



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

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y DETECCIÓN DE GENES DE  
RESISTENCIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASAS, EN CEPAS  
DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS  
(Modalidad: Investigación)

ENSONY JOSÉ TOVAR MARVAL

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

CUMANÁ, 2008

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y DETECCIÓN DE GENES DE  
RESISTENCIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASAS, EN CEPAS  
DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS  
(Modalidad: Investigación)

Aprobado por:

---

Prof. Marcos De Donato

Asesor

---

Profa. Dina Antón

Coasesora

---

Profa. Lorena Abadía

Jurado

---

Profa. Yasmina Araque

Jurado

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	5
Muestra.....	5
Análisis bacteriológico.....	5
Pruebas bioquímicas convencionales .....	5
Kligler: .....	5
Oxidasa:.....	5
Motilidad:.....	6
Oxidación de azúcares.....	6
Crecimiento a 42 °C: .....	6
Susceptibilidad a Polimixina B.....	7
Descarboxilación de la lisina: .....	7
Hidrólisis de la arginina .....	7
Hidrólisis de la esculina: .....	7
Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana .....	8
Selección de cepas resistentes .....	8
Detección de BLEE inhibibles por ácido clavulánico.....	9
Detección de metalobetalactamasas .....	9
Extracción de ADN.....	9
Detección de genes de resistencia.....	10
Control de calidad .....	11
Análisis de datos .....	11
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN .....	20
CONCLUSIONES .....	25
RECOMENDACIONES .....	26
BIBLIOGRAFÍA .....	27

## **DEDICATORIA**

A Dios Todopoderoso y a la Virgen del Valle

A mi hijo Ensony Jesús, quien me motiva y da muchas fuerzas y razones para superarme y seguir adelante.

A mi abuelita Lulú y mi hermana Marielvys a quienes siempre llevo en mi mente y mi pecho.

A mis Padres Ensony y Fanny, quienes incansable e incondicionalmente dan lo mejor de Sí para ayudarme, apoyarme y guiarme en todos los aspectos de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y la Virgen del Valle

A mis Padres Ensony y Fanny, a quienes siempre doy gracias por toda la ayuda y apoyo que me proporcionan.

A mi esposa, quien con su paciencia y constancia me ayuda, y, me dio lo más bello de la vida, un Hijo.

Al personal del Laboratorio Clínico Universitario II y SAHUAPA, Licenciada Maira Maita, Licenciada Belkys Medina, Prof. Márquez Flores, quienes me abrieron las puertas para iniciar esta investigación.

A mis amigas Dianny e Hiljanny quienes me acompañaron a lo largo de la carrera.

A los profesores Marcos De Donato, Dina Antón, Militza Guzmán y Hectorina Randulfo por su asesoría y cooperación.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la PCR para amplificar genes de Betalactamasas. .....	11
Tabla 2. Cepas de <i>P. aeruginosa</i> , según servicio. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.....	13
Tabla 3. Cepas de <i>P. aeruginosa</i> , según tipo de muestra. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006. ....	13
Tabla 4. Patrones fenotípicos de resistencia a betalactámicos y detección de genes de resistencia <i>Bla<sub>SHV</sub></i> y <i>VIM</i> en cepas de <i>P. aeruginosa</i> . Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.....	18

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de resistencia y sensibilidad de <i>P. aeruginosa</i> frente a los antimicrobianos ensayados. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006. ....	14
Figura 2. Distribución porcentual de BLEE, metalobetalactamasas y BLEE + metalobetalactamasas en cepas de <i>P. aeruginosa</i> , según método de detección fenotípica. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.....	15
Figura 3. Cepa de <i>P. aeruginosa</i> con fenotipo BLEE positivo proveniente del servicio de observación pediátrica del SAHUAPA. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.....	15
Figura 4. Cepa de <i>P. aeruginosa</i> con fenotipo metalobetalactamasa positivo proveniente del retén del SAHUAPA. Cumaná, estado Sucre. ....	16
Enero – marzo 2006. ....	16
Figura 5. Distribución porcentual de la presencia de genes VIM y <i>bla</i> <sub>SHV</sub> en cepas de <i>P. aeruginosa</i> , mediante el uso de PCR. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006. ....	17
Figura 6. Verificación de la amplificación del gen <i>bla</i> <sub>SHV</sub> en ..... electroforesis (Gel de agarosa al 1%).....	18
Figura 7. Verificación de la amplificación del gen VIM en ..... electroforesis (Gel de agarosa al 1%).....	18

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo no fermentador de azúcares, considerado actualmente un importante agente patógeno responsable de infecciones comunitarias y nosocomiales, debido principalmente a la elevada resistencia a los antimicrobianos betalactámicos por la producción de betalactamasas cromosómicas inducibles y/o plasmídicas. El objetivo de la investigación fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y detectar la presencia de genes de resistencia relacionados con la producción de betalactamasas en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas. Se estudió un total de 66 cepas provenientes del Servicio Autónomo “Hospital Antonio Patricio de Alcalá” y del Laboratorio Clínico Universitario II, de la ciudad de Cumaná. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en agar; la determinación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y metalobetalactamasas (MTBL) se realizó mediante el método fenotípico de sinergia con amoxicilina-ácido clavulánico y el método de doble disco con EDTA, respectivamente. La detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y VIM se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los mayores porcentajes de resistencia fueron para aztreonam (54,60%), piperacilina (36,40%) y ceftazidime (28,80%). Un total de 17 aislados (25,80%) presentaron fenotipo BLEE positivo mientras que 8 cepas de un total de 10 resistentes a imipenem y/o meropenem, presentaron fenotipo compatible con MTBL. Se detectaron únicamente los genes *bla<sub>SHV</sub>* (3 cepas) y VIM (6 cepas). El fenotipo de resistencia más común fue el de sensibilidad a ceftazidime, piperacilina e imipenem con resistencia a aztreonam (15 cepas). Los resultados evidencian la presencia de BLEE y MTBL en cepas de *P. aeruginosa* en la región y contribuyen con el conocimiento de la epidemiología fenotípica y molecular de las mismas.

## INTRODUCCIÓN

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 antibiótico (Bush y cols., 2000). Los primeros reportes clínicos de resistencia bacteriana a nivel mundial comienzan aproximadamente hace 40 años, con un progresivo y constante aumento a través de los años, debido, principalmente, al uso inadecuado e indiscriminado de la terapia antimicrobiana (Jackson y cols., 1998; Okeke y cols., 1999).

La adquisición y posterior diseminación de determinantes de resistencia antibiótica, en poblaciones de bacterias patógenas representa un problema importante para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Calvo y cols., 2002). La presencia de la resistencia bacteriana se da por la expresión de genes cromosómicos, los cuales son naturalmente intrínsecos de la bacteria, y/o genes extracromosómicos que son generalmente adquiridos, a través de intercambio genético con otras bacterias (Keith y cols., 2000).

Existen diversos mecanismos por los cuales las bacterias crean resistencia a los antimicrobianos, entre los más relevantes se encuentran: I) disminución de la permeabilidad de la membrana celular, lo cual dificulta el ingreso del antibiótico a la célula bacteriana; II) alteración del sitio de acción del antibiótico con la consecuente pérdida de afinidad de este por su sitio de acción y III) la modificación o inactivación del antibiótico por enzimas, siendo ésta última la forma más común de resistencia adquirida, determinada en gran medida, por la producción de enzimas, entre ellas se encuentran las betalactamasas (Jackson y cols., 1998).

Las betalactamasas constituyen la causa más frecuente de resistencia a los antibióticos betalactámicos; son un complejo grupo de enzimas con propiedades diferenciales en función del sustrato que hidrolizan o las inhibe (parámetros cinéticos), su localización (intra o extracelular), su codificación (cromosómica y/o extracromosómica), expresión genética (constitutiva o inducible) y otras propiedades

físico-químicas utilizadas para clasificarlas. Su mecanismo de acción se basa en unirse al antibiótico betalactámico, formando un complejo no covalente que genera una estructura acil-enzima, por unión del antimicrobiano con el grupo hidroxilo de la serina del centro activo. Existen betalactamasas con un espectro de acción mayor, llamadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), entre las cuales se pueden mencionar SHV, TEM, CTX y PER (Burke, 2000; Bradford, 2001).

