



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

INTEGRONES CLASE 1 EN CEPAS INTRAHOSPITALARIAS DE
Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EN EL
HOSPITAL "ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ"
(Modalidad: Tesis de Grado)

AURINÉS DEL VALLE RODRÍGUEZ MOLERO

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

Cumaná, 2012

INTEGRONES CLASE 1 EN CEPAS INTRAHOSPITALARIAS DE
Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EN EL
HOSPITAL "ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ"

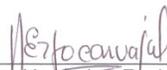
APROBADO POR:



Profa. Militza Guzmán Lista
Asesora



Profa. Elsa Salazar de Vega
Jurado principal



Profa. Hecctorina Robulfo
Jurado principal

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	I
METODOLOGÍA	7
Cepas.....	7
Subcultivos.....	7
Susceptibilidad antimicrobiana.....	7
Detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC, BLEE y metalobetalactamasas... 9	
Detección de integrones clase 1.....	10
Análisis de los datos	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES	29
RECOMENDACIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
HOJA DE METADATOS	38

DEDICATORIA

A

Mis padres, mi hermana, mi nane, mis sobrinos, mis suegros y mi novio por la comprensión y el apoyo incondicional que me han brindado en todo momento.

Mis amigos, en especial a Valmore Reyes, Andrés Rodríguez, Nairobi Seijas, Lianesa Marcano, Yolimar Gámez, Yuli Rodríguez, Loriannys Lastra y Nurexis Guzmán, quienes a lo largo de esta carrera demostraron su amistad sincera y espíritu de compañerismo.

Todos los estudiantes de bioanálisis, como inspiración y ejemplo de que si se pueden alcanzar las metas propuestas y vencer todas las dificultades.

A todos mil gracias.

AGRADECIMIENTOS

A

Mi asesora Dra Militza Guzmán, por brindarme su ayuda y dedicación, por el conocimiento aportado que permitieron la realización de este trabajo de investigación.

Las profesoras Elsa Salazar y Diorelis González que junto a todos mis compañeros del laboratorio de bacteriología clínica y laboratorio de bacteriología molecular compartieron los arduos momentos que conllevan la realización de un trabajo de grado.

Proyecto LOCTI (Epidemiología de bacilos Gram negativos no fermentadores), por financiar parcialmente este trabajo de grado, a través de la Corporación Parque Tecnológico de Oriente (CPTO) Universidad de Oriente.

A todos mil gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , aisladas en pacientes atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.....	8
Tabla 2. Frecuencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según el tipo de muestra, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.....	13
Tabla 3. Frecuencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según el servicio, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.....	15
Tabla 4. Fenotipos de resistencia presentes en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de un integrón clase 1 (tomado de Hall y Strokes, 1993, con modificaciones). *intl*: gen de la integrasa, P_c y P_i promotores que transcriben la integrasa (flechas divergentes). *attI* sitio de reconocimiento de la integrasa e integración de casete. *qacEΔI*: gen que confiere resistencia a las aminas cuaternarias, *sulI*: gen que confiere resistencia a sulfonamidas, *orf5*: marco abierto de lectura de función desconocida. 4

Figura 2. Distribución porcentual de la resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008. PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem, AN: amikacina, GEN: gentamicina, NET: netilmicina, NN: trobamicina, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, OFX: ofloxacina..... 16

Figura 3. Producto de amplificación de la región variable del integrón clase 1, aislado de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en un paciente atendido en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre, de 2008. Carril M: marcador 10 000 pb ADN Ladder (GeneRuler™), carril 1 y 2: *Klebsiella pneumoniae* (CVCM N° 682) control positivo 750 pb, carril 3: *Escherichia coli* J62-2 (CVCM N° 131) control negativo, carril 4: PA1, carril 5: PA5, carril 6: PA9, carril 7: PA11 (850 pb), carril 8: PA12, carril 9: PA13, carril 10: PA14. 24

RESUMEN

Se evaluó la presencia de integrones clase 1 en cepas intrahospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa*, para ello se seleccionaron 32 cepas al azar de un total de 64 aislados provenientes de pacientes asistidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado, Sucre durante el periodo de junio-septiembre de 2008. La confirmación de la especie se realizó empleando los protocolos convencionales para bacilos Gram negativos no fermentadores. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos para bacilos Gram negativos no fermentadores, establecidos por el instituto de estándares clínicos y de laboratorios (2012). La detección de los integrones clase 1 se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa empleando oligonucleótidos específicos que hibridan en las regiones conservadas 5'CS y 3'CS. El estudio reveló un alto porcentaje de cepas resistentes a diversos antimicrobianos. El mayor porcentaje de resistencia presentado por las cepas fue para gentamicina (81,25%), seguido de amikacina y netilmicina (78,13%), piperacilina (75,00%) e imipenem (71,88%). Sólo una cepa (3,13%) presentó integrones clase 1. La baja frecuencia de integrones clase 1 en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas contrastan con el elevado porcentaje de cepas resistentes, estos datos permiten inferir que los genes responsables de los posibles mecanismos involucrados en dicha resistencia no se encuentran localizados en estos elementos genéticos y abre la posibilidad de futuros estudios para determinar la ubicación de los genes causantes de la misma.

INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* agrupa a bacilos Gram negativos aerobios, que forman parte del grupo de microorganismos conocidos como bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), los cuales se caracterizan por no fermentar hidratos de carbono. Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, la cual está ubicada en el orden Pseudomonadales. Las estructuras morfológicas de *Pseudomonas* pueden medir entre 1,5 y 5,0 μm de largo, y entre 0,5 y 1,0 μm de diámetro. Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares, poseen un metabolismo aerobio estricto, la mayoría crecen a una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en un rango de temperatura entre 20 y 42°C (Martínez *et al.*, 2007; Koneman *et al.*, 2008).

Pseudomonas aeruginosa es considerada la principal especie patógena del género, ya que puede ocasionar diversas enfermedades infecciosas en el hombre, como septicemias, infección del tracto urinario y de heridas, neumonías, entre otras, las cuales son difíciles de tratar. Se estima que las tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados se encuentran entre 18,00% y 61,00%, principalmente, debido a la presencia de cepas multirresistentes (Rossolini y Mantengoli, 2005; Bodí y Garnacho, 2007).

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas terapéuticos existentes en los diferentes centros hospitalarios, la cual compromete el estado de salud del paciente. *P. aeruginosa* presenta resistencia natural a diversos antimicrobianos, sin embargo, debido al empleo imprudente y el abuso de los mismos, esta especie ha adquirido resistencia a los compuestos de uso terapéutico como betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, entre otros. Los mecanismos bioquímicos que se han asociado con este fenómeno son la baja permeabilidad en la membrana, la reducción de porinas como la OprD, las

bombas de expulsión activa, MexAB-OprM y MexCD-OprJ y la producción de enzimas, tales como, betalactamasa cromosómica de tipo AmpC, betalactamasas de espectro extendido (BLEE), metalobetalactamasas (MBL_S), enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA), entre otras (Bodí y Garnacho, 2007; Strateva y Yordanov, 2009).

En la última década, a nivel mundial, se ha observado un aumento significativo en los porcentajes de resistencia a diversos antimicrobianos, razón por la cual, la vigilancia de la resistencia de *P. aeruginosa* es esencial para la definición de los tratamientos empíricos (Navon-Venezia *et al.*, 2005; McGowan, 2006; Machado *et al.*, 2011). Una bacteria puede convertirse en resistente por mutación de un gen o por la adquisición de determinantes de resistencia presentes en diversos elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones (Alonso *et al.*, 2005; Rossolini y Mantengoli, 2005).

Un integrón es un elemento genético móvil y dinámico, que funciona como un sistema de captura de genes y presenta un mecanismo específico para adquirir y diseminar genes de resistencia; los integrones favorecen distintos eventos de diversificación genética dentro de los microorganismos procariotas, si bien no son esenciales para las bacterias, aportan genes adicionales que les permiten una mejor adaptación a ambientes. Los integrones suelen localizarse en plásmidos, transposones e incluso en el cromosoma bacteriano (Coque-González, 2008; Di Conza y Gutkind, 2010).

Existen distintas clasificaciones de los integrones, inicialmente, éstos fueron descritos agrupados en clases (1, 2 y 3) de acuerdo con la secuencia nucleotídica del gen de la integrasa (*intl*). Sin embargo, este sistema de clases ha quedado en desuso, debido a la gran variedad de integrasas descritas en los microorganismos, hecho que ha llevado a proponer una clasificación más práctica basada en una variedad de criterios. Se proponen dos grandes grupos

de integrones, grupo I: llamados integrones de resistencia a los antimicrobianos, a veces denominados “integrones móviles”, y el grupo II: conocido como integrones presentes en el cromosoma bacteriano, también referidos como “superintegrones”, y que esporádicamente están asociados a determinantes de resistencia (Di Conza y Gutkind, 2010; Yan *et al.*, 2010).

