



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

β -LACTAMASAS TIPO TEM EN CEPAS DE *Acinetobacter* sp., AISLADAS DEL
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
(IAHULA), MÉRIDA, ESTADO, MÉRIDA.
(Modalidad: Investigación)

CINTHIA LINET TOVAR AMAÍZ

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

CUMANÁ, 2009

β -LACTAMASAS TIPO TEM EN CEPAS DE *Acinetobacter* sp., AISLADAS DEL
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
(IAHULA), MÉRIDA, ESTADO, MÉRIDA.

APROBADO POR:

Prof. Elsa Zuleima Salazar de V.
Asesora

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| LISTA DE TABLAS | iv |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| RESUMEN..... | vi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| METODOLOGÍA | 6 |
| Cepas Bacterianas: | 6 |
| Subcultivo de Cepas:..... | 6 |
| Susceptibilidad Antimicrobiana:..... | 7 |
| Investigación de β -lactamasas:..... | 8 |
| Determinación de Genes de β -lactamasas por PCR:..... | 11 |
| Crecimiento bacteriano y aislamiento del ADN genómico: | 11 |
| Amplificación de genes de β -lactamasas tipo TEM: | 11 |
| Electroforesis de los productos de la amplificación:..... | 12 |
| Análisis de los Resultados: | 12 |
| RESULTADOS..... | 12 |
| DISCUSIÓN | 18 |
| CONCLUSIONES | 27 |
| RECOMENDACIONES | 28 |
| BIBLIOGRAFÍA | 29 |
| HOJA DE METADATOS | 39 |

DEDICATORIA

A:

Dios por llenarme de fortaleza en los momentos más difíciles.

Mi adorada, dedicada y ejemplar madre, por haberme sabido guiar hacia lo que soy. Gracias mami por no abandonarme nunca; sé que desde algún rincón del cielo, en tu cara está estampada una gran sonrisa de felicidad y de orgullo por este logro que tú también deseaste. Siempre estarás en mi corazón y mi mente por el resto de mi vida. Te amo mamá!

Mi amado padre. No tengo palabras para expresar el amor, la admiración y orgullo que siento por ti. Gracias por estar a mi lado apoyándome siempre en los momentos más difíciles. Este triunfo también es tuyo. Te amo papá.

Mis bellos hermanos: Flor, Miguel, Daniela y Nayelis; por ser cada día motivo de inspiración y superación. Gracias por llenar de felicidad cada día de mi vida. Los quiero mucho y espero sigan mi ejemplo, pues este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi ejemplar asesora, la doctora Elsa Salazar de Vegas, por guiarme y estar siempre dispuesta a colaborar en la realización del trabajo. La admiro y le estaré infinitamente agradecida.

Mis compañeros de clases: Yndira Lárez, Risela Morales, Paola Díaz, María Chópite, Celenys Vizcaíno, Rosalyd Arias, Diorelis González, Eliosmar Rodríguez, Hilemis Rodríguez, y Jesús Espinoza. Infinitas gracias por su sincera amistad. Los adoro a todos.

La señora Carmen Luisa Chópite por haber sido mi segunda madre durante mi carrera universitaria. Gracias por todo lo que hizo por mi.

Mis padrinos y tíos Ana y Gustavo Savignac, por su apoyo incondicional. Nunca dejaré de agradecerles.

Mi primo Luis Omar y a su esposa Glaydelis, gracias por no dejarme caer.

Mis familiares por creer siempre en mí. No los defraudaré.

Francisco Suárez, José Suárez y familia por todo el apoyo brindado, y por su completa disposición.

Muchas gracias a todos los que de una u otra forma colaboraron con la culminación de esta meta.

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. β -lactamasas descritas en <i>Acinetobacter baumannii</i> | 4 |
| Tabla 2. Controles positivos para la detección de puntos isoeléctricos y genes de resistencia por PCR, en cepas de <i>Acinetobacter</i> sp..... | 11 |
| Tabla 3. Fenotipos de resistencia en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas de Ia UCI-A y de la UARN. Enero 1998-abril, 1999. | 14 |
| Tabla 4. Fenotipos de resistencia en cepas de <i>Acinetobacter</i> RUH 1139, aisladas de Ia UCI-A y de la UARN. Enero 1998-abril, 1999. | 15 |
| Tabla 5. Punto isoeléctrico de β -lactamasas en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Enero 1998-abril, 1999. | 16 |
| Tabla 6. Punto isoeléctrico de β -lactamasas en cepas de <i>Acinetobacter</i> RUH 1139, aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Enero 1998-abril, 1999. | 16 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Detección de puntos isoeléctricos en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> , según Mathew y cols. (1975). | 10 |
| Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los β -lactámicos ensayados, en 20 cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA. Método de Kirby y Bauer. | 12 |
| Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los β -lactámicos ensayados, en 23 cepas de <i>Acinetobacter</i> RUH 1139, aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA. Método de Kirby y Bauer. | 13 |
| Figura 4. Detección del gen que codifica para la enzima TEM, mediante PCR, en cepas clínicas y ambientales de <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Acinetobacter</i> RUH 1139. | 17 |

RESUMEN

Con el objeto de determinar la presencia de β -lactamasas tipo TEM en cepas clínicas y ambientales de *Acinetobacter* sp., aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, estado Mérida, se estudiaron 43 cepas, 20 correspondían a *Acinetobacter baumannii* y 23 a *Acinetobacter* RUH 1139, dichas cepas fueron obtenidas de pacientes recluidos en la unidad de cuidados intensivos de adultos y en la unidad de alto riesgo neonatal y previamente identificadas, tanto bioquímica como molecularmente. La susceptibilidad de las mismas frente a 14 β -lactámicos ensayados, se determinó mediante la prueba de difusión en disco. La investigación de β -lactamasas se realizó mediante la prueba de nitrocefina, sinergismo de doble disco, isoelectroenfoque (pI) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a ampicilina, piperacilina y cefoxitin, el 95% fué resistente a cefotetan y cefuroxime; mientras que los carbapenemos fueron los antimicrobianos más activos. En el caso de las cepas identificadas como *Acinetobacter* RUH 1139, el 100% mostró resistencia ante ampicilina y cefamicinas, mientras que la ampicilina sulbactam y los carbapenemos fueron los agentes antimicrobianos más activos. Por la prueba de nitrocefina y punto isoelectroenfoque, tanto en las cepas de *A. baumannii* como las de *Acinetobacter* RUH 1139 fueron productoras de β -lactamasas. Se detectó una β -lactamasa con pI >9 en todas las cepas estudiadas, y una β -lactamasa con pI de 5.4 en todas las cepas de *A. baumannii*, pero no en las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139. El gen que codifica para β -lactamasas tipo TEM fue hallado solo en las cepas de *A. baumannii*.

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter es un bacilo corto o cocobacilo gramnegativo (1,5 a 2,5 μ por 1,0 a 1,5 μ), generalmente dispuestos en parejas. No fermenta la glucosa y es aerobio estricto, inmóvil, catalasa positivo y oxidasa negativo. Crece bien en todos los medios de cultivo utilizados de rutina y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35°C (Bergogne-Bèrèzin y cols., 1996).

Originalmente este género fué incluido dentro de la familia *Neisseriaceae*, pero actualmente, se ubica en la familia *Moraxellaceae*, incluyendo al menos 30 genoespecies, de las cuales, sólo 18 han podido ser nombradas (Rossau y cols., 1991; Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996; Garrity y cols., 2002; Carr y cols., 2003; Nemeček y cols., 2003). En la actualidad existe un grupo de cepas ubicadas en este género, más no han sido clasificadas aún dentro de una especie, entre ellas, se encuentra *Acinetobacter* cepa RUH 1139 (Salazar y cols., 2006).

Las especies de *Acinetobacter* se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza y muchos tipos de ambientes, siendo el agua y el suelo sus principales hábitats; este microorganismo se ha aislado de numerosos focos y fuentes, incluyendo la leche y sus derivados, aves de corral y comida congelada, además, en piel, conjuntiva, recto, vagina, nasofaringe, leche materna, garganta y uretra de sujetos sanos (El-Mohandes y cols., 1993; Fang y Madinger, 1996). La especie de *Acinetobacter baumannii* se ha encontrado involucrada en una gama de infecciones, pero su papel predominante es como agente causal de neumonías, particularmente, las que están asociadas a ventilación mecánica; dichos cuadros son difíciles de tratar clínicamente, debido a la resistencia que presenta esta bacteria a la mayoría de los agentes antimicrobianos (Doubovas y cols., 1994; Seifert y cols., 1995; Fernández, 2000; Navarro y cols., 2001).

En años recientes se han incrementado las infecciones nosocomiales causadas por *Acinetobacter* sp., afectando mayormente a pacientes debilitados, hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, y otros pacientes graves como los quemados, lo cual está probablemente relacionado al incremento de procedimientos terapéuticos invasivos, utilizados en dichas áreas, en los hospitales, durante las últimas décadas (Seifert y cols., 1995; Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996; Leturia y cols., 1997; Koneman y cols., 1998; Wisplinghoff y cols., 2003; Fernández, 2000; Prada, 2006; Salazar y cols., 2006). Numerosos reportes en la literatura médica científica han documentado altas tasas de resistencia antibiótica en *Acinetobacter* (Larson, 1984; Buisson y cols., 1990; Struelens y cols., 1993; Shi-Yuan y cols., 1996; Bello y cols., 1997). La resistencia bacteriana representa una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana, de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un agente antimicrobiano (Bush y cols., 1995).

Los primeros reportes de resistencia bacteriana a nivel mundial comienzan, aproximadamente, hace 40 años, con un progresivo y constante aumento en la actualidad, principalmente, debido al uso inadecuado e indiscriminado de la terapia antimicrobiana (Jackson y cols., 1998). La resistencia puede darse por la expresión de genes cromosómicos, los cuales son, intrínsecos de la bacteria y/o genes extracromosómicos, que son adquiridos, generalmente, a través de intercambio genético con otras bacterias (Keith y cols., 2000). El 50% de los agentes antimicrobianos administrados, mundialmente, son β -lactámicos, esto se debe a su baja toxicidad, fuerte actividad bactericida y fácil manejo. Éstos se utilizan comúnmente, junto con los aminoglucósidos, en la terapéutica de las infecciones nosocomiales ocasionadas por bacilos gramnegativos (Livermore, 1996; Jones, 2001).

