



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

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* POR
ERIC-PCR, PROVENIENTES DE MUESTRAS CLÍNICAS AISLADAS DEL
HOSPITAL “SANTOS ANIBAL DOMINICCI”
(Modalidad: Tesis de Grado)

YENNY MERCEDES MADRID SANTAMARÍA

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

CUMANÁ, 2012

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* POR
ERIC-PCR, PROVENIENTES DE MUESTRAS CLINICAS AISLADAS DEL
HOSPITAL “SANTOS ANIBAL DOMINICCI”

APROBADO POR:

Prof. Marcos De Donato.
Asesor

Jurado Principal

Jurado Principal

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	10
Recolección de muestras	10
Normas bioéticas	10
Análisis bacteriológico	10
Pruebas bioquímicas	11
Oxidasa	11
Hidrólisis de la L-Arginina	11
Licuefacción de la gelatina	12
Oxidación de azúcares	12
Crecimiento a 42°C	12
Susceptibilidad antimicrobiana	12
Control de calidad del antibiograma	13
Extracción de ADN	13
Amplificación por ERIC- PCR	14
Análisis estadístico	15
RESULTADOS	17
DISCUSION	27
BIBLIOGRAFÍA	33
APENDICE	43
HOJA DE METADATOS	44

DEDICATORIA

A

Dios y la Virgen, por haberme dado tanta fuerza y fortaleza en mis momentos difíciles y llenarme de fé y nunca olvidar de que el amor existe.

A mis padres Yelitza Mercedes Santamaría y Rafael Darío Madrid quienes supieron darme todo su apoyo y amor incondicional todo este tiempo, y enseñarme desde muy niña que la distancia no es motivo para decaer, más bien sirvió para luchar y llegar a ser lo que soy ahorita. Nunca olvidare su rol como padres, de verdad hoy les digo gracias por ser quiénes son y por comprender mi carrera, mi corazón es de ustedes.

A mi hermana Dayelis Madrid por ser mi segunda madre, Dalitza Madrid gracias por ayudarme a llegar alto, Delitza Madrid por darme tu ejemplo de que si se puede emprender una meta, Luisa Madrid siempre estuviste en mi corazón, te quiero mucho, y Sebastián Madrid que con solo 8 meses de edad fuiste otro motivo de alegría para culminar. A mis abuelos Tarcisia de Santamaría y Antonio Santamaría quienes me han dado un amor incondicional.

A mi madre Dilia Planchart y Ercilia Planchar le dedico mi trabajo por haberme enseñado que en la vida se tiene que ser humilde, nunca olvidar de donde somos, a ser transparentes y no hacer daño a nadie. Gracias por apoyarme! A mis sobrinos Manuel José y Ángel Gabriel quienes con su ternura y travesuras me sacaron esa sonrisa cuando más me hacía falta los amo con todo mi corazón y nunca olviden de ser buenos hombres y valorar a sus padres.

A mi novio Leoneixo Cedeño por enseñarme que cada amanecer es un regalo y el ayer un aprendizaje, que el amor llega cuando menos lo pensamos, dios y la virgen nos conceda mucha salud y fortaleza para seguir adelante y lograr nuestros sueños.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer al Dr. Marcos de Donato y MSc. Hectorina Rodulfo por haber confiado en mí y abrirme las puertas de su laboratorio cuando más lo necesite. Nunca cambien su forma de ser Dios y la Virgen los bendiga y les de mucha salud para que sigan adelante. Los admiro y aprecio mucho.

A mis compañeras del laboratorio de Genética Molecular IIBCA, María Eugenia, Bertinelis y Anlenys, en especial a Numirin por haber tenido la paciencia y dedicación al comienzo de este trabajo.

Al Laboratorio de Bacteriología del Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de la Ciudad de Carúpano Estado Sucre.

A Solange Paredes, Samantha Paredes y a Milagro Moreno por haberme brindado todo su apoyo antes y durante de este estudio.

A mis amigos de siempre Elsy García, Héctor Vargas, Verónica Miranda, Jame García, Adrian Mirabal, Linaida Mata, Alejandra Carvajal, Alina Velásquez, Simón Meneses, Nancy Lista, Santiago Bermúdez y Mínela Berti les dedico este trabajo. Gracias por nunca dejar que decayera y vencer todos los obstáculos que se presentan a diario. Los llevo en mi corazón.

A Dulce Jiménez y familia, gracias por haberme acobijado en su hogar en mis momentos de angustia, Dios y la Virgen del Valle lo bendiga siempre y lo colme de salud y éxitos, a ti “hija dulcimar” por siempre darme el ánimo y decirme “mami tranquila que si lo vas a lograr”.

A Loly Pérez y familia, por haber sido tía, amiga, madre y darme el abrazo y el consejo cuando más lo necesite, Sr. Oscar nunca tendré como agradecerle su apoyo y por haberme brindado un hogar cuando más lo necesite, Jennifer por estar allí ayudándome en este trabajo y enseñarme a usar las herramientas del éxito.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de aislamientos de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según el tipo de servicio del Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano estado Sucre.....	17
Tabla 2. Frecuencia de aislamientos de cepas de <i>P. aeruginosa</i> según el tipo de muestras en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano, estado Sucre.	18
Tabla 3. Características epidemiológicas, fenotipos y mecanismos de resistencia a diferentes antimicrobianos en cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, Estado. Sucre.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a diferentes antimicrobianos en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, Edo. Sucre.	19
Figura 2. Patrones de bandas por ERIC-PCR en cepas con fenotipo natural de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, Edo. Sucre.	21
Figura 3. Dendograma de los fenotipos de resistencia de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, estado Sucre con sus respectivos patrones de bandas obtenidos por ERIC-PCR. Abreviaturas de los servicios según la tabla 1.....	23
Figura 4. Fragmentos amplificados por ERIC-PCR de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en los servicios de pediatría, cirugía y nefrología del Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, estado Sucre.....	25
Figura 5. ERIC-PCR de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, estado Sucre. .	26

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos intrahospitalario más importante, debido a que está presente principalmente en pacientes inmunodeprimidos. Los reportes de multi-drogoresistencia en esta especie representan un grave problema en centros hospitalarios, debido al difícil control en la transmisión de esta bacteria por presentar resistencia natural a diferentes antimicrobianos. En este sentido, los métodos empleados para subtipificar cepas de *P. aeruginosa* han mostrado gran potencial en estudios epidemiológicos. Por ello el objetivo de esta investigación fue caracterizar mediante antibiograma y técnica molecular ERIC-PCR cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas en el Hospital “Santos Aníbal Dominici” de Carúpano, Estado Sucre. Se evaluaron 61 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el laboratorio bacteriológico de dicho hospital, las cuales fueron reidentificadas según esquema para bacilos Gram negativos no fermentadores. La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos del CLSI. El ADN genómico de las cepas se extrajo utilizando el Kit Wizard Genomic de Promega. La caracterización de los aislamientos y determinación de su variabilidad genética fue llevada a cabo a través de la amplificación de elementos genéticos repetitivos por (ERIC-PCR). El análisis de los patrones de la ERIC-PCR hecho por inspección visual, considerando la similitud de todas las bandas visibles de los aislados que mostraron la misma distancia de migración, sin considerar la intensidad de las mismas. Los resultados demostraron igual número de aislamientos de *P. aeruginosa* en los servicios de cirugía y unidad de cuidados intensivos UCI (16,39%), seguido de nefrología (14,75%) y pediatría (13,11%) a partir de secreciones de diferente índole (68,82%). El perfil de susceptibilidad evidenció mayor resistencia a la piperacilina (21,43%), ciprofloxacina (17,14%) aztreonam y gentamicina (ambos con frecuencia de 14,29%), además de imipenem (12,86%) y meropenem (11,43%), mostrando las cepas diferentes fenotipos y mecanismos de resistencia. Las cepas mostraron en general gran variabilidad genética por ERIC-PCR, sin embargo, en pediatría y cirugía se detectaron clones idénticos de *P. aeruginosa*, además de clones relacionados, estos últimos también fueron detectados en nefrología y UCI. Estos resultados indican la necesidad de aplicación de este tipo de estudio en hospitales para determinar fuentes de infección, reconocimiento de brotes y cepas particularmente virulentas, entre otros, con la finalidad de implementar medidas preventivas que contribuyan a disminuir la transmisión y propagación de infecciones bacterianas y su resistencia en centros asistenciales.

INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* está clasificado en el dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonaceae, en marzo de 2008, 95 especies de *Pseudomonas* fueron publicadas, siendo la especie tipo de este género *Pseudomonas aeruginosa*, la cual fue originalmente descubierta por Schroeter en 1872, sin embargo, el género fue propuesto por Migula en 1894 (Slabinek *et al.*, 2010).

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo ampliamente distribuido en la naturaleza encontrándose típicamente en ambientes húmedos, como el agua, suelo, plantas, frutas, verduras, y animales (Kinsa y Guillen, 1999; Polloc, 2000). Otros ambientes colonizados por *P. aeruginosa* son las piscinas, tinas calientes, soluciones de lentes de contacto, entre otras. Esta bacteria mide aproximadamente de 0,5 a 1 μm de ancho por 3 a 4 μm de largo, posee un solo flagelo, pero en forma ocasional algunas pueden tener dos o tres. Además producen dos pigmentos de importancia clínica: piocianina, que puede colorear de azul verdoso el pus de una herida, y pioverdina (fluoresceína), pigmento amarillo verdoso que fluoresce bajo la luz ultravioleta, sin embargo existen cepas no productoras de pigmento. Microbiológicamente *P.aeruginosa* es típicamente aerobia estricta, crece en diferentes medios sólidos tanto a 37 como a 42°C. La mayoría de las cepas tiene olor característico a uvas, son no fermentadoras de hidratos de carbono y son positivas a la prueba de oxidasa (Kiska *et al.*, 2003; Mago *et al.*, 2004).

La habilidad de *P. aeruginosa* para sobrevivir en condiciones desfavorables, crecer en diferentes medios y resistir a la mayoría de antisépticos y antibióticos, hacen que sea un importante y frecuente patógeno causante de una amplia variedad de infecciones (Bouza *et al.*, 2003). Rara vez se encuentra como flora microbiana de individuos sanos y en individuos hospitalizados la vía más probable de colonización es el tracto respiratorio,

describiéndose también infecciones en vías urinarias y tracto gastrointestinal (Paterson, 2006).

En las infecciones producidas por dicha bacteria se pueden observar tres estadios: colonización, destrucción tisular y diseminación. Entre los factores de virulencia asociados a cada uno de ellos destaca: los pilis o fimbrias que intervienen en la adherencia bacteriana, induciendo la lesión de la célula epitelial, la cápsula glucocálix que fija la bacteria a un sustrato y enzimas o toxinas extracelulares (adhesina, exotoxinas A y B, citotoxina, elastasa y colagenasa) que favorecen la destrucción tisular y la invasión bacteriana (Woods *et al.*, 1986).

En cuanto a la estructura antigénica *P. aeruginosa* posee tres tipos: somático (O), flagelar (H) y mucoide (M), siendo él O el específico para esta especie, y se ha demostrado que las condiciones del medio ambiente, como la tensión de O₂, la disponibilidad de hierro y la presencia de antibióticos, son factores que modulan la síntesis y la función de estos factores bacterianos (López *et al.*, 2004).

Las infecciones por *P. aeruginosa* rara vez son adquiridas por pacientes inmunocompetentes, sin embargo, cuando se alteran las barreras normales de la piel y mucosas (heridas, quemaduras, secreciones, intubaciones endotraqueales, cateterismos vesicales, vías venosas, etc.) esta bacteria puede llegar a causar infección, aumentando dicha probabilidad si los pacientes están inmunodeprimidos (diabetes mellitus, cáncer, SIDA, neutropenia) o expuestos a un ambiente hospitalario. En estos casos se ha llegado a reportar a ésta bacteria como patógeno primario de la infección (Kluytmans, 1997; Brooks *et al.*, 1999).

P. aeruginosa es un microorganismo oportunista frecuentemente implicado en infecciones intrahospitalarias, a las que corresponden la mayoría de sus aislamientos, ocasionando infecciones de vías respiratorias, urinarias, oculares, osteocarditis, bacteriemias, endocarditis, gastrointestinales, entre otras. (Díaz *et al.*, 2002). La mayoría de las infecciones intrahospitalarias producidas por esta bacteria son transmitidas de un

paciente a otro a través del personal sanitario que labora en recintos hospitalarios, debido a que estos se encuentran colonizados (Pollack, 2002).

Uno de los aspectos más importantes de *P. aeruginosa*, ha sido el notable incremento en la incidencia de resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias y comunitarias lo cual representa un problema de salud pública global, promovido, básicamente, por el uso indiscriminado de antibióticos en hospitales, clínicas, comunidad, agricultura, producción de alimentos, entre otros. Además, este fenómeno ha conducido a que importantes patógenos adquieran resistencia, al menos a un tipo de antibiótico. La magnitud del problema difiere de un país a otro e inclusive de un hospital a otro en un mismo país, por tanto, es indispensable el monitoreo continuo que permita generar resultados que puedan ser utilizados para el establecimiento de conductas sobre el tratamiento de las infecciones bacterianas (Herrera *et al.*, 2007).

En este sentido, la importancia de *P. aeruginosa* radica en su relativa resistencia a los antisépticos y antimicrobianos, siendo estos últimos uno de los principales problemas de la terapéutica actual, ya que presenta diversos mecanismos de resistencia bien sea por mutaciones o mediante la adquisición de nuevos genes (Livermore, 2002). Cabe destacar que la estancia hospitalaria prolongada, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCI) y la presión de selección de los antibióticos son los factores que favorecen la aparición de cepas multiresistentes (Pollack, 2002).

Las infecciones graves e intrahospitalarias por *P. aeruginosa* requieren, generalmente, un tratamiento antimicrobiano combinado con el fin de lograr un efecto bactericida y reducir la aparición de resistencia. Los antimicrobianos con efecto anti-*Pseudomonas* comprenden aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefoperazona) y cuarta generación (cefepima), monobactámicos (aztreonam), carbapenemas (imipenem, meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y penicilinas de espectro ampliado (ticarcilina, carbenicilina, ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina/tazobactam, mezlocilina). Los patrones locales de susceptibilidad deben considerarse en la elección inicial del

tratamiento, mientras que el estudio de la susceptibilidad de la cepa aislada del enfermo orienta el tratamiento antimicrobiano definitivo (Zambrano y Herrera, 2004).

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de β -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y mutaciones en las porinas transmembranales. Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos, de esta manera destruye el sitio activo del antibiótico e impiden su actividad y se caracterizan por su capacidad de inhibir determinados subgrupos de β -lactámicos los cuales son penicilinas, cefalosporinas y carbapenemasas. Dentro de las enzimas producidas naturalmente por *P. aeruginosa* se tiene las β -lactamasas tipo Amp-C. Además las cepas de esta especie pueden presentar fenotipos adquiridos de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (Nicolau y Oliver, 2010).