Los integrones de resistencia presentan, en general, casetes agrupados en arreglos relativamente pequeños, y es aquí donde se incluirían los integrones clase 1, 2 y 3. Los integrones clase 1 están conformados por dos regiones conservadas de ácido desoxirribonucleico (ADN) situadas en los extremos, denominadas secuencia conservada 5' (5'CS) y secuencia conservada 3' (3'CS) y una región variable localizada entre las dos anteriores (figura 1). El extremo 5'CS posee una longitud de 1,36 kb y dentro del mismo, se encuentra el gen *intl* que codifica para una integrasa. La enzima integrasa es una proteína de 38 000 masa molecular relativa, la cual es encargada de catalizar una recombinación genética sitio específico, continuo a éste se encuentra la secuencia *attI*, que es el sitio de recombinación específico donde se insertan los casetes génicos (Stokes y Hall, 1989; Gravel *et al.*, 1998).

Entre los genes *intl* y *attI* están los promotores divergentes P_c y P_i , los cuales, dirigen la expresión de los genes presentes en el casete y el gen *intl*. La región variable es donde se insertan los diferentes casetes génicos, que de acuerdo a estudios de secuenciación, son en su mayoría, pero no exclusivamente, genes que codifican resistencia a los antimicrobianos (Stokes y Hall, 1989; Gravel *et al.*, 1998).

El extremo 3'CS posee una longitud aproximada de 2 kb, en esta sección se localizan tres tipos de genes: *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5*, el primero confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternarios, el cual forma parte de algunos antisépticos y desinfectantes, el segundo confiere resistencia a

sulfonamidas y el *orf5* que codifica un marco de lectura abierto de función desconocida (Recchia y Hall, 1997; Bennett, 1999; Carattoli, 2001, Di Conza y Gutkind, 2010).

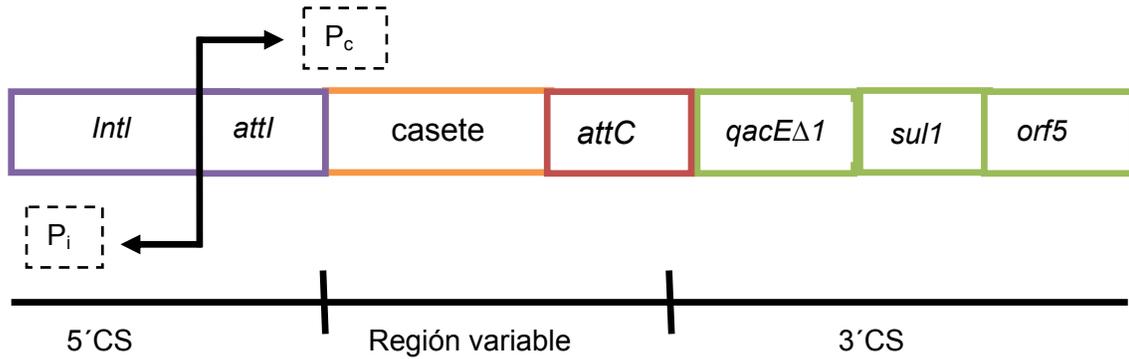


Figura 1. Estructura básica de un integrón clase 1 (tomado de Hall y Strokes, 1993, con modificaciones). *intI*: gen de la integrasa, P_c y P_i promotores que transcriben la integrasa (flechas divergentes). *attI* sitio de reconocimiento de la integrasa e integración de casete. *qacEΔ1*: gen que confiere resistencia a las aminas cuaternarias, *sul1*: gen que confiere resistencia a sulfonamidas, *orf5*: marco abierto de lectura de función desconocida.

Los casetes genéticos encontrados en los integrones son extremadamente variables, se han descritos más de 60 casetes genéticos, donde se encuentran casetes que confieren resistencia a aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, trimetoprim, cloranfenicol, entre otros antimicrobianos y compuestos desinfectantes. Adicionalmente, se pueden observar varios casetes genéticos en un mismo integrón, lo cual se relaciona con la multiresistencia a los antimicrobianos. Así mismo, se ha reportado la existencia de integrones vacíos (In_0), es decir, no poseen casetes genéticos (Di Conza y Gutkind, 2010; Yan *et al.*, 2010).

La técnica de la reacción en cadena a la polimerasa (PCR) ha permitido estudiar la amplia distribución de los integrones clase 1 en aislados clínicos. La síntesis de oligonucleótidos específicos para las secuencias conservadas (5'CS y 3'CS) del integrón, permiten identificarlos en varios géneros bacterianos

(Levesqué *et al.*, 1995).

Fonseca *et al.* (2005) ejecutaron una investigación con el propósito de verificar la presencia de integrones en 106 aislados de *P. aeruginosa*, obtenidos de pacientes en el Amazonas brasileiro. Los autores reportaron una frecuencia de 41,50% de integrones clase 1. El gen encontrado con mayor frecuencia fue el *aac(6)* con 69,00%, seguido de *bla_{oxa}* (52,00%). De las cepas positivas para integrones clase 1, detectaron que 15 aislamientos (34,00%) no portaban casetes génicos. Aún cuando, el 71,00% de las cepas en la investigación fueron multirresistentes, no se encontró correlación entre la presencia de integrones y la multirresistencia.

Lim *et al.* (2009) realizaron la búsqueda de integrones clase 1 en 48 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, provenientes de 6 hospitales de Malasia; los investigadores reportaron que el 68,75% de las cepas fueron multirresistentes y el 19,00% contenían integrones de clase 1, además, demostraron que la mayoría de los aislamientos eran genéticamente diversos.

Yan *et al.* (2010) llevaron a cabo un estudio en un hospital ubicado al sur de China, con el propósito de determinar integrones clase 1 y 2 en 118 aislados clínicos. En el mismo, se identificó *P. aeruginosa* en el 15,00% (18/118) de las cepas aisladas, de las cuales, 83,00% (15/18) poseían integrones clase 1. Los genes encontrados con mayor frecuencia en los casetes genéticos de los integrones clase 1 fueron *dfrA12*, *orfF* y *aadA2*.

Yousefi *et al.* (2010) realizaron un trabajo en un hospital de Irán, con la finalidad de relacionar la presencia de integrones clase 1 con la resistencia a imipenem presentada por 160 aislados clínicos de *P. aeruginosa*. En el estudio se encontró 41,90% (63/160) de resistencia a imipemem, y 53,30% de integrones

clase 1. De los aislados clínicos resistentes al imipemen 91,00% presentaron integrones clase 1 (61/63).

Guzmán y Alonso (2008) estudiaron la presencia de integrones clase 1 y su asociación con plásmidos en 23 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Sucre-Venezuela. En la investigación se encontró la presencia de integrones clase 1 en el 43,47% de las cepas, de las cuales nueve cepas contenían un integrón y una cepa dos. Todos los integrones identificados se encontraban asociados a plásmidos.

La resistencia a los antimicrobianos constituye un problema de salud pública que involucra cada día nuevas especies bacterianas, complicándose cuando el microorganismo puede presentar la combinación de dos o más mecanismos de resistencia. Debido a que, la resistencia a los antimicrobianos, está codificada en genes localizados en distintos elementos genéticos, que pueden diseminarse entre las poblaciones bacterianas existentes en un determinado ambiente, y considerando que los integrones juegan un papel fundamental en la captación de genes de resistencia, en el presente estudio se determinó la presencia de integrones clase 1 en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes asistidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, estado Sucre, Venezuela.

METODOLOGÍA

Cepas

Se estudiaron 32 cepas de *P. aeruginosa*, las cuales representan el 50,0% de una población de 64 aislados recolectados de pacientes con diagnóstico de infección e indicación de cultivo y antibiograma, asistidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre, durante el periodo de junio-septiembre de 2008 e identificadas bioquímicamente por los métodos convencionales para bacterias Gram negativas no fermentadoras, propuestos por Koneman *et al.* (2008) (Tabla 1). Las 32 cepas se seleccionaron al azar y fueron aisladas a partir de muestras de secreciones, sangre, líquidos, catéter y orina, las mismas se encuentran conservadas en el laboratorio de Bacteriología Clínica del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre.

