepas, se encontró una banda plasmídica compatible en tamaño con las observadas en las donantes. En ninguno de los casos se logró obtener un buen rendimiento de ADN cuando se utilizó el método de lisis alcalina empleando cloroformo-fenol (Figura 1). El posible fracaso pudo deberse, quizás a que, tanto las cepas de *K. pneumoniae* como de *Enterobacter* sp. se caracterizan fenotípicamente por ser mucoides. Al respecto, Guzmán (2006) señala que la presencia de la cápsula polisacárida es una limitante en el rendimiento de la técnica.

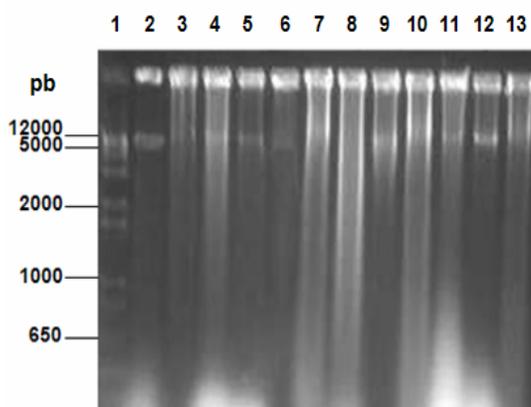


Figura 1 Perfil plasmídico de las cepas donantes de enterobacterias aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá y de las cepas transconjugantes de *Escherichia coli* obtenidas por conjugación *in vitro*.

Carriles del 1 al 13: 1: marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder. 2: cepa Esp06, 3: cepa Kp09, 4: cepa TKp 09, 5: cepa Esp 12, 6: cepa Esp 16, 7: cepa TEsp16, 8: cepa Kp 22, 9: cepa Esp28, 10: cepa Esp 29, 11: cepa TEsp29, 12: cepa Kp33, 13: cepa TKp33.

En vista de la problemática presentada y de las limitaciones que se tenían para realizar con poca cantidad de ADN las digestiones de los plásmidos, se procedió a emplear el estuche de extracción Wizards Plus SV Minipreps (Promega), con la finalidad de aumentar la eficacia, el rendimiento y la calidad de ADN plasmídico.

En la figura 2 se muestran los aislamientos de las cepas donantes y sus transconjugantes obtenidas mediante la extracción con el estuche. Los resultados revelaron la presencia de las bandas observadas por el método de lisis alcalina. Con el estuche no se logró detectar plásmidos en las cepas transconjugantes TKp22 y TEsp28; sin embargo, se recuperó ADN plasmídico en las cepas TEsp06 y TEsp12, que por el método anterior no se habían logrado aislar.

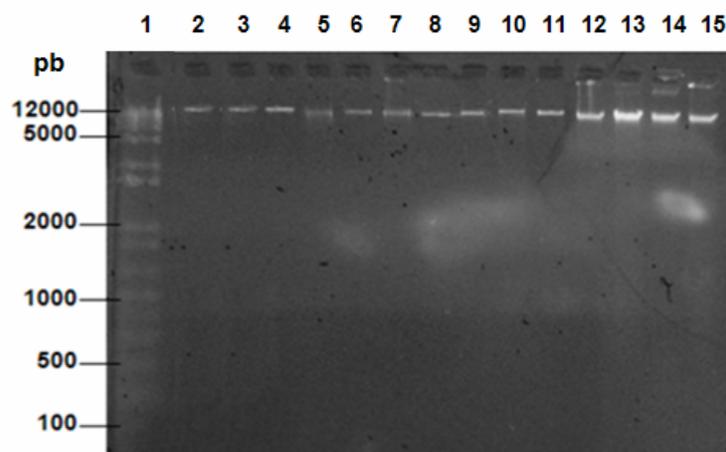


Figura 2. Perfil plasmídico de cepas donantes de enterobacterias aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá y de cepas transconjugantes de *Escherichia coli* obtenidas por conjugación *in vitro*.

Carriles del 1 al 15: 1: marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, 2: cepa Esp06, 3: cepa TEsp06, 4: cepa Kp09, 5: cepa TKp 09, 6: cepa Esp 12, 7: cepa TEsp 12, 8: cepa Esp16, 9: cepa TEsp16, 10: cepa Esp 29, 11: cepa TEsp29, 12: cepa Kp33, 13: cepa TKp33, 14: cepa Kp 22, 15: cepa Esp 28.