Con respecto a las enzimas Amp-C están codificadas en el cromosoma de la bacteria y tienen la capacidad de ser inducidas por los propios β -lactámicos, especialmente cefoxitin, imipenem, cefalotina y ampicilina, cuando esto sucede fenotípicamente se observa resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Las BLEE son codificadas por plásmidos, adquiriéndose principalmente por conjugación y se manifiestan también por resistencia a penicilinas y a cefalosporina. De igual manera las carbapenemasas se manifiestan por la adquisición de material extracromosomal ya sea mediante plásmidos, transposones o integrones (Livermore y Woodford, 2000)

Las carbapenemasas actúan inhibiendo a los carbapenemes y se han descrito dos clases de esta enzima que hidrolizan los carbapenemes: serin- β -lactamasas las cuales poseen un residuo de serina en su sitio activo y metalo- β -lactamasas que poseen un sitio activo de cationes divalentes de zinc como cofactor para su actividad enzimática (Bush *et al.*, 1995). Los carbapenemes, imipenem y meropenem, son antibióticos con un amplio espectro de actividad, pero ya se han descrito resistencias, principalmente en bacilos Gram negativos no fermentadores (Galani *et al.*, 2004; Soulica *et al.*, 2004).

En Japón, Watanabe *et al.* (1991) identificaron por primera vez a *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasas (MBLs), y desde entonces, se ha reportado en diferentes partes del mundo, causando brotes intrahospitalarios. Este fenómeno puede causar fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de uso clínico a través de mutaciones en los genes codificantes o reguladores de los mecanismos involucrados en su resistencia natural o a través de la adquisición de determinantes genéticos de enzimas con capacidad de hidrolizar antibióticos (Docquier *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2005; Queenan y Bush, 2007).

Por otro lado, la porina OprD permite la entrada al interior de *P. aeruginosa* de aminoácidos, péptidos pequeños y carbapenémicos, la pérdida de esta porina conduce a la pérdida de sensibilidad de *P. aeruginosa* a estos antibióticos, mientras que las proteínas que determinan el incremento en la expresión de los sistemas de eflujo del tipo Mex afectan en mayor o menor grado, la actividad de antibióticos β -lactámicos y carbapenémicos, sino también de otros antibióticos como fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, entre otros (Pirnay *et al.*, 2002; Wolter *et al.*, 2004; Quale *et al.*, 2006; Cejas *et al.*, 2008).

Algunos de los genes de resistencia presentes en *P. aeruginosa* pueden encontrarse en estructuras denominadas cassettes genéticos localizados en integrones, los cuales pueden jugar un rol importante en la transmisión de estos genes a otras bacterias (Yan *et al.*, 2006; Phongpaichit *et al.*, 2007). No obstante, la primera herramienta en bacteriología clínica convencional que puede ayudar a inferir cuáles son los mecanismos de resistencia presentes en cualquier aislamiento clínico es el antibiograma (Pollack, 2002). Esta es una técnica muy útil para el manejo de infecciones intrahospitalarias causadas por *P. aeruginosa* y permite no sólo orientar el tratamiento con antibióticos sino inferir cuáles no serían apropiados (Livermore *et al.*, 2001). A pesar de que la técnica permite predecir los diferentes mecanismos de resistencia, la confirmación de dichos fenómenos se debe realizar por métodos de biología molecular (Maslow *et al.*, 1993).

Los métodos para la tipificación molecular de los microorganismos pueden clasificarse en dos grandes grupos: fenotípicos los cuales se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas como actividades enzimáticas, susceptibilidad a agentes bactericidas, entre otros y los genotípicos que se basan en el estudio genómico del microorganismo causal de la enfermedad (Singh *et al.*, 2006).

Actualmente existe una técnica molecular basada en la genotipificación que se fundamenta en la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método posee un elevado poder de discriminación y muestra mayor efectividad para diferenciar cepas no relacionadas clonalmente y para establecer distinciones entre cepas relacionadas filogenéticamente, es más rápida y permiten trabajar con un mayor número de muestras (Van, 1994; Olive y Bean, 1999). Existen diversas variantes de la prueba de PCR que han sido aplicadas con fines epidemiológicos para el estudio de aislados patógenos, además se han utilizado otras técnicas como electroforesis de campo pulsado (PFGE), PCR con primers aleatorios, ribotipificación, amplificación de fragmentos de longitud polimórficos y otros métodos de tipificación asociados a PCR, los cuales son métodos rápidos para subtipificar cepas de *P. aeruginosa* (Syrmis *et al.*, 2004). No obstante se está imponiendo el uso de la ERIC-PCR (Amplificación de secuencias intergenicas consenso repetitivas de enterobacterias) cuando se requiere un poder de discriminación mayor. Los elementos ERIC son secuencias de ADN extragénicas, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma de las bacterias, emplean iniciadores que reconocen las secuencias conservadas ERIC y las regiones amplificadas corresponden a los segmentos que separan dichas secuencias. Así, el polimorfismo generado dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias ERIC dentro del genoma (Tobes y Pareja, 2006).

La mayor utilidad de los métodos de tipificación molecular es que son herramientas poderosas para determinar si cepas aisladas de diferentes pacientes o del medio ambiente, están relacionadas entre sí, aportando pruebas de la fuente común de transmisión de la infección. Además pueden ser usados para establecer la colonización

individual por el mismo microorganismo a través del tiempo o para determinar la relación de cepas bacterianas con diferentes perfiles de resistencia (Hyunseok *et al.*, 2003).

En este sentido, el estudio de Syrmis *et al.* (2004), en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística, encuentran que la ERIC-PCR permitió detectar 58 grupos clonales distintos, mientras que Gunjan *et al.*, al evaluar 27(81,8%) de muestras positivas a *P.aeruginosa*, reportan que la técnica de ERIC-PCR arrojó que 26 cepas estaban relacionadas clonalmente. Por su parte, Wolska y Szweda (2008), al evaluar 62 aislados clínicos de *P. aeruginosa* por ribotipificación y ERIC-PCR detectan 9 y 36 genotipos respectivamente, demostrando que esta última técnica presentó mayor poder discriminatorio, concluyendo que la ERIC-PCR es una poderosa herramienta para estudios de diversidad genética de *P. aeruginosa*

Los métodos genotípicos se han convertido en elementos esenciales en los análisis epidemiológicos, complementando las estrategias utilizadas para combatir la dispersión de las enfermedades infecciosas. Éstas técnicas no son un sustituto de los métodos convencionales, sólo permiten fortalecer el campo epidemiológico, dado que los métodos fenotípicos no permiten determinar relaciones clonales entre aislados de una misma especie. En epidemiología molecular también se hace indispensable la evaluación de la clonalidad entre aislados, cuando se estudian brotes de infecciones intra o extrahospitalaria permitiendo la confirmación de la relación genética entre los microorganismos, determinación de la fuente infección, el número de clones circulantes, el vehículo, la ruta y el patrón de distribución. Todo esto nos conlleva a una ampliación de las dimensiones del análisis y así poder penetrar con mayor fuerza en la realidad de la comunidad hospitalaria y por ende extrahospitalaria (Singh *et al.*, 2006).

Los brotes de enfermedades infecciosas a menudo son el resultado de la exposición a una fuente común del agente etiológico. Generalmente, este agente se deriva de una única célula cuya progenie son genéticamente idénticas o muy relacionadas. En términos epidemiológicos, los organismos involucrados en el foco infeccioso son clonalmente

relacionados, es decir, tienen un origen común, y son miembros de la misma especie que comparten factores de virulencia, características bioquímicas y rasgos genéticos. Sin embargo, hay suficiente diversidad a nivel de especie que organismos aislados a partir de diferentes fuentes en momentos diferentes y en diferentes áreas geográficas pueden diferenciarse o clasificarse en subtipos o cepas (Michael y Bean, 1999).