En las últimas décadas, se ha detectado que *Pseudomonas aeruginosa* tiene elevados porcentajes de resistencia a los agentes antimicrobianos, siendo considerada en la actualidad como un importante agente patógeno oportunista por excelencia, responsable de infecciones comunitarias y, sobre todo, nosocomiales (Higgins y cols., 2001). Es un bacilo Gram negativo, aerobio estricto, móvil, no fermentador de azúcares, oxidasa positivo, productor de pigmentos fluorescentes (pioverdina, piocianina, piorrubina); perteneciente al orden Pseudomonadales, familia *Pseudomonadaceae*. Este microorganismo es causante del 50% de neumonías, del 25-50% de bacteriemias fatales y, además, se presenta con una alta tasa de morbi-mortalidad (más del 75%) en las infecciones nosocomiales (Salasar y cols., 2002; Vila y Marco, 2002; Carvalho y cols., 2005).

*P. aeruginosa* posee una elevada resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, en especial a los betalactámicos, principalmente conferida por la producción de betalactamasas cromosómicas inducibles y/o plasmídicas, lo cual dificulta la terapéutica (Bradford, 2001). Se ha demostrado la capacidad que presenta este microorganismo para adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Uno de éstos, es la presencia de bombas de eflujo con capacidad para expulsar antimicrobianos betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprin, mientras que, la resistencia a quinolonas se relaciona con alteraciones de las topoisomerasas y las porinas (Vila y Marco, 2002). Por otra parte, presenta una escasa permeabilidad de la membrana externa, lo cual representa un mecanismo de resistencia natural (Poole, 2001).

*P. aeruginosa* produce varias enzimas betalactamasas, las cuales pueden ser codificadas por genes cromosómicos y, en ocasiones, pueden expresar otras de origen

extracromosómico. Sin embargo, debido a la importancia cuantitativa y a su gran difusión, merecen mención especial TEM, SHV, PER, CTX y OXA, sobre el resto de las enzimas. La gran distribución, tanto geográfica como específica, de estas enzimas, se debe a que los genes que las codifican se encuentran asociados a plásmidos de diversos grupos de incompatibilidad. Otra de las betalactamasas producidas por *P. aeruginosa* es la enzima AmpC, la cual es codificada por genes cromosómicos e inducida por la presencia de betalactámicos (Livermore, 1995). En la actualidad están cobrando gran importancia los mecanismos de resistencia a los carbapenemes, mediante la producción de enzimas carbapenemasas, estas son metaloenzimas que pueden hidrolizar a todos los betalactámicos a excepción del aztreonam (Tsakris, 2003; Sánchez y cols., 2004). Las metaloenzimas se clasifican, en base a la secuencia de aminoácidos, en cuatro familias: IMP, VIM, SPM, SIM y GIM (Andrade, 2005; Rossolini, 2005).

Echevarría y cols. (2000), aislaron 302 cepas de *P. aeruginosa* en trece centros asistenciales y obtuvieron resistencia a ceftriaxona de 83,30%, en el servicio de emergencia y 79,10% en medicina interna, de igual forma se observó resistencia a cefoperazona, de 50,00% y de 43,30% para esos mismos servicios, respectivamente.

Salasar y cols. (2002), estudiaron el comportamiento de 68 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en Cuba, frente a los antimicrobianos anti-*Pseudomonas*, (piperacilina, ticarcilina, entre otros) y encontraron 35,70% de resistencia a cefotaxima. En Jamaica, Izundu y Brown (2004) hallaron tasas de resistencia de 11,80% a tobramicina y de 17,60% a ceftazidima, en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de secreciones de oído.

En Venezuela se ha venido estudiando la resistencia de *P. aeruginosa* a los agentes antimicrobianos desde 1987. Estudio realizado por Bermúdez y cols., en 3 centros clínicos de Caracas (1993), reportó que *P. aeruginosa* presentó resistencia a ceftazidima (25,00%) y cefoperazona (31,00%), mientras que en un trabajo de investigación realizado en Maturín, estado Monagas, en pacientes hospitalizados se encontró 29,86% de resistencia a amikacina y 35,00% de resistencia a netilmicina (Ysacis y cols., 2000). En una investigación llevada a cabo por Martín y cols. (2003), en diversos centros médicos públicos y privados de

Venezuela, se encontró 30,00% de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem y 20,00% resistencia a meropenem.

En el 2003, Mendoza y cols. en Caracas, evaluaron 91 cepas de *P. aeruginosa* en pacientes ambulatorios, de donde obtuvieron 17,00% de resistencia a ceftazidima y 14,00% a cefepime, esta última una cefalosporina de cuarta generación.

El grupo venezolano de vigilancia de la resistencia bacteriana (2003), reportó porcentajes de resistencia de *P. aeruginosa* a cefoperazona (15,20%), cefepime (1,6%) y aztreonam (11,8%) en 35 hospitales del país para el período de julio – diciembre 2002.

A nivel mundial, la presencia de genes que codifican para betalactamasas es distinta para cada región. En Grecia, Tsakris y cols. (2000), detectaron genes de tipo VIM en 6 aislados de *P. aeruginosa* de un total de 35 cepas. Celenza y cols. (2006), hallaron en Bolivia 12 aislados productores de BLEE codificados por genes de tipo PER.

En vista de que *P. aeruginosa* es causante de un gran número de infecciones comunitarias y nosocomiales, responsable de elevados porcentajes de resistencia ante múltiples antimicrobianos betalactámicos, debido principalmente a la producción de betalactamasas, el objetivo de la presente investigación fue estudiar la susceptibilidad antimicrobiana y detectar la presencia de genes que codifican para betalactamasas en cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de muestras clínicas provenientes de pacientes de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, con el fin de suministrar información sobre el patrón de susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos betalactámicos y el tipo de betalactamasa prevalente en la región.

## **METODOLOGÍA**

### **Muestra**

Para este estudio se utilizaron aislados clínicos bacterianos previamente identificados como *P. aeruginosa*, provenientes de diversos tipos de muestras, suministrados por el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA) y el Laboratorio Clínico Universitario II (LCU II - Rental Sucre), de la ciudad de Cumaná, durante los meses de enero, febrero y marzo de 2006. Estos aislados se preservaron en medio de conservación hasta el momento de su procesamiento.

### **Análisis bacteriológico**

Para garantizar la viabilidad y pureza de los aislados obtenidos, se realizaron cultivos y pruebas bioquímicas, siguiendo los procedimientos y esquemas de identificación, establecidos para bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa, para ello, los aislados obtenidos se cultivaron en placas con agar tripticosa soya, agar cetrimide y agar MacConkey, incubándose por 24 horas a 37 °C. A partir del crecimiento bacteriano se verificaron las características morfológicas de las colonias y la producción de pigmento. La identificación bioquímica se realizó mediante pruebas convencionales (Koneman y cols., 2004).

### **Pruebas bioquímicas convencionales**

#### **Kligler:**

A partir del agar nutritivo se tomó un inóculo de las colonias y se procedió a sembrar en agar Kligler para demostrar el carácter no fermentador de azúcares, mediante la técnica de punción y estrías, incubándose a 35 °C por 24 horas. La no fermentación de los azúcares se verificó por la ausencia en el cambio de color del indicador.

#### **Oxidasa:**

La producción de la enzima citocromo-oxidasa es una prueba que permite diferenciar familias de bacterias pertenecientes al grupo de bacilos Gram negativos no fermentadores.

Para esta prueba se utilizó el reactivo dihidrocloruro de tetrametilparafenilendiamina al 1%, con éste se impregnó un trozo de papel filtro Whatman n° 5, con un palillo de madera se colocó una colonia del microorganismo, tomada a partir del crecimiento en agar tripticasa de soya. La aparición de un color púrpura en un lapso de 20 segundos, indicó una reacción positiva.

#### Motilidad:

Se realizó mediante la siembra por punción en agar sulfhidrilo indol motilidad (SIM), sólo a los 4 mm superiores del medio, la lectura se realizó a las 24 horas. La positividad de la prueba se evidenció mediante la presencia de una nubosidad turbia difundida por todo el medio, la negatividad de la prueba (sin motilidad) se leyó por la presencia de una línea limitada en el sitio de punción, manteniéndose el medio claro alrededor.