Este resultado pone de manifiesto que el uso del estuche logró recuperar plásmidos en cepas donde el método manual no lo hizo. Sólo en dos casos,

ninguno de los métodos de extracción logró detectar plásmidos, lo que hace suponer que en estas cepas pudiera existir un plásmido de gran tamaño que no fue extraído por ninguno de los dos métodos.

Con el estuche Wizard Plus SV Minipreps se obtuvieron mejores resultados que con el método de lisis alcalina, en cuanto a rendimiento, pureza y recuperación de ADN plasmídico se refiere.

En este sentido, Szabó *et al.* (2005), utilizaron el estuche Wizard Plus SV Minipreps (promega) para obtener el perfil plasmídico en cepas de *Enterobacter cloacae* y lograron detectar más de un plásmido, en todas las cepas cuyos tamaños oscilaron entre 700 y 20 000 pb.

Silva *et al.* (2000) emplearon el estuche Wizard Plus SV Minipreps (Promega) para evaluar la presencia de plásmidos en cepas de *E. coli* resistentes a cefotaxima; los resultados de la investigación revelaron la existencia de plásmidos con tamaños comprendidos entre 600 y 15 000 pb.

Ferreira *et al.* (2011) realizaron un estudio para detectar la presencia de plásmidos de resistencia en cepas aisladas de pacientes con VIH, los autores emplearon el estuche Wizard Plus SV Minipreps (promega) para realizar las extracciones, lo cual permitió detectar plásmidos de diferentes tamaños.

En todas las cepas, tanto donantes como transconjugantes, se observa la presencia de una banda plasmídica, a excepción, de las cepas Kp22 y Esp28 que pareciera tener dos bandas. Si se considera que cada banda corresponde a una molécula plasmídica, entonces, el perfil presentado por las cepas sugiere que la mayoría poseen una molécula que pareciera ser común tanto en *K. pneumoniae* como en *Enterobacter* sp.

Existen diversos estudios, a nivel internacional y nacional, que han demostrado la presencia de moléculas plasmídicas., Al respecto, Calderón *et al.* (2003) caracterizaron molecularmente cepas de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* productoras de BLEE, aisladas de una unidad de cuidados intensivos neonatal de Lima, Perú, demostrando la presencia de moléculas plasmídicas en todas las cepas, y además denotaron que todos los aislamientos portaban el gen que codifica para la BLEE tipo SHV-5 transferible a otras especies.

Espinal *et al.* (2004), en un estudio epidemiológico molecular realizado a 15 aislados de *K. pneumoniae*, provenientes de un hospital de tercer nivel en Bogotá, Colombia, demostraron la presencia de un plásmido de 23 kilobases, transferible por conjugación bacteriana que confería resistencia a ceftazidima.

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

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

Redondo y Alonso (2007) demostraron la presencia de moléculas plasmídicas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes, aisladas de cuatro centros de salud de Caracas, además, comprobaron la diseminación de los plásmidos, al detectarlos en cepas transconjugantes.

Navarro (2010) demostró la presencia de plásmidos en cepas de *K. pneumoniae*, donde el 58,3% de éstas presentó una banda plasmídica de gran tamaño y el resto, más de una molécula.

Con el propósito de discernir si las bandas de ADN obtenidas en las diferentes cepas se trataban de las mismas moléculas, se procedió a digerir el ADN plasmídico con la enzima *EcoRI*. Los resultados de la digestión con esta enzima no fueron satisfactorios, debido a que no se observaron cortes en el ADN. Este resultado se mantuvo reproducible, razón por la cual el ensayo se realizó empleando la enzima *NheI*, la cual tampoco generó cortes en el ADN plasmídico (Figura 3).

La gran mayoría de los estudios de restricción plasmídico realizados en el país emplean *EcoRI* como enzima, por generar cortes frecuentes y patrones de banda discernibles (Narváez, 2005; Guzmán, 2006; Redondo y Alonso, 2007; Guzmán y Alonso 2009).

Redondo y Alonso (2007) determinaron el patrón de restricción en plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes, aisladas de pacientes hospitalizados en cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas y emplearon *EcoRI* para establecer el patrón de restricción, en su trabajo se pudieron distinguir más de cinco plásmidos diferentes. Así mismo, Guzmán y Alonso (2009), emplearon *EcoRI* para determinar la existencia de plásmidos comunes en cepas de *K. pneumoniae*, basándose en la similitud de las bandas, en el estudio lograron detectar tres tipos de moléculas.

