



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

**TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN
AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*
(Modalidad: Tesis de Grado)**

OLYMAR DEL VALLE MARCHÁN MALAVÉ

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

CUMANÁ, 2012

TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

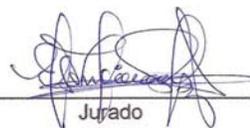
APROBADO POR:



MSc. Dina Antón
Aseora



Jurado



Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Cepas bacterianas	8
Clínicas o donantes	8
Receptora	8
Viabilidad de las cepas.....	8
Susceptibilidad antimicrobiana	8
Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	9
Detección de metalobetalactamasas (MBLs).....	10
Selección de cepas resistentes.....	10
Transferencia de plásmidos de resistencia	10
Determinación de la concentración de antimicrobiano a emplear en el ensayo de conjugación	10
Conjugación	11
Determinación de la frecuencia de transferencia	12
Verificación de los determinantes transferidos	12
Análisis de datos	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA	28
HOJA DE METADATOS	35

DEDICATORIA

A

Dios, luz y guía de cada uno de mis pasos.

Mi madre, el mejor regalo de Dios, a quien le debo todo lo que soy, quien siempre está ahí incondicionalmente para mi, apoyándome, queriéndome y enseñándome que solo una madre puede dar tanto amor. Este logro es por ti y para ti. TE AMO Mami.

Mis hermanos César y Luis, más que eso, amigos, compañeros de vida, razones de orgullo, motivos de muchas alegrías, no imagino mi vida sin ustedes. LOS AMO.

Mi Corazón, José quien siempre está ahí, acompañándome, apoyándome y queriéndome, en los altos y bajos de la vida, sin ti nada sería igual. TE ADORO MI VIVI.

Mis primas, amigas, hermanas Yli y Marie, compañeras de penas, alegrías, de esas interminables noches de risas, cómplices de recuerdos memorables, cuanto LAS AMO.

Mi mano derecha, y muchas veces izquierda, más que amiga, hermana de la vida, mi querida Patry, compañera de largos desvelos, frustraciones, tristezas, y lo mejor, las alegrías. Amiga, este triunfo es compartido.

Mis también queridísimas amigas y hermanas de la vida, Carmen V., Jenire y Patricia. Doy gracias a Dios por ponerlas en mi camino y permitirme compartir con ustedes cada uno de los momentos vividos durante todos estos años.

AGRADECIMIENTO

A

Mi Dios por permitirme contemplar cada nuevo día, por llenarme de paciencia y fortaleza para alcanzar esta meta tan anhelada.

Mi asesora, MSc. Dina Antón, por su guía, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de este camino, no fue fácil profe pero lo logramos.

Mis amigos y compañeros de laboratorio Rita Loero, Aura Nazaret, Samia Small, Ángel Alvarez, María V. Figueras y Rosimir Cabeza, por hacer más amena la estadía en el laboratorio y por sus palabras de aliento en los momentos de desesperanza.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma aportaron un granito de arena para materializar este sueño.

Infinitas gracias.....

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipos de susceptibilidad de cepas clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. Febrero-mayo de 2008.	17
Tabla 2. Frecuencia de transferencia plasmídica obtenida en el proceso de conjugación bacteriana en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Tabla 3. Perfil de resistencia y producción de metalobetalactamasas en la cepa donante, receptora y transconjugante.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los betalactámicos ensayados en las 26 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , aisladas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. Febrero-mayo de 2008.....	14
Figura 2. Detección de betalactamasas en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , aisladas en pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. Febrero-mayo de 2008.	20
Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas donante (A), receptora (B) y transconjugante (C), frente a los antibióticos betalactámicos ensayados.	21

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la transferencia de plásmidos en cepas intrahospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a betalactámicos y productoras de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y/o metalobetalactamasas (MBL's). Para ello, se estudiaron 26 cepas aisladas de pacientes reclusos en los diferentes servicios del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" estado Sucre, recolectadas entre los meses de febrero-mayo de 2008. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante la prueba de difusión del disco en agar, la producción de BLEE y MBL's se determinaron por pruebas de sinergia de doble disco y el método del disco combinado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), respectivamente, mientras que los ensayos de conjugación se realizaron empleando la técnica sobre filtro. El 88,46% de las cepas fueron resistentes a ceftriaxona; 46,15% resistentes a ceftazidima; 38,46% resistentes a aztreonam e imipenem respectivamente; 19,23% a meropenem y sólo 11,54% resistente a cefepime. Ninguna de las cepas en estudio expresó la producción de BLEE, mientras que 7,69% mostró fenotípicamente la producción de MBL's. Se obtuvo que el 100,00% de las cepas ensayadas en el proceso de conjugación lograron transferencia de genes codificadores de resistencia a ceftriaxona a la cepa receptora *E. coli* K-12 J53-2, con una frecuencia de transferencia de 10^{-4} (transconjugantes por célula donante). La transferencia de resistencia a ceftriaxona a la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2 permite inferir que la resistencia a este antibiótico en cepas de *P. aeruginosa* se encuentra en elementos de resistencia que pueden ser transferidos hacia otras bacterias.

Palabra y/o Frases Claves: *Pseudomonas aeruginosa*, Betalactámicos, Plásmidos, Betalactamas, Metalobetalactamasas, Conjugación en *Pseudomonas aeruginosa*

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por la capacidad natural o adquirida de una cepa bacteriana a permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antimicrobiano (Koneman et al., 1999). El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental, realizada por los antisépticos y desinfectantes, ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir eficazmente la acción bactericida de los antimicrobianos (Pedroza et al., 2002).

Existen, básicamente, cuatro mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos: I) disminución de la permeabilidad de la membrana celular, lo cual evita el paso del antibiótico a la célula bacteriana; II) modificación química del sitio blanco sobre el que actúa el antibiótico, con la consecuente pérdida de la afinidad de éste por su sitio de acción; III) aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de flujo, las cuales son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y periplasma bacteriano compuestos antibióticos y IV) la modificación o inactivación del antibiótico por enzimas, siendo ésta la forma más común de resistencia adquirida, determinada en gran medida, por la producción de enzimas, entre las cuales se encuentran las betalactamasas. Cabe destacar que estos mecanismos pueden actuar simultáneamente (Grkovics et al., 2002; Livermore, 2002; Poole, 2004).

Las betalactamasas son proteínas fijadoras de penicilina que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico de los antibióticos que lo poseen (penicilinas, cefalosporinas, oxacilinas), separando el enlace amida, impidiéndole al antimicrobiano inhibir la síntesis de la pared celular, lo que impide su actividad terapéutica. Estas enzimas se caracterizan por su capacidad de inhibir determinados

subgrupos de betalactámicos; por esto, algunas subclasificaciones las denominan penicilinas, cefalosporinas o carbapenemasas, dependiendo de la familia de betalactámicos que tengan mayor sensibilidad a ser atacada por la enzima (Gómez et al., 2005).

La resistencia a los antibióticos, por parte de una bacteria, puede ser natural o intrínseca, la cual es una característica estructural o funcional presentada por algunas cepas bacterianas; o extracromosómica, que es generalmente adquirida, a través de intercambio genético con otras bacterias (Snyder y Champness, 1997; Keith et al., 2000). La resistencia a múltiples antimicrobianos es un fenómeno frecuentemente asociado a la presencia de plásmidos transmisibles (Pedroza et al., 2002).