Dentro del género *Acinetobacter*, la especie con mayor resistencia antimicrobiana es *A. baumannii*. Es frecuente encontrar resistencia combinada a los

β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas. Los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos descritos en éste microorganismo incluyen: alteración de la proteína de unión a la penicilina, reducción de la permeabilidad de la membrana externa, producción de β -lactamasas; siendo ésta última la forma más frecuente de resistencia adquirida y sistemas de bombeo de agentes antimicrobianos (Jackson y cols., 1998; Martínez, 2001).

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, destruyendo de esta forma la parte activa del antimicrobiano, dando lugar a un compuesto sin actividad antibacteriana (Livermore, 1995; López y López-Brea, 2000).

Dado que la resistencia a los β -lactámicos puede deberse a mecanismos distintos a la producción de β -lactamasas, la primera aproximación para conocer la posible implicación de éstas en la resistencia, es la detección de la actividad de dichas enzimas. Diversos ensayos se han realizado para constatar la producción de las β -lactamasas, los procedimientos más comúnmente empleados incluyen los que utilizan una cefalosporina cromogénica, el acidimétrico y el yodométrico; todos ellos se basan en la detección visual del producto final de la hidrólisis de un β -lactámico por acción de una β -lactamasa, mediante una reacción colorimétrica. No todos los métodos son útiles para la detección de dichas enzimas en cualquier bacteria. De todos ellos el más utilizado es el de la nitrocefina (cefalosporina cromogénica). Este método, aunque costoso, es sensible y permite detectar la mayoría de las β -lactamasas conocidas (Vila y Marco, 2002). Existen β -lactamasas con amplio espectro de acción, llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), entre las cuales se pueden mencionar: SHV (excepto SHV 1), CTX, PER y las TEM a excepción de TEM 1 y TEM 2 (Burke, 2000; Bradford, 2001).

Sato y Nakae (1991) demostraron la presencia de una alteración significativa de la permeabilidad en cepas de *A. calcoaceticus*; también encontraron que la

producción de β -lactamasas parece incrementar notablemente la resistencia de *Acinetobacter* sp. bajo condiciones de baja permeabilidad de la membrana externa a las drogas β -lactámicas. Existe una gran variedad de dichas enzimas, las cuales tienen la misma función, pero se diferencian en la secuencia de aminoácidos y en su afinidad por diferentes sustratos β -lactámicos. Estas pueden ser codificadas en el cromosoma o plásmidos y pueden ser del tipo constitutivo o inducible (French y cols., 1996; Chamber y Sande, 1996; Medeiros, 1997; Koneman y cols., 1998). La producción de β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más estudiado en éste microorganismo y el de mayor importancia (Blehschmidt y cols., 1992; Fernández, 2000; Suárez y cols. 2006; Pino y cols. 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. β -lactamasas descritas en *Acinetobacter baumannii*.

| Clase | Tipo de β -lactamasas |
|-------|---|
| A | 2b: TEM-1, TEM-2, CARB-5 2be: PER-1 2f: ARI-2, AbRC-1 |
| B | IMP-12 al IMP-4, IMP-5, IMP-11 VIM-1-2 |
| C | ACE 1-4 AmpC, ACT-1 |
| D | OXA-3, 10 y OXA-20, 21, 23-27, 33, 37, 40, 49, 51, 58, 69 |

Tomado de: Salazar y cols. 2006.

En la actualidad se afirma que *A. baumannii* es resistente a la mayoría de β -lactámicos, en especial a penicilinas y cefalosporinas, en particular, las cepas aisladas de pacientes que se encuentran en áreas de cuidados intensivos. Es poco frecuente encontrar cepas de este microorganismo con un fenotipo que presente una total sensibilidad a los β -lactámicos. La resistencia a ampicilina, carboxipenicilina y ureidopenicilinas se ha relacionado frecuentemente con la presencia de β -lactamasas plasmídicas tipo TEM 1 o TEM 2, en cepas de *A. baumannii* (Vila y cols., 1993).

Durante las últimas décadas, las infecciones producidas por *Acinetobacter* sp. han aumentado de forma progresiva, en los hospitales, tanto a nivel nacional como internacional (Vila y cols., 1999; Bou y cols., 2000; Spence y cols., 2002; Heritier y cols., 2005; Salazar y cols., 2006).

El incremento de infecciones nosocomiales, causadas por cepas multirresistentes de dicho microorganismo, ha originado un aumento en el estudio de la actividad *in vitro* de diversos agentes antimicrobianos contra cepas de *A. baumannii* (Shi-yuan y cols., 1996; Pandey y cols., 1998; Giarmarellos-Borboulis, 2000). A nivel nacional se han realizado escasos trabajos referidos al tema; sin embargo, son menos aún los que reportan estudios sobre sensibilidad antimicrobiana en otras genoespecies de *Acinetobacter* (Rivera y cols., 2004; Salazar y cols., 2006).

El estudio publicado por Salazar y cols. (2006), reporta sobre un brote epidémico producido por un clon *Acinetobacter* cepa RUH 1139, en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAUHULA), Mérida; dichas cepas muestran fenotipos de resistencia ante ciertos antimicrobianos incluyendo a los β -lactámicos; sin embargo, no se hace referencia sobre los mecanismos que median dicha resistencia, en las cepas aisladas en este centro hospitalario. En lo que respecta a *Acinetobacter* cepa RUH 1139, no se encontraron estudios que describan su comportamiento frente a los antibióticos β -lactámicos. Por ello, con la finalidad de ampliar el estudio sobre la caracterización de la resistencia a β -lactámicos en cepas pertenecientes a 2 genoespecies de *Acinetobacter*, se propone detectar la presencia de β -lactamasas tipo TEM en cepas, de *Acinetobacter* sp. aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAUHULA), Mérida, estado Mérida.

METODOLOGÍA

Cepas Bacterianas:

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

Subcultivo de Cepas:

Con el objeto de probar la viabilidad de los aislados, cada uno fue colocado en caldo infusión cerebro corazón. Luego, los mismos fueron cultivados en agar Mac Conkey y, posteriormente, se observó el crecimiento bacteriano. En cada ocasión, el material fue incubado durante toda la noche a 35°C. Con el fin de verificar que los cultivos correspondían a *Acinetobacter* sp., las colonias con características de no fermentador, fueron identificadas a nivel de género mediante el método bioquímico convencional, el cual incluyó: características morfológicas, tintoriales y de colonias, motilidad, prueba de oxidasa, oxidación de la glucosa, xilosa, fructosa, maltosa sacarosa, ornitina, arginina y lisina crecimiento a 37, 42 y 44°C, respectivamente (Bouvet y Grimont, 1987).

Susceptibilidad Antimicrobiana:

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión en disco, siguiendo las recomendaciones descritas por Bauer y cols., 1966) y por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, del inglés: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2006). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril al 0,85%, a partir de un crecimiento de 18 horas sembrado en agar tripticasa de soya, ajustado 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 obtenida la turbidez respectiva, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión restándolo varias veces y ejerciendo presión sobre las paredes interiores del tubo con el fin de eliminar el exceso de líquido.

La suspensión bacteriana se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton contenido en placas de Petri, dejando secar para luego proceder a colocar los discos de los antibióticos seleccionados: ampicilina (10 μg), ampicilina sulbactam (20 μg), amoxicilina-acido clavulámico (30 μg), cefuroxima (30 μg), cefotetan (30 μg), cefoxitin (30 μg), cefotaxima (30 μg), ceftazidime (30 μg), cefepima (30 μg), ceftriazona (30 μg), imipenem (10 μg), cefoperazona (30 μg), piperacilina (30 μg), aztreonam (30 μg), todos de la marca comercial Beston, Dickison and company. Las placas se incubaron a 35°C durante 18 horas, en aerobiosis, y luego se realizó la lectura de los halos de inhibición, empleando una regla milimetrada. Los resultados obtenidos se compararon con los diámetros de las zonas de inhibición según recomendaciones del CLSI (2006), y se reportaron las categorías de interpretación de acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro*.

La calidad de los medios de cultivos, así como los discos de antibióticos empleados en el presente estudio fue comprobada empleando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Investigación de β -lactamasas:

La producción fenotípica de β -lactamasas se determinó mediante la prueba de nitrocefina (OXOID), punto isoeléctrico (pI) y sinergismo del doble disco; ésta última se utilizó para investigar la producción de BLEE, propuesta por Jalier y cols. (1988), siguiendo los lineamientos establecidos por CLSI (2006). Para la preparación de la muestra y del inóculo en la placa, se procedió igual que para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, antes descrita. Posterior, se colocó en el centro de la placa un disco de amoxicilina/ácido clavulánico 2:1(20/10 μ g), y luego a una distancia aproximada de 20 mm, se colocó un disco de cefotaxima, por un lado, y uno de ceftazidima por el otro. Una vez dispuestos los discos en la placa, éstas se incubaron en aerobiosis, durante 24 horas a 37°C. La formación de un óvalo o disminución del crecimiento bacteriano en la zona de conversión del halo de inhibición de los agentes antimicrobianos empleados y el disco central de amoxicilina/ácido clavulánico, fue indicativo, desde el punto de vista fenotípico, de la presencia de BLEE.

Para la detección de β -lactamasas, se utilizó la prueba de nitrocefina, la cual se basa en el cambio químico producido en la molécula de cefalosporina al ser hidrolizado el anillo β -lactámico por estas enzimas. La nitrocefina muestra un rápido cambio de color de amarillo a rojo cuando la prueba es positiva. Para la determinación β -lactamasas mediante la prueba de nitrocefina y de pI; se prepararon extractos crudos de β -lactamasas por sonicación (Mathew y cols., 1975), para la detección rápida de β -lactamasas, mediante la prueba de nitrocefina se colocaron 10

μl del extracto de cada muestra en su pocillo respectivo, y luego se agregaron 10 μl del reactivo de nitrocefina. Se consideró un resultado positivo cuando se formó una coloración roja en la mezcla de reacción contenida en cada pocillo como se puede observar en la figura 1. Por otro lado los extractos se corrieron en el gel IEF 3-9 Phastgel, utilizando un Phastsystem (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Los geles fueron revelados con nitrocefina y los pI se determinaron por comparación con extractos de β -lactamasas de pI conocidos. Las cepas utilizadas como controles para la detección de los pI se muestran en la tabla 2.