El hecho de no haber obtenido patrones de bandas que permitieran diferenciar los plásmidos, y poder establecer la presencia de un plásmido circulante en el centro hospitalario, puede deberse a diversos factores. En primer lugar, no se puede descartar el hecho de que los plásmidos aislados hayan sido cortados

una vez por la enzima y que su configuración superenrollada haya pasado a ser lineal, aspecto que no se observa en la figura 3, ya que si se considera la teoría según la cual los plásmidos superenrollados migran más rápido en una electroforesis, en la figura se puede detallar que las bandas que se sometieron a la digestión y las obtenidas después de la misma, se observan en el mismo nivel (Sambrook y Russel, 2001).

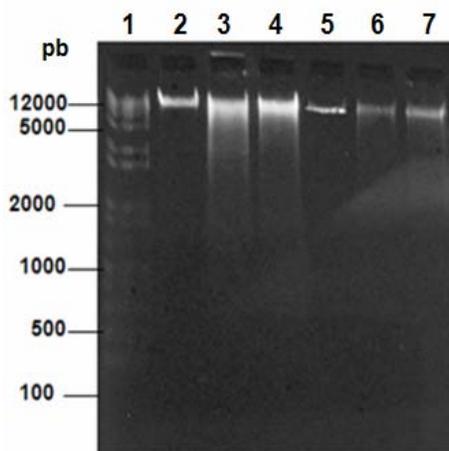


Figura 3. Perfil de restricción plasmídico de cepas donantes y transconjugantes con enzimas *EcoRI* ó *NheI*.

Carriles del 1 al 7: 1: marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, 2: cepa Kp 33, 3: Digestión Kp33 con *EcoRI*, 4: Digestión Kp33 con *NheI*, 5: cepa TKp33, 6: Digestión TKp33 con *EcoRI*, 7: Digestión TKp33 con *NheI*.

En las bacterias existe un sistema de modificación-restricción, cuya función es bloquear los sitios de restricción en el ADN, mecanismo con el cual la bacteria se protege, generalmente, el mecanismo empleado es la metilación el cual consiste en la adición de un grupo metilo (-CH₃) en la base donde se genera el corte (Wilson, 1991).

Algunos investigadores han reportado la existencia de plásmidos donde se ha determinado la presencia de sistemas de modificación-restricción. Al respecto, Perichón *et al.* (2008) reportaron la presencia del sistema de modificación-restricción de ADN tipo I en plásmidos aislados de 1 540 cepas de

enterobacterias, provenientes de pacientes atendidos en un hospital belga. Por su parte, Ichege y Kobayashi (2005) reportaron la presencia de un sistema de modificación-restricción *EcoRI* en plásmidos aislados de diferentes cepas bacterianas. También, Kulakauskas *et al.* (1995) reportaron un sistema de modificación-restricción *EcoRI* en plásmidos. Todos los trabajos antes mencionados concluyen que los sistemas de modificación-restricción son importantes en el mantenimiento de los plásmidos en las células bacterianas.

Las β -lactamasas tipo BLEE son enzimas que presentan un espectro incrementado de actividad hidrolítica contra las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, cepefima) y sobre el aztreonam (Torres *et al.*, 2005). La resistencia bacteriana a los antimicrobianos, dada por la producción de β -lactamasas plasmídicas tipo BLEE, es un grave problema, descrito, principalmente, en cepas de origen intrahospitalario, el cual es originado por la presión selectiva ejercida en dicho ambiente (Blanc, 2007). En las bacterias gramnegativas causantes de infecciones, el grado de resistencia que generan estas enzimas se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes β -lactámicos y por sus propiedades hidrolíticas (Marín y Gudiol, 2003; Blanc, 2007)

Las BLEE son derivadas a partir de mutaciones puntuales de las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) TEM-1, TEM-2 y SHV-1, aunque existen otras familias de BLEE, como las tipos CTX-M, OXA y PER, que tienen orígenes diferentes y una escasa relación estructural con las TEM y SHV (Bonnet *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista clínico, la detección de las BLEE es importante, porque de su reporte depende el éxito terapéutico al utilizar cefalosporinas de tercera generación o aztreonam. En los pacientes en los cuales se han aislado cepas productoras de BLEE, no es recomendable la administración de estos

antimicrobianos, ya que conducirán a un fracaso terapéutico, sobre todo cuando las CMI oscilan entre 2-8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Martínez, 2006; Armindo *et al.*, 2007). La detección fenotípica de una β -lactamasa sólo permite predecir la posible clase de BLEE existente en una bacteria, razón por la cual hay que recurrir a estudios moleculares para poder establecer el tipo específico de enzima. Desde el punto de vista molecular, la identificación de una β -lactamasa se realiza mediante la técnica de PCR, amplificando un determinado gen (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{PER}, entre otros); sin embargo, para la identificación definitiva se tienen que secuenciar los productos (Bonnet *et al.*, 2001).