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, que se replican en forma independiente del cromosoma de la célula hospedera, presentan un tamaño que oscila entre menos de 10 a más de 400 kilopares de bases; constituyendo sólo una pequeña parte de genoma celular, en general, entre 1,00 y 3,00%. Aún así, esta pequeña fracción de la información hereditaria determina rasgos genéticos accesorios, pero importantes. Los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que le otorgan al microorganismo funciones que favorecen la supervivencia en condiciones especiales, las cuales les confieren a los organismos hospederos ventajas competitivas frente a otros microorganismos en el proceso de colonización de nuevos ambientes (Kado, 1998; Alonso et al., 2001; Alonso et al., 2002, Narváez, 2000; Toba, 2000). Además poseen la capacidad de codificar mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos, a metales pesados, producción de bacteriocinas, toxinas y otros compuestos, así como la habilidad de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos complejos (Rodríguez et al., 1998).

La diseminación de los plásmidos ocurre tanto de forma vertical (de célula

madre a célula hija) como horizontal, esencialmente a través del proceso de conjugación; ésta capacidad está determinada por la presencia de un grupo de genes que codifican para proteínas de transferencia (tra), sin las cuales no se puede realizar el proceso, ocupando dentro del plásmido una porción hasta de 33 kb. Este proceso permite que se pueda llevar a cabo el intercambio de plásmidos entre especies e incluso géneros (Ayres et al., 1995).

La transferencia horizontal del ADN plasmídico de una bacteria donadora a una receptora se puede producir de tres formas; la transducción, donde se transporta un pequeño fragmento del ADN bacteriano por medio de bacteriófagos; la transformación, mecanismo por el cual se da la transferencia de un fragmento de ADN desnudo (del medio ambiente); generalmente ocurre entre miembros de la misma especie o poco relacionados; y la conjugación, la cual consiste en la transferencia directa de plásmidos desde una bacteria a otra, por contacto físico temporal entre las células (Prescott et al., 2004; Koneman et al., 2008). El proceso de conjugación es una parte del ciclo de vida de un plásmido conjugativo, y es considerado un tipo de replicación especial de ADN, mediante el cual una hebra del plásmido en replicación es mantenida en la célula donante, mientras que la segunda hebra es transferida a una célula receptora (Lawley et al., 2002).

En el proceso de conjugación se diferencian dos grandes fases, las cuales ocurren en paralelo, aunque sean mencionadas por separado. La primera fase es el contacto entre la célula donante y la receptora. La célula donante presenta en su superficie un pilus, el cual se forma de los productos de expresión de determinados genes, éstos son apéndices en forma de cilindro constituidos por unidades de la propia proteína pilina, siendo específicos para cada tipo de plásmido, lo que permite agruparlos. Generalmente se encuentran de 1-3 pili por célula. Cada pilus se origina en la membrana interna de la célula donante extendiéndose a través de su pared celular hasta el ambiente extracelular, allí interacciona específicamente con una

proteína presente en la membrana externa de las células receptoras. Cuando esto sucede se lleva a cabo el proceso de despolimerización del pilus, dejando en contacto pared-pared a las células, al estabilizarse las células se forma el poro conjugativo (Frost et al., 2005).

La segunda fase del proceso de conjugación es conocida como transferencia de ADN, se inicia en una región del plásmido denominada origen de transferencia (oriT). Dicha fase está basada en un proceso de replicación y secreción (Llosa et al., 2002).

Para que pueda ocurrir la transferencia efectivamente, los plásmidos conjugativos deben presentar genes que codifican las proteínas necesarias para la conjugación, al igual que los genes para la producción de pilus. El proceso también depende de la incompatibilidad del plásmido a ser transferido, con los posibles plásmidos que se encuentren originalmente en la célula receptora, ya que dos plásmidos con un mismo tipo de control de replicación no son estables dentro de una misma célula. Existen plásmidos que no presentan todos los genes necesarios para la transferencia, denominados plásmidos no conjugativos, y sólo pueden cotransferirse con los plásmidos conjugativos. Este proceso de transferencia horizontal y de cotransferencia de los plásmidos, puede producirse en cualquier ambiente, suelo, aguas, e incluso centros hospitalarios, en donde se ha observado un aumento en el número de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos por su uso constante e indiscriminado, permitiendo la selección de cepas bacterianas resistentes (Davies, 1996; Griffiths et al., 1998; Koneman et al., 2008).

En las últimas décadas, el uso indiscriminado de antimicrobianos en centros hospitalarios ha permitido que *Pseudomonas aeruginosa* emerja como uno de los principales patógenos oportunistas causantes de infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario; comúnmente afecta individuos inmunocomprometidos, como aquellos

infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), fibrosis quística, leucopénicos, quemados o en las unidades de cuidados intensivos (Martínez et al., 2001). La infección por esta bacteria puede provocar infecciones graves como: bacteremia, neumonía, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario e infecciones cutáneas en personas quemadas. Las infecciones causadas por *Pseudomonas* son generalmente intrahospitalarias y tienen un curso fulminante y una letalidad extremadamente alta a pesar de un tratamiento adecuado con antibiótico (Lujan-Roca et al., 2008).

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, no esporulado, aeróbico estricto, perteneciente al género *Pseudomonas* y a la familia *Pseudomonadaceae*, no fermentador de glucosa, móvil gracias a un flagelo único, oxidasa positivo, produce pigmentos fluorescentes (pioverdina, piocianina y piorrubina); emite un olor dulzón en el medio de cultivo y tiene la habilidad característica de crecer a 42°C (Mandell et al., 2002; Koneman et al., 2008). Se encuentra ampliamente distribuidos en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelos, aguas limpias o contaminadas, así como de plantas y animales (Rahme et al., 1997).

Tanto estructural como funcionalmente, *P. aeruginosa* presenta resistencia a una gran variedad de agentes antimicrobianos, la cual se debe a la baja permeabilidad de su membrana externa, el sistema de eflujo de los antibióticos hacia el exterior de la célula y la producción de enzimas inactivadoras de los antimicrobianos (Nakae, 1997). Dentro de estas enzimas se encuentran las betalactamasas, ya sean codificadas por plásmidos o de origen cromosómico, las cuales juegan un papel fundamental en la resistencia a los antibióticos betalactámicos (Vahaboglu et al., 2001).

González et al. (2003), en un estudio realizado en 117 cepas de *P. aeruginosa* para evaluar la resistencia a betalactámicos mediada por plásmidos, en Cuba, encontraron que la resistencia a cefuroxima y ceftazidima fue transferida

espontáneamente de cepas resistentes de *P. aeruginosa* a cepas receptoras de *E. coli*; y que las transconjugantes resultantes resistentes a cefuroxima y ceftazidima fueron capaces de producir betalactamasas.

Son escasos los trabajos publicados en Venezuela sobre la conjugación plasmídica en *P. aeruginosa*, sin embargo, existen varias publicaciones de ensayos realizados en enterobacterias con resultados exitosos (Araque et al., 1997; Torres et al., 2005; Redondo y Alonso, 2007).

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

Redondo y Alonso (2007) demostraron la presencia de plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes, aislados de cuatro (4) centros de salud del área metropolitana de Caracas; ellos sugieren que éstas cepas han podido obtener el fenotipo de resistencia mediante la adquisición de plásmidos que codifican resistencia a diferentes agentes antimicrobianos.

Silva (2009) determinó la transferencia plasmídica en aislados de enterobacterias resistentes a betalactámicos, aislados de los diferentes servicios del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” demostrando que el 50,00% de las cepas en estudio, de un total de 18, transfirieron exitosamente los plásmidos de resistencia.