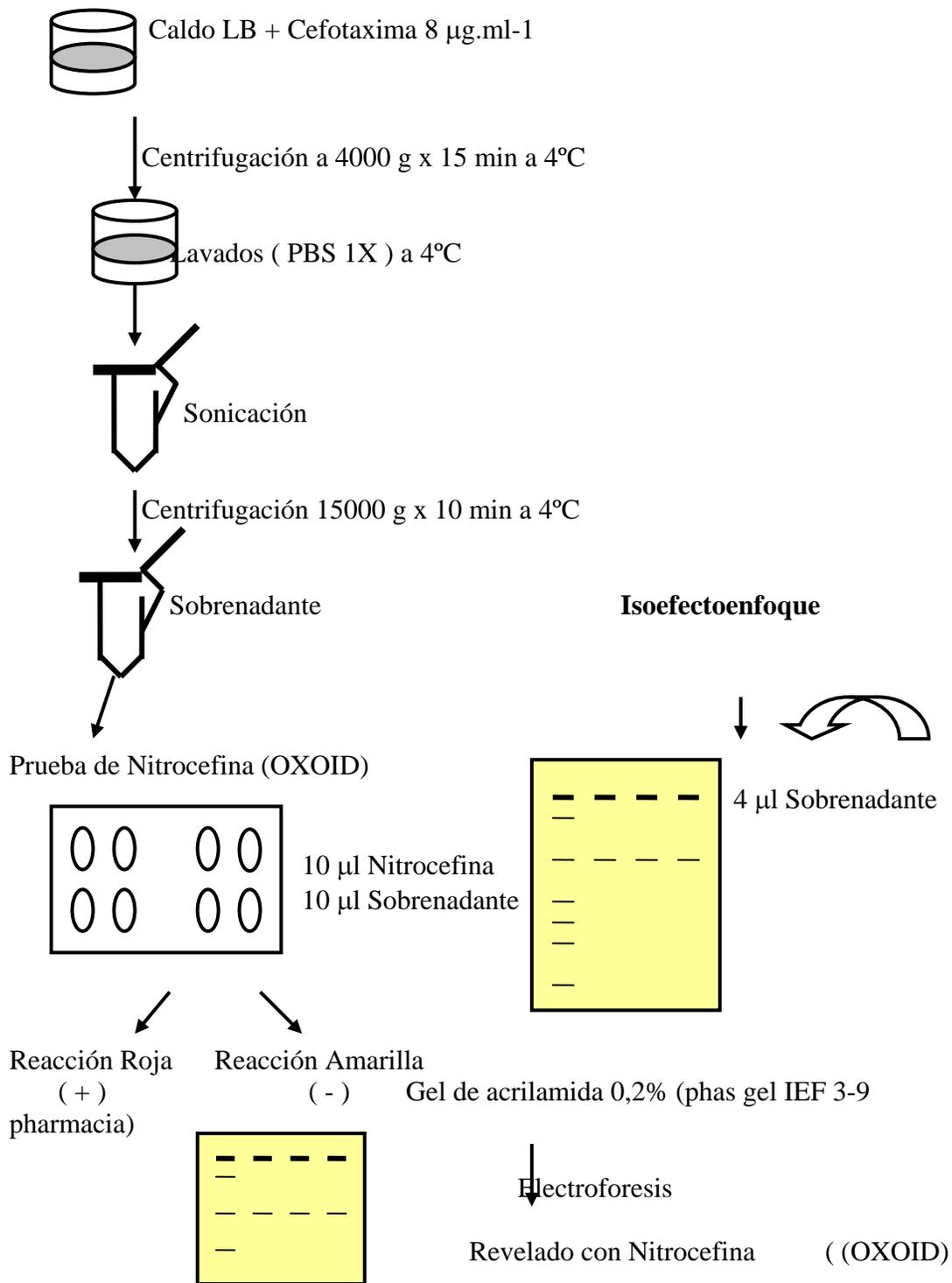


Figura 1. Detección de puntos isoelectríficos en cepas de *Acinetobacter baumannii*, según Mathew y cols. (1975).

Tabla 2. Controles positivos para la detección de puntos isoeléctricos y genes de resistencia por PCR, en cepas de *Acinetobacter* sp.

| Cepa control | Tipo de Enzima | Punto isoeléctrico |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Salmonella</i> sp. | TEM-70 | 5.2 |
| <i>E. coli</i> | SHV-1 | 7.6 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> (470) | CARB-2 | 5.7 |
| <i>A. baumannii</i> (661SRA) | OXA-21 | 7.0 |
| <i>A. baumannii</i> (RYC52763) | OXA-24 | 9.0 |
| <i>A. baumannii</i> (14F) | OXA-58 | 7.2 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> (2557) | TEM-1, OXA-30 | 5.4, 7.0, >9.0 |

Determinación de Genes de β -lactamasas por PCR:

La detección de los genes de β -lactamasas tipo TEM fué llevada a cabo por PCR, cuyos procedimientos se describen a continuación.

Crecimiento bacteriano y aislamiento del ADN genómico:

Cada aislado bacteriano se cultivó en agar Luria Bertani, durante 18 - 24 h a 35°C. Luego, se tomó una colonia aislada y fué resuspendida en 25 μ l de agua destilada estéril, contenida en un tubo para PCR, con el objeto de destruir la pared celular por ebullición (100°C), durante 10 minutos en un termociclador, y luego se centrifugó a 14 000 g, por 30 segundos (Vila y cols., 1999).

Amplificación de genes de β -lactamasas tipo TEM:

Por cada muestra se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, la cual se desarrolló con un volumen final de 50 μ l. 25 μ l fueron preparados con buffer de PCR más MgCl₂ 2X (Roche), 400 mol.l⁻¹ de dNTPs (Invitrogen), 1 mol.l⁻¹ de los oligonucleótidos Tem-AMP 1: 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3' y Tem-AMP 2: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3 (Roche), con los cuales se amplificó un producto de 1080 pb (Navia y cols., 2002), 1U de Taq polimerasa

(Roche) y agua bidestilada estéril, y los otros 25 µl correspondieron a la muestra de ADN. Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes anteriormente citados, excepto el ADN. Se utilizó como control positivo la cepa de *Salmonella typhimurium* (2557), productora de β-lactamasa tipo TEM (Vila y cols., 1999).

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

Electroforesis de los productos de la amplificación:

Las muestras resultantes de la amplificación fueron colocadas en un gel de agarosa al 1,5%, el cual fué teñido con bromuro de etidio, en buffer TAE 1X, y sometido a una corrida electroforética a 70 Voltios, durante unos 30 minutos, aproximadamente. Para estimar el tamaño del fragmento de ADN resultante, se utilizó un marcador de masa molecular con bandas de concentración definidas (100 pb Ladders. Invitrogen). Las bandas fueron detectadas por transiluminación con luz ultravioleta (UVP, INC) y documentados fotográficamente (Polariod Instantánea DS 34). La observación de un amplicón de unos 1080 pb, aproximadamente, que concuerde con el control positivo, se correspondió virtualmente con una β-lactamasa tipo TEM.

Análisis de los Resultados:

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

RESULTADOS

En la figura 2 se muestran los patrones de resistencia en cepas de *A. baumannii* frente a los antimicrobianos ensayados, el 100% de las mismas resultó resistente a ampicilina, piperacilina y ceftoxitin. Por su parte, el 90% de la resistencia se obtuvo frente a cefotetan, cefotaxima, cefoperazona y aztreonam, el 80% de la resistencia se obtuvo frente amoxicilina. Ác. Clavulánico; mientras que, entre el 90% y 100% de sensibilidad sólo se observó frente a imipenem y meropenem, respectivamente.

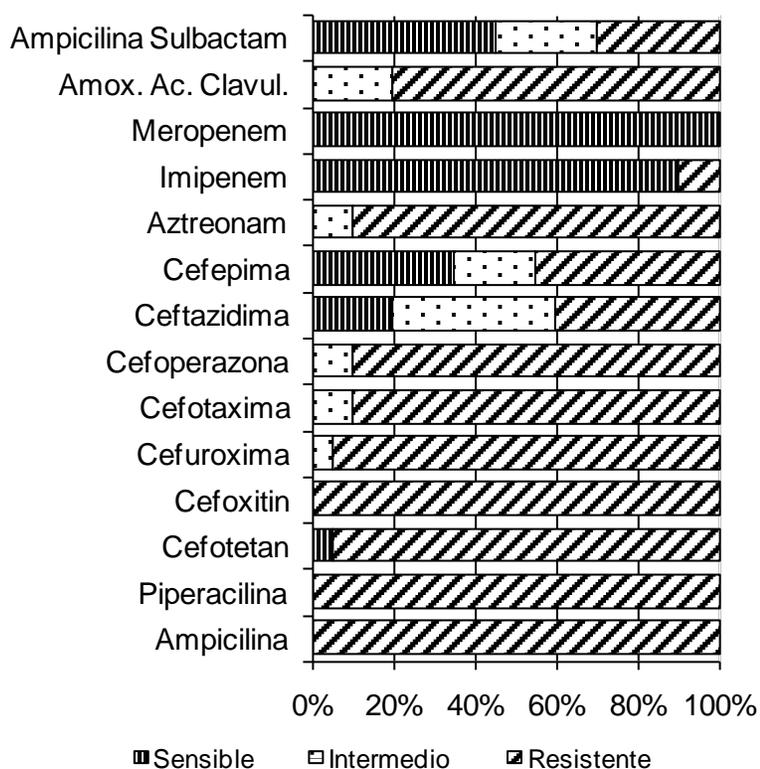


Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los β -lactámicos ensayados, en 20 cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA. Método de Kirby y Bauer.