La existencia de plásmidos conjugativos que portan genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar ciertos antimicrobianos es considerado un factor epidemiológico importante, ya que éste es responsable de la diseminación de la resistencia a otros patógenos (Araque *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006; Armindo *et al.*, 2007).

En cuanto a la determinación de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, el gen *bla*_{SHV} se encontró en seis aislamientos plasmídicos (Esp06, TEsp06, Esp12, TEsp12, Kp33, TKp33), mientras que, el gen *bla*_{TEM} se identificó únicamente en el aislamiento plasmídico de la cepa donante Esp06 y TEsp06, lo que revela que la cepa donante Esp06 poseía los dos genes (figura 4).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por diversos autores, quienes han demostrado que las BLEE están codificadas en plásmidos transferibles, de gran tamaño, que pueden portar simultáneamente otros determinantes de resistencia (Moland *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006). Este hallazgo debe ser considerado como un factor de riesgo en el centro hospitalario, ya que la conjugación y la presión selectiva facilitan la diseminación de determinantes de resistencia, e incluso, pueden provocar brotes intrahospitalarios en otras áreas.

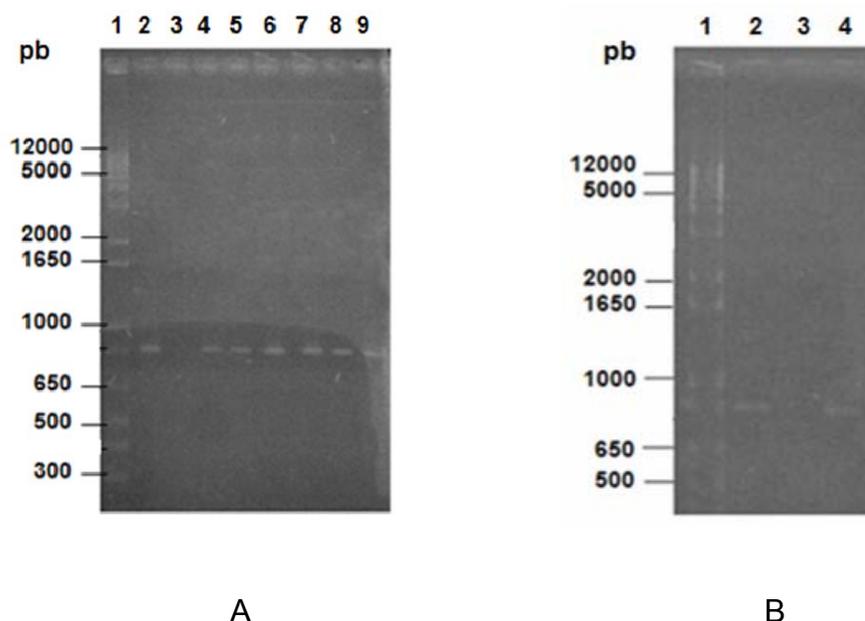


Figura 4. Producto de PCR obtenido de la amplificación del gen *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en las cepas donantes de enterobacterias y en cepas transconjugantes a partir de ADN plasmídico.

A. Cepas con el gen *bla*_{SHV}. Líneas 1 a 9. 1 : Marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, 2: *E. coli* J62-2 (Control negativo), 3: *K. pneumoniae* M1 (control positivo), 4: cepa Esp 06, 5: cepa TEsp06, 6: cepa Esp12, 7: cepa TEsp12, 8: cepa Kp33, 9: cepa TKp33. B. Cepas con el gen *bla*_{TEM} Líneas 1 a 4. 1: Marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, 2 : *K. pneumoniae* ATCC 700603 (control positivo), 3: *E. coli* J62-2 (Control negativo), 4: cepa Esp 06.