Desde el punto de vista de salud pública, los determinantes genéticos de mayor importancia, que pueden ser codificados por plásmidos, son los que codifican para los

factores de virulencia y los asociados a la resistencia antimicrobiana. Los plásmidos portadores de determinantes de resistencia, con capacidad conjugativa o de movilización, son las estructuras extracromosomales de mayor relevancia epidemiológica, por su capacidad de promover la diseminación horizontal de un gran número de genes de resistencia, contribuyendo al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y promoviendo la aparición de cepas patógenas multirresistentes (Narváez et al., 2005).

P. aeruginosa es causante de un gran número de infecciones comunitarias e intrahospitalarias, ya que presenta plásmidos que codifican para resistencia a múltiples antimicrobianos betalactámicos (Nakazawa et al., 1996). En vista de lo antes expuesto y debido a los pocos trabajos de investigación, respecto a este tema, realizados en nuestro país, la finalidad de la presente investigación fue evaluar la transferencia de resistencia a antimicrobianos betalactámicos en cepas de *P. aeruginosa*, por medio de la conjugación.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Clínicas o donantes

Para el presente estudio se utilizaron veintiséis (26) cepas identificadas previamente mediante métodos convencionales como *P. aeruginosa*, provenientes de muestras clínicas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA), durante el año 2008, las cuales se encuentran conservadas en el Laboratorio de Investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente.

Receptora

Se utilizó como receptora de plásmidos, la cepa *Escherichia coli* K12 J53-2, la cual fenotípicamente es resistente a prolina, metionina y rifampicina (F⁻, pro^r, met^r, rif^r); suministrada por el Laboratorio de Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis.

Viabilidad de las cepas

Con el objeto de comprobar la viabilidad de las cepas, éstas se sembraron en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 37°C, durante 18 horas; posteriormente, se sembraron en agar MacConkey (AMC) con la finalidad de verificar su pureza y observar las características macroscópicas de las colonias.

Susceptibilidad antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión por disco en agar Mueller Hinton (MH), descrito por Bauer *et al.* (1966); considerando las actuales recomendaciones publicadas por “Instituto de Estándares

Clínicos y Laboratorio”, del inglés: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010).

El procedimiento utilizado se llevó a cabo de la siguiente manera: se suspendieron de 2 a 4 colonias provenientes del agar nutritivo en 4,50 ml de solución salina fisiológica ajustando al patrón 0,50 de Mac Farland. Posteriormente, se realizó la siembra en una placa de agar MH utilizando un hisopo de algodón estéril, impregnado con la suspensión bacteriana. Se realizaron inóculos uniformes en cuatro direcciones; dejando secar la placa antes de colocar los discos de antibióticos; las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas. Los antibióticos ensayados fueron ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), rifampicina (5 µg). Paralelamente se realizó un control de calidad, utilizando una cepa certificada de *P. aeruginosa* “Centro Americano de Colección de Microorganismos”, del inglés American Type Culture Collection (ATCC 27853). De acuerdo con el halo de inhibición producido por el antibiótico, los microorganismos se clasificaron como sensibles, intermedios y resistentes, según los criterios establecidos por la CLSI (2010).

Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

La determinación fenotípica de BLEE se realizó por la técnica de sinergia de doble disco, descrito por Jarlier *et al.* (1988). Se aplicó un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20 µg/10 µg) en el centro de la placa con agar MH. Luego se colocaron discos alrededor, a una distancia de 15 mm borde-borde y ángulo de 90°, de ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepima (30 µg) y ceftriaxona (30 µg), empleando pinzas de metal esterilizadas al calor. Las placas se dejaron reposar 15 minutos incubándose 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, 2010).

Detección de metalobetalactamasas (MBLs)

En una placa de agar MH inoculada con una suspensión de la cepa en estudio ajustada al 0,50 en la escala McFarland, se colocaron dos discos comerciales de imipenem (10 µg) y dos de meropenem (10 µg). Se añadieron 10 µl de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mol/l sobre uno de los discos de imipenem, meropenem, y un disco estéril que sirvió como control de la actividad inhibitoria nula del EDTA en el crecimiento de las cepas; las mismas fueron incubadas durante 18 a 24 horas a 37°C. Considerando prueba positiva y, por tanto, presencia de metalobetalactamasas, la observación de una ampliación del halo de inhibición en los discos que contenían EDTA (Arakawa *et al.*, 2000).

Selección de cepas resistentes

Las cepas de *P. aeruginosa* que mostraron resistencia al menos a dos (2) betalactámicos y productoras de BLEE y/o metalobetalactamasas y resultaron sensibles a rifampicina fueron cultivadas nuevamente en 2 ml de caldo LB e incubadas a 37°C por 24 horas para su posterior utilización en el proceso de conjugación.

Transferencia de plásmidos de resistencia

Para evaluar la transferencia de plásmidos que contengan genes de resistencia a ceftriaxona, se utilizaron cepas receptoras de *E. coli* K12 J53-2 y se empleó el método de conjugación.

Determinación de la concentración de antimicrobiano a emplear en el ensayo de conjugación

La Concentración Mínima Inhibitoria para el antimicrobiano ensayado en el proceso de conjugación se determinó empleando el método de dilución en agar Mueller Hinton, según los lineamientos del CLSI, 2010 para lo cual se utilizaron soluciones stock de ceftriaxona (CRO) y rifampicina (RIF) obtenidos comercialmente

(Glaxo Smith Kline). Para preparar las soluciones stock (512 $\mu\text{g/ml}$) se pesó la cantidad adecuada de CRO y RIF (para preparar 100 ml) en una balanza de precisión y, posteriormente, se añadió el volumen de diluyente (agua destilada) necesario. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 del agente antimicrobiano en agua destilada. Se realizaron diluciones seriadas desde 512 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,125 $\mu\text{g/ml}$.

El medio MH se preparó de la manera habitual siguiendo las indicaciones comerciales y se esterilizó en autoclave. Una vez esterilizado, se dejó enfriar antes de agregar las soluciones de antimicrobianos. Se vertió el medio en placas de petri estériles en la proporción de 19 ml de medio por 1 ml de solución de la correspondiente concentración de antimicrobiano completando 20 ml del total. Se dejaron solidificar y se usaron inmediatamente o se almacenaron en nevera en bolsas de plástico hasta su uso.

La cepa de *P. aeruginosa* se creció en agar MK a 37°C, para obtener cepas con crecimiento de 24 horas. Se preparó una suspensión con SSF cuya concentración fue ajustada al patrón 0,50 de Mac Farland y se sembró en cada placa de MH con la concentración antimicrobiana correspondiente.

Conjugación

El proceso de conjugación se realizó empleando la técnica sobre filtro en medio sólido, descrita por Pedroza *et al.* (2001), para lo cual se crecieron cultivos de 2,00 ml cada uno caldo Luria Bertani (LB) con la cepa donante (*P. aeruginosa*) y otro con la cepa receptora (*E. coli*), los cuales se incubaron durante toda la noche a 35 y 37°C, respectivamente. Posteriormente, se inoculó 0,10 ml de cada cultivo en 5,00 ml de LB y se dejaron crecer hasta 60 unidades Klett (UK) la cepa donante y 80 UK la cepa receptora, durante cuatro horas aproximadamente.