En La figura 3 se muestra la susceptibilidad antimicrobiana en 23 cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, todas resultaron resistentes a ampicilina, cefotetan y cefoxitin. El 91,3% de las cepas tuvo resistencia frente a piperacilina y cefoperazona, sin embargo, se observa que también el 91,3% de las cepas fue sensible a imipenem y ceftazidima; mientras que el meropenem y la ampicilina sulbactam fueron los antimicrobianos ante los cuales, todas las cepas mostraron sensibilidad.

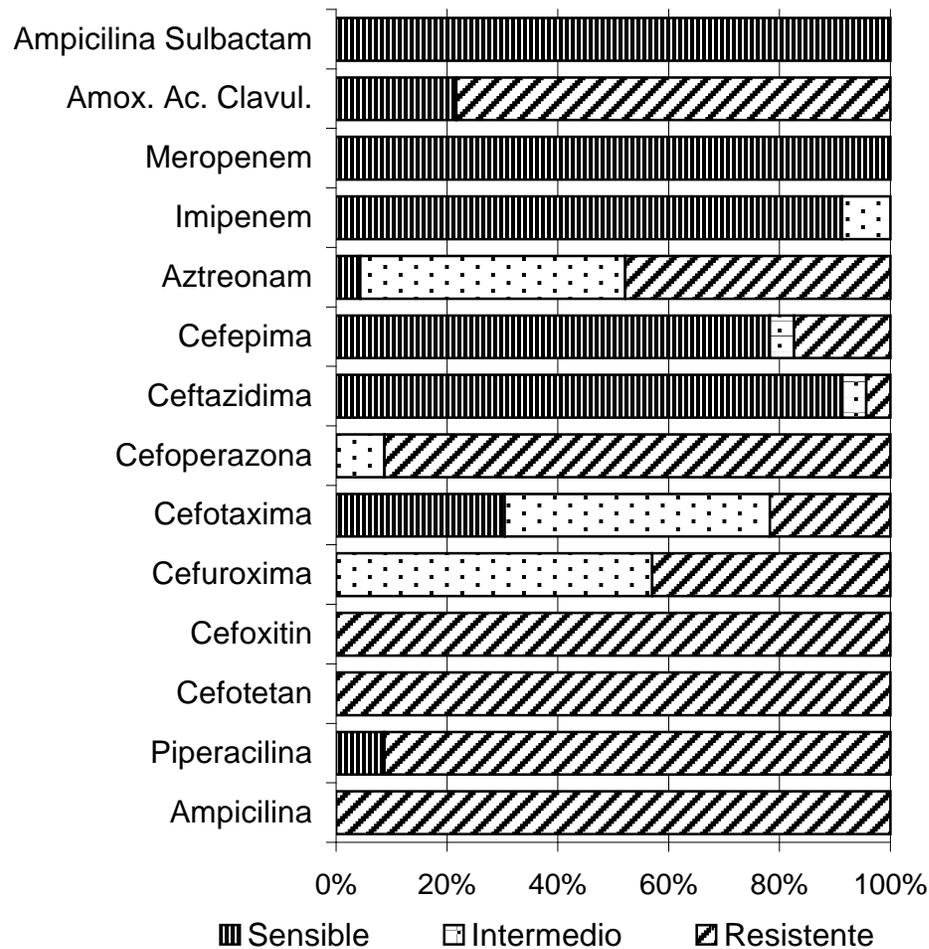


Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los β -lactámicos ensayados, en 23 cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, aisladas de pacientes hospitalizados en el IAHULA. Método de Kirby y Bauer.

Con el análisis de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana, en ambas especies, se obtuvieron XIV patrones o fenotipos de resistencia diferentes, seis (6) se observaron entre las especies de *A. baumannii*, siendo el fenotipo I el más frecuentemente hallado (50%) entre las cepas, el cual se caracterizó por presentar resistencia a la mayoría de los antimicrobianos β -lactámicos ensayados, a excepción de los carbapenemos y ampicilina sulbactam (Tabla 3).

Tabla 3. Fenotipos de resistencia en cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de la UCI-A y de la UARN. Enero 1998-abril, 1999.

| Agentes antimicrobianos | fenotipos | | | | | |
|-------------------------|-----------|------|------|------|-----|-----|
| | I | II | III | IV | V | VI |
| AM | R | R | R | R | R | R |
| PI | R | R | R | R | R | R |
| CF | R | R | R | R | R | S |
| FOX | R | R | R | R | R | R |
| CXM | R | R | R | R | I | R |
| CTX | R | R | R | R | I | I |
| CP | R | R | R | I | R | R |
| CAZ | I | R | R | R | S | S |
| FEP | R | S | S | I | I | S |
| AZ | R | R | R | R | S | S |
| IMP | S | S | S | S | R | R |
| MER | S | S | S | S | S | S |
| AMC | R | R | R | I | I | I |
| SAM | S | I | R | R | R | R |
| Cepas | 10 | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| (%) | (50) | (20) | (10) | (10) | (5) | (5) |

AM: ampicilina; PI: piperacilina; CF: cefotetan; FOX: cefoxitin; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CP: cefoperazona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; AZ: aztreonam; IMP: imipenem; MER: meropenem; AMC: amoxicilina-ác. Clavulánico. SAM: ampicilina sulbactam; R: resistente; I: intermedio; S: sensible.

En el caso de las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, se encontraron ocho (8) fenotipos de resistencia, siendo el fenotipo VII el más frecuentemente observado (34,78%), el cual estuvo presente en todas aquellas cepas que mostraron resistencia a

las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y al imipenem (Tabla 4).

Tabla 4. Fenotipos de resistencia en cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, aisladas de la UCI-A y de la UARN. Enero 1998-abril, 1999.

| Agentes | Fenotipo | | | | | | | |
|------------------------|----------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV |
| Antimicrobianos | | | | | | | | |
| AM | R | R | R | R | R | R | R | R |
| PI | R | R | R | R | R | S | S | S |
| CF | R | R | R | R | R | R | R | R |
| FOX | R | R | R | R | R | R | R | R |
| CXM | R | I | R | I | I | I | I | I |
| CTX | I | S | S | I | R | S | R | I |
| CP | R | R | R | R | R | R | R | I |
| CAZ | S | S | S | S | S | S | S | R |
| FEP | S | R | S | S | S | S | S | I |
| AZ | R | I | R | I | I | R | I | S |
| IMP | S | S | S | S | S | S | S | I |
| MER | S | S | S | S | S | S | S | S |
| AMC | R | R | S | R | R | S | S | S |
| SAM | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Cepas | 8 | 4 | 2 | 2 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| (%) | (34,8) | (17,4) | (8,7) | (8,7) | (17,4) | (4,3) | (4,3) | (4,3) |

AM: ampicilina; PI: piperacilina; CF: cefotetan; FOX: cefoxitin; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CP: cefoperazona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; AZ: aztreonam; IMP: imipenem; MER: meropenem; AMC: amoxicilina-ác. Clavulánico. SAM: ampicilina sulbactam; R: resistente; I: intermedio; S: sensible.

Mediante la prueba de nitrocefina se obtuvo positividad tanto en las cepas pertenecientes a *A. baumannii* como de *Acinetobacter* RUH 1139, sin embargo, en ninguna cepa se detectó la producción de BLEE, mediante la prueba del doble disco. En la tabla 5 se muestra los pI de las β -lactamasas halladas en las cepas clínica y ambientales de *A. baumannii*, cuyas cepas fueron agrupadas arbitrariamente en tres (3) grupos, encontrándose que el mayor porcentaje de

estas (65%) se ubicaron en el grupo 1, las cuales producen, al menos, tres (3) β -lactamasas con punto isoeléctrico de 5.4, 7.0 y >9 . Además, en ninguna se detectó BLEE, por el método del sinergismo del doble disco.

Tabla 5. Punto isoeléctrico de β -lactamasas en cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Enero 1998-abril, 1999.

| Grupo de cepa de laboratorio | Pi |
|------------------------------|---------------------|
| Grupo 1 | 5.4, 7.0, >9 |
| Grupo 2 | 5.2, 5.4, 7.0, >9 |
| Grupo 3 | 5.4, >9 |

pI= punto isoeléctrico; Grupo 1: PIN 082-C1, PIN 085-B1, PIN 390-2, PIN 434-B2, PIN 596-D2, PIN 597-1, PIN 653-A, PIN 653-B1, PIN 274-2, PIN 296-2, PIN 428-B1, PIN 682, PIN 7-HU. Grupo 2: PIN 341-B, PIN 404, PIN 544-B. Grupo 3: PIN 341-B, PIN 404, PIN 544-B.

En la tabla 6 se muestra la caracterización de las β -lactamasas halladas en la cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, encontrándose que el 100% de las cepas analizadas mostraron punto isoeléctrico >9 . En este grupo de cepas no se detectó BLEE, ni tampoco el gen que codifica para β -lactamasas tipo TEM.

Tabla 6. Punto isoeléctrico de β -lactamasas en cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Enero 1998-abril, 1999.

| Grupo de cepa de laboratorio | pI |
|------------------------------|------|
| Grupo 4 | >9 |

pI= punto isoeléctrico; Grupo 4: PIN 428-A, PIN 566-2, PIN-567-2, PIN 570- A2, PIN 571-2, PIN 585, PIN 592, PIN 594-2, PIN 616-2, PIN 622, PIN 623-A, PIN 624-A, PIN 627, PIN 631, PIN 639, PIN 649, PIN 654-2, PIN 661-2, PIN 664-2, PIN 680, PIN 683, PIN12-SP, PIN14-SP.

En todas las cepas de *A. baumannii* se detectó el gen que codifica para β -lactamasas tipo TEM, mediante PCR (figura 4).