#### Oxidación de azúcares

La oxidación de los azúcares glucosa, manitol y maltosa se evidenció mediante la inoculación por duplicado en tubos que contenían medio basal oxidación-fermentación (O/F), con 1% de carbohidratos, de los cuales, uno debió sellarse con parafina líquida estéril. Esta prueba se incubó a 35 °C, durante 24 horas. Las reacciones oxidativas y fermentativas se evidenciaron por el cambio del indicador de verde a amarillo por la presencia de ácido.

#### Crecimiento a 42 °C:

Las colonias seleccionadas se repicaron en agar tripticasa soya e incubaron a 42 °C por 24 horas. El crecimiento de la bacteria a dicha temperatura se tomó como positiva.

## Susceptibilidad a Polimixina B

Se probó en conjunto con las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La formación de un halo de inhibición mayor o igual a 12 mm de diámetro se consideró sensible (CLSI, 2007).

## Descarboxilación de la lisina:

Esta prueba permitió medir la capacidad enzimática del microorganismo para descarboxilar un aminoácido y formar una amina, utilizando el método de Möeller, que se basa en el cambio de pH. Se inoculó el medio con la cepa a estudiar e incubó a 35°C por 24 horas. Se incluyó un tubo control no inoculado y libre de aminoácidos para comparar las reacciones. Ambos tubos se sellaron con parafina líquida para proporcionar un ambiente anaeróbico. La positividad de la prueba se evidenció al observarse el color púrpura en el medio y la negatividad, por la observación de un color amarillo.

## Hidrólisis de la arginina

Esta prueba sirvió para determinar si las bacterias en estudio eran capaces de hidrolizar el aminoácido arginina a través del sistema arginina deshidrolasa, utilizando el método de Möeller. Se inoculó el medio con la cepa e incubó a 35 °C por 24 horas. Se incluyó un tubo control libre de aminoácidos para comparar las reacciones y ambos tubos se sellaron con parafina líquida para proporcionar el ambiente anaeróbico y controlar el pH del medio. La positividad de la prueba se evidenció al observarse el color púrpura en el medio y la negatividad, por la observación de un color amarillo.

## Hidrólisis de la esculina:

Esta prueba se realizó inoculando la cepa por estría en medio esculina, incubándose a 35 °C por 24 horas. La esculina es un medio que fluoresce al incidir la luz ultravioleta a través de una lámpara de Wood, cuando la esculina fue hidrolizada el medio se tornó negro rojizo y desapareció la fluorescencia, indicando una reacción positiva.

## **Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana**

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* se realizó mediante el método de difusión en agar, descrito por Bauer y cols. (1966) método recomendado y estandarizado por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI, 2007). Para ello se tomaron 4 a 5 colonias de las cepas identificadas como *P. aeruginosa*, se preparó un inóculo en solución salina estéril, hasta ajustarlo al 0,5 de la escala de Mc Farland. Posteriormente se impregnó un hisopo estéril con la suspensión bacteriana, sembrando la superficie entera del agar Mueller–Hinton en tres direcciones diferentes, luego se dejó reposar 5 minutos para aplicar los discos de antimicrobianos, empleando pinzas de metal estériles previamente flameadas. Los antimicrobianos ensayados fueron los recomendados para *P. aeruginosa* por el CLSI (2007) a saber: ceftazidima (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefepima (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg) y piperacilina (100 µg) (BBL™, Becton Dickinson and Company, USA).

Las placas se dejaron reposar 15 minutos, posteriormente se incubaron por 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se realizó la medición del diámetro de los halos de inhibición interpretándose en función del antimicrobiano y los puntos de corte estipulados en el manual (CLSI, 2005).

## **Selección de cepas resistentes**

Se seleccionaron las cepas de *P. aeruginosa* que mostraron resistencia a los antimicrobianos betalactámicos ensayados, estas se cultivaron en 5 ml de infusión cerebro corazón (BHI) para la realización de las pruebas posteriores. Aquellas cepas que presentaron resistencia a uno o varios de los antimicrobianos betalactámicos ensayados (cefalosporinas Tercera Generación, cefepime o aztreonam), se les realizó la prueba de detección de BLEE, mientras que, aquellas que resultaron resistentes a imipenem y/o meropenem, se sometieron a la detección de metalobetalactamasas.

### **Detección de BLEE inhibibles por ácido clavulánico**

La determinación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido se realizó mediante la técnica de sinergia de doble disco, descrito por Jarlier y cols., (1988). Se aplicó un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20 µg / 10 µg) sobre el centro de la placa en la superficie del agar Mueller-Hinton. Luego se colocaron discos alrededor, a una distancia de 15 mm borde-borde y ángulo de 90°, de ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg) y cefepima (30 µg) empleando pinzas de metal estériles previamente flameadas. Las placas se dejaron reposar 15 minutos incubándolas por 24 horas a 37 °C. Se consideró sinergia positiva y, por tanto, presencia presuntiva de BLEE al observar una ampliación o distorsión del halo de inhibición adyacente al disco de amoxicilina-ácido clavulánico de alguna de las cefalosporinas o del aztreonam (CLSI, 2005).

### **Detección de metalobetalactamasas**

Se colocaron dos discos de imipenem (10 µg) y dos de meropenem (10 µg), en una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con una suspensión de la cepa en estudio ajustada al 0,5 en la escala de Mc Farland. Seguidamente se añadió 10 µl de EDTA 0,5 M sobre un disco de imipenem y otro de meropenem, los discos restantes sirvieron como control negativo de la actividad del EDTA en el crecimiento de las cepas, las mismas fueron incubadas durante 18 a 24 horas a 37 °C. Se consideró prueba positiva y por tanto, presencia de metalobetalactamasas, al observar una ampliación del halo de inhibición en los discos que contenían EDTA (Sánchez y cols., 2004).

### **Extracción de ADN**

Para la extracción del ADN genómico de las cepas resistentes se utilizó el kit de extracción Genomic Wizard (Promega); Para esto se tomó 1,5 ml de caldo Luria Bertani (LB), inoculado con la cepa de *P. aeruginosa* con 24 horas de crecimiento previo, el cual se centrifugó durante 5 minutos a 5 000 g. Luego, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 450 µl de solución de lisis de núcleo, mezclándose suavemente. Se añadieron 3 µl de solución de RNasa, mezclándose de 5 a 6 veces por inversión para incubarlo luego a 80 °C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego se añadió 150 µl de solución precipitante de proteínas.

Se mezcló bien con vortex por 20 segundos y se incubó en hielo por 5 minutos. Seguidamente se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos, a 4 °C y se transfirió el sobrenadante, cuidadosamente, a un tubo limpio que contenía 600 µl de isopropanol, mezclándose bien pero lentamente y centrifugando a máxima velocidad por 15 minutos a 4 °C. Después se decantó el isopropanol y se agregaron 600 µl de etanol al 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos. Seguidamente se decantó el etanol y se agregó 100 µl de etanol al 95%, decantándose y dejándose secar a 37 °C, con cuidado de no exceder el secado. Posteriormente, se resuspendió en 100 µl de solución de rehidratación del ADN, dependiendo del tamaño del precipitado, incubándose a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Por último, se guardó a -20 °C hasta su uso (Promega, 2002).

### **Detección de genes de resistencia**

Para la detección de los genes de resistencia tipo VIM, se aplicó la técnica de PCR, utilizando el siguiente programa: 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial; 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización; a 52 °C por 40 segundos para la hibridación; a 72 °C por 50 segundos para la extensión; 1 paso a 72 °C por 6 minutos, para la extensión final (Sánchez y cols., 2004).

Para la detección de los genes de resistencia tipo *bla<sub>SHV</sub>*, se aplicó la técnica de PCR, utilizando el siguiente programa: 1 ciclo a 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial; 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto para la desnaturalización; a 52 °C por 1 minuto para la hibridación; a 72 °C por 1,5 minutos para la extensión; 1 paso a 72 °C por 10 minutos, para la extensión final (Quinteros y cols., 2003).