Luego, se mezclaron 0,50 ml de la cepa donante con 2,50 ml de la cepa

receptora, dicha mezcla se centrifugó por 1 minuto a 6 000 g y el sedimento se colocó en una membrana de filtro millipore estéril de 0,22 μm , previamente colocada sobre una placa de agar MacConkey (AMC). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente, al terminar el tiempo de incubación, se resuspendió la mezcla de conjugación en 1,00 ml de cloruro de sodio (NaCl) 0,85% y se sembraron por rastrilleo, tanto directamente de la mezcla como de diluciones, desde 10^{-1} hasta 10^{-5} en AMC, suplementadas con ceftriaxona (32 $\mu\text{g/ml}$) y rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$). Las placas se distribuyeron de la siguiente manera: AMC solo con rifampicina, AMC solo con ceftriaxone y AMC con ceftriaxone y rifampicina, y fueron incubadas a 37°C por 24-72 horas. Se consideraron cepas transconjugantes aquellas crecidas en las placas de AMC que contengan las combinaciones de ceftriaxone (32 $\mu\text{g/ml}$) y rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$).

Determinación de la frecuencia de transferencia

La frecuencia de transferencia (FT) de los plásmidos se determinó mediante la siguiente relación: $FT = T/DV$, donde T: es el título de transconjugantes obtenidas en las placas de selección y DV: es el título de células donantes viables en la mezcla de conjugación.

El título de donantes viables (DV) se calculó sembrando 50 μl de diluciones seriadas (desde 10^{-1} a 10^{-5}) de la cepa donante al momento de realizar la mezcla de conjugación. El título de donantes viables y de las transconjugantes se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$DV = n^{\circ} \text{ colonias} \times \text{factor de dilución/volumen de siembra}$$

Verificación de los determinantes transferidos

Para confirmar cuales determinantes de resistencia se transfirieron a la cepa receptora, se realizaron antibiogramas, según Bauer *et al.* (1966).

Análisis de datos

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis descriptivo y se expresaron a través de tablas y figuras, según Jiménez (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

P. aeruginosa constituye uno de los patógenos oportunistas aislados con mayor frecuencia en pacientes internados. El tratamiento de las infecciones graves causadas por este microorganismo suele ser difícil, ya que éste es naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos y, además, pueden adquirir mecanismos de resistencia a prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento, de manera que las infecciones producidas por este microorganismo son cada vez más difíciles de tratar (Pagniez *et al.*, 2006).

En la figura 1 se muestran los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a los betalactámicos ensayados.

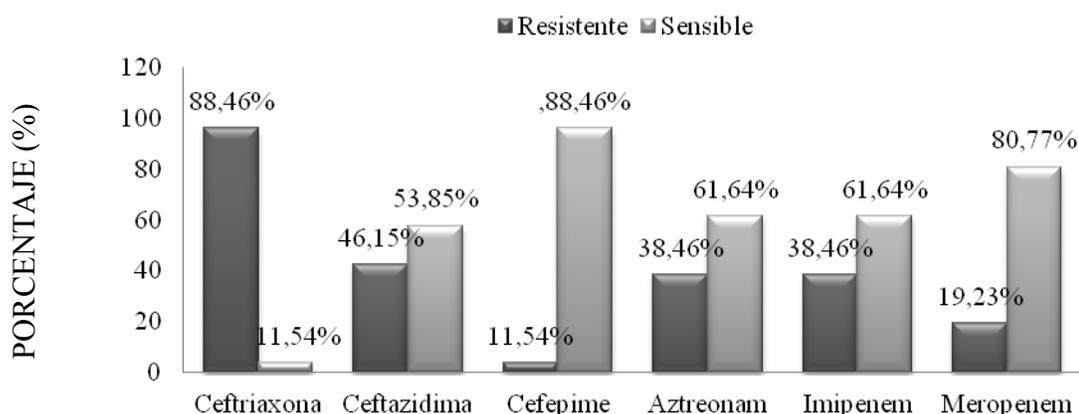


Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los betalactámicos ensayados en las 26 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. Febrero-mayo de 2008.

El 88,46% de las cepas resultó resistente a ceftriaxona, representando el mayor porcentaje de resistencia obtenido en dicho ensayo, 46,15% a ceftazidima, 38,46% a aztreonam e imipenem, respectivamente, y 19,23% a meropenem. Al respecto, Jaramillo (1996), en un estudio realizado sobre resistencia bacteriana, en la unidad de cuidados intensivos del Hospital de Caldas Colombia, encontró que un alto porcentaje de cepas de *P. aeruginosa* fue resistente a carbenicilina, cefotaxime y ceftriaxona; menor porcentaje de las cepas resultaron resistentes a amikacina, ceftazidima, aztreonam, piperacilina y ciprofloxacina; y ninguna mostró resistencia al imipenem. Mata (2002) reportó un 11,60% de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a meropenem en aislados del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. De igual manera, Pagniez *et al.* (2006) reportaron porcentajes de resistencia a carbapenemas similares a los obtenidos en el presente trabajo, en un Hospital Universitario de Buenos Aires, Argentina.

Las cepas evaluadas fueron sensibles al cefepime, sólo tres resultaron resistentes (11,54%), estos resultados son comparables a los reportados por Ortega y Figueroa (1998), en un estudio realizado en un hospital escuela de Honduras, igualmente, Malavé (2008) reportó un bajo porcentaje de cepas resistentes de *P. aeruginosa* ante cefepime, en un estudio realizado en el Hospital “Antonio Patricio de Alcalá” de Cumaná.

P. aeruginosa se caracteriza por expresar una resistencia natural (intrínseca) a diversos antibióticos sin relación estructural, esto se debe principalmente a una escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de una betalactamasa cromosómica inducible tipo AmpC y la expresión constitutiva de diversos sistemas de expulsión activa, la participación conjunta de éstos tres factores condiciona resistencia natural a penicilina, aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona, cefalosporinas de tercera generación orales, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetropim,

tetraciclina, novobiocina y ácido nalidíxico (Lauretti *et al.*, 1999; Naas y Nordmann, 1999; Gibb, 2002)

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es uno de los serios problemas en la terapia de las enfermedades infecciosas y en la práctica epidemiológica (Williams, 2000). Ninguna sustancia antimicrobiana actúa sin el riesgo futuro de que los microorganismos desarrollen resistencia frente a ella (Stuart y Levy, 1998). Las cepas de *P. aeruginosa* se aíslan con frecuencia en pacientes sometidos a tratamientos antimicrobianos prolongados, lo cual favorece la adaptación al antimicrobiano y el surgimiento de la multiresistencia bacteriana (Asboe *et al.*, 1998).

Los agentes antimicrobianos ejercen una fuerte presión selectiva sobre las comunidades bacterianas que comparten un nicho particular, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia, dando origen al fenómeno conocido como resistencia múltiple a los antibióticos, fenómeno que afecta a un gran número de especies bacterianas (Narváez *et al.*, 2005).

Al analizar los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se pudieron diferenciar diez (10) fenotipos en las cepas en estudio (Tabla 1), los cuales se designaron arbitrariamente con números romanos (I hasta el X). Los fenotipos I y II fueron los más observados, con siete aislados cada uno.

De acuerdo con la variedad de fenotipos observados se puede inferir la existencia de diversos mecanismos de resistencia en las cepas, e incluso la combinación de muchos de ellos.

El fenotipo I se caracterizó por presentar resistencia a cefalosporinas de tercera generación (CRO, CAZ) y al ATM, con sensibilidad a FEP y ambos carbapenemes pudiendo ser la presencia de una bomba de eflujo el mecanismo involucrado en la resistencia, o una desrepresión parcial de AmpC, la cual se manifiesta por la

sensibilidad presentada a FEP, MER e IMP en las cepas. Si bien la producción de BLEE no es un mecanismo común en *Pseudomonas*, éste no puede descartarse, aun cuando fenotípicamente no se hayan observado cepas con este mecanismo. Al respecto, se sugiere emplear la técnica del disco combinado para dilucidar posibles BLEE en *Pseudomonas* (Vila y Marco, 2010).