Subcultivos

Con el propósito de determinar la viabilidad de las cepas, éstas se sembraron en caldo Luria-Bertani (LB) a 35°C durante 18 horas. Posteriormente, se confirmó el género y la especie mediante los protocolos de identificación convencionales para bacterias Gram negativas no fermentadoras, incluyendo las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa, oxidación/fermentación de carbohidratos (glucosa, manitol, maltosa y xilosa), motilidad, hidrólisis de la arginina, descarboxilación de la lisina, crecimiento a 42°C, hidrólisis de la urea y susceptibilidad a polimixina B (Koneman *et al.*, 2008).

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo los lineamientos para bacilos Gram negativos no fermentadores propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, del inglés: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012).

Tabla 1. Características de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en pacientes atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.

Cepas	Servicio	Muestra	Terapia antimicrobiana previa	Estadía (días)
PA1	Medicina	Secreción	CIP, CLI	5
PA2	UCI	Secreción	OXA, IMP	8
PA3	Medicina	Secreción	AN	2
PA4	Diálisis	Orina	(-)	5
PA5	Medicina	Catéter	NO	4
PA6	Medicina	Líquido	OXA	39
PA7	Cirugía	Secreción	AN	6
PA8	UCI	Secreción	AMP, AN, CIP	7
PA9	UCI	Secreción	AMP, AN, CIP	15
PA10	Pediatría	Secreción	PEN, OXA	6
PA11	Medicina	Secreción	TZP	2
PA12	UCI	Secreción	(-)	9
PA13	Retén	Sangre	MEM, VAN	4
PA14	Medicina	Secreción	CIP, CLI	9
PA15	Medicina	Secreción	CIP, CLI	4
PA16	Retén	Catéter	AMP	2
PA17	Medicina	Secreción	OXA, CAZ, CIP, CLI	3
PA18	Pediatría	Catéter	CTX, VAN	5
PA19	Medicina	Espujo	(-)	10
PA20	UCI	Catéter	(-)	3
PA21	UCI	Secreción	CTX	7
PA22	Medicina	Espujo	PEN, FEP, CLI	4
PA23	Medicina	Secreción	IMP, CIP	21
PA24	Retén	Sangre	AMS	3
PA25	Retén	Sangre	AMS	4
PA26	Pediatría	Sangre	(-)	2
PA27	Retén	Sangre	AMS	3
PA28	UCI	Catéter	(-)	4
PA29	Retén	Sangre	AMS	2
PA30	Retén	Secreción	AMS	2
PA31	Retén	Sangre	AMS	7
PA32	Retén	Sangre	OXA	2

(-): no tenía terapia antimicrobiana previa, UCI: unidad de cuidados intensivos, PEN: penicilina G, AMP: ampicilina, AMS: ampicilina-sulbactam, OXA: oxacilina, TZP: piperacilina- tazobactam, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, VAN: vancomicina.

Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas sembrado en agar tripticasa de soya (Himedia), ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a $1,50 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Una vez obtenida la turbidez respectiva, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton (Himedia) contenido en placas de Petri, dejando secar para proceder a colocar los discos de los agentes antimicrobianos a ensayar: piperazilina (100 µg), piperazilina-tazobactam (100/10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (10 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), amikacina (30 µg), netilmicina (30 µg), gentamicina (30 µg), tobramicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), ofloxacina (5 µg) y cloranfenicol (30 µg) (todos marca OXOID). Las placas fueron incubadas a 35°C, durante 18 horas en aerobiosis, posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición empleando una regla milimetrada.

El halo de inhibición observado en la cepa bacteriana ante cada antimicrobiano se interpretó según las categorías sugeridas por el CLSI (2012), como susceptible, intermedio y resistente. La calidad de los discos se verificó empleando la cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Los fenotipos de resistencia obtenidos a través del estudio de la susceptibilidad antimicrobiana, se establecieron considerando el tipo de antimicrobiano que no presentó actividad para una cepa en particular. Dichos fenotipos fueron designados arbitrariamente con números romanos.

Detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC, BLEE y metalobetalactamasas

Se ubicaron estratégicamente discos de ceftazidima, amoxicilina/ácido

clavulánico, imipenem, meropenem y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para detectar los siguientes mecanismos:

Betalactamasa cromosómica de tipo AmpC: se dispusieron los discos de ceftazidima e imipenem a 15 mm de distancia. La presencia de AmpC inducible se observó cuando entre los discos se presentó un halo truncado (Radice *et al.*, 2011).

Betalactamasa de espectro extendido (BLEE): se ubicó el disco de ceftazidima a 15 mm del disco de amoxicilina/ácido clavulánico. La presencia de BLEE se evidenció con una distorsión en el halo de inhibición entre los discos de ceftazidima y amoxicilina/ácido clavulánico (Radice *et al.*, 2011).

Carbapenemasa de tipo metalobetalactamasa: se situaron discos de imipenem y meropenem a 15 mm del disco de EDTA. La presencia de metalobetalactamasa se observó a través de la sinergia entre los discos de carbapenémicos y EDTA (Radice *et al.*, 2011).

Detección de integrones clase 1

La extracción de ADN total se realizó empleando el estuche comercial Wizard Genomic (Promega). Siguiendo las instrucciones de la casa fabricante, se tomó 1,5 ml de caldo LB, inoculado con la cepa a estudiar, con 18 horas de crecimiento previo, se centrifugó durante 5 minutos a 5 000 g, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 450,0 µl de la solución de lisis de núcleo, se agitó suavemente. Se añadieron 3,0 µl de solución de ARNasa, se homogenizó de 5 a 6 veces por inversión para ser incubadas a 80°C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos, para luego añadir 150,0 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, se añadieron 600,0 μl de isopropanol y se centrifugó a 2 000 g por 15 minutos a 4°C. Después se descartó el isopropanol y se agregaron 600,0 μl de etanol al 70,00% el cual, se centrifugó a 12 000 g por 3 minutos. Seguidamente, se decantó el etanol y se agregaron 100,0 μl de etanol al 95,00%, se decantó y se dejó secar a 37°C, con cuidado de no exceder el secado. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 50,0 μl de solución de rehidratación de ADN y se incubó a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Finalmente, se guardó a -20°C hasta su uso.

Los integrones clase 1 fueron determinados utilizando la técnica de la PCR. Para la amplificación se emplearon los oligonucleótidos: 5'CS: 5'- GGC ATC CAA GCA GCA A -3' y 3'CS: 5'- AAG CAG ACT TGA CCT GA -3', los cuales son segmentos de ADN que hibridan en las regiones 5'CS y 3'CS de un integrón clase 1. Se emplearon 12,5 μl de master mix 2X (Promega), 4,0 μl de cada oligonucleótido (Invitrogen) para una concentración final de 0,62 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ y 2,5 μl del ADN bacteriano. Se completó con 2,0 μl agua destilada hasta obtener un volumen total de reacción de 25,0 μl (Levesqué *et al.*, 1995).

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización 94°C por 1 minuto, hibridación, 45°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto, durante 30 ciclos. Con una extensión final de 72°C por 10 minutos (Levesqué *et al.*, 1995).

Para el control de calidad de la PCR se empleó como control positivo la cepa *K. pneumoniae* (CVCM 682), la cual presenta un integrón de 750pb y como negativo *E. coli* J62-2 (CVCM 131), la cual no presenta integrón clase 1.

Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2,00%, el cual se preparó en buffer TBE1X (stock 10X: tris base 0,89 mol.l^{-1} , ácido bórico 0,89 mol.l^{-1} , EDTA 0,02 mol.l^{-1}). Este buffer, además, se utilizó para realizar las

migraciones electroforéticas (60 voltios durante una hora, aproximadamente) de los productos amplificados (Sambrook y Russell, 2001).

Para estimar el tamaño del fragmento de ADN amplificado, se utilizó el marcador ADN Ladder (GeneRuler™) de 10 000 pb de longitud, el cual se colocó en el gel junto a las muestras y los controles de la PCR.

Los geles fueron coloreados con solución de bromuro de etidio $0,50 \text{ mol.l}^{-1}$ durante 5 minutos, el exceso se eliminó manteniendo el gel en agua durante 5 minutos. Los productos amplificados fueron detectados en el gel, mediante la observación a través de un transluminador de luz ultravioleta, para finalmente ser fotografiados y analizados.

Análisis de los datos

Los resultados obtenidos fueron analizados y expresados porcentualmente en tablas y figuras (Dawson y Robert, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

P. aeruginosa constituye uno de los patógenos oportunistas aislados con mayor frecuencia de pacientes hospitalizados, debido a que produce una gran variedad de enfermedades infecciosas, tanto superficiales como sistémicas, las cuales, cursan con una letalidad extremadamente alta, a pesar del tratamiento con antimicrobianos. (Mago *et al.*, 2004; Morales y Andrade, 2006; Martínez *et al.*, 2007; Lujan *et al.*, 2008; Strateva y Yordanov, 2009).