Para cada amplificación se prepararon 25 µl de mezcla de reacción en tubos de PCR de 0,2 ml cuyos componentes fueron: 50 ng de ADN de cada muestra, buffer 10X de PCR (200 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,4; 500 mmol l<sup>-1</sup> KCl), 0,2 mmol l<sup>-1</sup> de cada nucleótido trifosfato (dNTP), 0,5 µmol l<sup>-1</sup> de cada iniciador, 1,5 mmol l<sup>-1</sup> de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), y 1 U *Taq* polimerasa (Promega) (Quinteros y cols., 2003; Sánchez y cols., 2004).

Se utilizaron los siguientes iniciadores, descritos por Quinteros y cols. (2003) para detectar betalactamasas de tipo SHV (Tabla 1), y por Nordmann y Poirel (2002) para detectar las metalobetalactamasas de tipo VIM:

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la PCR para amplificar genes de Betalactamasas.

<b>Genes (Enzima)</b>	<b>Iniciadores</b>
<i>bla<sub>shv-f</sub></i> :	5' - TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT - 3'
<i>bla<sub>shv-r</sub></i> :	5' - AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG - 3'
<i>vim-b</i>	5' - ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC - 3'
<i>vim-f</i>	5' - TGG GCC ATT CAG CCA GAT C - 3'

Cada producto de amplificación fue analizado mediante una corrida electroforética (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo) utilizando gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las bandas de ADN se observaron con un transluminador (UV) de luz ultravioleta (UVP<sub>INC</sub>) y se fotografiaron con una cámara digital (Samsung). Para estudiar el tamaño de los fragmentos de ADN resultantes se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) como referencia, con tamaño esperado aproximado de 180 pb para *bla<sub>SHV</sub>* y 550 pb para VIM.

### Control de calidad

Para el control de calidad de las pruebas bioquímicas y antibiogramas se utilizaron las cepas certificadas de *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup>27853, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup>25922 y *E. coli* ATCC<sup>®</sup>35218 según lo establecido por el CLSI (2007). En el control de calidad de la PCR se usó cepas de CVCM1683 *Klebsiella pneumoniae* para el gen *bla<sub>SHV</sub>* (Donada por la profesora Militza Guzmán) y una cepa de *K. pneumoniae* INH77917 del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel para el gen VIM (Donada por la Lcda. Damarys Sánchez), así como la cepa de *E. coli* ATCC<sup>®</sup>25922 como control negativo.

### Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis descriptivo y expresados a través de tablas y figuras (Morton y cols., 1993).



## RESULTADOS

Para el estudio se recolectó un total de 66 cepas de *P. aeruginosa*, de éstas 55 provenían de los distintos servicios de hospitalización del SAHUAPA y, 11 cepas del LCU II, según se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *P. aeruginosa*, según servicio. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

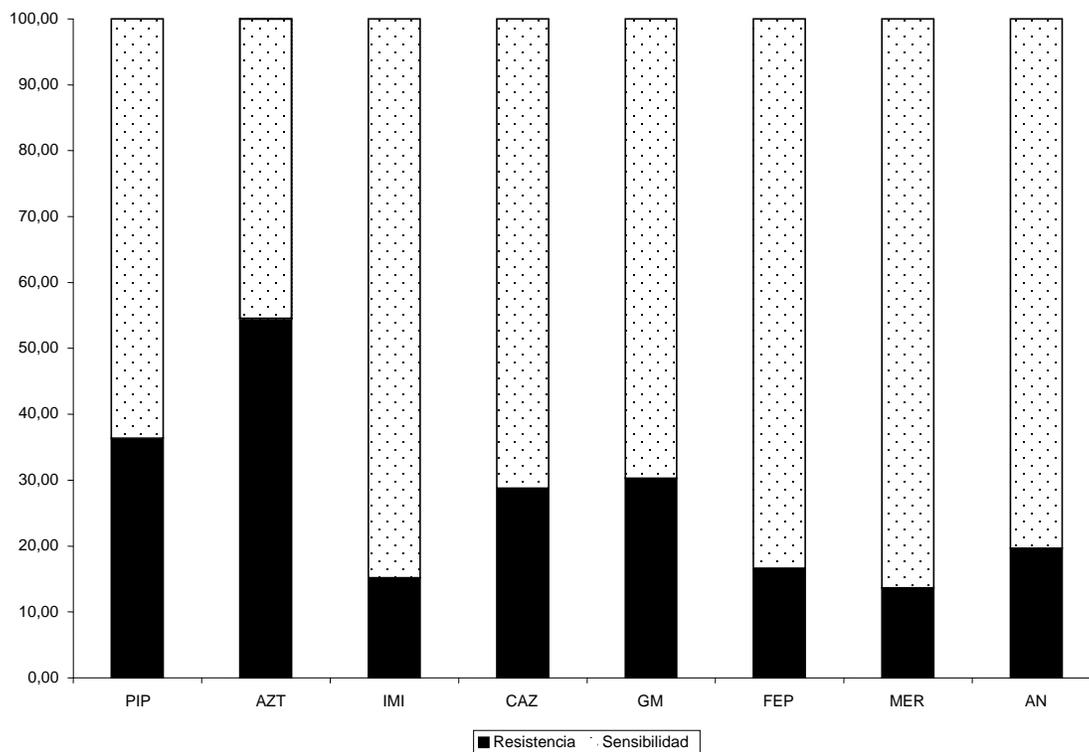
Servicio	Cepas aisladas	%
<b>SAHUAPA</b>		
Hospitalización adultos	26	39,39
Diálisis	2	3,03
Pediatría	8	12,12
Emergencia	6	9,09
Retén	3	4,55
UCI	10	15,15
LCU II	11	16,67
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>100,00</b>

El 69,69% de las cepas de *P. aeruginosa* fue aislada de secreciones purulentas, mientras que, el 30,31% se aisló de muestras de orina y sangre, tal como se visualiza en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *P. aeruginosa*, según tipo de muestra. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

Tipo de muestra	Cepas aisladas	%
Secreción heridas	28	42,42
Secreción ótica	4	6,06
Secreción bronquial y esputo	14	21,21
Orina	17	25,76
Sangre	3	4,55
Heces	1	1,52
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>100,00</b>

En cuanto a la resistencia a los antimicrobianos ensayados, se obtuvo 36,36% de resistencia a piperacilina, 54,55% resistencia al aztreonam y 15,15% a imipenem como se expresa en la figura 1. En general, todas las cepas incluidas mostraron resistencia al menos a uno de los antimicrobianos betalactámicos.



PIP: piperacilina, AZT: aztreonam, IMI: imipenem, CAZ: ceftazidima, GM: gentamicina, FEP: cefepima, MER: meropenem, AN: amikacina

Figura 1. Porcentajes de resistencia y sensibilidad de *P. aeruginosa* frente a los antimicrobianos ensayados. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

En lo que se refiere a las BLEE, la detección fenotípica fue positiva en el 26,00 % de las cepas estudiadas (17/66) (Figura 2 y 3).

Un total de 10 cepas que mostraron resistencia a imipenem y/o meropenem, se sometieron al ensayo de detección fenotípica para metalobetalactamasas (MTBL), encontrándose la presencia de éstas en un 11,00 % (Figuras 2 y 4). Mientras que 4 cepas (6,00%) presentaron fenotipo combinado BLEE más MTBL.