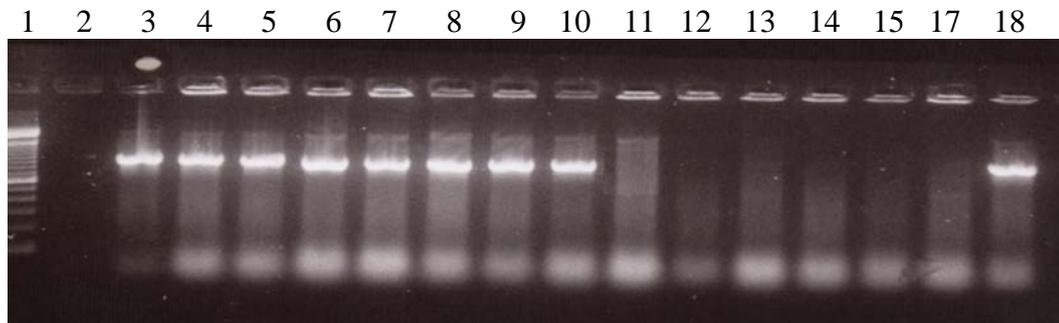


Figura 4. Detección del gen que codifica para la enzima TEM, mediante PCR, en cepas clínicas y ambientales de *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter* RUH 1139. Línea 1: Marcador de masa molecular (100 pb) Ladder, (Invitrogen); Línea 2: Control negativo; Línea 3 : Control positivo: (*Salmonella typhimurium* cepa 2557); Línea 4: cepa PIN 082-C1; Línea 5: cepa PIN 404; Línea 6: cepa PIN 538-A; Línea 7: cepa PIN 562; Línea 8: cepa PIN 596-D2; Línea 9: cepa PIN 597-1; Línea 10: cepa PIN 653-B1; Línea 11: cepa PIN 274-2; Línea 12: cepa PIN 428-A; Línea 13: cepa PIN 566-2; Línea 14: cepa PIN 592; Línea 15: cepa PIN 622; Línea 16: cepa PIN 680; Línea 17: cepa PIN 12-SP; Línea 18: cepa PIN 7-HU.

DISCUSIÓN

Actualmente, las infecciones nosocomiales constituyen uno de los problemas más importantes en la medicina moderna, considerándose a *A. baumannii* la especie de mayor incidencia clínica dentro de su género (Marco, 2001; Pedroza, 2001). La incidencia de *A. baumannii* como patógeno nosocomial ha aumentado en los últimos 20 años, particularmente en la unidades de cuidados intensivos, donde el uso de antimicrobianos es mayor y el hospedador es más susceptible (Nuñez y cols., 1998; Pandey y cols., 1998; Marco, 2001; Salazar y cols., 2005). Este microorganismo puede permanecer en el ambiente gracias a su capacidad para utilizar las distintas fuentes de carbono y crecer ante las más críticas condiciones de pH y humedad. Tal capacidad, le permite a las bacterias incluidas en este género, desarrollarse fácilmente en las diferentes áreas hospitalarias; sin dejar de mencionar que su resistencia frente a los múltiples agentes antimicrobianos les permite, a su vez, favorecer a que los pacientes ya infectados puedan actuar como reservorios (Pinzón, 2006).

En cuanto a la identificación de especies en *Acinetobacter*, diversos autores afirman que la expresión de caracteres fenotípicos puede estar afectadas por factores ambientales, mientras que los métodos de identificación genética suelen ser mucho más estables, por lo que en la actualidad es recomendable identificar las distintas especies de *Acinetobacter* por estos últimos (Rivera y cols., 2004; Salazar y cols., 2006; Kilic y cols., 2008). Por otro lado, es de importancia mencionar que, el crecimiento a 44°C es una de las pruebas empleadas con frecuencia para la diferenciación de *A. baumannii* de otras genopecies (Bouvet y Grimont, 1987; Chu y cols., 1999), sin embargo, se han reportado que cepas de *Acinetobacter* geno especie 3 han logrado desarrollarse perfectamente bajo esta temperatura (Dijkshoom y cols., 1993; Gemer-Smidt y Tjemberg, 1993; Rivera y cols., 2004). En este estudio se

obtuvo que, tanto las cepas de *A. baumannii* como las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, crecieron a 44°C; lo cual permite corroborar que el crecimiento a esta temperatura no es característica diferencial de la especie *A. baumannii* (Salazar y cols., 2006).

El uso masivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos vienen a conformar uno de los factores predisponentes a infecciones bacterianas (Pedroza, 2001). Las infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* constituyen un problema terapéutico difícil de tratar, debido a que, con el pasar del tiempo, las bacterias pertenecientes a esta especie se han vuelto, cada vez, más resistentes a la mayoría de los antimicrobianos empleados (Ling y cols., 1996). Por su parte, Pinzón y cols. (2006) reportaron que el 66,66% de las cepas de *A. baumannii*, sometidas a estudio, presentaron resistencia a todos los β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas probados, incluyendo a las carbapenemas.

Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana aquí obtenidos muestran que todas las cepas de *A. baumannii* presentaron resistencia a ampicilina, piperacilina y cefoxitin. Resultados similares fueron reportados por López-Hernández y cols. (2001), en España. Las cefalosporinas de segunda generación, utilizadas en este estudio, prácticamente no presentaron actividad antimicrobiana contra este microorganismo; estos resultados son similares a los publicados por Pedroza y cols. (2001), en Caracas. En el caso de las cefalosporinas de tercera generación, la actividad fue poca o moderada, a excepción de ceftazidima; estos resultados se asemejan a los obtenidos por varios autores, tanto a nivel nacional como internacional (Comegna y cols., 2000; Harris y cols., 2000; Kotimopoulos y cols., 2000; Carmona y cols., 2003; Pinzón y cols., 2006),

Se ha descrito que *Acinetobacter* sp. tiene resistencia natural frente a los β -lactámicos, especialmente ante las aminopenicilinas, ya que las bacterias

pertenecientes a este género presentan una β -lactamasa cromosómica conocida como AmpC (Hood y Amyes, 1991; Domínguez y cols., 1996; Bello y cols., 1997; Suárez y cols., 2006; Pino y cols., 2007), la cual confiere resistencia ante penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, además de los inhibidores de β -lactamasas.

En cuanto a las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, se obtuvo que más del 90% fué resistente a ampicilina, cefotetan, cefoxitin, piperacilina y cefoperazona, por el contrario, un significativo porcentaje de cepas (91,3%) mostró sensibilidad a imipenem y ceftazidima; mientras que el meropenem y la ampicilina sulbactam fueron los antimicrobianos más activos (100%). En la bibliografía consultada no se encontró reporte alguno sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *Acinetobacter* cepa RUH 1139. Al comparar los resultados de estas dos genoespecies, se observó que las cepas pertenecientes a *Acinetobacter* RUH 1139 mostraron mayor sensibilidad frente a las cefalosporinas de tercera generación, carbapenemas y ampicilina sulbactam que las de *A. baumannii*. Es importante recalcar que en diversos estudios se han reportados altos porcentajes de cepas resistentes de *A. baumannii* frente a distintos agentes antimicrobianos, incluyendo a todos los β -lactámicos (Bou y cols., 2000; Ruíz y cols., 2003; Huys y cols., 2004; Cookson, 2005), sin embargo, en cuanto a las otras genoespecies, son pocas las experiencias sobre resistencia reportada, tanto a nivel nacional como internacional, que hayan utilizado métodos genéticos para la identificación de la especie, y donde se aborden datos sobre la susceptibilidad antimicrobiana de las mismas (Nemec y cols. 2003; Rivera y cols. 2004; Salazar y cols. 2006; Salazar y cols. 2007).

Los β -lactámicos son los antimicrobianos más empleados para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo *A. baumannii*. Según Prada (2006), el emplear estos agentes antimicrobianos de manera indiscriminada, en las últimas décadas, ha provocado el incremento en la aparición,

cada vez más frecuente, de cepas alarmantemente resistente, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos.

Al analizar los resultados obtenidos de susceptibilidad antimicrobiana se diferenciaron catorce (14) fenotipos de resistencia, donde seis (6) de ellos fueron encontrados entre las cepas de *A. baumannii*, los cuales se designaron arbitrariamente con números romanos (I hasta VI), siendo el fenotipo I el mayormente observado (50%), el cual se caracterizó por reunir a las cepas que presentaron resistencia a la mayoría de los β -lactámicos ensayados, excepto imipenem, meropenem y ampicilina sulbactam; el 20% de las cepas mostró el fenotipo II, caracterizado por la resistencia a ceftazidima y cefepima, además de los antimicrobianos ya mencionados. En el caso de *Acinetobacter* cepa RUH 1139, se obtuvieron ocho (8) fenotipos de resistencia, igualmente designados con números romanos; siendo el fenotipo VII el más frecuente (34, 78%), el cual estuvo representado por aquellas cepas que mostraron poca resistencia frente a los antimicrobianos ensayados. Cabe destacar que sólo una cepa (4, 34%) mostró el fenotipo XIV, la cual fue resistente a los antimicrobianos probados, a excepción de meropenem y ampicilina sulbactam.

Según Labarca (2002), en la actualidad se puede deducir el posible mecanismo enzimático involucrado, a partir de la presencia de un fenotipo de resistencia observado en un antibiograma, los cuales pueden ser identificados mediante técnicas moleculares. La resistencia a ampicilinas se ha relacionado con la presencia de β -lactamasas tipo TEM-1 o TEM-2, sin embargo, varios autores sugieren que la sobre expresión de una cefalosporinasa cromosómica tipo AmpC es un mecanismo frecuente de resistencia a β -lactámicos y genera un fenotipo de resistencia caracterizado por resistencia a ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima e inhibidores de β -lactamasas (Fernandez, 2000; Burke, 2000; Carmona y cols.; 2003). Un tipo de β -lactamasa encontrado, a menudo, en aislamientos clínicos de *A. baumannii* son las β -lactamasas tipo OXA, de clase molecular D. Dichas

enzimas inactivan amoxicilina más ácido clavulánico, ticarciclina, piperacilina y cefalotina, pero algunas de ellas pueden tener actividad frente a cefotaxima y ceftazidima. Aunque las carbapenemas poseen una buena estabilidad frente a este tipo de β -lactamasas, se han descrito varias oxacilinasas que presentan actividad frente a este tipo de antimicrobiano (Vila y Marco, 2002). Al respecto, la β -lactamasa OXA 58 se ha reportado, en años recientes, en cepas de *A. baumannii*, tanto a nivel nacional como internacional, demostrándose que estas enzimas también tienen actividad frente a carbapenemas (Heritier, 2005; Peleg y cols., 2006; Pournaras y cols., 2006; Vahaboglu y cols., 2006; Salazar y cols. 2007).