En la tabla 2 se observa la frecuencia de *P. aeruginosa*, según el tipo de muestra de donde fue aislada. El 46,88% de las cepas se obtuvo de muestras de secreciones (respiratorias, de heridas quirúrgicas y de abscesos), seguida de muestras de sangre (25,00%), punta de catéter (15,63%), esputo (6,25%), líquidos estériles (3,13%) y orina (3,13%).

Tabla 2. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa*, según el tipo de muestra, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patrício de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.

Muestra	Número de cepa	Frecuencia (%)
Secreciones*	15	46,9
Sangre	8	25,0
Catéter	5	15,6
Esputo	2	6,3
Líquido	1	3,1
Orina	1	3,1
TOTAL	32	100,0

(*Secreciones respiratorias, de heridas quirúrgicas, abscesos).

En el presente estudio, la mayor frecuencia de *P. aeruginosa* fue detectada en muestras de secreciones y de sangre. Resultados relacionados fueron publicados por Murillo *et al.* (2009), quienes realizaron un estudio en el hospital general de Culiacán, México, encontrando porcentajes de *P. aeruginosa* superiores al 60,0% en cultivos de secreciones y de 7,2% en muestras de sangre. Así mismo, Mago *et al.* (2004), en un trabajo realizado en diferentes

centros de salud del estado Nueva Esparta, detectaron que el mayor aislamiento de *P. aeruginosa* se obtuvo de muestras de secreciones (81,9%). Sin embargo, Lujan *et al.* (2008) reportaron una mayor frecuencia de *P. aeruginosa* aislada de muestras de orina (62,2%) seguido de secreciones bronquiales (37,8%).

P. aeruginosa es el segundo patógeno causante de neumonía adquirida en hospitales, incluyendo las asociadas a ventilación mecánica, afectando principalmente a pacientes inmunosuprimidos, como aquellos que sufren del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, quemaduras, fibrosis quística, entre otros (Morales y Andrades, 2006; Yousefi *et al.*, 2010).

Las infecciones por *P. aeruginosa* han sido reportadas en todos los servicios de un centro hospitalario, pero su mayor frecuencia se presenta en la unidad de cuidados intensivos (UCI), salas quirúrgicas y de quemados (Lebeque *et al.*, 2006; Vitkauskienė *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011).

En este estudio, la distribución porcentual de los aislados según el servicio, indica que *P. aeruginosa* se presentó con mayor frecuencia en el área de medicina y retén, con 11 y 9 casos, respectivamente (Tabla 3).

Aunque varios autores reportan mayor aislamiento de *P. aeruginosa* en UCI (Martínez *et al.*, 2007; Picao *et al.*, 2009; Vitkauskienė *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011), en esta investigación se encontró mayor frecuencia en el área de medicina, este hecho puede deberse a que el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” posee tres salas de medicina interna (A, B y C) y sólo una sala de UCI; por lo tanto, puede existir una mayor concentración de pacientes en dicha área.

Tabla 3. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa*, según el servicio, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patrício de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.

Servicio	Número de cepa	Frecuencia (%)
Medicina	11	34,4
Retén	9	28,1
UCI	7	21,9
Pediatría	3	9,4
Cirugía	1	3,1
Diálisis	1	3,1
Total	32	100,0

UCI: unidad de cuidados intensivos.

En este mismo orden de ideas, Camacho *et al.* (2007), en un estudio realizado en un Hospital Universitario al norte de México, reportaron un 21,7% de *P. aeruginosa* aisladas, principalmente, del servicio unidad de cuidados críticos médicos y postquirúrgicos, seguido de medicina interna y cirugía general. Mientras que, Murillo *et al.* (2009) detectaron una prevalencia de *P. aeruginosa* del 32,4% proveniente de medicina interna, 28,8% de cirugía general y 26,1% de UCI.

Según los resultados de susceptibilidad en las cepas evaluadas, se observa un alto porcentaje de resistencia ante los distintos antimicrobianos ensayados (figura 2). El mayor porcentaje de cepas resistentes se ubico en gentamicina (81,3%) y el menor porcentaje para aztreonam (28,1%).

En cuanto a los betalactámicos, un elevado porcentaje de aislados presentó resistencia ante piperacilina (75,0%), imipenem (71,9%) y meropenem (68,8%). Con respecto a los aminoglucósidos, se encontraron elevados porcentajes de cepas resistentes a gentamicina (81,3%), amikacina (78,1%), netilmicina (78,1%) y trobamicina (59,4%). Entre las quinolonas ensayadas, el mayor porcentaje de cepas resistentes fue observado frente a ofloxacina (59,4%).

Se ha reportado que la resistencia bacteriana es un problema de salud pública reconocido a nivel mundial, que trae como consecuencia un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad de los pacientes, complicándose cuando un microorganismo puede presentar más de un mecanismo de resistencia y tiene la facultad de transmitirlo (García, 2003; Hernández, 2010).

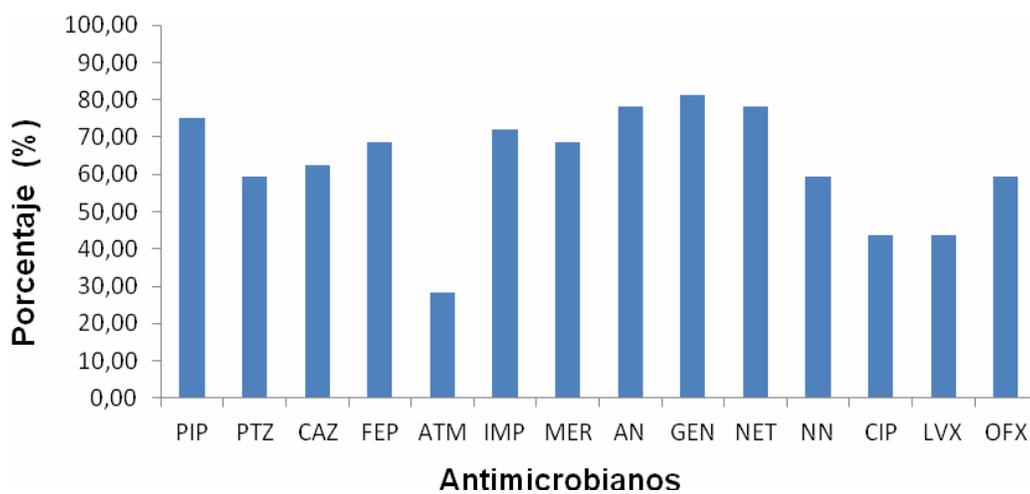


Figura 2. Distribución porcentual de la resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008. PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem, AN: amikacina, GEN: gentamicina, NET: netilmicina, NN: tobramicina, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, OFX: ofloxacina.

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a muchos antibióticos, entre ellos, a la mayoría de los betalactámicos, ácido nalidíxico, cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, trimetoprim-sulfametoxazol y rifampicina, razón por la cual, los agentes antimicrobianos que se pueden utilizar contra las infecciones por *P. aeruginosa* son relativamente limitados. Entre los agentes antipseudomonadales que se emplean para el tratamiento están ticarcilina, piperacilina, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina, ciprofloxacina, levofloxacina y ofloxacina (Branski *et al.*, 2009).

Un elevado porcentaje de las cepas estudiadas presentará resistencia a los antimicrobianos de uso común en la práctica médica, como lo son ceftazidima, cefepima, piperacilina, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, netilmicina y trobamicina, razón por la cual, no deben ser considerados como opciones terapéuticas en el tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Estos resultados coinciden con los publicados por Lujan *et al.* (2008), quienes al estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa*, en un hospital de Lima, Perú, encontraron altos porcentajes de resistencia a ceftazidima (71,0%), aztreonam (62,0%), ciprofloxacina (57,0%) y gentamicina (55,0%).

Otros autores han notificado altos porcentajes de cepas de *P. aeruginosa* resistentes (Martínez *et al.*, 2007; Picao *et al.*, 2009; Poole, 2011). Al respecto, Yousefi *et al.* (2010), en un estudio realizado en Teherán sobre la resistencia de *P. aeruginosa*, reportaron que dicho microorganismo es uno de los patógenos intrahospitalarios más difícil de tratar, debido a su multirresistencia, además, encontraron una frecuencia elevada de cepas resistentes a los carbapenemas.