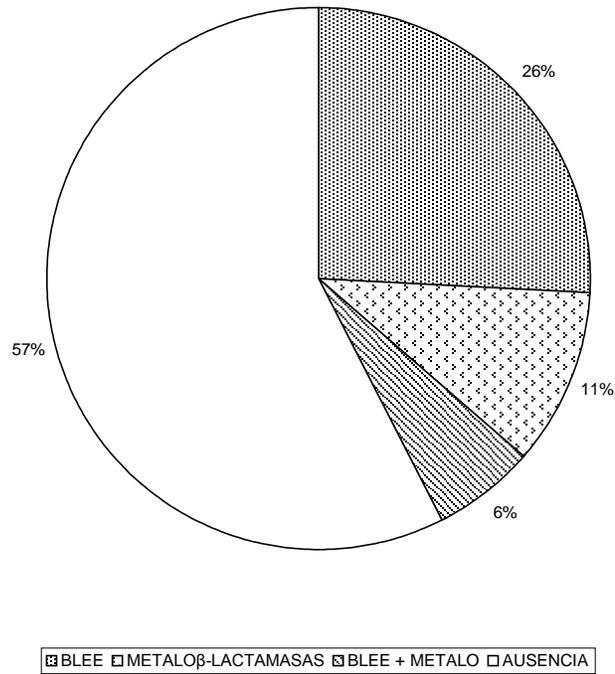


Figura 2. Distribución porcentual de BLEE, metalobetalactamasas y BLEE + metalobetalactamasas en cepas de *P. aeruginosa*, según método de detección fenotípica. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

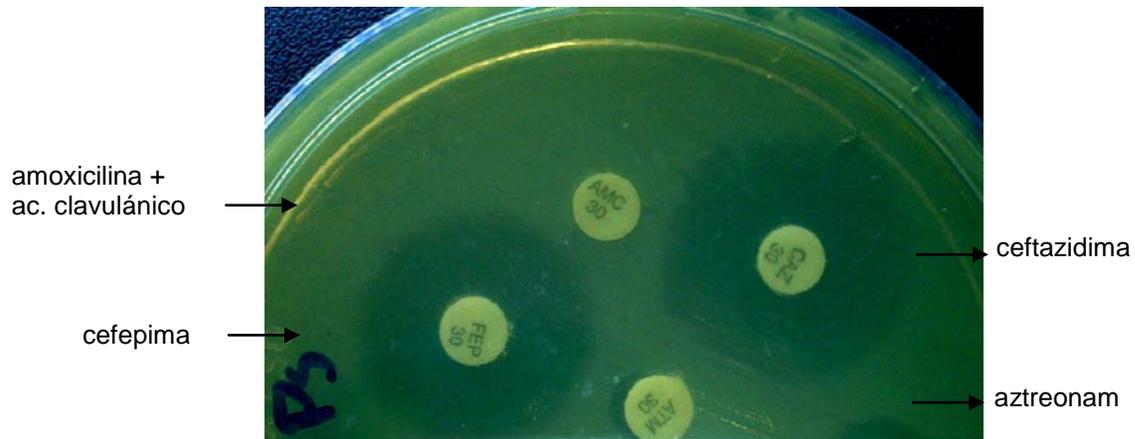


Figura 3. Cepa de *P. aeruginosa* con fenotipo BLEE positivo proveniente del servicio de observación pediátrica del SAHUAPA. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

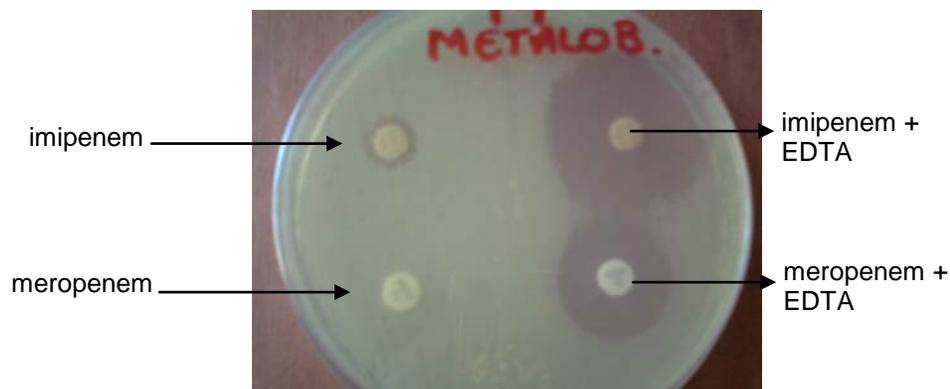


Figura 4. Cepa de *P. aeruginosa* con fenotipo metalobetalamasa positivo proveniente del retén del SAHUAPA. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

En cuanto a la detección molecular de genes de resistencia mediante PCR, se encontró la presencia del gen *bla<sub>SHV</sub>* en 4,00 % y el gen *VIM* en 9,00 % del total de las muestras en estudio. También se obtuvo un 1% de cepas en las que se detectó la presencia de ambos genes. Tales resultados se visualizan en la figura 5.

En la tabla 4 se presentan los fenotipos obtenidos de las cepas estudiadas, destacando que el fenotipo II fue el más frecuente, con un total de 20 cepas, seguido del fenotipo I con 17 cepas.

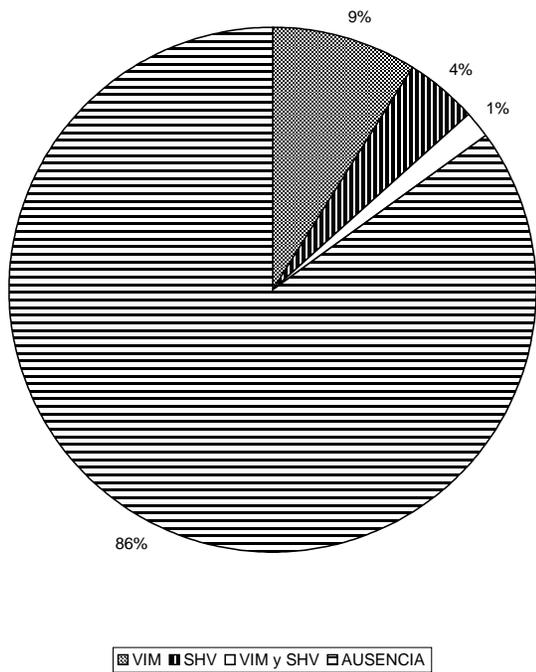
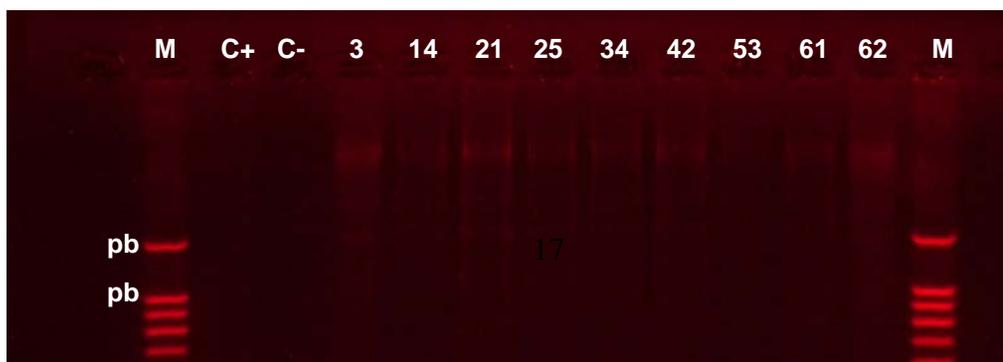
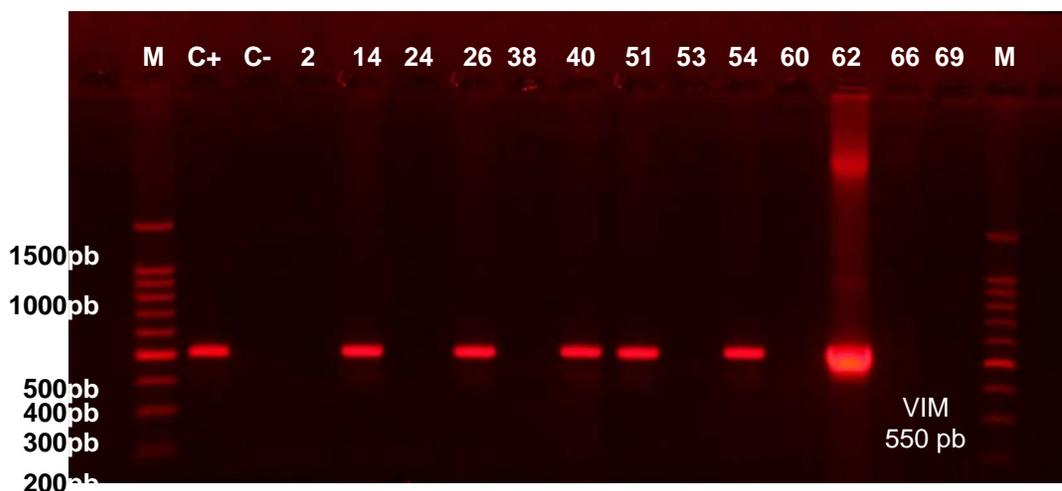


Figura 5. Distribución porcentual de la presencia de genes VIM y *bla<sub>SHV</sub>* en cepas de *P. aeruginosa*, mediante el uso de PCR. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.