En el presente estudio se obtuvieron diferentes patrones o fenotipos de resistencia tanto para *A. baumannii* como para *Acinetobacter* cepa RUH 1139, donde, todas las cepas de ambas genoespecies fueron resistentes a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación. La mayoría de las cepas de *A. baumannii* también resultaron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, lo cual sugirió la posibilidad de que dicha resistencia estuviera dada por la presencia de β -lactamasas. Este supuesto fue comprobado al encontrar resultados positivos para la producción de β -lactamasas con la prueba de la nitrocefina; sin embargo, los resultados para la detección de β -lactamasas de espectro extendido, por medio de la prueba del sinergismo del doble disco, fueron negativos para ambas especies. Datos similares fueron reportados por Pinzón y cols. (2006), donde estudiaron cepas de *Acinetobacter* sp., obteniendo resultados positivos para la producción de β -lactamasas, mediante la prueba de nitrocefina, más no para la detección de BLEE. Estos investigadores afirman que el método del sinergismo del doble disco ha sido empleado de manera exitosa para la detección de BLEE en los miembros de la familia Enterobacteriaceae, especialmente, en especies de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, sin embargo, de acuerdo a los resultados que obtuvieron, en la detección de BLEE en bacilos gramnegativos no fermentadores, llegaron a la

conclusión de que es posible que este método no sea el más propicio para la detección de BLEE en *Acinetobacter*.

Según el trabajo realizado por Pino y cols. (2007), en Chile, donde se estudió la producción de β -lactamasas de espectro extenso en cepas pertenecientes al género *Acinetobacter* por ambos métodos, concluyeron que en ocasiones la presencia de la enzima de tipo AmpC, puede llegar a enmascarar la producción fenotípica de BLEE en cepas productoras de dichas enzimas, resultando así un falso negativo. Por otro lado, la hiperproducción de una β -lactamasa, por parte del microorganismo, que además producen β -lactamasas de espectro extendido, también puede llegar a causar falsos negativos en pruebas fenotípicas (Centro de Control y Prevención de Enfermedades C D C, en Estados Unidos, 1999).

En los laboratorios microbiológicos se pueden desarrollar varias técnicas de identificación bioquímica y molecular de las β -lactamasas, basadas unas en las características propias de la β -lactamasa como proteína, en la detección de los genes responsables de su codificación plasmídica y/o en el estudio de clonalidad. Entre los métodos bioquímicos se encuentra incluido el isoelectroenfoque (IEF), el cual permite conocer el punto isoeléctrico (pI) de la proteína, este método era de gran utilidad cuando existían pocas β -lactamasas descritas. En la actualidad se utiliza poco debido a la descripción de diferentes β -lactamasas que comparten el mismo pI; sin embargo, es muy útil si se combina con el análisis del fenotipo de sensibilidad, ya que puede orientar hacia el tipo de β -lactamasa para un estudio molecular posterior (Mesa y cols. 2007).

En el presente estudio, 65% las cepas de *A. baumannii* mostraron tres pI (5.4, 7.0, >9), 20% mostraron dos pI (5.4, >9); mientras que, 15% de la cepas mostraron cuatro pI (5.2, 5.4, 7.0, >9), lo cual permite afirmar que existen, por lo menos, dos tipos de β -lactamasas diferentes presentes en todas éstas cepas. Al respecto, Suárez y

cols. (2006) detectaron pI en cepas multirresistentes de *A. baumannii*, comprobando que estas cepas poseen la capacidad de albergar genes que codifican para diferentes β -lactamasas, las cuales son responsables, al menos, de parte de la resistencia observada en dichas cepas. Las β -lactamasas tipo TEM tienen un pI de 5.4, es por ello que, en las cepas de *A. baumannii* utilizadas en este estudio se investigó la presencia de genes que codifican para β -lactamasas tipo TEM, mediante PCR, encontrándose que en el 100% de las mismas la amplificación fue positiva.

En cuanto a las dieciséis (16) cepas de *A. baumannii* que mostraron pI igual a 7.0, según algunos reportes de β -lactamasas conocidas, este pI se corresponde, probablemente, con una β -lactamasa tipo OXA, SHV o con una tipo PER-2, entre ellas, las más reportadas en *A. baumannii* son las tipo OXA (Afzal-Shah y cols., 2001; Navia y col., 2002; Pino y cols. 2007), las cuales no fueron objeto de estudio en esta investigación.

En el presente estudio, también se obtuvieron tres (3) cepas de *A. baumannii* productoras de una β -lactamasa con pI igual a 5.2. Comúnmente las β -lactamasas tipo TEM son reportadas con pI de 5.4, pero algunos trabajos han publicado resultados donde este tipo de enzimas tienen pI de 5.2; lo cual explicaría el haber obtenido, en este estudio, la presencia de cepas de *A. baumannii* con pI de 5.2 y con presencia de genes codificantes para β -lactamasas TEM. La variación del pI en una β -lactamasa puede verse afectado por mutaciones puntuales, las cuales afectan el pI, pero no la afinidad por el sustrato (Medeiros, 1997). Tal es el caso del estudio realizado en Oklahoma, por Kim y cols. (2005), en el cual incluyeron cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, donde se demostró que la resistencia a β -lactámicos era debida a la producción de β -lactamasas del tipo SHV-11 y TEM-1, arrojando ambas pI de 6.2 y 5.2, respectivamente.

Por otro lado, al igual que en las cepas de *A. baumannii*, en el caso de las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139, el 100% de las mismas mostró un pI>9, lo cual es indicativo de que las mismas son productoras de una enzima diferente a la TEM o tipo OXA, probablemente, este resultado esté ligado a la producción de una β -lactamasa, de tipo AmpC, lo cual no fue objeto de estudio en el presente trabajo.

Al respecto, Pino y cols. (2007), en Chile, estudiaron 69 cepas de *A. baumannii* que mostraron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, pero encontraron que solo cuatro cepas amplificaron un fragmento intragénico de genes de familia TEM, y una de ellas amplificó, también, para el gen de la familia OXA. Además evidenciaron un bajo porcentaje de cepas productoras de BLEE, y que el 100% de las cepas estudiadas mostraron pI>9, llegando a la conclusión de que la producción de AmpC es el principal mecanismo de resistencia de *A. baumannii* ante β -lactámicos.

También, Afzal-Shah y cols. (2001), por medio de la detección del punto isoeléctrico (pI), hallaron que las cepas de *A. baumannii*, incluidas en su estudio, producían varias β -lactamasas, además encontraron carbapenemasas y penicilinasas, entre otras. El pI de las penicilinasas fué característico de las β -lactamasas de los tipo TEM-1 y TEM-2 (pI= 5.4 y 5.6, respectivamente).

Por lo antes dicho, sería interesante, en próximas investigaciones, seguir caracterizando la naturaleza de las otras β -lactamasas aquí detectadas. La existencia de cepas multirresistentes de *A. baumannii* está bien documentada (Vila y cols., 1998; Hsueh y cols., 2002; Vila y Marcos, 2002; Jain y Danzinger, 2004; Diomedi, 2005; Lee y cols., 2005), sin embargo, en cuanto a otras genopecies, son pocos los estudios publicados al respecto (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Vila y cols., 1999; McDonald y cols., 1999; Rivera y cols., 2004; Beceiro y cols., 2004). En el caso de *Acinetobacter* cepa RUH 1139, cabe destacar que también hay escasa información publicada, donde se incluya la determinación de la susceptibilidad

antimicrobiana y se mencione la utilización de métodos genéticos que les permite llegar a la identificación definitiva de la especie en *Acinetobacter*, la cual puede redundar en la emisión de resultados erróneos, cuando no se aplican métodos moleculares para la identificación de la especie en cepas de *Acinetobacter* (Houang y cols., 2003; Rivera y cols., 2004; Salazar y cols. 2006).

En relación a los resultados encontrados, se puede resumir que, las cepas incluidas en el presente estudio producen diferentes β -lactamasas, comprobándose la presencia de β -lactamasas tipo TEM, la cual se ha descrito frecuentemente en cepas de *A. baumannii*, y también, en *A. calcoaceticus*, logrando explicar, en parte, la resistencia observada en las cepas ante la penicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación, pero no explica el comportamiento de las cepas de *A. baumannii* ante las cefalosporinas de amplio espectro. La presencia de una β -lactamasa tipo OXA podría explicar la resistencia observada ante la amoxicilina más ácido clavulánico, ticarciclina, piperacilina, cefalotina y, posiblemente, a cefotaxima y ceftazidima (Vila y Marco, 2002). Por otra parte, la β -lactamasa tipo AmpC, según el pI encontrado (pI 9.0), también se ha descrito comúnmente en *A. baumannii*, a nivel cromosomal; la sobre expresión de dicha β -lactamasa es un mecanismo frecuente de resistencia a β -lactámicos, generando resistencia a ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima y pudiera involucrar también, a ceftazidima (Bou y cols., 2000; Dánes y cols., 2002; Pino y cols., 2007).

Debido a la multirresistencia que *Acinetobacter* sp. ha venido desarrollando, de manera significativa, durante los últimos años, a nivel hospitalario, es indispensable el uso racional de los distintos agentes antimicrobianos, ya que de esta manera se puede prevenir la sobrevivencia y diseminación de este microorganismo causando nuevas infecciones, perpetuándose en el tiempo.

Los agentes antimicrobianos, en especial los β -lactámicos, no deben ser empleados como agentes terapéuticos a ciegas para tratar las infecciones causadas por *A. baumannii*. Estos solo deben ser usados cuando los estudios de susceptibilidad antimicrobiana demuestren resultados satisfactorio sobre su actividad frente al agente causal; sobretodo en casos donde las cepas no puedan ser diferenciadas molecularmente (González y Satiferal, 1996; Shakil y cols., 2008).

CONCLUSIONES

Las cepas de *A. baumannii* fueron más resistentes a los antimicrobianos β -lactámicos con respecto a las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139.

El imipenem y meropenem tuvieron más del 85% de actividad *in vitro* frente a ambas genoespecies de *Acinetobacter*, siendo estos antibióticos los más activos entre los β -lactámicos probados.