El proceso de subtipificación es importante epidemiológicamente para el reconocimiento de los brotes de infección, la detección de la transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, la determinación de la fuente de la infección, reconociendo cepas particularmente virulentas de organismos. Esta subtipificación o clasificación de cepas ha sido logrado por diferentes enfoques, con diferentes métodos, los cuales deben cumplir varios criterios con el fin de que sea ampliamente útil, en el sentido de que todos los organismos dentro de una especie deben ser tipificable por el método utilizado (Michael y Bean, 1999).

En la última década numerosas publicaciones hacen notar que los hospitales en diferentes países enfrentan la crisis de aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos (Jacoby y Archer, 1991; Vicent *et al.*, 1995; Dieckhaus y Cooper, 1998), lo cual ha conducido a las instituciones y a grupos multidisciplinarios al ajuste en los criterios, métodos de diagnóstico, identificación de patógenos más frecuentes, incidencia de resistencia a antibióticos y factores que la promueven y por último a elaborar en consenso estrategias de prevención y control de la diseminación de microorganismos multiresistentes (Gould, 1994; Cunhan, 1995; Vicent *et al.*, 1995; Álvarez, 1998).

Al respecto, en Venezuela entre los trabajos sobre resistencia de *P. aeruginosa* publicados, se puede citar la investigación de Araque y Nieves (1993) donde al evaluar 83 pacientes con infecciones intrahospitalarias de pulmón, encuentran a esta bacteria como el segundo patógeno más frecuente con un 15,1% mostrando sensibilidad a la mayoría de los antibióticos evaluados. Por su parte, Araque y Velazco (1998) evaluaron 263 bacilos Gram negativos multiresistentes, y reportaron *P. aeruginosa* como la tercera especie con mayor multiresistencia (12,2%). Durante los años 1997-2003,

Rodríguez *et al.* (2006) evaluaron 16 287 cepas bacterianas en Caracas, de las cuales 243(1,5%) correspondieron con *P.aeruginosa* resistentes a diferentes antimicrobianos, donde la gentamicina y tobramicina mostraron las mayores frecuencias (30,9 y 26,3% respectivamente). Finalmente, Guevara *et al.*(2009) en el hospital de Ciudad Bolívar reportan cepas de *P. aeruginosa* con metaloenzimas y presencia de genes *bla-VIM 2* por PCR, sin embargo, este último es el único estudio donde se emplean métodos de biología molecular para la caracterización de la resistencia a carbapenemicos en esta especie.

Debido a lo anteriormente expuesto, y aunado a la necesidad de determinar la susceptibilidad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias y comunitarias de *P. aeruginosa*, en este trabajo de investigación se plantea caracterizar mediante antibiogramas y técnica molecular ERIC-PCR cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, estado Sucre, esto con la finalidad de proporcionar información sobre los posibles mecanismos de resistencia de las cepas, clonalidad y variabilidad genética de las mismas, fuentes comunes de transmisión de infecciones, entre otras; que permitan establecer medidas terapéuticas y preventivas que contribuyan a disminuir los casos de infecciones por *P. aeruginosa* en este centro asistencial evaluado.

METODOLOGÍA

Recolección de muestras

Para este estudio se evaluaron 61 cepas bacterianas de *P. aeruginosa*, recolectadas durante marzo y mayo de 2009. Estas cepas fueron aisladas de pacientes con diagnóstico de infecciones intrahospitalarias y comunitarias con indicación de cultivo y antibiograma, atendidos en las diferentes áreas médicas del Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, de Carúpano, estado Sucre. Las cepas se preservaron en agar Luria Bertoni (LB) para su traslado al área de bacteriología del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO) donde se realizó el procesamiento de las mismas.

Normas bioéticas

Los pacientes que participaron en este estudio firmaron un consentimiento informado donde se les suministró información sobre los objetivos, riesgos y alcances de este proyecto. Adicionalmente a estos pacientes se les aplicó una encuesta clínico-epidemiológica para obtener información personal y clínica de los mismos. El manejo de la información generada en esta investigación se realizó aplicando las normas bioéticas, establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad del IIBCAUDO (CoBioBios).

Análisis bacteriológico

Para garantizar la viabilidad y pureza de los aislados clínicos obtenidos, se realizó reidentificación de las cepas, sembrándolas en cultivos y pruebas bioquímicas siguiendo los procedimientos y esquemas de identificación, establecidos para bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa (Koneman *et al.*, 2004). Para ello, los aislados obtenidos se cultivaron en placas de agar nutritivo, agar cetrimide y agar MacConkey,

incubándose a 37°C por 24 h. A partir del crecimiento bacteriano se verificaron las características morfológicas de las colonias y la producción de pigmento.

Pruebas bioquímicas

Fermentación de azúcares

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

Oxidasa

La producción de la enzima citocromo-oxidasa es una prueba que permite diferenciar familias de bacterias pertenecientes al grupo de bacilos Gram negativos no fermentadores. Para esta prueba se utilizó el reactivo dihidrocloruro de tetrametil parafenilendiamina al 1% y con éste se impregnó un trozo de papel filtro Whatman n° 5, con un palillo de madera se colocó una colonia del microorganismo, tomada a partir del crecimiento en agar nutritivo. La aparición de un color púrpura en un lapso de 20 segundos, indicó una reacción positiva.

Hidrólisis de la L-Arginina

El aminoácido L-arginina sufre la desaminación inicial para dar citrulina, amoníaco y fosfato inorgánico, por acción de la enzima específica arginina deshidrolasa. El segundo paso implica un sistema de clivaje de la citrulina donde la citrulina sufre la ruptura fosforolítica en presencia de H₃PO₄. Esta prueba permitió medir la capacidad enzimática del microorganismo capaz de hidrolizar a la L-Arginina, observándose en el caldo Moller con 1% de Arginina, se inoculó el medio con la cepa e incubó a 37°C por 24 h. La positividad de la prueba se evidenció al observarse un color púrpura alcalino después de incubarse por 24 horas en aerobiosis por 37°C.

Licuefacción de la gelatina

Determina la capacidad del microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación, la licuefacción es la turbidez en la zona alrededor del desarrollo. Se tomaron una colonia del agar cetrímide y se procedió a sembrar en el agar gelatina mediante la técnica de estrías incubándose a 37°C por 24 h. El resultado positivo mostro una precipitación de color blanco lechoso, revelando halos de 3-6 mm de ancho mostrando así una licuefacción positiva, mientras que la negativa no evidencio ningún cambio en la zona.

Oxidación de azúcares

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

Crecimiento a 42°C

Las colonias seleccionadas se sembraron en agar nutritivo y se incubaron a 42°C por 24 h. El crecimiento de la bacteria a dicha temperatura se tomó como positiva.

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* se realizó mediante el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo los lineamientos para *Pseudomonas* propuesto por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Para ello, se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 h sembrado en agar nutritivo, ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MarcFarland correspondiente a 1,5 x

10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. 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 (marca BD) en tres direcciones diferentes; luego, se dejó reposar 5 minutos para aplicar los discos de antimicrobianos, empleando pinzas de metal estériles previamente flameadas. Se ensayaron los siguientes discos de antimicrobianos de acuerdo a los protocolos propuestos por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (Anexo 1) : meropenen (10 µg), piperacilina/tazobactan (30/10µg), , cefepima (30 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30/10 µg) , ceftazidima (30µg), imipenen (10µg) , amikacina (30 µg), gentamicina (10µg), aztreonam (30 µg), piperacilina (30µg), colistin (30 µg), ciprofloxacina (5µg), netilmicina (30 µg) y tobramicina (30 µg), (todos marca OXOID).