M: Marcador de peso molecular (100 pb), C+: Control positivo (Cepa CVCM1683),  
 C-: Control negativo (ATCC<sup>®</sup>25922), 3,14,21,25,34,42,53,61,62: Muestras estudiadas.

Figura 6. Verificación de la amplificación del gen *bla<sub>SHV</sub>* en electroforesis (Gel de agarosa al 1%).



M: Marcador de peso molecular (100 pb), C+: Control positivo (INH77917),  
 C-: Control negativo (ATCC<sup>®</sup>25922), 2,14,26,38,40,51,53,54,60,62,66,69: Muestras estudiadas.

Figura 7. Verificación de la amplificación del gen VIM en electroforesis (Gel de agarosa al 1%).

Tabla 4. Patrones fenotípicos de resistencia a betalactámicos y detección de genes de resistencia *Bla<sub>SHV</sub>* y VIM en cepas de *P. aeruginosa*. Cumaná, estado Sucre. Enero – marzo 2006.

Fenotipo	N°de Cepas	Antimicrobianos					MER	BLEE (SHV) y/o MTLβ (VIM) [N° de cepas]
		CAZ	PIP	AZT	IMP			
I	17	R	R	R	R	R	R	SHV [2] VIM [4]
II	20	R	R	R	S	S	S	SHV[1]
III	4	S	R	R	S	S	S	-
IV	4	S	R	S	R	R	R	-
V	1	S	R	R	R	R	R	VIM[1]
VI	4	S	S	S	R	R	R	VIM [1]
VII	16	S	S	S	S	S	S	-

CAZ: ceftazidima, PIP: piperacilina, IMP: imipenem, AZT: aztreonam,  
R: Resistencia, S: Sensibilidad.

## DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* en su carácter de potencial patógeno intrahospitalario, multirresistente es motivo de interés en diversas investigaciones.

De los aislados suministrados por el Laboratorio de Bacteriología del SAHUAPA y el LCU II de la ciudad de Cumaná, se obtuvo que la mayor parte de las cepas provenían de los servicios de hospitalización (39,39%), Unidad de Cuidados Intensivos (15,15%) y consulta externa (16,67%), de esta última podría inferirse que estuvo conformada por cepas de *P. aeruginosa* de origen comunitario.

Tales resultados coinciden con un estudio realizado por Rodríguez y cols. (2005), en el Hospital Universitario de Caracas en el que encontraron 36,90% de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados. El hecho de que la mayoría de las cepas provenían de pacientes hospitalizados es natural, debido a que, como es conocido, es un patógeno principalmente nosocomial como lo confirman diversos estudios (Poole, 2001; Martín, 2003; Sánchez y cols., 2004).

Se pudo observar que las cepas de *P. aeruginosa* fueron aisladas principalmente de secreciones de partes blandas las cuales representaron el 42,42%, seguida de muestras de orina (25,76%), obtenidas mayormente de pacientes cateterizados y de secreciones bronquiales y de esputo en 21,21%. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores (Rodríguez y cols., 2005), reflejando así el tropismo que tiene *P. aeruginosa* por los tejidos blandos y las heridas expuestas, así como por las células del tracto respiratorio.

Los antimicrobianos betalactámicos son los de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas*, debido a su baja toxicidad, amplio espectro y bajo costo (Peroso y Castellano, 2005). Al hacer una revisión retrospectiva de diversos estudios se visualiza una tendencia al aumento de la resistencia de *Pseudomonas* ante estos agentes antimicrobianos. En 2003 Martín y cols., encontraron en un estudio realizado en la ciudad

de Caracas, 21% de resistencia a ceftazidima y 32% a piperacilina en cepas de *P. aeruginosa* tanto comunitarias como nosocomiales. En 2001, Cavallo y cols., reportaron 42% y 24% de resistencia a aztreonam y ceftazidima, respectivamente.

En Cumaná, Mata (2002), halló 11,6% de resistencia a imipenem y 11,8% a cefepime. En 2004 Sacha y cols., reportó 8,3% de resistencia a ceftazidima en cepas intrahospitalarias. En tanto que los porcentajes de resistencia hallados en la presente investigación para estos antimicrobianos antes señalados fueron 36,36%, 54,55%, 15,15%, 28,79% y 16,7% para piperacilina, aztreonam, imipenem, ceftazidima y cefepime, respectivamente.

Pacientes hospitalizados por largos períodos, con tratamientos antimicrobianos inadecuados (tipo de antimicrobiano seleccionado, tiempo de tratamiento, entre otros), constituyen factores importantes en la generación de bacterias multirresistentes, así como, la presencia continua de antimicrobianos que ejercen una presión selectiva sobre estos patógenos, generando la producción, expresión y transmisión de determinantes de resistencia.

Las BLEE representan uno de los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* frente a los antimicrobianos betalactámicos (Bradford, 2001). En la actual investigación, se encontró 26,00% de aislados de *P. aeruginosa* productoras de BLEE, mediante la utilización del método de detección fenotípica de sinergia con disco de ácido clavulánico (Jarlier y cols., 1988). Dicho resultado es menor al hallado por Martínez y cols. (2003), en Colombia, quienes reportaron 38% de cepas de *P. aeruginosa* productoras de BLEE, usando este mismo método.

En otra investigación, Jiang y cols. (2006), en China, encontraron 13% de cepas de *P. aeruginosa* productoras de BLEE, utilizando sinergia con ácido clavulánico y concluyeron, que debido a la incidencia y relevancia clínico – epidemiológica de BLEE en *P. aeruginosa* a nivel mundial, existe la necesidad de disponer de pruebas confiables para la detección de estas enzimas debido a que, hasta la fecha, no se han estandarizado los métodos para la

determinación fenotípica de BLEE, en bacilos Gram negativos no fermentadores, por lo que se sugiere estandarizar nuevos métodos para la detección fenotípica de BLEE.

La presencia de este porcentaje de cepas de *P. aeruginosa* productoras de BLEE, se explica si se considera el origen nosocomial (hospitalización y UCI) de la mayoría de los aislados estudiados. En estas áreas existe una elevada utilización de cefalosporinas y otros betalactámicos de amplio espectro que crean un ambiente favorecedor de la selección de microorganismos resistentes, productores de BLEE.

Las BLEE son codificadas principalmente por plásmidos conjugativos (Peroso y Castellano, 2005), que facilitan la transmisión horizontal entre los microorganismos presentes en éstas áreas. También podría considerarse como un factor contribuyente a la diseminación y expansión de las cepas junto con sus determinantes de resistencia, debido a la transferencia de pacientes entre unidades del mismo hospital o de distintos hospitales (Bradford, 2001).

Al realizar el análisis de PCR para la detección de genes codificantes de BLEE, se observó únicamente en 3 cepas el gen *bla<sub>SHV</sub>*. Este hallazgo podría explicarse debido a la presencia de otros genes diferentes a los investigados y que han sido reportados como más frecuentes en *P. aeruginosa*, tales como *bla<sub>PER</sub>*, *bla<sub>PSE</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>* (Bradford, 2001; Vila y Marco, 2002; Bert y cols., 2002).

En relación a este hecho, investigadores como Oh y cols. (2006), señalan que, si bien es posible encontrarlos, la presencia de *bla<sub>SHV</sub>* en *P. aeruginosa*, es mas bien poco frecuente. El gen *bla<sub>SHV</sub>* es mayormente encontrado en *Klebsiella pneumoniae*, no obstante también se ha reportado, con menor frecuencia, en *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* (Bradford, 2001). Naas y cols. (1999), hallaron el gen *bla<sub>SHV</sub>* en una cepa de *P. aeruginosa* de origen nosocomial, de igual manera, encontraron que la secuencia de ADN de este gen tenía fuerte homología con un gen plasmídico de *K. pneumoniae*, el cual codifica para una variante de SHV, por lo que concluyeron, un probable origen a partir de la familia *Enterobacteriaceae*, sugiriendo la transmisión horizontal a *P. aeruginosa*.