Todas las cepas de *A. baumannii* estudiadas fueron productoras de β -lactamasas cuyos genes fueron correspondientes a la familia TEM.

RECOMENDACIONES

La especie *A. baumannii* es considerada patógeno nosocomial, capaz de adaptarse muy rápidamente al ambiente intrahospitalario, por lo que, sin duda alguna, puede continuar siendo un problema a futuro. Es de mayor preocupación aún el observar estos resultados, debido a la resistencia que han mostrando estas bacterias frente a los β -lactámicos ensayados. Por tal motivo, se considera importante controlar el uso indiscriminado de antibióticos, para disminuir la aparición de nuevas cepas multirresistentes.

Determinar la susceptibilidad de *A. baumannii* frente a otros antimicrobianos (aminoglucósidos, quinolonas), ya que, estos pudieran servir como terapia alternativa.

Continuar con los estudios genéticos, para la detección de otro tipo de enzimas, así como de otros mecanismos de resistencia presentes en estas cepas y que puedan estar involucradas en la resistencia desarrollada, por parte de este microorganismo, frente a los antibióticos β -lactámicos.

BIBLIOGRAFÍA

Afzal-Shah, M.; Woodford, N. y Livermore, D. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents. Chemother., 45(2): 583-588.

Bauer, A.; Kirby, M.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic Susceptibility testing by standardized single disk method. J. Clin. Pathol., 9(45): 493-496.

Beceiro, A.; Domínguez, L.; Rivera, A.; Vila, J.; Molina, F.; Villanueva, R.; Eiros, J. y Bou, G. 2004. Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC β -lactamase in a clinical strain of *Acinetobacter* genomic species 3. Antimicrobial. Agents. Chemother., 48(4): 1374-1378.

Bello, H.; González, G.; Domínguez, M.; Zemeleman, R.; García, A. y Mella, S. 1997. Activity of selected β -lactams; Ciprofloxacin, and Amikacin against Different *Acinetobacter baumannii* Biotypes from Chilean Hospitals. Diagnostic. Microbiol. Infect. Dis., 28: 183-186.

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

Blehschmidt, B.; Bomeleit, P. y Kléber, H. 1992. Purification and characterization of an extracellular β -lactamase produced by *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Microbiol., 138: 1197-202.

Bou, G.; Oliver, A. y Martínez-Beltrán, J. 2000. OXA-24, a novel class D β -lactamase activity in an *Acinetobacter baumannii*. Clinical strain antimicrobial. Agents. Chemother., 44: 1556-1561.

Bouvet, P. y Grimont, P. 1987. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp., nov.; *Acinetobacter haemolyticus* sp., nov.; *Acinetobacter johnsonii* sp., nov., and *Acinetobacter junii* sp., nov., and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter woffii*. Int. Syst. Bacteriol., 36(2): 228-240.

- Bradford, A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21 Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Review., 14(4): 933-951.
- Buisson, Y.; Tran Van Nhieu, G.; Ginot, L.; Bouvet, P.; Schill, H.; Driot, L. y Meyran, M. 1990. Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant, tobrayicin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation con amikacin usage. J. Hosp. Infect., 15: 83-93.
- Burke, A. 2000. Antibiotic resistance. Med. Clin. Of North American., 84: 6.
- Bush, K.; Jacoby, G. y Madeiros, A. 1995. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemother., 39: 1211-1233.
- Carmona, O.; Guzmán, M.; Comegna, M.; Castro, J. y Grupo Venezolano de Vigilancia de Resistencia Bacteriana. 2003. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Periodo Julio 2001-Diciembre 2002. RSVM., 23(1): 89-97.
- Carr, E.; Kämpfer, P.; Patel, B.; Gürtler, V. y Serviour, R. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int. Syst. Evol. Microbiol., 53: 953-963.
- Center for Disease Control (C.D.C). 1999. Laboratory detection of extended spectrum β -lactamases (ESBLs). <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/lab/fact_sheet/esb.htm> (06/03/01).
- Chamber, H.; F. y Sande, M. 1996. Fármacos Antimicrobianos. Novena edición. Mc Graw – Hill. México.
- Chu, Y.W.; Leung, C.M.; Houang, E.T.; Cheng, K.C.; Leung, C.B.; Leung, H.Y. y Cheng, A.F. 1999. Skin carriage of *Acinetobacter* in Hong Kong. J. Clin. Microbiol., 37(7): 2962-2967.
- Clinical y Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for disk difusión antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved. 23: 3.
- Cookson, B. 2005. Interim working party guidance on the control of multi-resistant-*Acinetobacter* outbreaks. <http://hopking-heic.org/infectious_diseases/acinetobacter.html> (05/09/2007).

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

Danés, C., Navia, M. M, Ruiz, J., Marco, F., Jurado, A., Jiménez de Anta, M. T., y Vila., J. 2002. Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* Clinical isolates and the effect of syn (AmpC inhibitor) on the MICs of different β -lactam antibiotics. J. Antimicrobial. Chemother., 50: 261-264.

Dijkshoorn, L.; Van Dalen, R.; Van Ooyen, A.; Bijil, D.; Tjernberg, I.; Michel, M. F. y Horrevorts, A. M. 2003. Endemic *Acinetobacter* in intensive care units: epidemiology and clinical impac. J. Clin. Pathol., 46: 533-536.

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

Domínguez, M.; Zemelman, C.; Bello, H.; González, G.; Zemelman, R. y García, A. 1996. Betalactamasas plasmidiales en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a cefotaxima y ceftazidima. Abstracts of the XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Abstr MB 026, p. 313. In Caracas, Venezuela.

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

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

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

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

French, G.; Shannon, K. y Simmons, M. 1996. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad spectrum cefalosporins and β -lactam- β - lactamases inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 β -lactamase. J Clin. Microbiol., 34: 358-363.

Garrity, G.; Winters, M. y Searles, D. 2002. Bregey's manual of systematic bacteriology. Taxonomic outline of the prokaryotic. <<http://www.cme.msu.edu/bergeys/outlines.prn.pdf>> (01/06/2002).

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

Giarmarellos-Bourboulis, E.; Greka, P. y Giarmarellos, H. 2000. *In vitro* activity of rifampin (R), of colimicin (C), of Meropenem (M), and Trovafloxacin (T) on nosocomial *Acinetobacter* sp. *Rev. Esp. European Congreso of Chemotherapy. Abstract Book. T217. Quimioterapia.*, **13**(2): 88.

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

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

Heritier, C.; Dubouix, A.; Pore, L.; Marty, N. y Nordmann, P. 2005. Nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hidrolising oxacilinase OXA-58. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**: 115-118.

Hood, J. y Amyes, S. 1991. The chromosomal β -lactamases of genus *Acinetobacter* enzymes which challenge our imagination. En: Towner, K.; Bergogne-Bérézin, E. y Fewson, C. (Eds). *The biology of Acinetobacter*. Plenum Publishing Corp., New York. 117-132.

Houang, E.; Chu, Y.; Chu, K.; Leung, C. y Chen, A. 2003. Significance of genomic DNA group delineation in comparative studies of antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. *Antimicrobiol. Agents. Chemother.*, **47**: 1472-1475.

Hsueh, P.; Teng, L.; Chen, C.; Chen, W.; Yu, C.; Ho, S. y Luh, K. 2002. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg. Infet. Dis.*, **8**: 827-832.

Huys, G., Cnockaert, M. y Vaneechoutte, M. 2004. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistent *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospital. *Res. Microbiol.*, **156**: 348-355.

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

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

Jalier, V.; Nicolás, M; Fournier, G. y Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Arch. Microbiol., 10: 867-877.

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

Jones, R. 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. Chest., 119(2): 397-404.

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

Kim, S.; Wei, C.; Tzou, Y. and An, H. 2005. Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. J. Food. Prot., 68(10): 2022-9.

Keith, S.; Henry, S. y Elias, A. 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. Infect. Dis. Clin North Am., 14(2): 293-319.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 1998. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5^o Edición. Philadelphia-New York.

Kotimopoulos, N.; Roussou, Z.; Merkouri, H.; Nanos, G.; Melas, J.; Kyriakopoulos, C. y Kitsou, S. 2000. In Vitro susceptibility of multiresistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Esp. Quimioterap. European Congress of Chemotherapy. Abstrct Book. T118. 13(2): 63.

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

- Larson, E. 1984. A decade of nosocomial *Acinetobacter*. Am J. Infect. Control., 12: 14-18.
- Lee, C.; Lim, H.; Liu, C. y Tseng, H. 2005. Treatment of pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Scand J. Infect. Dis., 37: 195-199.
- Leturia, A.; Cobos, J. y Díaz, L. 1997. Estudio de las resistencias a antibióticos de *Acinetobacter* en infecciones urinarias en una unidad de enfermos con lesión medular. Rev. Esp. Quimioterap., 10: 236-239.
- Ling, J.; Cheng, K.; Cheng, A. y Norrby, R. 1996. Susceptibilities to 23 antimicrobial agents and β -lactamase production of blood culture isolate of *Acinetobacter* sp in Hong Kong. Scand J. Infect. Dis. Suppl., 101: 21-25.
- Livermore, D. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev., 8: 557-584.
- Livermore, D. 1996. Are all β -lactams created equal?. Scandinavian Journal of Infect. Dis., (suppl 101): 33-43.
- López, S; y López-Brea, M. 2000. ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*?. Enferm. Infect. Microbiol. Clin. 18: 153-158.
- López-Hernández, S.; Alarcón, T.; Delgado, T.; De las Cuevas, M., y López-Brea, M. 2001. Actividad in Vitro de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. <<http://diariomédico.com/microbiología/n281299.html>> (10/02/02).
- Marcos, M. 2001. *Acinetobacter baumannii*. ><http://www.semic.org/control/revi-bacte/acinetobacter.htm>> (9/06/02).
- Martínez, J. 2001. Inhibición de mecanismos de permeabilidad y bombeo. <<http://www.altavista.com>> (04/10/02).
- Mathew, A.; Harris, A.; Marshall, M. y Ross, G. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. J. Microbiol., 88: 169-178.
- McDonald, A.; Amyes, S. y Paton, R. 1999. The persistence and clonal spread of a single strain of *Acinetobacter* 13TU in a large Scottish teaching hospital. J. Chemother., 11: 338-344.