Tabla 1. Fenotipos de susceptibilidad de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. Febrero-mayo de 2008.

FENOTIPO	N	SENSIBLE	RESISTENTE	MBL
I	7	FEP, IMP, MER	CRO, CAZ, ATM	-
II	7	CAZ, FEP, ATM, MER	CRO,IMP	-
III	3	CAZ, FEP, ATM, IMP, MER	CRO	-
IV	2	FEP, IMP	CRO, CAZ, ATM, MER	-
V	2	CRO, CAZ, FEP, ATM, IMP	MER	-
VI	1	ATM	CRO, CAZ, FEP, IMP, MER	+
VII	1	ATM, MER	CRO, CAZ, FEP, IMP	+
VIII	1	CRO, CAZ, FEP, ATM, MER	IMP	-
IX	1	ATM, IMP, MER	CRO, CAZ, FEP	-
X	1	CAZ, FEP, IMP, MER	CRO, ATM	-

N: Número de cepas; CRO: Ceftriaxona; IMP: Imipenem; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; MER: Meropenem; MBL: metalobetalactamasa.

Las cepas pertenecientes al fenotipo II mostraron resistencia a CRO e IMP. La resistencia a IMP puede ser debido a la pérdida de la porina OprD, ya que esta porina es la vía principal de entrada de las carbapenemas, y la pérdida de ésta, produce una disminución de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a estos antibióticos; la sensibilidad a MER, podría indicar que éste antibiótico utiliza otra vía de entrada al interior de la célula (Pérez *et al.*, 1996; Vila y Marco, 2010).

El fenotipo III sólo mostró resistencia a CRO, *Pseudomonas aeruginosa* expresa una resistencia natural a este antibiótico (Vila y Marco, 2010).

Las cepas pertenecientes al fenotipo IV mostraron resistencia a CRO, CAZ, ATM y MER, lo cual podría deberse a la expresión de varios mecanismos de resistencia combinados, como una BLEE no detectada o una AmpC desreprimida (Vila y Marco, 2010).

Los fenotipos V y VIII se caracterizan por ser resistentes a MER e IMI respectivamente, ésta resistencia sólo a las carbapenemas podría deberse a la pérdida de la porina OprD, ya que la pérdida de ésta produce una disminución de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a éstos antibióticos (Vila y Marco, 2010).

El fenotipo VI se caracteriza por mostrar resistencia a CRO, CAZ, FEP, IMI y MER y ser sensible a ATM, la resistencia se puede atribuir a la presencia de una metalobetalactamasa ya que éstas atacan a los betalactámicos incluidos carbapenémicos sin afectar al ATM (Vila y Marco, 2010).

En el caso del fenotipo VII, éste muestra resistencia a CRO, CAZ, FEP e IMI y sensibilidad a ATM y MER, la resistencia a los betalactámicos y al IMI se puede atribuir a la presencia de una metalobetalactamasa, que no afecta al ATM, y la sensibilidad a MER podría indicar que éste antibiótico utilizó otra vía de entrada al interior de la célula (Vila y Marco, 2010).

Sólo una cepa (Fenotipo IX) presentó resistencia a CRO, CAZ y FEP y fue sensible a ATM, IMP y MER, en este caso la resistencia puede ser debida a la combinación de varios mecanismos de resistencia como una impermeabilidad de la membrana, desrepresión de AmpC, ya que la resistencia a FEP ocurre generalmente cuando están presentes estos dos mecanismos, y también pudiera ser debido a la presencia de una betalactamasa tipo OXA que expresan un espectro de actividad hidrolítica extendido (Vila y Marco, 2010).

El fenotipo X se caracterizó por ser resistente a CRO y ATM, *Pseudomonas aeruginosa* expresa una resistencia natural a CRO, mientras que la resistencia a aztreonam pudo ser debido a la presencia de una bomba de eflujo (Vila y Marco, 2010).

Estudios realizados en *P. aeruginosa* revelan la presencia de diferentes perfiles fenotípicos de resistencia a betalactámicos e infieren que *P. aeruginosa* tiene una fácil adaptación al ambiente una rapidez en adquirir resistencia antibiótica, confluendo en ella, muchos mecanismos de resistencia (Crespo, 2002).

El estudio de los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* es importante para una buena aproximación terapéutica, ya que no siempre se expresan fenotípicamente. Existe la posibilidad de que *in vivo*, el tratamiento con betalactámicos suponga un fracaso terapéutico (Sánchez *et al.*, 2006). Es necesario en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*, utilizar fármacos de forma combinada, pues pueden desarrollar más fácilmente resistencia cuando se usan de forma única, la literatura recomienda combinar un betalactámico más un aminoglucósido (Pérez *et al.*, 1991; Follath *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 2001; Trucco *et al.*, 2002).

Los ensayos de producción de betalactamasas tipo BLEE y MBL en las 26 cepas de *P. aeruginosa* en estudio, evidenciaron la nula producción de BLEE (Figura 2). A pesar de que las cepas en estudio mostraron porcentajes de resistencia considerables ante las cefalosporinas de tercera generación (CRO y CAZ), no se observó la expresión fenotípica de BLEE, esto pudo deberse a que su observación *in vitro*, está condicionada por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia, que pudieran interferir con su expresión fenotípica (Calvo *et al.*, 2011).

La producción fenotípica de MBL's se observó en 2 cepas (7,69%) de *P. aeruginosa*, pertenecientes a los fenotipos VI caracterizado por ser resistente a ambos carbapenemas y el fenotipo VII resistente sólo a IMI. Estos resultados difieren de los reportados por Ferrero *et al.* (2009), en un estudio realizado sobre la resistencia a carbapenemas por MBL's en *P. aeruginosa*, donde obtuvieron 15 cepas (17,40%) productoras de MBL's de un total de 86 cepas estudiadas. Resultados similares a los anteriores fueron obtenidos por Pagniez *et al.* (2006), en el Hospital Universitario de Buenos Aires, determinando 10 (11,00%) de los aislamientos recuperados productores de MBL's, los cuales fueron resistentes a ambas carbapenemas en su totalidad.

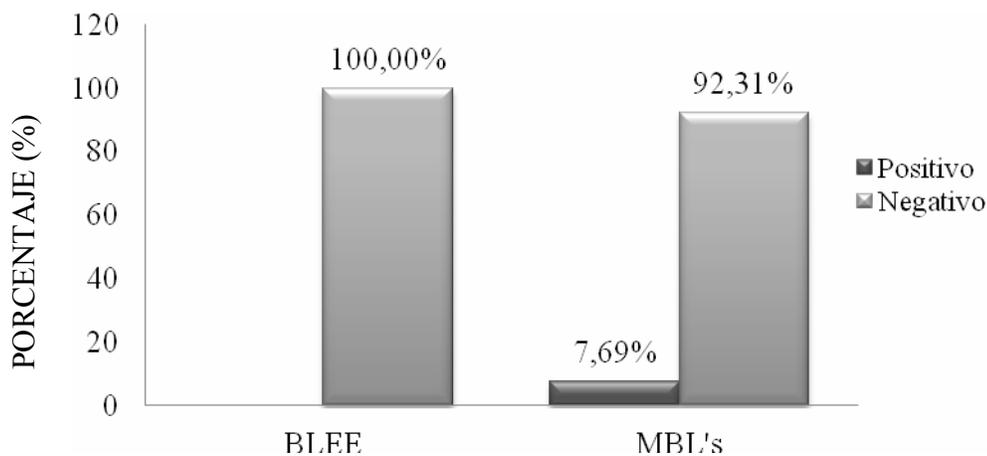


Figura 2. Detección de betalactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en pacientes recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. Febrero-mayo de 2008.