La importancia clínica y terapéutica de BLEE radica primeramente en su amplia capacidad de diseminación a través de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, que median la transmisión a otros microorganismos bacterianos, además de aumentar la morbimortalidad nosocomial y limitar las opciones terapéuticas, incrementando el uso de antimicrobianos más complejos y costosos como los carbapenemes (Peroso y Castellano, 2005).

Los carbapenemes son antimicrobianos que presentan una efectiva actividad bactericida ante *Pseudomonas aeruginosa* y en oportunidades constituyen la única opción terapéutica. La resistencia a estos antimicrobianos ha aumentado considerablemente en los últimos años (Andrade, 2005).

En este estudio se analizó un total de 66 cepas de las cuales 10, fueron resistentes a imipenem y/o meropenem. Estas fueron sometidas al ensayo de detección fenotípica de MTBL obteniéndose 70% de cepas positivas. De las 7 cepas positivas fenotípicamente para MTBL, se detectó el gen VIM en 6 de estas. Resultados estos que coinciden con los obtenidos por Pagniez y cols. (2006) en Argentina, en donde hallaron 11% (10/91) de cepas positivas fenotípicamente MTBL y todas contenían el gen VIM. De igual manera en Korea, se encontró un porcentaje concordante de resistencia a imipenem (15%) detectándose también el gen VIM (Lee y cols., 2002).

Fiett y cols. (2006), realizaron una investigación en 17 hospitales de Polonia, 38 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* positivas fenotípicamente MTBL poseían el gen VIM. Este aumento en la prevalencia de genes VIM y por consiguiente la expresión de enzimas que confieren resistencia a carbapenemes, puede deberse a la presión selectiva con carbapenemes a la que son sometidas estas cepas y a la facilidad de transmisión de estos genes ubicados en integrones de clase 1, que se encuentran en elementos móviles tales como plásmidos y transposones, que promueven la transferencia horizontal entre diferentes especies bacterianas, lo cual facilita la divergencia evolutiva de estas enzimas (Andrade, 2005).

La importancia clínica y epidemiológica de este mecanismo de resistencia, radica, principalmente, en el hecho de que no existen inhibidores de uso terapéutico, contra estas enzimas (Andrade, 2005), por lo que es relevante proporcionar datos acerca de los porcentajes de resistencia a los carbapenemes y de la detección fenotípica y molecular de MTBL en la región.

En cuanto a la expresión dual de BLEE más MTBL en *P. aeruginosa* se ha sugerido que es producto de la acumulación de determinantes de resistencia en estas cepas. La selección del fenotipo de resistencia a carbapenemes y otros betalactámicos de amplio espectro probablemente es favorecido debido a terapias continuas con estos antimicrobianos en infecciones nosocomiales (Andrade, 2005).

Los aislamientos analizados mostraron diferentes patrones fenotípicos de resistencia siendo el más frecuente, el de resistencia a ceftazidima, piperacilina y aztreonam, con sensibilidad a imipinem y meropenem (fenotipo II, 20 cepas), el cual resultó positivo para *bla<sub>SHV</sub>* y negativo para el gen VIM. Un patrón similar ha sido reportado en otra investigación por Martínez y cols. (2007), en donde observaron aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistentes a betalactámicos que presentaron resistencia conjunta a ceftazidima, piperacilina y aztreonam.

Las cepas que resultaron positivas a la detección del gen *bla<sub>SHV</sub>*, se ubicaron dentro de los fenotipos I y II, los cuales tienen en común la resistencia a ceftazidima, mientras que los aislados con presencia del gen *bla<sub>VIM</sub>*, presentaron patrones fenotípicos heterogéneos. Estos diferentes patrones fenotípicos podrían deberse a la expresión de otros tipos de BLEE o MTBL, a variaciones en la cantidad de las enzimas, a la expresión conjunta BLEE más MTBL y/o a la posible presencia de otros mecanismos de resistencia a antimicrobianos betalactámicos, tales como alteraciones en la permeabilidad mediada por porinas o la expresión de bombas de eflujo (Livermoore, 2001). En línea con esta hipótesis, los fenotipos encontrados son representativos, de acuerdo con la literatura, de la presencia de otros mecanismos de resistencia no investigados en el presente estudio como: desrepresión

de AmpC, presencia de *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, entre otros (Vila y Marco, 2002; Sader y Jones, 2005), por lo que se necesitan posteriores investigaciones para la detección de estos mecanismos en aislados locales de *P. aeruginosa*.

Este estudio permitió evidenciar la resistencia ante diversos agentes antimicrobianos, la presencia de BLEE y MTBL y la detección de genes que codifican para estas enzimas, en cepas de *P. aeruginosa* de la región. La epidemiología molecular y monitoreo de cepas productoras de BLEE y MTBL contribuirá a la predicción de fenotipos de resistencia y por consiguiente al establecimiento de terapias antimicrobianas adecuadas.

## CONCLUSIONES

Existe en la región estudiada, una elevada resistencia de *P. aeruginosa* frente a los antimicrobianos betalactámicos, conferida en algunos casos, por betalactamasas de espectro extendido y metaloenzimas.

Se detectó la presencia de los genes VIM y *bla*<sub>SHV</sub> en *P. aeruginosa*, no obstante, los patrones fenotípicos de resistencia obtenidos, sugieren la existencia de otros genes codificantes para BLEE y MTBL u otros mecanismos de resistencia.

## RECOMENDACIONES

Educar al personal de los laboratorios clínicos microbiológicos, sobre la importancia predictiva de realizar lectura interpretativa de los antibiogramas y de esta forma inferir la posible presencia de BLEE y MTBL.

Investigar en *P. aeruginosa* la presencia de otros genes de resistencia responsables de la producción de BLEE, como por ejemplo, *bla<sub>PSE</sub>*, *bla<sub>PER</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* y la producción de MTBL como *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>* y *bla<sub>GIM</sub>*.

Insistir en el uso racional de los antimicrobianos, con especial énfasis en los pacientes hospitalizados en cuidados intensivos.

## BIBLIOGRAFÍA

Andrade, V. 2005. Emergencia de la resistencia a carpenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- $\beta$ -lactamasas. *Bioquímica*, 30 (2): 53-58.

Ausubel, F.; Brent, R.; Kinston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. y Struhl, J. 1999. *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York.

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

Bermúdez, J.; Gracia, S.; Avila, H. y Hurtado, O. 1993. Resistencia bacteriana a antimicrobianos. *Act. Infect.*, 9 (2): 4-10.

Bert, F.; Branger, C. y Lambert-Zechovsky, N. 2002. Identification of PSE and OXA betalactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR restriction fragment length polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50 (1): 11-18.

Burke, A. 2000. Antibiotic resistance. *Med. Clin. of North America*, 84 (6) 1407-1429.

Bradford, A. 2001. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21<sup>st</sup> Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 (4): 933-951.

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

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

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

Cavallo, J.; Leblanc, F.; Fabre, R. y Fourticq-Esqueoute, A. 2001. Survey of the antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* in France and the distribution of beta-lactam resistance mechanism: the GERPB 1999 study. *Pathol. Biol. (Paris)*, 49 (7): 534-539.

Celenza, G.; Pellegrini, C.; Caccamo, M.; Segatore, B.; Amicosante, G. y Perilli, M. 2006. Spread of *bla*<sub>(CTX-M-Type)</sub> and *bla*<sub>(PER-2)</sub> beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother*, 57 (5): 975-978.

CLSI. 2005: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. *Document M100-S15*. Wayne, Pennsylvania.

CLSI. 2007: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. *Document M100-S17*. Wayne, Pennsylvania.

Echevarría, J.; Seas, C.; Zerpa, R.; Wong, W.; Acosta, L.; Linares, E.; Saenz, A.; Quiroz, L.; Luna, E.; Roe, E.; Anduaga, G.; Prada, A.; Delgado, F.; Zea, E. Y Arasco, M. 2000. Sensibilidad bacteriana a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en diferentes áreas hospitalarias. *Act. Infect., 1*: 2-18.