Las placas se dejaron reposar durante 15 minutos para luego ser incubadas a 35°C, durante 18 h en ambiente de aerobiosis; transcurrido ese tiempo, se realizó la lectura de los halos de inhibición empleando una regleta milimetrada. Los halos de inhibición que presentó cada antimicrobiano se interpretaron siguiendo los valores de referencia señalados en la tabla del CLSI (2012) como sensible, intermedio y resistente.

Control de calidad del antibiograma

La calidad de los discos de antimicrobianos y de las pruebas bioquímicas fueron verificados empleando cepas controles *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 del Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas (CVM).

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN genómico de las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas se utilizó el kit de extracción de ADN Wizard Genomic (Promega); para esto se suspendió de 10

a 12 colonias de la placa de agar nutritivo en 1 000 µl de caldo Luria Bertoni (LB) los cuales fueron incubados a 37°C por 12 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar los tubos inoculados a 3 500 g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se le agregó agua tridestilada estéril. Este paso se repitió hasta que se obtuvo una suspensión libre de caldo nutritivo. Luego se tomaron 200 µl del precipitado y se colocaron en un tubo eppendorff de 1,5 ml que contenía 600 µl de solución lisante de núcleo, mezclándose suavemente de 5 a 6 veces por inversión. Posteriormente los tubos se incubaron a 80°C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se agregaron 200 µl de solución precipitante de proteínas, mezclando bien con vortex por 20 segundos y luego se incubaron en hielo por 5 minutos. Seguidamente se centrifugaron los tubos a 14 000 g por 15 minutos a una temperatura de 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml limpio que contenía 600 µl de isopropanol mezclándose la suspensión lentamente y centrifugando a 14 000 g por 15 minutos a 4°C. Después se descartó el isopropanol y se agregaron 600 µl de etanol al 70% a los tubos mezclando suavemente para luego centrifugar a 14000g por 5 minutos a 4°C. Luego se descartó el etanol para posteriormente dejar secar a 37°C, sin excederse en el secado. Luego se rehidrató con 100 µl de solución rehidratante de ADN y finalmente de los tubos con ADN se tomó una alícuota de 10 µl para verificar la calidad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio al 0,05 µl.ml⁻¹. Por último, los tubos con ADN se guardaron a -20°C hasta su uso para la metodología molecular.

Amplificación por ERIC- PCR

La amplificación de elementos genéticos repetitivos usando el sistema ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias) se basa en la caracterización de los aislamientos, así como también, en determinar la variabilidad genética entre las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas en este estudio. Para la ERIC-PCR se utilizaron los primers:

ERIC1R (3CACTTAGGGGT CCTCGAATGTA-5')
ERIC2 (5'AAGTAAGTGA CTG HGGGTGAGCG-3').

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ l en tubos de PCR de 0,2 ml cuyos componentes fueron: 50 pmol de cada primers, cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato 1.25 Mm de cada uno, 2 U de ADN *Taq* polimerasa en un buffer 5x con 10% (vol/vol) de dimetil sulfoxide y 100 ng de ADN genómico (Koganet *al.*, 1987; Reboli *et al.*, 1994). Para la amplificación de los fragmentos correspondientes, todos los tubos de la PCR fueron colocados en un termociclador que fue programado para ser utilizado de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 minuto, apareamiento de los oligonucleótidos a 45°C por un minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, finalmente se programó una extensión final a 72°C por 10 minutos. Una vez culminado el programa de amplificación seleccionado, se tomaron 15 μ l del producto de amplificación y fueron corridos mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo), teñido con bromuro de etidio (0,05 μ l.ml⁻¹). Los diferentes patrones de bandas de cada una de las cepas analizadas se observaron con un transluminador de luz ultravioleta y se fotografió con una cámara digital (Samsung). En cada corrida se utilizó patrón de peso molecular de 100 pb (Axigen).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se emplearon un análisis porcentual y los datos fueron expresados en tablas y figuras (Dawson y Robert, 1997). La presencia o ausencia de bandas en los geles de agarosa para analizar los resultados de la ERIC-PCR fueron determinados por inspección visual, considerando la similitud de todas las bandas visibles de los aislados que muestren la misma distancia de migración, sin considerar la intensidad y forma de las bandas (Reboli *et al.*, 1994), la interpretación de los patrones de bandas generados por ERIC-PCR se realizó basándose en los criterios establecidos por Tenover et al. (1995), quienes señalan que estos criterios son confiables si la técnica resuelve al menos 10 fragmentos distintos. Las cepas fueron categorizadas de la siguiente manera:

1. **Clones indistinguibles:** cuando el patrón de bandas de la ERIC-PCR evidencie el mismo número de bandas y que muestren tamaños aparentemente iguales.
2. **Clones relacionados:** Cuando el patrón de bandas de la ERIC-PCR demostró de 1-3 bandas de diferencia.
3. **Clones no relacionados:** Cuando los patrones de bandas de la ERIC-PCR demuestren diferencias de bandas superiores a 3.

El árbol de las relaciones entre cepas basadas en los antibiogramas fue construido utilizando la resistencia o sensibilidad de cada antibiótico como un carácter binario (R/S) y tomando cada antibiótico como una variable. Se establecieron las diferencias entre pares de cepas utilizando el programa Fingerprint Analysis with Missing Data (FAMD, versión 1,25) (Schlüter y Harris, 2006) cuyos valores fueron utilizados para la construcción del árbol, por medio del programa Tree View X (versión 0.5.0) (Page, 1996).

RESULTADOS

De un total de 61 cepas de *P. aeruginosa* recolectadas durante el período comprendido entre marzo y mayo de 2009 de pacientes atendidos en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, se encontró que el 31,15% (19/61) fueron aisladas de pacientes con infecciones comunitarias, mientras que el 68,85% de las cepas estuvieron asociadas a infecciones intrahospitalarias (42/61).

Al evaluar la frecuencia de aislamientos de *P. aeruginosa* según los diferentes servicios existentes en el centro asistencial, se encontró que el mayor número de cepas fueron aisladas e identificadas en pacientes de los servicios de cirugía y UCI con 16,39% cada uno, seguidos de nefrología (14,75%) y pediatría (13,11%) (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de aislamientos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* según el tipo de servicio del Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano estado Sucre.

Servicio	N° de Cepas Aisladas	Frecuencia (%)
Sala de Shock (S/S)	1	1,62
Pediatría (P)	8	13,11
Nefrología (N)	9	14,75
Cirugía (C)	10	16,39
Medicina (M)	3	4,91
Emergencia de Adultos (E/A)	4	6,55
Emergencia Pediátrica (E/P)	6	9,83
Cirugía/Traumatología (C/T)	4	6,55
Reten (R)	1	1,63
Obstetricia (O)	1	1,63
Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)	10	16,39
UCI-Neonatal (UCIN)	3	4,91
Total	61	100,00

La frecuencia de *P. aeruginosa* de acuerdo al tipo de muestra analizada (Tabla 2), evidencia predominio de este microorganismo en secreciones de diferente índole (68,82%). Del total de las secreciones donde se aislaron las cepas, el 39,32% eran secreciones de heridas, piel y partes blandas aisladas en pacientes de diferentes servicios. No obstante, se obtuvo un 18,03% de cepas en secreciones óticas