En la tabla 3 se muestra un resumen de las características detectadas en los plásmidos presentes en las cepas de enterobacterias. En las extracciones plasmídicas de las cepas Kp09, TKp09, Esp16, TEsp16, Kp22, Esp28, Esp29 y TEsp29 no se encontraron ningunos de los genes estudiados; sin embargo, no significa que estos plásmidos no posean genes de resistencia, al respecto, hay que tener presente que el gen *bla*_{CTX-M} (no detectado en este estudio) puede conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aspecto que hay que considerar, debido a que no se conoce el espectro hidrolítico de las cepas de manera cuantitativa (concentración mínima inhibitoria) a este grupo de antimicrobianos.

Eckert *et al.* (2004) realizaron un trabajo con el propósito de determinar la diseminación de β -lactamasas tipo CTX-M en plásmidos de 19 cepas de enterobacterias, en Francia, las cuales presentaban un alto nivel resistencia a CTX y ATM. En todas las cepas, el gen responsable de conferir resistencia a las cefalosporinas fue *bla*_{CTX-M-15}, adicionalmente, se encontró el gen *bla*_{TEM_1} en 10 de los aislamientos. Estos genes fueron encontrados en plásmidos de gran tamaño.

En Venezuela, Torres *et al.* (2006) detectaron genes en plásmidos conjugativos y señalaron una alta prevalencia del gen *bla*_{SHV}, al identificarlo en el 71,60% de las cepas. Simultáneamente, en el 21,10% de los aislamientos se identificó el gen *bla*_{CTX-M1}, en las cepas que poseían resistencia a CTX y resistencia o susceptibilidad intermedia a FEP, comportamiento que es característico de las enzimas pertenecientes a la familia CTX-M.

El gen *bla*_{SHV} se encontró en los aislamientos plasmídicos de las cepas, Esp12, Kp33, así como en sus respectivas transconjugantes, TEsp12, TKp33, las cuales, desde el punto de vista fenotípico, son productoras de BLEE y tienen resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aspectos que coinciden para una cepa productora de β -lactamasa tipo SHV. No obstante, no debe descartarse el hecho de que las cepas presenten el gen que codifica para la enzima SHV-1 y, además tenga una CTX-M como responsable de conferir resistencia a todas las cefalosporinas de tercera generación, igual la cepa Esp06 y su transconjugante (TEsp06) presentan los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en un plásmido conjugativo, es posible que en las cepas el gen *bla*_{TEM} detectado sea responsable de codificar una β -lactamasa tipo TEM-1 o TEM-2, la cual confiere resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de primera generación, mientras que, el gen *bla*_{SHV} pueda codificar una enzima tipo SHV-1, de ser cierto dichas afirmaciones, los enzimas codificadas por estos genes son BLEAs, las cuales

Tabla 3. Caracterización de plásmidos bacterianos presentes en cepas de enterobacterias aisladas de pacientes con IIH del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”

Cepa	BLEE	Resistencia a los β-lactámicos	Número de plásmidos Kit /Lisis alcalina	Genes detectados en plásmidos
Esp 06	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	SHV,TEM
TEsp 06	+	AMP CF CAZ CTX	1/0	SHV, TEM
Kp 09	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	-
TKp09	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	-
Esp 12	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	SHV
TEsp12	+	AMP CF CAZ CTX	1/0	SHV
Esp 16	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	-
TEsp 16	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	-
Kp 22	+	AMP CF CAZ CTX	2/1	-
TKp22	+	AMP CF CAZ CTX	ND/ND	ND
Esp 28	+	AMP CF CAZ CTX	2/1	-
TEsp 28	+	AMP CF CAZ CTX	ND/ND	ND
Esp 29	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	-
TEsp 29	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	-
Kp 33	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	SHV
TKp33	+	AMP CF CAZ CTX	1/1	SHV

IIH: BLEE: β -lactamasas de espectro extendido, Kp: *K. pneumoniae*, Esp: *Enterobacter* sp, AMP:ampicilina CF: cefalotina CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, ND: no detectado.

no serían las responsables de conferir resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, por esta razón, no se cierra la posibilidad de que en el plásmido se encuentre otro gen que codifica para una enzima tipo BLEE o que el gen, SHV detectado codifique para una SHV tipo BLEE. Para dilucidar con exactitud el tipo de enzimas presentes en los plásmidos aislados de las cepas, se recomienda hacer análisis de secuenciación.