En contraposición a lo encontrado en la presente investigación, Gamero *et al.* (2007), en un estudio realizado en un hospital de España, reportaron altos porcentajes de cepas de *P. aeruginosa* sensibles a los antimicrobianos betalactámicos (80,0%) y aminoglucósidos (75,0%), lo que pone de manifiesto que los porcentajes de susceptibilidad pueden variar dependiendo del área geográfica.

Al igual que en la presente investigación, Tovar (2008) realizó un estudio en Cumaná, estado Sucre, con el objeto de determinar la susceptibilidad antimicrobiana en 66 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, sin embargo, encontró que el mayor porcentaje de resistencia en las cepas fue para aztreonam (54,6%) y el menor para imipenem (15,2%), así mismo, reportó porcentajes de

resistencia menores al 30,0% para piperacilina, ceftazidima, cefepima, meropenem, gentamicina y amikacina.

Según los resultados de susceptibilidad antimicrobiana, se encontró que el 43,2% de los aislados clínicos estudiados fueron resistentes a 3 o más familias de antimicrobianos, lo que indica que dichas cepas presentaban multirresistencia. Este hecho desencadena un problema a nivel clínico, puesto que se disminuyen las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*. Al respecto, varios autores reportan la presencia de un elevado porcentaje de cepas multirresistentes en aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Martínez *et al.*, 2007; Pessoa *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2011).

La multirresistencia en *P. aeruginosa* puede deberse a varios mecanismos de resistencia, incluyendo sistemas de eflujo, producción de enzimas y pérdida de las proteínas de membrana externa, los cuales pueden presentarse simultáneamente y originar fenotipos de resistencia donde resulta difícil definir en base al antibiograma cuál de ellos sea el responsable (Moraga *et al.*, 2007; Strateva y Yordanov, 2009).

Desde el punto de vista clínico, los resultados del estudio fenotípico de la resistencia son importantes porque logran proveer información para minimizar la terapia empírica inapropiada, la cual ha sido asociada con un incremento en las tasas de mortalidad en las infecciones por *P. aeruginosa*.

En este trabajo de investigación, la evaluación de la actividad antimicrobiana permitió detectar 17 fenotipos de resistencia diferentes (Tabla 4). El fenotipo I se presentó con mayor frecuencia, encontrándose en diez cepas (PA13, PA15, PA16, PA24, PA25, PA27, PA29, PA30, PA31, PA32), seguido del fenotipo XI (PA1, PA2, PA14), fenotipo II (PA12 y PA20), fenotipo VIII (PA9 y PA23), fenotipo XI (PA1, PA2 y PA14) y el fenotipo XVI (PA5 y PA10).

Tabla 4. Fenotipos de resistencia presentes en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre de 2008.

Fenotipo	Perfil de resistencia	Nº de cepas	AmpC	BLEE	MBLs
I	PIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MER, GEN, NN, NET, AN	10	-	-	+
II	PIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MER, GEN, NET, AN, CIP, LVX, OFX	2	+	-	+
III	PIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MER, NET, AN, CIP, LVX, OFX	1	+	-	+
IV	PIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MER, AN, CIP, LVX, OFX	1	+	-	+
V	PIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, GEN, NN, NET, AN	1	-	-	+
VI	PIP, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MER, GEN, NET, AN, CIP, LVX, OFX	1	-	-	+
VII	PIP, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MER, GEN, NN, NET, AN, CIP, LVX, OFX	1	-	-	+
VIII	PIP, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MER, GEN, NN, NET, AN, CIP, LVX, OFX	2	-	-	-
IX	PIP, CAZ, FEP, ATM, NN, NET, AN	1	-	-	-
X	PIP, CAZ, ATM, GEN, NN, NET, CIP, LVX, OFX	1	+	-	-
XI	PIP, IMP, MER, GEN, NN, NET, AN, CIP, LVX, OFX	3	+	-	-
XII	ATM, IMP, MER, GEN, NET, AN, CIP, LVX, OFX	1	+	-	-
XIII	FEP, ATM, GEN, AN, LVX, OFX	1	+	-	-
XIV	FEP, ATM, OFX	1	+	-	-
XV	ATM, CIP	1	+	-	-
XVI	GEN, OFX	2	+	-	-
XVII	OFX	1	+	-	-

PIP: piperacilina, TZP: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem, AN: amikacina, NET: netilmicina, GEN: gentamicina, NN: trobamicina, CIP: ciprofoxacina, LVX: levofloxacina, OFX: ofloxacina, AmpC: observación fenotípica de betalactamasa cromosómica inducible de clase C, BLEE: observación fenotípica de betalactamasa de espectro extendido, MBLs: observación fenotípica de metalobetalatamasas.

Con respecto a los betalactámicos, en la tabla 4 se observa que los fenotipos I, II, III, y IV, presentaron resistencia a piperacilina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem y meropenem, con producción de metalobetalactamasa, mecanismo de resistencia que se caracteriza por tener un perfil hidrolítico que incluye a todos los betalactámicos con la excepción del aztreonam. Además, en los fenotipos II, III y IV, también se evidenció la presencia de AmpC inducible, enzima que en *P. aeruginosa* es natural y de muy poco valor epidemiológico al estar presente una metaloenzima (Vila y Marco, 2010; Radice *et al.*, 2011).

Los fenotipos V, VI y VII fueron productores de enzima tipo metalobetalactamasa, sin embargo, presentaron variaciones en la actividad de dos antimicrobianos, en el fenotipo V se observó sensibilidad a meropenem, en el fenotipo VI y VII incluye resistencia ante aztreonam, lo cual sugiere, al interpretar el antibiograma, que en estas cepas puede existir, adicionalmente, la presencia de una bomba de eflujo, BLEE o alteración de la permeabilidad (Vila y Marco, 2010; Radice *et al.*, 2011).

En las cepas que presentaron el fenotipo VIII, se observó resistencia a piperacilina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem y meropenem, sin la observación fenotípica de AmpC inducible o metalobetalactamasas, por lo tanto, es probable que exista la producción de otra clase de carbapenemasa, como por ejemplo, las serinocarbapenemasas del grupo A (KPC), las cuales, se caracterizan por hidrolizar eficientemente las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas, sin ser inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam (Corso *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2011). Para la detección fenotípica de dichas enzimas se recomienda aplicar a las cepas el método de Hodge modificado (“Hodsuda”).

En las cepas que presentaron el fenotipo IX se observó resistencia a

piperacilina, ceftazidima, cefepima y aztreonam y las cepas con el fenotipo X fueron resistentes a piperacilina, ceftazidima y aztreonam, aunque, en el presente trabajo no se observó, mediante el estudio fenotípico la producción de BLEE, a través de la sinergia de doble disco, la presencia de la misma no puede ser descartada, ya que estas constituyen un grupo importante de enzimas que poseen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, pero no a cefamicinas ni a carbapenémicos, siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Los genes que codifican para dichas enzimas se suelen encontrar generalmente en plásmidos, elementos genéticos móviles que facilitan su diseminación (Vila y Marco, 2010; Navarro *et al.*, 2011; Radice *et al.*, 2011).

Las cepas que poseen el fenotipo XI se caracterizaron por presentar resistencia a piperacilina, imipenem y meropenem, y las cepas con el fenotipo XII son resistentes a aztreonam, imipenem y meropenem, este comportamiento puede deberse a la combinación de dos mecanismos, tales como, impermeabilidad de la membrana y sistemas de expulsión activa. En *P. aeruginosa* es frecuente la producción de sistemas de eflujo tales como MexAB-OprM y MexXY-OprM, los cuales no sólo afectan en menor o mayor medida a los betalactámicos, sino también a las fluoroquinolonas y otros antimicrobianos. La impermeabilidad de la membrana se atribuye a pérdida de proteínas de membrana (porinas), las cuales son los canales de entrada de los antimicrobianos a la célula bacteriana. La impermeabilidad de la membrana de forma similar a los sistemas de eflujo puede causar resistencia a varios antimicrobianos simultáneamente (Vila y Marco, 2010; Radice *et al.*, 2011).

Los fenotipos XIII y XIV mostraron resistencia a cefepima y aztreonam, y el fenotipo XVI sólo a aztreonam. Posiblemente, el mecanismo involucrado en dichas resistencias sean sistemas de expulsión activa.

La mayor parte de los fenotipos observados en las cepas de *P. aeruginosa*, presentaron resistencia al menos a un aminoglucósido. La producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos es el mecanismo de resistencia más importante en *P. aeruginosa*, frente a estos antimicrobianos. Los genes que codifican para dichas enzimas suelen encontrarse en integrones clase 1, que a su vez, están localizados en plásmidos conjugativos. Sumado al mecanismo anteriormente señalado, se encuentran las bombas de expulsión activas de tipo MexXY-OprM, MexXY-OprB, MexXY-OpmG y MexXY-Opml, aunque son mecanismos de resistencia poco frecuentes contra los aminoglucósidos en *P. aeruginosa* (Yan *et al.*, 2007; Radice *et al.*, 2011; Budak *et al.*, 2012).