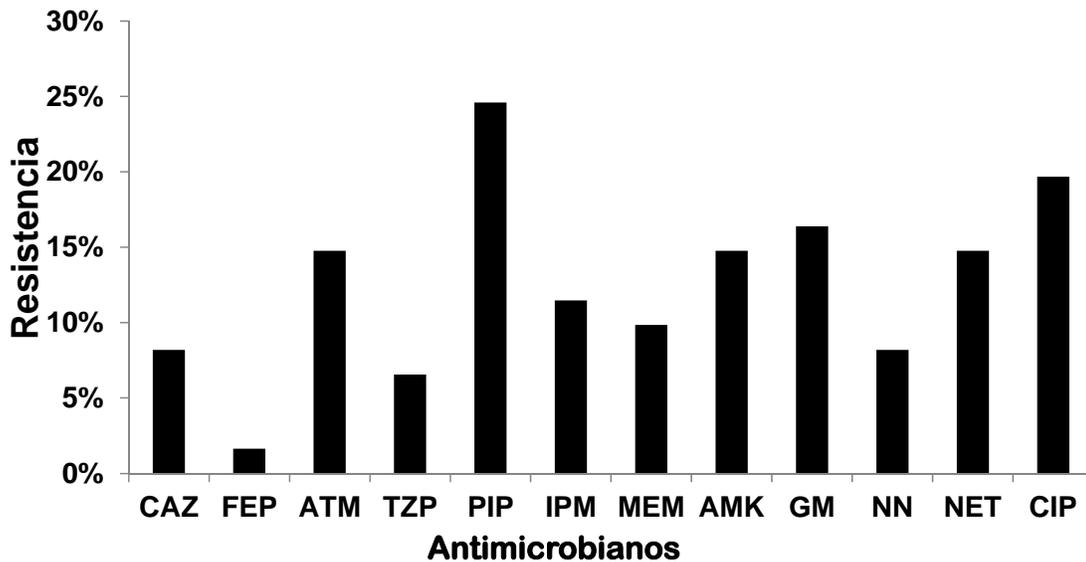
pertenecientes a las áreas de pediatría, emergencia pediátrica y adulta (Datos no mostrados). Un 14,75 % de *P.aeruginosa* se aislaron en muestras de orina de pacientes atendidos en nefrología, emergencia pediátrica/adulta y obstetricia.

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos de cepas de *P. aeruginosa* según el tipo de muestras en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano, estado Sucre.

Tipos de Muestras	N° de Cepas Aisladas	Frecuencia (%)
Orina	9	14,75
Heces	1	1,63
Sangre	6	9,83
Secreciones	42	68,82
Líquido Peritoneal	3	4,91
Total	61	100,00

Con respecto al perfil de resistencia presentado por las cepas de *P. aeruginosa* en este estudio (Figura 1), se evidenció que de los β -lactámicos evaluados, la mayor frecuencia de resistencia fue a la piperacilina (24,59%) seguido de aztreonam (14,75%), imipenem (11,48%) y meropenem (9,84%). El 19,67% de estas cepas también presentaron resistencia a ciprofloxacina. Con respecto a los aminoglucósidos, la gentamicina mostró la mayor frecuencia de resistencia con un 16,39%, seguido de netilmicina y amikacina con 14,75%, cada uno, y tobramicina con 8,20%.

De acuerdo a los ensayos de susceptibilidad realizados a las 61 cepas evaluadas, se identificaron 27 cepas resistentes que se agruparon en 20 fenotipos de resistencia (Tabla 3), los cuales mostraron diferentes perfiles de resistencia a los diferentes β -lactámicos, excepto los fenotipos XVI y XVII. El fenotipo V se puede asociar a una pérdida de porina, como mecanismo de resistencia a esta clase de antimicrobiano, el fenotipo VIII evidenció un fenotipo compatible con desrepresión de AmpC, OXAs-BLEE y Sistema MexXY-OprM, mientras que los fenotipos VII y XIV demostraron β -lactamasa de clase A no BLEE, por su resistencia solo a la piperacilina. El mecanismo de resistencia más importante a los β -lactámicos fue observado en el fenotipo VI, con producción de metalobetalactamasas (Tabla 3).



CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, TZP: piperacilina-tazobactam, PIP: piperacilina, IMP: imipenen, MEM: meropenen, AMK: amikacina, GM: gentamicina, NN: Tobramicina, NET: netilmicina, CIP: ciprofloxacina

Figura 1. Frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a diferentes antimicrobianos en el Hospital “Santos Aníbal Dominici” de Carúpano, Edo. Sucre.

Por otro lado, se identificaron 8 fenotipos (VI, X, XII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII) con resistencia a ciprofloxacina, lo que sugiere posible mutación en los genes *gyrA* y *parC* como mecanismo de resistencia (Tabla 3). Los fenotipos V, VI, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVIII y XIX, presentaron resistencia a los diferentes aminoglucósidos evaluados, de los cuales el fenotipo XI se presentó como posible mecanismo de resistencia ACC(3)-I (Tabla 3) y los fenotipos VI, XIV y XVIII presentaron una combinación de enzimas, sistema de expulsión y permeabilidad como mecanismo de resistencia asociado a los aminoglucósidos.

Es de destacar el hallazgo de 6 fenotipos multiresistente de *P. aeruginosa* (VI, X, XII, XIV, XV, XVIII) con diferentes mecanismos de resistencia, tal como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Características epidemiológicas, fenotipos y mecanismos de resistencia a diferentes antimicrobianos en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital “Santos Aníbal Dominicki” de Carúpano, Estado. Sucre

Cepa	Edad/ Sexo	Servicio	Tipo de muestra	Estadía	Fenotipo	Antibiotipo	Mecanismos de Resistencia
218 B	3/M	E/P	S. Oído	1 D	I	TZP	
236 B	40/M	UCI	S. Herida	7 D	II	IMP	Perdida de porina
435 A	3/M	E/P	Orina	1 D	III	ATM	Sistema de expulsión MexXY-OprM
630 D	9m/F	P	S. Oído	4 D			
303 E	67/F	N	Cateter	1 D	IV	PIP-CAZ-ATM	BLEE
457 B	27/M	UCI	S. Traqueal	7 D			
605 B	79/F	C/T	S. Talón	9 D	V	IMP-MER-AMK	Perdida de porina
612 B	59/M	C	Orina	9 D	VI	PIP -TZP-CAZ-FEP-IMP-MER-GM- NN-NET- AMK-CIP	Metalo-β-lactamasa, sistema de expulsión MexXY-OprM, enzimas-sistema de expulsión-permeabilidad y mutación en <i>gyrA+parC</i>
373 B	56/F	UCI	S. Traqueal	8 D			
504 E	40/F	N	Sangre	1 D	VII	PIP	β-lactamasa de clase A no BLEE
327D	46/M	N	Catéter	1D			
585 E	RN/M	UCIN	Sangre	4 D	VIII	PIP- TZP-CAZ-FEP-ATM	Desrepresión de AmpC, OXAs-BLEE y Sistema MexXY-OprM
837 A	40/F	S/S	Orina	2 D	IX	PIP –ATM	
183 D	58/M	UCI	Catéter	7 D	X	PIP -ATM-IMP-MER- NET CIP	Mutación en <i>gyrA+parC</i>
240 D	38/F	N	L. Peritoneal	1D	XI	IMP-MEM-GM	ACC(3)-I
683 B	36/M	UCI	S. Drenaje	8 D	XII	PIP-IMP -GM-AMK-NET-CIP	Mutación en <i>gyrA+parC</i>
1496 B	18/M	C	S.Abdominal	7D	XIII	NET	
780 B	53/F	C/T	S. Pierna	10 D	XIV	PIP-GM- AMK-NN-NET-CIP	β-lactamasa de clase A no BLEE. enzimas-sistema de expulsión-permeabilidad Mutación en <i>gyrA+parC</i>
859 B	16/M	C	S. Herida	7 D	XV	PIP-MEM-GM-AMK- CIP	Mutación en <i>gyrA+parC</i>
317 D	53/F	C/T	S. Herida	8 D	XVI	GM-AMK- CIP	Mutación en <i>gyrA+parC</i>
1408	16/M	C	S. Herida	7 D			
907 B	23/M	UCI	S. Traqueal	6 D	XVII	CIP	Mutación en <i>gyrA+parC</i>
483 D	48/M	M	Orina	7 D			
1131 B	64/M	UCI	S. Traqueal	10 D	XVIII	PIP-ATM-GM- AMK-NN-NET-CIP	Sistema de expulsión MexXY-OprM, enzimas-sistema de expulsión-permeabilidad y mutación en <i>gyrA+parC</i>
529 D							
1163 B	9/M	P	S. Oído	4 D	XIX	MER-NET	
306-E	RN/M	R	Sangre	3 D	XX	PIP-CAZ-TZP-IMP	

RN: recién nacido, S: secreción, L: líquido, D: día, Com: comunitaria. Abreviaturas de los servicios según la tabla 1 y los antibióticos según la figura 1.