A nivel mundial, se ha registrado, especialmente en Europa y Asia, un notable incremento en el informe de MBL's y en la diseminación entre microorganismos relacionados e incluso no relacionados, descritas en bacilos Gram negativos causantes de infecciones intrahospitalarias, considerando a éstas enzimas un factor de riesgo en

el fracaso terapéutico y originando un incremento en los niveles de morbilidad y mortalidad (Livermore, 1993; Bush, 1998; Livermore y Woodford, 2000).

Las 2 cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL's y que fueron resistentes a CRO, se sometieron al ensayo de conjugación, obteniéndose dos cepas transconjugantes, las cuales resultaron resistentes a ceftriaxona, sin embargo, no se evidenció fenotípicamente la producción de betalactamasas (Figura 3).

Al respecto, González *et al.* (2003) realizaron ensayos de conjugación en 117 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico, obteniendo una conjugación efectiva en el 100,00% de las cepas resistentes a los antibióticos betalactámicos ensayados, más no todas las transconjugantes obtenidas fueron productoras de betalactamasas.

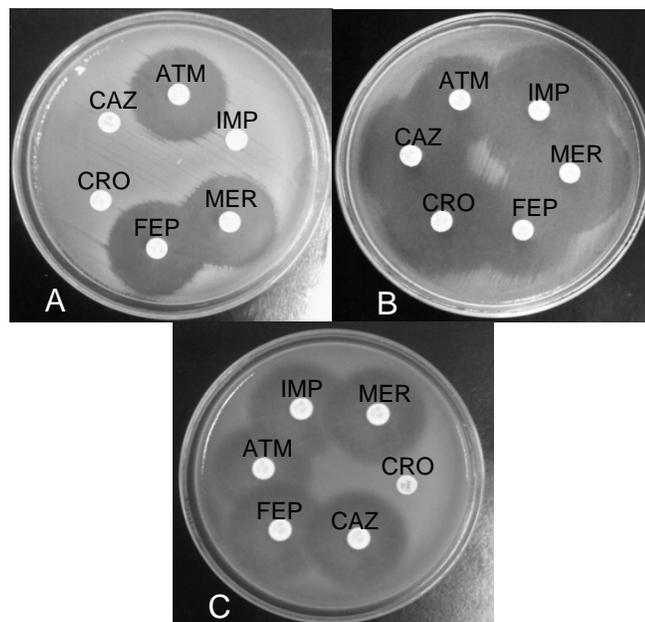


Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas donante (A), receptora (B) y transconjugante (C), frente a los antibióticos betalactámicos ensayados.

A nivel nacional, son escasos los experimentos de conjugación, reportados en *P. aeruginosa*, con el fin de evaluar la presencia de plásmidos

transferibles, portadores de determinantes de resistencia, sin embargo, se han reportado muchos trabajos realizados en cepas de enterobacterias (Pedroza *et al.*, 2002; Narváez *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005; Guzmán 2006; Redondo y Alonso, 2007).

Las 2 cepas de *P. aeruginosa* fueron capaces transferir el plásmido que porta resistencia a ceftriaxona a la cepa receptora de *E. coli*. A pesar de que la frecuencia de transferencia horizontal obtenida en este ensayo fue baja de 10^{-4} transconjugante/célula donante, como se observa en la tabla 2, es importante destacar que la transferencia de genes fue posible entre dos géneros bacterianos distintos, reflejando así, *in vitro* lo que ocurre en el mundo bacteriano, esto representa un gran problema epidemiológico, ya que organismos multirresistentes pueden diseminar genes de resistencia a bacterias susceptibles a la mayoría de los agentes antimicrobianos, haciendo cada vez más difícil poder eliminar a dichas bacterias (Hall y Stokes, 1993; Alonso *et al.*, 2001).

Tabla 2. Frecuencia de transferencia plasmídica obtenida en el proceso de conjugación bacteriana en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Cepas transconjugantes	Frecuencia de conjugación (transconjugantes/células donantes)
T. PA005	$2,4 \times 10^{-4}$
T. PA017	$1,2 \times 10^{-4}$

T: Transconjugante; PA: *P. aeruginosa*.

Marchandin *et al.* (2000), también estudiaron cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de BLEE, aisladas de pacientes hospitalizados durante largos periodos de tiempo, en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Arnaud de Villeneuve, en Francia, obteniendo una frecuencia de transferencia plasmídica de 10^{-4} transconjugantes por célula donante, mediante ensayos de conjugación exitosos entre *P. aeruginosa* y *E. coli* HB101 (resistente a rifampicina), la cual se correlaciona

con la obtenida en el presente trabajo.

La no transferencia de plásmidos en la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* bajo las condiciones ensayadas pudo deberse a diferentes causas, entre ellas, la presencia de plásmidos termosensibles, los cuales pueden ser inhibidos a una temperatura inadecuada, este estudio se realizó a 37°C, lo cual pudo disminuir la capacidad de transferencia plasmídica; bien sea por represión de los genes de transferencia, inhibición de la formación del *pilus* sexual o por alteración de alguna de las proteínas implicadas en el acoplamiento de las células para la conjugación (Sherburne *et al.*, 2002).

Con respecto a la verificación de los patrones de resistencia transferidos a la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2, se pudo observar que las cepas transconjugantes presentaron resistencia a ceftriaxona, cualidad de la que carecía la cepa receptora antes de realizar el ensayo de conjugación (Tabla 3). Por su parte, Cabeza (2010) determinó que algunas de las cepas empleadas para este estudio como cepas donantes poseen plásmidos, tal es el caso de las cepas PA005 y PA017, a las cuales describe con un mismo perfil plasmídico, 1 banda de >10,00kb. Al respecto, Narváez *et al.* (2005), en aislados del Hospital Universitario de Caracas, obtuvieron una cepa transconjugante de *P. aeruginosa*, la cual presentó un plásmido mayor de 60 kb.

Tabla 3. Perfil de resistencia y producción de metalobetalactamasas en la cepa donante, receptora y transconjugante.

Cepa	Resistencia antimicrobiana	Fenotipo
R. <i>E. coli</i> J53-2	CRO ^S CAZ ^S FEP ^S ATM ^S IMP ^S MER ^S RIF ^R	
D. PA005	CRO ^R CAZ ^R FEP ^R ATM ^S IMP ^R MER ^R RIF ^S	VI
T. PA005	CRO ^R CAZ ^S FEP ^S ATM ^S IMP ^S MER ^S RIF ^R	
D. PA017	CRO ^R CAZ ^R FEP ^R ATM ^S IMP ^R MER ^S RIF ^S	VII
T. PA017	CRO ^R CAZ ^S FEP ^S ATM ^S IMP ^S MER ^S RIF ^R	

R: Receptora; D: Donante; T: Transconjugante; CAZ: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; AZT: Aztreonam; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; RIF: Rifampicina; PA: *P. aeruginosa*; MBL's: Metalobetactamasas.

P. aeruginosa presenta una resistencia bastante peculiar a muchos agentes antimicrobianos. De manera natural es resistente al CRO, donde los genes que codifican para esta resistencia se ha señalado que pueden estar localizados a nivel cromosomal. Esta resistencia se ha asociado con la presencia de enzimas CTX-M, donde el gen *bla*_{CTX-M2} que codifica para esta betalactamasa se ha señalado podría estar localizado en el cromosoma bacteriano (Nordmann *et al.*, 2009).