La resistencia presentada por las cepas estudiadas a las quinolonas, posiblemente, se deba a una combinación de mecanismos tales como alteraciones de las proteínas diana, alteraciones en la permeabilidad de la membrana y sobreexpresión de bombas de expulsión. Sin embargo, se han reportado genes de resistencia a quinolonas codificados en plásmidos y asociados a integrones clase 1, tales como, *qnr* y el *aac (6')-Ib-cr*, que codifica la enzima inactivante de aminoglucósidos que acetila también las quinolonas (Rodríguez, 2005; Ruiz, 2007; Vila y Marco, 2010; Navarro *et al.*, 2011; Radice *et al.*, 2011).

La aparición de cepas resistentes se debe, fundamentalmente, al uso masivo e irracional de los antimicrobianos y a la existencia de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones, los cuales son claves en la diseminación de la misma. Particularmente, los integrones se han identificados en distintas bacterias, entre las cuales se encuentran las enterobacterias y los BGNNF. El papel de estos elementos ha tomado gran valor, debido a que son responsables, en parte, de la adquisición de mecanismos de resistencia por vía horizontal, presentándose como almacenadores de genes de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias

(Fonseca *et al.*, 2005; Moraga *et al.*, 2007). La frecuencia de integrones clase 1 en bacilos Gram negativos, causantes de infecciones hospitalarias, varía de acuerdo al hospital y al período en que son analizados los aislamientos y, en la última década, se han considerado como un factor clave en la investigación de las bases genéticas causantes de la multirresistencia de *P. aeruginosa* (Levesqué *et al.*, 1995; Maguire *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001; Budak *et al.*, 2012)

A pesar de que en esta investigación se identificaron cepas multiresistentes y con diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana, los resultados de la PCR muestran que sólo la cepa PA11 (1/32), presentó un integron clase 1 (Fenotipo XIV), la cual se aisló de una muestra de secreción, que provenía del área de medicina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, con resistencia a cefepima, aztreonam y ofloxacina (Figura 3). Al respecto, a nivel internacional, numerosos trabajos han determinado integrones clase 1 en *P. aeruginosa* (Ruíz, 2007; Yan *et al.*, 2007; Juan *et al.*, 2009; Kotsakis *et al.*, 2010).

En este orden de ideas, Yan *et al.* (2006) realizaron un estudio en 26 aislados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes en Taiwán, en el cual encontraron que el 88,5% de las cepas poseían integrones clase 1, los cuales se relacionaban con determinantes de resistencia para betalactámicos, tales como *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-3}, *bla*_{OXA-17} y *bla*_{OXA-10}. Por su parte, Manzur *et al.* (2007) estudiaron 41 muestras clínicas de *P. aeruginosa*, provenientes de distintas instalaciones médicas de Bolivia, con la finalidad de evaluar la presencia de integrones clase 1 y 2. Dichos autores reportaron integrones clase 1 en el 46,3% de las muestras analizadas y además observaron una relación entre la presencia de integrones y la multirresistencia de las muestras estudiadas.

Moraga *et al.* (2007) investigaron la presencia de integrones clase 1 y 2 y su

relación con el fenotipo de resistencia en bacilos Gram negativos provenientes de muestras clínicas de un hospital de Chile. De un total de 88 cepas, 32,0% (28/88) fueron identificadas como BGNNF, de los cuales, 7,3% (6/28) correspondieron a *P. aeruginosa*, entre ellas, se detectó una cepa portadora de integrones clase 2. Los autores concluyeron que los datos obtenidos no permitieron encontrar una relación entre la presencia de integrones y el fenotipo de resistencia.

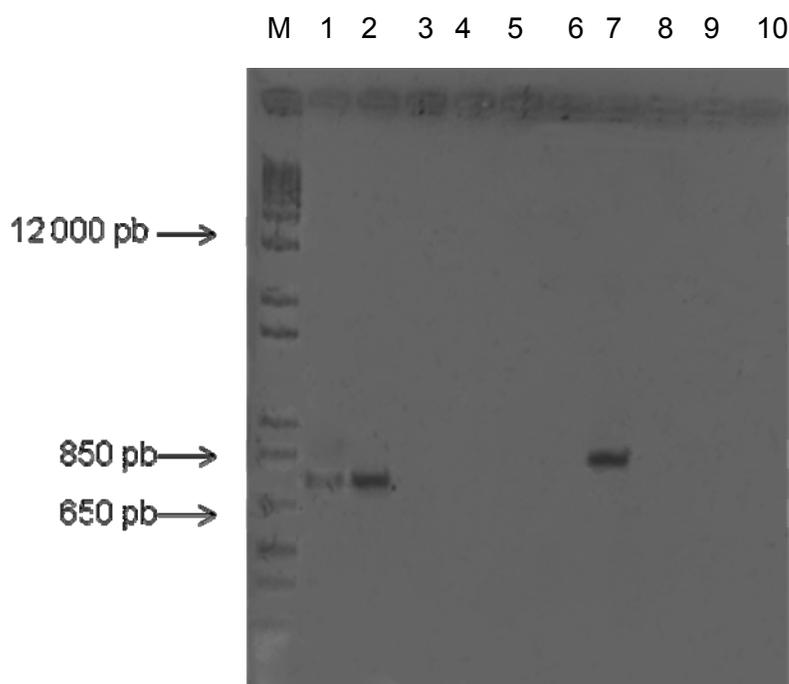


Figura 3. Producto de amplificación de la región variable del integrón clase 1, aislado de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en un paciente atendido en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo junio–septiembre, de 2008. Carril M: marcador 10 000 pb ADN Ladder (GeneRuler™), carril 1 y 2: *Klebsiella pneumoniae* (CVCM N° 682) control positivo 750 pb, carril 3: *Escherichia coli* J62-2 (CVCM N° 131) control negativo, carril 4: PA1, carril 5: PA5, carril 6: PA9, carril 7: PA11 (850 pb), carril 8: PA12, carril 9: PA13, carril 10: PA14.

Por otra parte, en España, Rodríguez *et al.* (2010) caracterizaron molecularmente 9 aislados clínicos de *P. aeruginosa* productores de metalobetalactamasas, provenientes del servicio de microbiología, revelando la presencia de integrones clase 1 en todos los aislados clínicos, dichos

integrones poseían el gen *bla_{VIM-2}*, lo que justificaba la resistencia a los carbapenemas.

Más reciente, Budak *et al.* (2012) evaluaron cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de la UCI de 6 hospitales de Turquía, con el propósito de estudiar los genes de resistencia a betalactámicos y el rol de los integrones clase 1 en dicha resistencia. Los resultados revelaron la presencia de integrones clase 1 en el 14,3% de las cepas estudiadas y los análisis de secuenciación mostraron que los integrones clase 1 encontrados no contenían ningún determinante de resistencia para betalactámicos, por lo tanto, los autores no lograron relacionar la resistencia a los betalactámicos con la presencia de los integrones clase 1.

En la región variable de los integrones clase 1 se han reportado, aproximadamente, más de 100 casetes genéticos, los cuales pueden conferir resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y quinolonas, siendo los genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, los que con mayor frecuencia se detectan en *P. aeruginosa*. Sin embargo, se han reportado desde integrones con región variable vacía, hasta algunos con más de siete casetes genéticos, sin embargo, habitualmente se suelen encontrar de dos o tres casetes genéticos en los integrones. En los últimos años, se han descrito numerosas combinaciones de casetes genéticos, incluso varias copias de un mismo casete en un mismo integrón (García, 2002; Ruíz, 2007; Di Conza y Gutkind, 2010, Budak *et al.*, 2012).

En la presente investigación, el tamaño del integrón detectado en la cepa PA11 fue de 850pb. Según el fenotipo de resistencia expresado y el tamaño del integrón, se puede sospechar de una enzima tipo CTX-M, por la resistencia de la cepa a cefepima, sin embargo hay que resaltar que para conocer el gen que porta el integrón clase 1, es necesario realizar análisis de secuenciación, ya que

incluso puede tratarse de un gen que no se esté expresando. El tamaño de los integrones varía según el arreglo de los genes que posea el casete genético, existen reportes de integrones clase 1 con tamaños entre 200 a 400pb, sin casetes genéticos o vacíos, también se han encontrado integrones clase 1 con una longitud entre 750 a 865pb, los cuales poseen un gen en el casete, tales como, *bla_{GES}* o *aadB*. De forma similar, se han descrito integrones clase 1 entre 1100 a 1700pb, donde se observan varios genes en un mismo casete (*aadA2-dfrA12*), así como combinaciones de genes en varios casetes dentro de un integrón (Ruíz, 2007; Di Conza y Gutkind, 2010; Kotsakis *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Budak *et al.*, 2012).