Con respecto a la caracterización molecular por ERIC-PCR se observó en general gran variabilidad genética en las diferentes cepas evaluadas en los servicios del hospital de Carúpano, las cuales no evidenciaron resistencia adquirida a los antimicrobianos evaluados en esta investigación (Figura 2), evidenciándose que en algunos casos el fenotipo (Antibiotipo) no tiene relación directa con el genotipo de las cepas por ERIC-PCR, lo cual puede evidenciarse en la figura 2 donde las cepas con fenotipos de sensibilidad no muestran un patrón de bandas idéntico por ERIC-PCR (Figura 2).

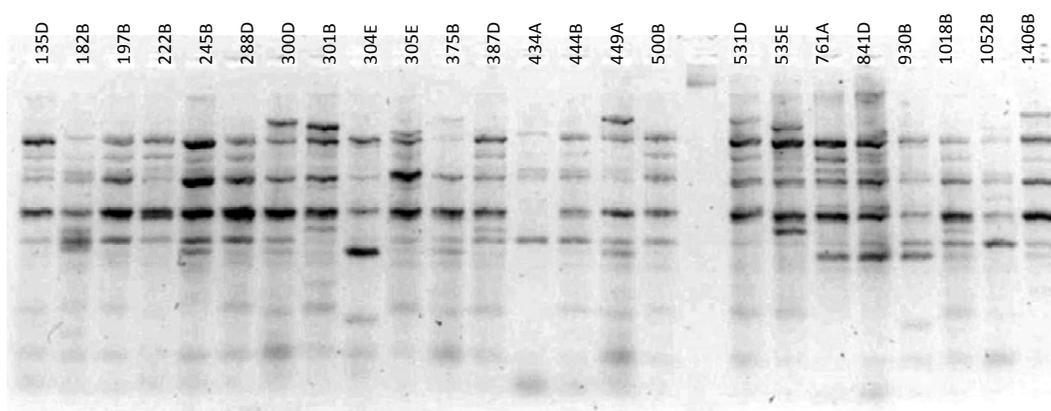


Figura 2. Patrones de bandas por ERIC-PCR en cepas con fenotipo natural de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, Edo. Sucre.

En cuanto a la caracterización de las cepas resistentes por ERIC-PCR, se observa en la figura 3 que los aislados clínicos 435-A, 303-E, 585E son el mismo clon, encontrándose en los servicios de emergencia pediátrica, nefrología y UCIN, respectivamente, y las cepas 837-A y 612-B son clones relacionados, aislados en sala de shock y cirugía. Por otro lado, las cepas 907-B y 529D aisladas en UCI y cirugía, respectivamente, son clones relacionados entre si, mientras que los aislados 1131-B, 317D, y 780-B son el mismo clon de *P. aeruginosa* aislada en los servicios de UCI y cirugía-trauma respectivamente (Figura 3).

Es importante señalar que las cepas 317D y 780B fueron aisladas del mismo paciente, solo que en estos casos *P. aeruginosa* fue aislada en estadias diferentes mostrando diferente patrón de resistencia, presentando inicialmente resistencia a los

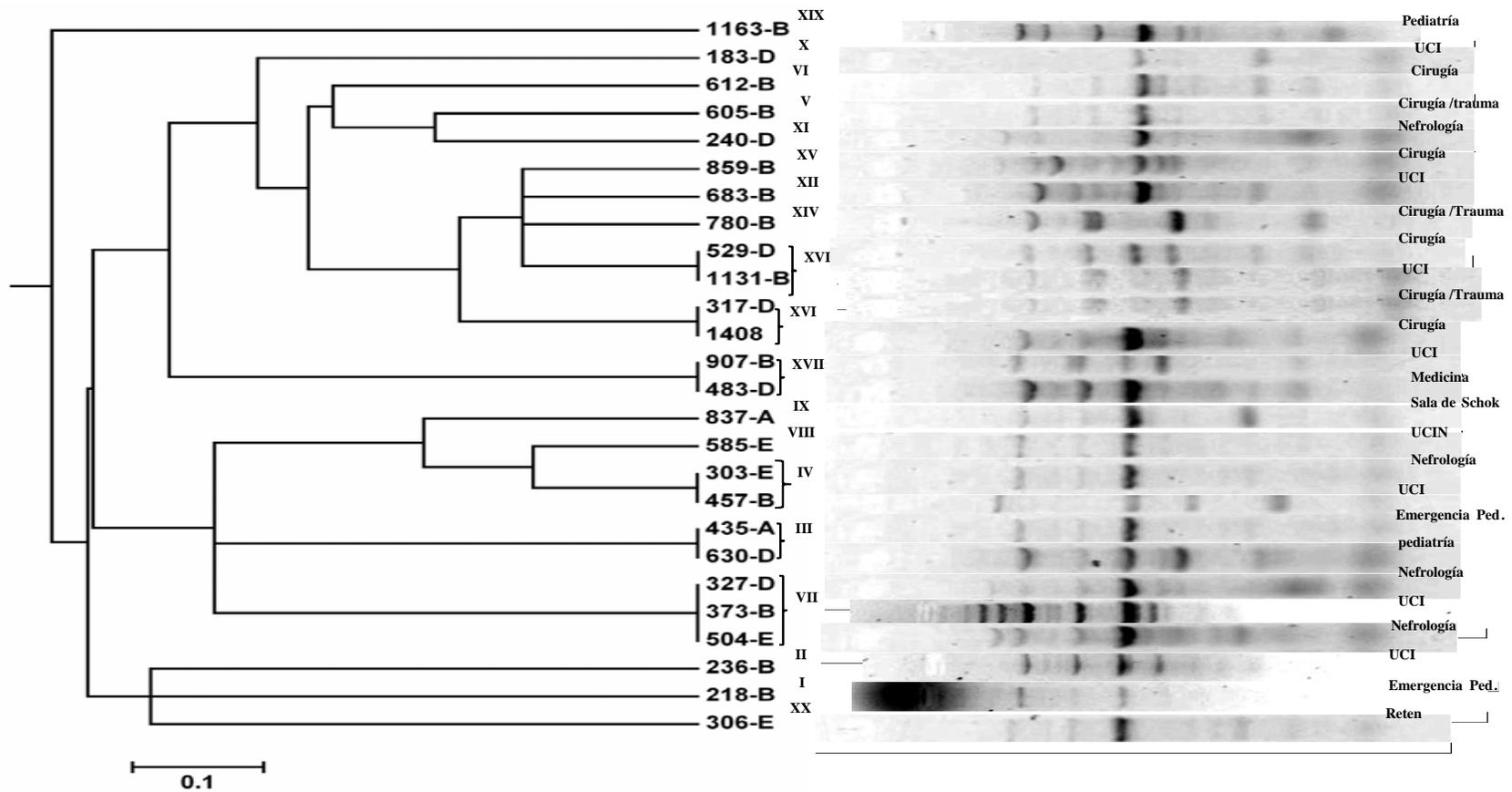


Figura 3. Dendrograma de los fenotipos de resistencia de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital “Santos Aníbal Dominici” de Carúpano, estado Sucre con sus respectivos patrones de bandas obtenidos por ERIC-PCR. Abreviaturas de los servicios según la tabla 1.