Fiett, J.; Baraniak, A.; Mrówka, A.; Fleischer, M.; Drulis-Kawa, Z.; Naumiuk, Ł.; Samet, A.; Hryniewicz, W. y Gniadkowski, M. 2006. Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother., 50* (3): 880-886.

Grupo venezolano de vigilancia de la resistencia bacteriana. 2003. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela período julio 2001-diciembre 2002. *Rev. Soc. Ven. Microbiol., 23* (1): 89-97. ISSN 1315-2556.

Higgins, C.; Murtough, S.; Hiom, S.; Payne, D.; Russell, A y Walsh, T. 2001. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7*: 308-315.

Izundu, A. y Brown, P. 2004. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Jamaica. *Rev. Panam. Sal. Púb., 2* (16): 125-130.

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

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

Jiang, X.; Zhang, Z.; Li, M.; Zhou, D.; Ruan, F.; y Lu, Y. 2006. Detection of extended-spectrum betalactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother., 50* (9): 2990-2995.

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. 1999. *Diagnóstico microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lee, K.; Lim, J.; Yum, J.; Yong, D.; Chong, Y.; Kim, J. y Livermore, D. 2002. *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob. Agents Chemother., 46* (4): 1053-1058.

- Livermore, D. 1995.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8 (4): 557-584.
- Livermore, D. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 247-250.
- Martínez, P.; Mercado, M. y Máttar, S. 2003. Determinación de betalactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb. Méd.* (4):196-205.
- Martínez, P.; Espinal, P. y Máttar, S. 2007. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Infectio.*, 11 (1): 6-15.
- Martín, G.; Carmona, O. y Guzmán, M. 2003. Resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* en centros médicos de Venezuela durante el año 2000. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.*, 23 (2): 30-34.
- Mata, G. 2002. Frecuencia de cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infección intrahospitalaria en la unidad de cuidados intensivos del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", Cumaná, Estado Sucre. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná.
- Mendoza, M.; Lara, I. y Tovar, I. 2003. Evaluación de la sensibilidad para cefalosporinas de tercera y cuarta generación en bacilos Gram negativos aislados en la clínica Ávila en el período de enero 2001 a junio 2002. *Act. Infect.*, 1: 2-4.
- Morton, R.; Hebel, J. y Mc Carter, R. 1993. *Bioestadística y Epidemiología*. Tercera edición. Editorial Mac Graw Hill. México.
- Naas, T.; Philippon, L.; Poirel, L.; Ronco, E. y Nordmann, P. 1999. An SHV-derived extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (5): 1281-1284.
- Nordmann, P. y Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.*, 8: 321-331.
- Okeke, I.; Lamirank, A. y Edelman, R. 1999. Socioeconomic and behavioural factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 18-27.
- Pagniez, G.; Radice, M.; Cuirolo, A.; Rodríguez, O.; Rodríguez, H.; Vay, C.; Famiglietti, A. y Gutkind, G. 2006. Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Rev. Argent. Microbiol.*, 38: 33-37.

Peroso, A y Castellano, M. 2005. Manual de pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Zulia, centro de referencia bacteriológica SAHUM*. Maracaibo.

Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, 3: 255-264.

Promega. 2002. *Quick Protocol Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit*. Promega Corporation. Chicago, Illinois, USA.

Quinteros, M.; Radice, M.; Gardella, N.; Rodríguez, M.; Costa, N.; Couto, E.; Korbenfeld, D. y Gutkind, G. 2003. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 (9): 2864-2867.

Rossolini, G. 2005. Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamases: An Increasing Clinical Threat. *Clin. Infect. Dis.* 41:1557-1558

Rodríguez, G.; Bastidas, P.; Rivero, M.; Flores, L.; Villarroel, E. y Andrade, E. 2005. "Detección de cepas productoras de betalactamasas inducibles en el Hospital Universitario de Caracas". "Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Metropolitano. Caracas". <<http://caibco.ucv.ve>>. (18/05/2005).

Sacha, P.; Jakoniuk, P.; Wiczorec, P.; Zalewska, M. y Leszczynska, K. 2004. Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 56 (3): 263-273.

Sader, H. y Jones, R. 2005. Evaluación completa *in vitro* de Cefepima combinada con Aztreonam o Ampicilina/Sulbactam contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* multirresistentes. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25 (5): 380-384.

Salasar, D.; González, A.; Palma, S. y Reyes, T. 2002. Susceptibilidad antimicrobiana y serotipiaje de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH/SIDA. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 54 (2): 142-146.

Sánchez, A.; Salso, E. y Picazo, J. 2004. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Esp. Quimioter.*, 17 (4): 336-340.

Tsakris, A.; Tassios, P.; Polydorou, F.; Papa, A. Malaka, E. ; Antoniadis, A. y Legakis, N. 2003. Infrequent detection of acquired metallo- $\beta$ -lactamase among carbapenem-resistant *Pseudomonas* isolates in a Greek hospital. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 846-851.

Vila, J. y Marco, F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos Gram negativos no fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 20 (6): 304-312.

Ysacis, J.; Salazar, J.; Ollarves, L. y Girón, C. 2000. Comparación de la sensibilidad bacteriana *in vitro*: amikacina versus netilmicina. *Act. Infect.*, 2: 15-17.



# **Hoja de Metadatos**

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

<b>Título</b>	Susceptibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia para la producción de betalactamasas, en cepas de <i>pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de muestras clínicas
<b>Subtítulo</b>	

## Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
ENSONY JOSÉ TOVAR MARVAL	CVLAC	13772424
	e-mail	ensony.tovar@cantv.net
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

## Palabras o frases claves:

BETALACTAMASAS, RESISTENCIA BACTERIANA, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

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

## Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	<b>BIOANÁLISIS</b>

### Resumen (abstract):

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo no fermentador de azúcares, considerado actualmente un importante agente patógeno responsable de infecciones comunitarias y nosocomiales, debido principalmente a la elevada resistencia a los antimicrobianos betalactámicos por la producción de betalactamasas cromosómicas inducibles y/o plasmídicas. El objetivo de la investigación fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y detectar la presencia de genes de resistencia relacionados con la producción de betalactamasas en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas. Se estudió un total de 66 cepas provenientes del Servicio Autónomo “Hospital Antonio Patricio de Alcalá” y del Laboratorio Clínico Universitario II, de la ciudad de Cumaná. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en agar; la determinación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y metalobetalactamasas (MTBL) se realizó mediante el método fenotípico de sinergia con amoxicilina-ácido clavulánico y el método de doble disco con EDTA, respectivamente. La detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y VIM se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los mayores porcentajes de resistencia fueron para aztreonam (54,60%), piperacilina (36,40%) y ceftazidime (28,80%). Un total de 17 aislados (25,80%) presentaron fenotipo BLEE positivo mientras que 8 cepas de un total de 10 resistentes a imipenem y/o meropenem, presentaron fenotipo compatible con MTBL. Se detectaron únicamente los genes *bla<sub>SHV</sub>* (3 cepas) y VIM (6 cepas). El fenotipo de resistencia más común fue el de sensibilidad a ceftazidime, piperacilina e imipenem con resistencia a aztreonam (15 cepas). Los resultados evidencian la presencia de BLEE y MTBL en cepas de *P. aeruginosa* en la región y contribuyen con el conocimiento de la epidemiología fenotípica y molecular de las mismas.

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

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
MARCOS DE DONATO	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input checked="" type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
LORENA ABADÍA	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
JASMINA ARAQUE	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	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
2008	02	18

Lenguaje: spa

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

## Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-ENSONYTOVARMARVAL	Aplication/word

## Alcance:

**Espacial :** \_\_\_\_\_ (Opcional)

**Temporal:** \_\_\_\_\_ (Opcional)

## Título o Grado asociado con el trabajo:

LICENCIADO

**Nivel Asociado con el Trabajo:** LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

## Área de Estudio:

BACTERIOLOGÍA, GENÉTICA

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

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

Derechos:  
Título y Resumen

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



ENSONY TOVAR

---

AUTOR 2

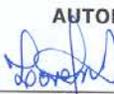
---

AUTOR 3



Dr. MARCOS DE DONATO

Asesor



Dra. LORENA ABADÍA

Jurado



Dra. YASMINA ARAQUE

Jurado

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