Los mecanismos de resistencia relacionados con genes presentes en los integrones son variados e incluyen la síntesis de proteínas como las enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA), cloranfenicol acetil transferasas (CAT), modificantes de rifampicina, betalactamasas, especialmente carbapenemasas, cefotaximasas y dihidrofolato reductasas. También, se han descrito genes que codifican proteínas protectoras de la ADN girasa y bombas de eflujo (González *et al.*, 2004; Ruiz, 2007; Di Conza y Gutkind, 2010).

Se ha demostrado una gran variedad de casetes genéticos en los integrones clase 1 en *P. aeruginosa*, tales como, genes que codifican resistencia a aminoglucósidos (*aadB*, *aadA*), a los betalactámicos (*bla_{oxa}* y *bla_{vim}*), a trimetoprim (*dfrA12*), entre otros. Es importante resaltar que, los genes que se encuentran ubicados cercanos a los promotores, son los que, generalmente, se expresan (Pagniez *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007; Shahcheraghi *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Vila y Marco, 2010; Yan *et al.*, 2010; Radice *et al.*, 2011; Budak *et al.*, 2012).

En este mismo orden de ideas, Yan *et al.* (2010) reportaron integrones clase 1 con tamaños desde 200 hasta 2655pb, en el estudio se identificaron 33 casetes

genéticos distintos, dentro de los cuales predominaban genes de resistencia a aminoglucósidos (*aadA2*) y a trimetoprim (*dfrA12*). Estos determinantes son responsables de conferir resistencia a los antimicrobianos estreptomicina, espectomicina y trimetoprim, los cuales son empleados con mucha frecuencia en infecciones del tracto urinario, factor que contribuye a que permanezcan estos casetes.

Pagniez *et al.* (2006) realizaron una investigación en un hospital universitario de Argentina, en la cual encontraron una asociación entre los genes que codifican para metalobetalactamasas (MBL_S) y los integrones clase 1 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemas. En todos los casos (10/91), los genes codificantes de MBL_S se encontraban como casetes en la región variable de los integrones clase 1.

En Venezuela, existen trabajos realizados sobre identificación de integrones clase 1 en bacterias distintas a *P. aeruginosa*. Al respecto, Torres *et al.* (2005), detectaron integrones clase 1 en 14 aislados clínicos de enterobacterias, en varios hospitales de Caracas, encontrando una relación entre los integrones clase 1 y los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}. En el Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá, de Cumaná, estado, Sucre, también se han realizado investigaciones previas sobre integrones, tal es el caso de Rodríguez (2008), quien detectó integrones clase 1, en 3 cepas de enterobacterias, mientras que, Guzmán y Alonso (2009) reportaron integrones clase 1 asociados a plásmidos en 10 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.

Se encuentra bien establecida la amplia distribución de los integrones clase 1 en los bacilos Gram negativos, y su importancia en la adquisición y diseminación de genes de resistencia. Los integrones clase 1 se muestran como elementos genéticos que les permiten a las bacterias poseer un gran potencial adaptativo, estos se pueden expresar bajo presión selectiva y además

compartir entre microorganismos de la misma especie o entre especies diferentes. La baja frecuencia de integrones clase 1 en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas contrastan con la elevada resistencia presentadas por dichas cepas. Estos datos permiten inferir que los posibles mecanismos involucrados en dicha resistencia no se encuentran ubicados en integrones clase 1, lo que abre un camino a investigaciones futuras, que permitan dilucidar los mecanismos genéticos que promueven la transmisión de genes responsables de la resistencia antimicrobiana en cepas de *P. aeruginosa* en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.

CONCLUSIONES

Los pacientes internados en el área de medicina y retén fueron los más afectados con infecciones por *P. aeruginosa*, siendo aislada con mayor frecuencia de las muestras de secreción y sangre.

El mayor porcentaje de cepas resistentes fue frente a gentamicina, amikacina, netilmicina y piperacilina. El antimicrobiano más activo contra *P. aeruginosa* fue aztreonam.

Se evidencia baja frecuencia de integrones clase 1 en los aislados clínicos de *P. aeruginosa* evaluados.

RECOMENDACIONES

Fomentar el uso y selección adecuada de los agentes antimicrobianos de amplio espectro en el ambiente hospitalario, especialmente, en el área de medicina y retén, de tal manera de evitar el progreso y propagación de infecciones intrahospitalarias; y además, concientizar al personal de salud para que aplique normas higiénicas antes y después de examinar a los pacientes.

Realizar la detección de otros genes de resistencia a las cepas de *P. aeruginosa* recolectadas en la presente investigación, puesto que es importante continuar con los estudios de epidemiología molecular, que permitan crear estrategias y planes para evitar la diseminación de microorganismos multirresistentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, G.; Malaver, E.; Guzmán, M. y Rodríguez, V. 2005. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multirresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 4: 81-84.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Bennett, P. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 1-4.
- Bodí, M. y Garnacho, J. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a la monoterapia. *Medicina Intensiva*, 31 (2): 83-87.
- Branski, L.; Al Mousawi, A.; Rivero, H. y Jeschke, M. 2009. Emerging infections in burns. *Surgical Infections*, 10 (5): 389-397.
- Budak, F.; Kasap, M.; Kolayli, F.; Faradenizli, A. y Vahaboglu, M. 2012. Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Turk Journal of Medical Science*, 42 (1): 149-156.
- Camacho, A.; Acosta, G.; Rositas, F. y Cañizalez, J. 2007. Resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital de enseñanza del norte de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 27: 44-48.
- Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32: 243-259.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Twentieth second informational supplement M100-S22. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA.
- Corso, A.; Guerriero, L.; Pasteran, F.; Ceriana, P.; Callejo, R.; Prieto, M.; Tuduri, E.; Lopardo, H.; Vay, C.; Smayervsky, J.; Tokumoto, M.; Álvarez, J.; Ramón, P. y Galas, M. 2011. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30 (6): 619-626.

- Coque-González, M. 2008. Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23: 251-253.
- Dawson, S. y Robert, G. 1997. *Bioestadística Médica*. Editorial el Manual Moderno S.A. México.
- Di Conza, J. y Gutkind, G. 2010. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42: 63-78.
- Fonseca, E.; Vieira, V.; Cipriano, R. y Vicente, A. 2005. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 44 (3): 303-309.
- Gamero, M.; García, A.; Rodríguez, F.; Ibarra, A. y Casal, M. 2007. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*, 20 (2): 230-233.
- García, J. 2002. Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos. *Actualidad Sociedad Española de Microbiología*, 28:18-22.
- García, P. 2003. Resistencia bacteriana en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 20: 11-23.
- González, G.; Mella, S. y Zemelman, R. 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile*, 132: 619-626.
- Gravel, A.; Fournier, B. y Roy, P. 1998. DNA complexes obtained with the integron integrate *IntI1* at the *attI1* site. *Nucleic Acid Research*, 26 (19): 4347-4355.
- Guzmán, M. y Alonso, G. 2009. Integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28: 105-109.
- Hernández, E. 2010. "Escherichia coli" productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Trabajo de Postgrado. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.
- Juan, C.; Mulet, X.; Zamorano, L.; Alibertí, S.; Pérez, L. y Oliver, A. 2009. Detection of a novel extended-spectrum β -lactamase OXA-161 from a plasmid located integrón in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (12): 5288 - 5290.

Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Jonda, W.; Sommers, H. y Winn, W. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. México.

Kotsakis, S.; Papagiannistis, C.; Tzelepi, E.; Legakis, N.; Miriagou, V. y Tzouvelekis, L. 2010. GES-13, a β -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (3): 1331-1333.

Lebeque, Y.; Morris, H. y Calás, N. 2006. Infecciones nosocomiales: Incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Medicina*, 45 (1). <http://scielo.sld.cu.com>. (15/03/2012).

Levesqué, C.; Piche, L.; Larose, C.; Roy, P. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39 (1): 185-191.

Lim, K.; Yasin, R.; Yeo, C.; Puthucheary, S.; Balan, G.; Maning, N.; Wahab, Z.; Ismail, N.; Tan, E.; Mustaffa, A. y Thong, K. 2009. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *Journal of Microbiology and Immunology Infectology*, 42 (3): 197-209.