La existencia de varios genes en un plásmido fue reportada en aislamientos bacterianos obtenidos del HUAPA, por Guzmán y Alonso (2009), quienes encontraron la presencia de genes *bla*_{TEM} y también los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en plásmidos conjugativos y no conjugativos presentes en cepas de *K. pneumoniae*; además, evidenciaron la combinación *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} en 15 cepas, la combinación *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM} en dos cepas. La combinación de los tres genes fue observada en tres cepas, de un total de 25. El análisis de secuenciación indicó que las enzimas identificadas reveló la presencia de TEM-1, SHV-5-2a y CTX-M-2.

Garza *et al.* (2007), identificaron la presencia del gen que codifica para la BLEE tipo SHV-2 y SHV-5 codificadas en plásmidos transferibles y no transferibles en enterobacterias de un banco de cepas obtenidas de siete diferentes hospitales de México. Por su parte, Alarcón *et al.* (2008) caracterizaron β -lactamasas de espectro extendido en 30 aislamientos clínicos de *E. coli* en 2 hospitales de México, y reportaron la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} codificados en plásmidos conjugativos.

La aparición de cepas resistentes que contienen plásmidos conjugativos y que portan genes de resistencia que codifican para una BLEE, ha sido uno de los principales problemas de resistencia a los antimicrobianos en las últimas décadas, a nivel mundial, y los resultados presentados en esta investigación lo ponen de manifiesto una vez más, razón por la cual, es importante seguir con el

monitoreo de este tipo de cepas en nuestro medio, con el fin de poder utilizar el mejor procedimiento diagnóstico para identificarlas.

CONCLUSIONES

En todas las cepas donantes de enterobacterias y en la mayoría de las cepas transconjugantes, se aislaron plásmidos de gran tamaño $\geq 12\ 000$ pb.

Las moléculas plasmídicas obtenidas no fueron digeribles por las enzimas *EcoRI* y *NheI*.

El gen *bla_{SHV}* se encontró en un 75,00% y el gen *bla_{TEM}* en un 25,00%, en los plásmidos presentes, tanto en cepas donantes, como en cepas transconjugantes.

RECOMENDACIONES

Mantener la vigilancia epidemiológica, tanto de las bacterias que se encuentran circulando en las áreas médicas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, como de los distintos elementos genéticos responsables de la resistencia bacteriana.

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

Continuar con los ensayos de digestión plasmidica, empleando otras enzimas, con la finalidad de lograr obtener el perfil de restricción, para así determinar la relación clonal entre los plásmidos aislados.

Continuar con la búsqueda de genes de resistencia, tanto a β -lactámicos, como a otros antimicrobianos, que se alberguen en plásmidos conjugativos, con el fin de identificar cuáles son los genes predominantes, que interesan para recomendar el mejor tratamiento y conseguir el éxito terapéutico en los pacientes afectados.

BIBLIOGRAFÍA

Actis, L.; Tomasky, M. y Crosa J. 2000. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Bioscience*, 4: 43-62.

Alarcón, N.; Carreón, E.; Godínez, M y Alarcón, L. 2008. Caracterización molecular de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 28(3): 114-120.

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

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

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

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

Alonso, G.; Vilchez, G.; Bruzual, I. y Rodríguez, V. 2002. Characterization of plasmid MIP233 (IncHI3) of the H complex. *Journal Research in Microbiology*, 153: 149-153.

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

Ariffin, H.; Navaratnam, P.; Kee, T. y Balan, G. 2004. Antibiotic resistance patterns in nosocomial Gram-negative bacterial infections in units with heavy antibiotic usage. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(1): 26-31.

Armindo, P.; Castellano, M.; Ginestre, M.; y Harris, B. 2007. Caracterización molecular y detección de β -lactamasas de espectro extendido en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en las unidades de cuidados intensivos de un hospital universitario. *Kasmera*, 35(2): 91-106.

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

Beatson, S.; Ong, C.; McEwan, A. y Schembri, M. 2009. Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21): 6783-6791.

Betancour, L.; Gadea, P. y Flores, K. 2006. Genética Bacteriana. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Universidad de la República, Facultad de Medicina. Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene. Segunda edición. Oficina del libro FEFMUR. Uruguay. Pág. 62-77.

Birboim, H. y Doly, A. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acid Research*, 7: 1513-1523.