Por otro lado, en este estudio se obtuvieron cepas transconjugantes resistentes a CRO, estos resultados permiten inferir que los genes que codifican para la resistencia a CRO en *P. aeruginosa* pudieran estar localizados en un plásmido conjugativo, los cuales han demostrado la capacidad de transferencia entre bacterias de diferentes géneros, lo que constituye un factor de alto riesgo a nivel hospitalario, ya que una transferencia espontánea *in vivo* de plásmidos de resistencia generaría la diseminación de los mismos en el área hospitalaria, aumentando el número de cepas multirresistentes, haciendo cada vez más difícil el tratamiento terapéutico de las infecciones intrahospitalarias.

Aunque no se evidenció la presencia de metalobetalactamasas en las cepas transconjugantes, no se descarta la posibilidad de la transferencia de estos genes hacia las cepas receptoras; la no detección puede ser debido a que los genes que codifican para estas enzimas se encuentren reprimidos y no pudieran ser detectados mediante la técnica de sinergia de doble disco a la distancia utilizada entre los discos.

Ingold *et al.* (2011) en Uruguay, señalan la detección el gen *bla*_{VIM2} codificante para metalobetalactamasas, asociado con el gen *bla*_{CTX-M2} en un integrón de clase 1, de un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*. La detección del gen *bla*_{CTX-M2} en *P. aeruginosa* podría constituir una evidencia del probable intercambio de genes de resistencia localizados en integrones entre enterobacterias

y *P. aeruginosa*, especie que probablemente constituya un reservorio subestimado de tales genes.

Los resultados obtenidos en la presente investigación dan a conocer el hallazgo de un plásmido conjugativo mediador de resistencia a ceftriaxona en *P. aeruginosa*, los cuales han demostrado la capacidad de transferencia entre bacterias de diferentes géneros, lo que constituye un factor de alto riesgo a nivel hospitalario, ya que una transferencia espontánea *in vivo* de plásmidos de resistencia generaría la diseminación de los mismos en el área hospitalaria, aumentando el número de cepas multirresistentes, haciendo cada vez más difícil el tratamiento terapéutico de las infecciones intrahospitalarias.

CONCLUSIONES

Ninguna cepas de *P. aeruginosa* en estudio fue capaz de expresar fenotípicamente BLEE mientras que 2 expresaron MBL's.

Fue posible la transferencia de plásmidos, por conjugación, entre La cepa donante de *P. aeruginosa* resistente a ceftriaxona y una receptora de *E. coli* K12 J53-2.

La frecuencia de conjugación entre las cepas de *P. aeruginosa* y la *E. coli* K12 J53-2, fue baja, en el orden de 10^{-4} transconjugante/célula donante.

Las cepas transconjugantes sólo expresaron resistencia a ceftriaxona.

RECOMENDACIONES

Implementar medidas de control sanitario en todas las áreas hospitalarias con el fin de evitar la diseminación de genes de resistencia que favorecen las infecciones intrahospitalarias.

Vigilar y controlar el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro en el ambiente hospitalario, a fin de disminuir la aparición de cepas multirresistentes, capaces de transferir los determinantes de resistencia a otros géneros bacterianos.

Realizar estudios frecuentes sobre los determinantes de resistencia y la capacidad de transferencia de estos.

Realizar nuevos estudios a fin de caracterizar los plásmidos conjugados, confirmar la presencia de los mismos y relacionar su presencia con la multirresistencia bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, G.; Narváez, P.; Toba, F.; Gómez, C.; Pedroza, R. y Rodríguez, V. 2001. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 3: 93-96.

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

Arakawa, Y.; Shibata, N. y Shibayama, K. 2000. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. *Journal Clinical Microbiology*, 38: 40-43.

Araque, M.; Nieves, B.; Ruiz, O. y Dagert, M. 1997. Caracterización de plásmidos que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gram negativas de origen nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 15: 299-305.

Asboe, G.; Gant, V.; Aucken, H.; Moore, D.; Umasankar, S. y Bingham, J. 1998. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS*, 12: 1771-1775.

Ayres, E.; Kuehner, D. y Figurski, D. 1995. Mechanism of retrotransfer in conjugation: Prior transfer of the conjugative plasmid is required. *Journal of Bacteriology*, 178: 1457-1464.

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.

Bush, K.; Jacoby, G. y Medeiros, A. 1998. A funcional classification scheme for beta-lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.

Cabeza, R. 2010. Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados de muestras clínicas. Trabajo de grado. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, Pennsylvania.

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

Davies, J. 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología*, 12: 9-16.

Ferrero, S.; Gómez, L. y Reparaz, M. 2009. Resistencia a carbapenemes por metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*. <<http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2009/CM-073.pdf>> (21/02/09).

Follath, F.; Costa, E.; Thommen, A.; Frei, R.; Burdeska, A. y Meyer, J. 1992. Consecuencias clínicas del desarrollo de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación. *Medicina Práctica*, 4: 7-12.

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

Gibb, A.; Tribuddharat, C. y Moore, R. 2002. Nosocomial outbreaks of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla_{IMP} allele, bla_{IMP-7}. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46: 255-258.

Gómez, C.; Leal, A.; Pérez, M. y Navarrete, M. 2005. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: Entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 53: 27-34.

González, A.; Salazar, D.; Rojas, N. y Hernández, Y. 2003. Resistencia a Beta-lactámicos mediada por plásmidos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22(3): 231-238.

Griffiths, A.; Miller, J.; Susuki, D.; Lewontin, R. y Gelbart, W. 1998. *Genética*. Quinta edición. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, España. 863pp.

Grkovics, S.; Brown, M. y Skurray, R. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 671-701.

Guzmán, M. 2006. Caracterización de los determinantes que codifican β-lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*,

en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela.

Hall, R. y Stokes, H. 1993. Integrons: novel DNA which capture genes by site-specific recombination. *Genetica*, 90: 115-132.

Ingold, A.; Castro, M.; Nabm, A.; Borthagaras, G. y Márquez, C. 2011. Detección del gen codificante de la metalobetalactamasa VIM-2 en un integrón de clase 1 asociado con el gen bla CTX-M-2 en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en el Uruguay: primera comunicación. *Revista Argentina de Microbiología*. 43: 198-202.

Jaramillo, L. 1996. Resistencia bacteriana a los antibióticos en la unidad de cuidados intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. *Colombia Médica*, 27: 69-76.

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

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

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

Keith, S.; Henry, S. y Elias, A. 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious Diseases Clinical North America*, 14: 293-319.

Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V., Janda, W.; Sommers, H. y W. Winn. 1999. *Diagnóstico microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P.; Winn, W.; Procop, G. y Woods, G. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lauretti, L.; Riccio, M.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G. y Fontana, R. 1999. Cloning and characterization of blaVim, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1584-1590.

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

Livermore, D. 1993. Determinants of the activity of β -lactamase inhibitor combinations. *Journal antimicrobial thermochemistry*, 31: 9-21.

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

Livermore, D. y Woodford, N. 2000. Carbapenemasas a problem in waiting? *Curr Opin Microbiology*, 3: 489-495.

Llosa, M.; Gomis-Rüth, F.; Coll, M. y De la Cruz, F. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology*, 45: 1-8.

Lujan-Roca, D.; Ibarra, J. y Mamani, E. 2008. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Universitario de Lima. *Revista Biomedical*, 19: 156-160.

Malavé, H. 2008. Frecuencia de bacterias Gram negativas en infecciones de heridas post operatorias en unidades de cirugía del Servicio Autónomo del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Estado Sucre. Trabajo de grado. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Oriente.