Lujan, D.; Ibarra, J. y Mamani, E. 2008. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. *Revista Biomédica*, 19: 156-160.

Machado, G.; Lagoz, A.; Riccardi, S. y Bopp, D. 2011. Occurrence and the susceptibility to antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. at a tertiary hospital in southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44 (2): 168-172.

Mago, O.; Betancourt, J., Castillo, E.; González, G. y Marín, G. 2004. Frecuencia de *Pseudomonas* spp. Grupo fluorescente provenientes de diferentes centros de salud del estado Nueva Esparta-Venezuela. *Kasmera*, 32 (2): 80-88.

Manzur, M.; Bustamante, Z. y González, G. 2007. Presencia de integrones y su relación con la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Gaceta Médica Boliviana*, 5: 1-12.

Martínez, P.; Espinal, P. y Mattar, S. 2007. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el hospital San Jerónimo de Montería. *Infectio*, 11(1): 6-15.

Maguire, A.; Brown, D.; Gray, J. y Desselberger, U. 2001. Rapid screening technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (4): 1022-1029.

McGowan, J. 2006. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *American Journal of Infection Control*, 34: 29-37.

Moraga, R.; Santander, E.; Arias, T. y Méndez, F. 2007. Integrones y su relación con el fenotipo de resistencia en bacilos gram-negativos aislados en el Hospital Torres Galdames de Iquique, Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 24 (5): 384-390.

Morales, J. y Andrade, J. 2006. Factores asociados a mortalidad y patrones de susceptibilidad antibiótica en bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa*. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*, 63: 291-300.

Murillo, J.; Sosa, L. y López, G. 2009. Patrón de Resistencia Antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital General de Culiacán. *Sociedad Médica del Hospital General de Culiacán "Dr. Bernardo J. Gastélum"*, 3 (2): 6-11.

Navarro, F.; Calvo, J.; Cantón, R.; Fernández, F. y Mirelis, B. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram-negativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (7): 524-534.

Navon-Venezia, S.; Ben-Ami, R. y Carmeli, Y. 2005. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18 (4): 306-313.

Pagniez, G.; Radice, M.; Cuirolo, A.; Rodríguez, O.; Rodríguez, H.; Vay, C.; Famiglietti, A. y Gutkind, G. 2006. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 33-37.

Peter, E.; Leverstein, M.; Box, A.; Verhoef, J. y Fluit, A. 2001. Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2961-2994.

Pessoa, E.; Ramos, H.; Vieira, M.; Monteiro, M.; Gomes, N. y Gomes, R. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: frequency of resistance to multiple drugs and cross-resistance between antimicrobials in Recife/PE. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 19 (4): 421-427.

Picao, R.; Poriel, L.; Gales, A. y Nordmann, P. 2009. Diversity of β -lactamasas produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing

bloodstream infections in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (9): 3908- 3913.

Poole, K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2: 1-12.

Radice, M.; Marín, M.; Giovanakis, M.; Vay, C.; Almuzara, M.; Limansky, A.; Casellas, J.; Famiglietti, A.; Quinteros, M.; Bantar, C., Galas, M.; Kovensky, J.; Nicola, F.; Pasteran, F., Soloaga, R. y Gutkind, G. 2011. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos Gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, 43: 136-153.

Recchia, G. y Hall, R. 1997. Origins of mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiology*, 5: 389-394.

Rodríguez, E. 2008. Integrones de la clase 1 en cepas de enterobacterias aisladas de pacientes con infección nosocomial. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Rodríguez, J. 2005. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23 (1): 25-31.

Rodríguez, M.; Ruíz, B.; Rodríguez, C.; Romo, M.; Monteagudoy, I. y Martínez, L. 2010. Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (2): 99-103.

Rossolini, G. y Mantengoli, E. 2005. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 17-32.

Ruíz, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Trabajo de postgrado. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España.

Sambrook, L. y Russell, D. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor. New York.

Shahcheraghi, F.; Nikbin, V. y Feizabadi, M. 2009. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases genes among multidrug-resistant isolates of

Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. *Microbial Drug Resistance*, 15 (1): 37-39.

Stokes, H. y Hall, R. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3: 1669-1683.

Strateva, T. y Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1133-1148.

Torres, L.; Benítez, M.; Domínguez, M., Torres, O.; Gagliotta, V.; Calvo, A.; Rodríguez, N., Ardila, J. y Pedroza, R. 2005. Detección de integrones clase 1 en cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV y CTX-M grupo 2. *Vitae Academia Biomédica Digital*. <http://caibco.ucv.ve>. (15/03/2012).

Tovar, E, 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia para la producción de betalactamasas, en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

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

Vitkauskiene, A.; Skrodeniene, E.; Dambrauskiene, A.; Macas, A. y Sakalauska, R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina (Kaunas)*, 46 (7): 490-495.

White, P.; Melder, C. y Rawlinson, W. 2001. Integrons and gene cassette in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2658-2661.

Yan, H.; Li, L.; Zong, M.; Jahangir, A.; Shinoda, S. y Shi, L. 2010. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacterial isolates from patients in south China. *Journal of Health Science*, 56 (4): 442-450.

Yan, H.; Shi, L.; Yamasaki, S.; Li, X.; Cao, Y.; Li, L.; Yang, L. y Miyoshi, S. 2007. A plasmidic class 1 integron from five *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains harbored *aacA4* and nonsense-mutated *cmlA1* gene cassettes. *Journal of Health Science*, 53 (6): 750-755.

Yan, J.; Hsueh, P.; Lu, J.; Chang, F.; Ko, W. y Wu, J. 2006. Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 530-536.

Yousefi, S.; Nahaei, M.; Farajnia, S.; Ghojazadeh, M.; Akhi, M.; Milani, M. y Ghotaslou, R. 2010. Class 1 integron and imipenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence and antibiotic susceptibility. *Iranian Journal of Microbiology*, 2 (3): 113-119.

HOJA DE METADATOS

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

Título	INTEGRONES CLASE 1 EN CEPAS INTRAHOSPITALARIAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AISLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO “ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ”
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rodríguez, M. Aurinés, Del V.	CVLAC	18 248 199
	e-mail	rodriguez_aurines@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

INTEGRONES CLASE 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
INTRAHOSPITARIOS

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Microbiología	Bacteriología

Resumen (abstract):

Se evaluó la presencia de integrones clase 1 en cepas intrahospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa*, para ello se seleccionaron 32 cepas al azar de un total de 64 aislados provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria asistidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre durante el periodo de junio-septiembre de 2008. La confirmación de la especie se realizó empleando los protocolos convencionales para bacilos Gram negativos no fermentadores. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos para bacilos Gram negativos no fermentadores, establecidos por el instituto de estándares clínicos y de laboratorios (2012). La detección de los integrones clase 1 se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa empleando oligonucleótidos específicos que hibridan en las regiones conservadas 5'CS y 3'CS. El estudio reveló un alto porcentaje de cepas resistentes a diversos antimicrobianos. El mayor porcentaje de resistencia presentado por las cepas fue para gentamicina (81,25%), seguido de amikacina y netilmicina (78,13%), piperacilina (75,00%) e imipenem (71,88%). Sólo una cepa (3,13%) presentó integrones clase 1. La baja frecuencia de integrones clase 1 en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas contrastan con el elevado porcentaje de cepas resistentes, estos datos permiten inferir que los genes responsables de los posibles mecanismos involucrados en dicha resistencia no se encuentran localizados en estos elementos genéticos y abre la posibilidad de futuros estudios para determinar la ubicación de los genes causantes de la misma.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Guzmán, Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	miltzaguz@yahoo.com
	e-mail	
Salazar, Elsa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	elsazul2003@yahoo.com
	e-mail	
Rodulfo, Hectorina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	hrodulfo2002@yahoo.es
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	08	02

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
AuriTesisDigital.doc	Aplication/ Word.doc

Alcance:

Espacial: Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Bioanálisis

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

Universidad de Oriente

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA

RECIBIDO POR *[Firma]*

FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNDELO
Secretario



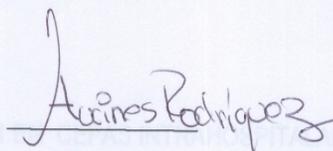
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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

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



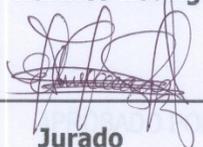
Autor

Aurinés Rodríguez



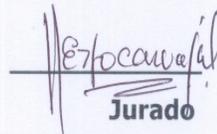
Asesor

Guzmán, Militza



Jurado

Salazar, Elsa



Jurado

Rodolfo, Hectorina

POR LA COMISIÓN DE TESTES