Blanc, P. 2007. Caracterización de cepas y de plásmidos de *Enterobacteriaceae* portadores de betalactamasas de espectro extendido. Tesis Doctoral. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Bogaerts P.; Rodriguez-Villalobos H.; Bauraing C.; Deplano A.; Laurent C.; Berhin C.; Struelens M. y Glupczynski, Y. 2009. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered at two belgian hospitals. *Pathologie Biologie*, 58(1): 78-83.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.; Chanal, C.; Sirot, D. y Labia, R. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45(8): 2269-2275.

Bradford, P. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Infection Microbiology Clinical*, 14: 933-935.

Brisse, S. y Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* gene sequencing and automated ribotyping. *Institution Systemic Evolution and Microbiology*, 51: 915-924.

Bruin, B. 1994. Les infections dans les hopitaux. *La Recherche*, 266: 706-707.

Bush, K.; Jacoby, G. y Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.

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

Calderón, R. y Yagui, M. 2002. "Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular". "Instituto Nacional de Salud Lima, Perú". <http://www.ins.sld.pe>. (04/06/2011).

Calderón, R. 2003. Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos neonatal de Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20(3): 121-127.

Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6): 2227–2238.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement M100-S20. Wayne: National Committee Clinical Laboratory Standards.

Denton, M. 2007. Enterobacteriaceae. *International Journal Antimicrobial Agents*, 29: 9-22.

Eckert, C.; Gautier, V.; Saladin-Allard, M.; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z.; Barnaud, G.; Delisle, F.; Rossier, A.; Lambert, T.; Philippon, A. y Arlet, G. 2004. Dissemination of CTX-M- type β -lactamasas among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1249-1255.

Espinal, P.; Mantilla, J.; Saavedra, C.; Leal, A.; Alpuche, C. y Valenzuela, E. 2004. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*, 24: 252-261.

Ferreira, C.; Antunes, W.; Almeida N.; Naveca, F y Barbosa, M. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3): 1076-1084.

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

Garza, U.; Martínez, E y Silva, J. 2007. SHV-type Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Revista de Salud Pública Mexicana*, 49: 415-421.

Giamanellou, H. 2005. Multidrug resistance in Gram - negative bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology Infections*, 11: 1-16.

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

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

Guzmán, M. y Alonso, G. 2009. Caracterización de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre - Venezuela. *Investigación Clínica*, 50: 419-431.

Hernández, J.; Martínez, L.; Cantón, R.; Coque, T.; Pascual, A. y The spanish group for nosocomial infections (GEIH). 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2122-2125.

Ichege, A. y Kobayashi, I. 2005. Stability of *EcoRI* restriction-modification enzymes in vivo differentiates the *EcoRI* restriction-modification system from other postsegregational cell killing systems. *Journal of bacteriology*, 187(19): 6612-6621.

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

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

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

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

Kulakauskas, S.; Lubys, A y Ehrlich, D. 1995. DNA restriction-modification systems mediate plasmid maintenance. *Journal of Bacteriology*, 177(12): 3451-3454.

Lawley, T.; Gordon, S.; Wright, A. y Taylor, D. 2002. Bacterial conjugative transfer: visualization of successful mating pair and plasmid establishment in live *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44: 947-956.

Martinez, L. 2006. "Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos". Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España. Servicio de Microbiología". <<http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1624/75/1v0n1624a13093951pdf001.pdf>> (26/10/2011).

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

Mulvey M.; Susky E.; McCracken M.; Morck D. y Read, R. 2009. Similar cefoxitin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources. *Veterinary Microbiology*, 134(3-4): 279-287.

Muzachiodi, M. y Ferrero, S. 2005. Incidencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Universidad Nacional del Nordeste. comunicaciones científicas y tecnologías. <<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/co2005/3-Medicina/M-135.pdf>> (10/01/2008).

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

Navarro, J. 2010. Perfil plasmídico en aislados intrahospitalarios de *Klebsiella* spp. Tesis de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Nodarse, R. 2002. Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(3): 201-208.

Pedroza, R., Torres, L.; Narváez, P.; Alonso, G. y Rodríguez, V. 2001. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos

Gram negativos de origen hospitalario. *Memoria del Instituto de Biología Experimental*, 3: 97-100.

Périchon, B.; Bogaerts, P.; Lambert, T.; Frangeu, L.; Courvalin, P y Galimand, M. 2008. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 52(7): 2581-2592.