Mandell, R.; Gordon, D. y Bennet, J. 2002. Enfermedades infecciosas: Principios y Prácticas. Quinta edición. Buenos Aires. Editorial Panamericana.

Marchandin, H; Jean Pierre, H.; Champs, C.; Serat, D.; Dorbas, H.; Perigoult, P. y Carriere, C. 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 213-216.

Martínez, A.; Pérez, J. y Pérez, M. 2001. *Pseudomonas* En: Microbiología y parasitología médicas. Llop A, Valdés- Dapena MM, Zuazo JL. Ciencias Médicas. Ciudad de la Habana. 303-320.

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.

Nass, T. y Nordmann, P. 1999. OXA-type B-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5: 865-889.

Nakae, T. 1997. Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Microbiologia*, 13: 273-284.

Nakazawa, K.; Furukawa, D.; Haas, D. y Silver, S. 1996. *Molecular biology of Pseudomonas*. Washington D.C. 398-416.

Narváez, P. 2000. Resistencia a la amikacina codificada por plásmidos en bacterias del Hospital Clínico Universitario de Caracas. Tesis de grado de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, UCV.

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

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

Nordmann, P.; Picao, R.; Poirel, L. y Gales, A. 2009. Further identification of CTX-M-2. Extended spectrum betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 53(5): 2225-2226.

Ortega, J. y Figueroa, E. 1998. Susceptibilidad antimicrobiana en el Hospital escuela. *Revista Médica de Honduras*, 64: 107-115.

Pagniez, G.; Radice, A.; Cuirolo, A.; 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.

Pedroza, R.; Cuotto, W.; Velásquez, O.; Torres, L. y Rodríguez, O. 2002. Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* en tres centros hospitalarios. *Revista de la Facultad de Medicina*, 25: 80-82.

Pedroza, R.; Torres, L.; Narváez, P.; Alonso, G. y Rodríguez, V. 2001. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram negativos de origen hospitalario. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 3: 97-100.

Pérez, M.; Rodríguez, D. y Zuazo, J. 1991. Marcadores epidemiológicos en el estudio de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de una unidad de cuidados intensivos pediátricos. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 43(2): 132-135.

Pérez, F; Gimeno, C; Navarro, D. y García, L. 1996. Meropenem permeation through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* can involve pathways other than OprD porin channel. *Chemothrapy*. 42: 210-214.

Poole, K. 2004. Resistance to betalactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 2200-2223.

Prescott, L.; Harley, John. y Klein, D. 2004. *Microbiología*. Quinta edición. Mc Graw Hill Interamericana. España.

Rahme, L., Lee, S.; Wong, R.; Tompkins, S.; Calderwood, F. y Ausubel, M. 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 94: 13245-13250.

Redondo, C. y Alonso, G. 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2): 100-107.

Rodríguez, V.; Pedroza, R. y Alonzo, G. 1998. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos del complejo de histocompatibilidad H. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 1: 69-72.

Sánchez, M.; Bello, H.; Dominguez, M.; Mella, S.; Zemelman, R. y González, G. 2006. Transferencia de betalactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias. *Revista Médica de Chile*, 134: 415-420.

Sherburne, C.; Lawley, T.; Gilmour, M.; Blattner, F.; Burland, V.; Grotbeck, E.; Rose, D. y Taylor, D. 2002. The complete AND sequence and analysis of R27, a large IncH12 plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Research*, 10: 2177-2186.

Silva, S. 2009. Transferencia plasmídica en aislados nosocomiales de enterobacterias resistente a β -lactámicos. Trabajo de grado. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Snyder, L. y Champness, W. 1997. Molecular genetics of bacteria. Tercera edición. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Stuart, B. y Levy, M. 1998. Multidrug Resistance- A sign of the times. *New England Journal Medical*, 7: 1376-1377.

Toba, F. 2000. Caracterización de plásmidos de cepas aisladas del embalse Pao-Cachinche. Tesis de grado de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, UCV.

Torres, L.; Benitez, M.; Dominguez, M.; Torres, O.; Gagliota, V.; Calvo, A.; Rodriguez, N.; Ardils, J. y Pedroza, R. 2005. Detección de integrones clase 1 en cepas de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido tipo SHV y CTX-M grupo 2. "VITAE" <<http://www.caibco.ucv.ve>> (10/06/08).

Trucco, O.; Prado, V. y Duran, C. 2002. Grupo Pronares. Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES: Informe primer semestre 2001. *Revista Chilena Infectología*, 19(2): 140-148.

Vahaboglu, H.; Coskuncan, F.; Tansel, O.; Ozturk, R.; Sahin, N.; Noksal, I.; Kocazeybek, B.; Tatman-Otkun, M.; Leblebicioglu, H.; Ozimel, M.; Akalin, H.; Kocagos, S. y Korten, V. 2001. Clinical importance of extended spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal Medical Microbiology*, 50(7): 642-645.

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

Williams, R. 2000. Resistencia a los antimicrobianos: los hechos. Boletín de medicamentos esenciales. *Organización Mundial de la Salud*, 28.

HOJA DE METADATOS

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

Título	TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Marchán, Olymar	CVLA C	17.214.910
	e-mail	Olymarchan7@yahoo.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Pseudomonas aeruginosa, Betalactámicos
Plásmidos, Betalactamas, Metalobetactamasas
Conjugación en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

El objetivo de este trabajo fue determinar la transferencia de plásmidos en cepas intrahospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a betalactámicos y productoras de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y/o metalobetalactamasas (MBL's). Para ello, se estudiaron 26 cepas aisladas de pacientes reclusos en los diferentes servicios del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" estado Sucre, recolectadas entre los meses de febrero-mayo de 2008. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante la prueba de difusión del disco en agar, la producción de BLEE y MBL's se determinaron por pruebas de sinergia de doble disco y el método del disco combinado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), respectivamente, mientras que los ensayos de conjugación se realizaron empleando la técnica sobre filtro. El 88,46% de las cepas fueron resistentes a ceftriaxona; 46,15% resistentes a ceftazidima; 38,46% resistentes a aztreonam e imipenem respectivamente; 19,23% a meropenem y sólo 11,54% resistente a cefepime. Ninguna de las cepas en estudio expresó la producción de BLEE, mientras que 7,69% mostró fenotípicamente la producción de MBL's. Se obtuvo que el 100,00% de las cepas ensayadas en el proceso de conjugación lograron transferencia de genes codificadores de resistencia a ceftriaxona a la cepa receptora *E. coli* K-12 J53-2, con una frecuencia de transferencia de 10^{-4} (transconjugantes por célula donante). La transferencia de resistencia a ceftriaxona a la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2 permite inferir que la resistencia a este antibiótico en cepas de *P. aeruginosa* se encuentra en elementos de resistencia que pueden ser transferidos hacia otras bacterias.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Antón Dina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8647499
	e-mail	dinacar@hotmail.com
	e-mail	
Salazar Elsa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	10460717
	e-mail	elsazul2003@yahoo.es
	e-mail	
Guzmán Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8954225
	e-mail	militzaguz@yahoo.es
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	12	14

Lenguaje: _____

SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-marchan.DOC	Aplication/word

Alcance:

Espacial: NACIONAL

Temporal: TEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis.

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIADA

Área de Estudio: Bioanálisis.

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUMBELO
Secretario

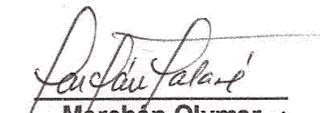


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/maruja

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 Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización".


Marchán Olymar
Autor


Antón Dina
Asesor


Por la comisión de Trabajo de Grado