- Medeiros, A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generation of β -lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis., 24(1): S19-S45.
- Mesa, L.; Ramos, A.; Nadal, L.; Morffi, J.; Hernández, E.; Alvarez, A.; Marchena, J. 2007. Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* De aislados clínicos hospitalares. Rev. Cubana. Med., 59(1): 22-36.
- Navarro, P.; Andrade, E.; Villarroel, E.; Sánchez, C. y Montes, J. 2001 Infecciones por *Acinetobacter baumannii*: procedencia hospitalaria y susceptibilidad antimicrobiana. Antib. Inf., 9(4): 161-164.
- Navia, M.; Ruíz, J.; and Vila, J. 2002. Characerization of an integron carry a new class D β -lactamase OXA 37 in *Acinetobacter baumannii*. Microb. Drug Resist.J. Syst. Evol. Microbiol., 8: 261-265.
- Nemec, A.; Dijkshoorn, L.; Cleenwerck, L. De Baere, T.; Jassens, D.; Van der Reijden, T.; Jezek, P. y Vanechoutte, M. 2003. *Acinetobacter parvus*. Nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 1563-1567.
- Nuñez, M.; Martínez, M.; Simarro, E.; Segovia, M. y Ruíz, J. 1998. Appearance of resistance to meropenem during the treatment of a patient with meningitis by *Acinetobacter*. Scand. J. Dis., 30: 421-423.
- Pandey, A.; Kapil, A.; Sood, S., Goel, V.; Das, B. y Seth, P. 1998. *In vitro* activities of ampicilin-sulbactam and amoxicilin-clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Dis., 36: 3415-3416.
- Pedroza, R.; Torres, L.; Narváez, P.; Alonzo, G. y Rodríguez, V. 2001. Multiresistencia a agentes antimicrobianos medida por plásmidos en bacilos gramnegativos de origen hospitalario. M.I.B.E., 3: 97-100.
- Peleg, A.; Franklin, C.; Walter, I. and Spelman, D. 2006. OXA 58 and IMP 4 Carbapenem Hidrolyzing β -lactamases in an *Acinetobacter junii* Blood Culture isolate from Australia. Antimicrob. Agents.Chemother., 50: 399-400.
- Pournara, S.; Markogiannakis, A.; Ikoomidis, A.; Kondyli, L. and Tsakris, A. 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA 58 cabapenemase I an intensive care unit. J. Antimicrob. Chemother., 57: 577-561.

Pino, C.; Domínguez, M.; González, G.; Bello, H.; Sepúlveda, M.; Mella, S.; Zemelman, C. y Zemelman, R. 2007. Producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales VIII^a región, Chile. Rev. chil., 24(2): 137-141.

Pinzón, J.; Mantilla, J. y Valenzuela, E. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. Infect., 10(2): 78-85.

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

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

Rossau, R.; Van Landschoot, A.; Gillis, M. y De Ley, J. 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. Nov. a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 310-319.

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

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

Salazar, E. y Nieves, B. 2005. *Acinetobacter* sp., aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Rev. Sociedad Venezolana de Microbiología., 25: 64-71.

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

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

- Sato, K. y Nakae, T. 1991. Outer membrana permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother., 28: 33-45.
- Seifert, H.; Strate, A. y Pulverer, G. 1995. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. clinical features, epidemiology and predictors of mortality. Medicine., 74: 340-349.
- Shakil, S.; Khan, R.; Zarrilli, R. y Khan. U. 2008. Aminoglycosides versus bacteria-a description of the acton, resistance mechanism, and nosocomial battleground. J. Biomed. Scienc., 15: 5-14.
- Shi-Yuan, S.; Yuk-Fong Liu, P.; Yen- Jun, L.; Yu-Hui, L.; Bor-Shen, H. y Jainn-Ming, S. 1996. Antimicrobial Susceptibility of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 24: 81-85.
- Spence, R.; Twoner, K.; Henwood, C.; James, D.; Woodforf, N. y Livermore, D. 2002. Population structure and antibiotic resistance of *Acinetobacter* DNA group 2 and 13TU isolates from hospitals in the UK. J. Med. Microbiol., 51: 1107-1112.
- Struelens, M.; Carlier, E.; Maes, N.; Serruys, E.; Quint, W. y Belkum, A. 1993. Nosocomial colonization and infection with multiresistans *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction análisis and PCR-fingerprinting. J. Hosp. Infect., 25: 15-32.
- Suárez, C.; Catan, J.; Guzmán, A. y Villegas, M. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Infect., 10(2): 85-93.
- Vahaboglu, H.; Budak, F.; Kasap, M.; Gacar, G.; Torol, S.; Karadenizli, A., and Eroglu. 2006. High prevalence of OXA 58 yype class D β -lactamases among ceftazidime resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp. Co existence with OXA 58 inmultiple center. J. Antimicrob. Chemother., 58: 537- 542.
- Vila, J. 1998. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. Rev. Med. Microbiol., 9: 87-97.
- Vila, J. y Marco, F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativas no fermentadores. Enferm. Infect. Microbiol. Clin., 20(6): 304-312.
- Vila, J.; Marcos, A.; Marcos, F.; Abdalla, S.; Vergara, Y.; Reig, R.; Gómez-Luz, R. y Jimenez, T. 1993. In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside modifying enzymes, and chloramphenicol acetytransferase by and susceptibility of

clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents. Chemother., 37: 138-141.

Vila, J.; Ruíz, J. y Navia, M. 1999. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemia strain. J Clin. Microbiol., 37: 758-761.

Wisplinghoff, H.; Decker, M.; Haefs, C.; Krut, O.; Plum, G. y Seifert. 2003. Mutation in *gyrA* y *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbial. Chemother., 30: 2921-2929.

HOJA DE METADATOS

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

| | |
|------------------|---|
| Título | β -LACTAMASAS TIPO TEM EN CEPAS DE <i>Acinetobacter</i> sp. AISLADAS DEL INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES (IAHULA), MÉRIDA, ESTADO, MÉRIDA. |
| Subtítulo | |

Autor(es)

| Apellidos y Nombres | Código CVLAC / e-mail | |
|---------------------------|-----------------------|--|
| CINTHIA LINET TOVAR AMAIZ | CVLAC | 16 314 824 |
| | e-mail | cinth83@hotmail.com |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |

Palabras o frases claves:

| |
|--|
| β -lactamasas, β -lactámicos, <i>Acinetobacter</i> |
| |
| |
| |

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

Líneas y sublíneas de investigación:

| Área | Subárea |
|----------|-------------|
| Ciencias | Bioanálisis |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Resumen (abstract):

Con el objeto de determinar la presencia de β -lactamasas tipo TEM en cepas clínicas y ambientales de *Acinetobacter* sp., aisladas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, estado Mérida, se estudiaron 43 cepas, 20 correspondían a *Acinetobacter baumannii* y 23 a *Acinetobacter* RUH 1139, dichas cepas fueron obtenidas de pacientes recluidos en la unidad de cuidados intensivos de adultos y en la unidad de alto riesgo neonatal y previamente identificadas, tanto bioquímica como molecularmente. La susceptibilidad de las mismas frente a 14 β -lactámicos ensayados, se determinó mediante la prueba de difusión en disco. La investigación de β -lactamasas se realizó mediante la prueba de nitrocefina, sinergismo de doble disco, isoelectroenfoque (pI) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a ampicilina, piperacilina y cefoxitin, el 95% fué resistente a cefotetan y cefuroxime; mientras que los carbapenemos fueron los antimicrobianos más activos. En el caso de las cepas identificadas como *Acinetobacter* RUH 1139, el 100% mostró resistencia ante ampicilina y cefamicinas, mientras que la ampicilina sulbactam y los carbapenemos fueron los agentes antimicrobianos más activos. Por la prueba de nitrocefina y punto isoeléctrico, tanto en las cepas de *A. baumannii* como las de *Acinetobacter* RUH 1139 fueron productoras de β -lactamasas. Se detectó una β -lactamasa con pI >9 en todas las cepas estudiadas, y una β -lactamasa con pI de 5.4 en todas las cepas de *A. baumannii*, pero no en las cepas de *Acinetobacter* RUH 1139. El gen que codifica para β -lactamasas tipo TEM fue hallado solo en las cepas de *A. baumannii*.

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

Contribuidores:

| Apellidos y Nombres | ROL / Código CVLAC / e-mail | |
|---------------------|-----------------------------|--|
| ELSA SALAZAR | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 10 460 717 |
| | e-mail | elsazul2003@cantv.net |
| | e-mail | |
| MILITZA GUZMÁN | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 8 954 225 |
| | e-mail | militzaguz@cantv.net |
| | e-mail | |
| YASMINA ARAQUE | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 8 000 717 |
| | e-mail | yasmasi40@hotmail.com |
| | e-mail | |
| | ROL | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |

Fecha de discusión y aprobación:

| Año | Mes | Día |
|------|-----|-----|
| 2009 | 04 | 01 |

Lenguaje: Spa

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

Archivo(s):

| Nombre de archivo | Tipo MIME |
|--------------------------|------------------|
| Tesis_MCBC.doc | Aplicattion/word |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Alcance:

Espacial : Universal (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO: Licenciatura en Bioanálisis

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO: Licenciatura

ÁREA DE ESTUDIO: Bioanálisis

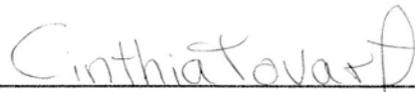
INSTITUCIÓN(ES) QUE GARANTIZA(N) EL TÍTULO O GRADO:

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

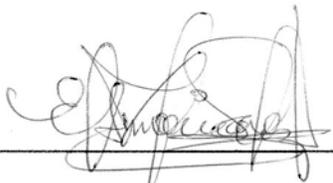
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de difundir por cualquier medio el resumen de este trabajo de investigación. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales y comerciales.



Cinthia Linet Tovar Amaiz



Profa. Elsa Salazar



Profa. Militza Guzmán



Profa. Yasmina Araque

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