Promega Corporation. 2010. Technical Bulletin. Instructions for use of products. Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System. USA.

Redondo, C. y Alonso, G. 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(2): 100-107.

Rice, L. 2001. Evolution and clinical importance of extended spectrum β -lactamases. *Chest*, 119: 391-396.

Ryoo, M.; Kim, E.; Hong, S.; Park, Y.; Lee, K.; Bae, I.; Song, E. Y Jeong, S. 2005. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 698-702.

Sambook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor New York.

Sánchez, M.; Bello, H.; Domínguez, M.; Mella, S.; Zemelman, R. y González, G. 2006. Transference of extended-spectrum β -lactamases from nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae* to other species of *Enterobacteriaceae*. *Revista Médica de Chile*, 134(4): 415-420.

Silva, J.; Aguilar, C.; Ayala, G.; Estrada, M.; Garza-Ramos, U.; Lara-Lemus, R y Ledezma, L. 2000. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44(4): 997-1003.

Silva, S. 2009. Transferencia plasmídica en aislados nosocomiales de enterobacterias resistentes a β -lactámicos. Tesis de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Subramaniam, G.; Palasubmaniam, S. y Navaratnam, P. 2006. SHV-5 extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* in Malasia. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(3): 205-207.

Szabó, D.; Bonomo, R.; Silveira, F.; Pasculle, W.; Baxter, C.; Linden, P.; Hujer, A.; Hujer, K.; Deeley y Paterson, D. 2005. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase production is associated with reduced cefepime susceptibility in *Enterobacter cloacae*. *Journal Clinical Microbiology*, 43(10): 5058-5064.

Tafur, J.; Torres, J. y Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12: 227-232.

Torres, L.; Díaz, S.; Hudson, V.; Morales, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Calvo, A.; Rodríguez, N. y Pedroza, R. 2005. Distribución de BLEE en enterobacterias aisladas en centros de salud del área Metropolitana de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1: 53- 68.

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

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

Wilson, G. 1991. Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*, 19(10): 2539-2563.

HOJA DE METADATOS

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

Título	PLÁSMIDOS CONJUGATIVOS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS EN CEPAS DE ENTEROBACTERIAS
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Lastra L. Loriannys S.	CVLAC	19 237461
	e-mail	Lory_sll@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

ENTEROBACTERIAS
PLÁSMIDOS
INTRAHOSPITARIOS

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Microbiología	Bacteriología

Resumen (abstract):

El propósito de este trabajo fue analizar la presencia de plásmidos conjugativos que portan genes de resistencia a β -lactámicos en cepas de enterobacterias, aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias, del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, Cumaná, estado Sucre, durante el período comprendido entre septiembre y noviembre de 2005. La extracción de los plásmidos conjugativos se realizó en ocho cepas de enterobacterias y sus respectivas transconjugantes, obtenidas previamente mediante conjugación bacteriana; para tal fin se empleó el método de lisis alcalina con fenol-cloroformo y el estuche Wizards Plus SV Minipreps (Promega). Para obtener el perfil de restricción de los plásmidos, el ADN plasmídico fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *NheI*. La presencia de los genes que codifican resistencia a β -lactámicos se realizó empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el uso de iniciadores específicos para los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*. Se logró aislar plásmidos, mediante el método de lisis alcalina con fenol cloroformo, en todas las cepas donantes, pero no se aisló en cuatro transconjugantes, mientras que con el método de extracción estuche Wizards Plus SV Minipreps (Promega) se obtuvo aislamiento plasmídico en las ocho cepas donantes y en seis transconjugantes. El análisis de restricción de los plásmidos no permitió definir ningún perfil en las cepas, ya que no se produjeron cortes con las enzimas empleadas. En seis aislamientos plasmídicos se logró obtener amplificación para el gen *bla_{SHV}*, y en dos la presencia del gen *bla_{TEM}*. Los resultados revelan la existencia de plásmidos conjugativos en cepas de enterobacterias que portan genes de resistencia a β -lactámicos.

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

Contribuidores:

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

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	07	12
------	----	----

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_SLL.doc	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 – 5/6



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.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Mazley*
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNVELO
Secretario

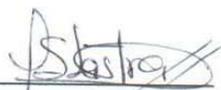


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación 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 Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



Autor
Lastra L., Loriannys L.



Asesora
Guzmán, Militza



Jurado
Salazar, Elsa



Jurado
Medina, Belkis

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