Antimicrobianos AMK-GM-CIP y luego en el segundo aislamiento la cepa presentó adicionalmente resistencia a PIP, NN, NET (Tabla 3), demostrándose por ERIC-PCR que son el mismo clon (figura 3). Además la cepa 317D mostró un fenotipo de resistencia idéntico con la cepa 1408 (Tabla 3), sin embargo, se observa en la Figura 3 que son clones diferentes de *P. aeruginosa*. Del mismo modo, las cepas 1131B y 529D que presentan un fenotipo idéntico de resistencia, son clones diferentes por ERIC-PCR.

Al analizar los genotipos de ERIC-PCR de las cepas de *P. aeruginosa* de acuerdo a los servicios de pediatría, cirugía y nefrología (Figura 4), se observó que en pediatría todas las cepas fueron aisladas de muestras de secreciones óticas (Datos no mostrados), observando en la Figura 3 la presencia de 1 clon en tres de las cepas evaluadas (387D-1217-492D), con fenotipos de sensibilidad a todos los antimicrobianos evaluados. Además, las cepas 630D y 300D evidencian ser clones relacionados, siendo esta última aislada en Junio con fenotipo de sensibilidad y la 630D en el mes de noviembre evidenciando resistencia a ATM. La cepa 375B fue la única de este grupo que fue aislada de secreción de región lumbar, mostrando un patrón de bandas diferente a las demás cepas identificadas en este servicio.

En las cepas aisladas en el servicio de cirugía (Figura 4), solo se observó 1 clon en las cepas 288D-222B, las cuales fueron aisladas de muestras de secreciones, evidenciando sensibilidad a todos los antimicrobianos probados. Todas las *P. aeruginosa* aisladas de este servicio se asociaron a secreciones de heridas en infecciones intrahospitalarias, excepto la 612B que fue aislada de una muestra de orina, demostrando ser una cepa intrahospitalaria multiresistente (fenotipo VI de la Tabla 3).

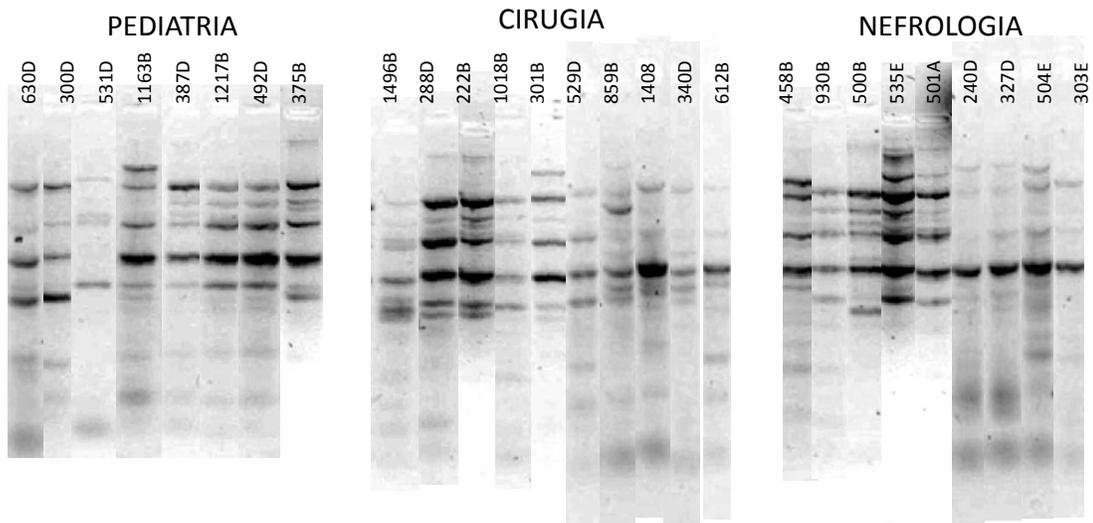


Figura 4. Fragmentos amplificados por ERIC-PCR de cepas de *P. aeruginosa* aisladas en los servicios de pediatría, cirugía y nefrología del Hospital “Santos Aníbal Dominici” de Carúpano, estado Sucre.

En las cepas de nefrología (Figura 4), se observan dos clones relacionados (535E-501A), sensibles a los antibióticos evaluados, siendo aisladas en los meses de mayo y octubre a partir de muestras de orina y líquido peritoneal respectivamente. Además se observan 3 cepas 240D-327D-504E que son clones relacionados por ERIC-PCR (Figura 3) pero mostraron diferentes patrones de resistencia a los antibióticos evaluados (Tabla 3), siendo infecciones comunitarias aisladas de diferentes muestras biológicas. Aquí hay que acotar que los pacientes de nefrología son pacientes que frecuentan este servicio del hospital por sus diferentes condiciones clínicas, ameritando diálisis, colocación de catéteres, entre otros, situación que facilita o los predispone a este tipo de infecciones.

Referente a las cepas aisladas en la Unidad de Cuidados intensivos (UCI) del hospital de Carúpano (Figura 5), se observó que la mayoría fueron aisladas de secreciones traqueales en pacientes con infecciones intrahospitalarias. Hay que resaltar la observación de que en estas cepas existe un patrón de bandas que es compartido por las primeras cepas (197B a la 373B) con fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos evaluados en este estudio (Figura 4), mientras que en las 5 últimas cepas (907B a la

457B) con fenotipos de resistencia muestran un patrón de bandas totalmente diferente a las primeras.

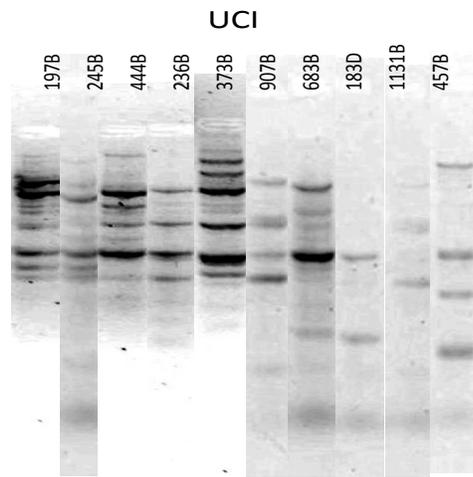


Figura 5. ERIC-PCR de cepas de *P. aeruginosa* aisladas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital “Santos Aníbal Dominici” de Carúpano, estado Sucre.

DISCUSION

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista intrahospitalario, que también puede adquirirse comunitariamente, siendo responsable de variados procesos infecciosos, por su habilidad exacerbada para desarrollar altos niveles de resistencia a los antibióticos que dificultan su tratamiento, asociándose esto a una considerable morbilidad y mortalidad de los pacientes afectados. Por ello, la multiresistencia en esta bacteria es causa de preocupación por las limitadas opciones terapéuticas disponibles para tratar infecciones causadas por este microorganismo (Hancock y Speert, 2000; Master *et al.*, 2011).

En este sentido, las cepas resistentes de *P. aeruginosa* evaluadas en este estudio afectaron principalmente a los pacientes de los servicios de cirugía, pediatría, nefrología y unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital “Santos Aníbal Dominicci” de Carúpano, aislándose principalmente en muestras de secreciones de diferente índole en pacientes con infecciones intrahospitalarias. Estos resultados coinciden con los reportados por Rodríguez *et al.* (2005) en el Hospital Universitario de Caracas donde encuentran que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas eran de pacientes hospitalizados. Además, se ha reportado que en áreas de cirugía y UCI los pacientes presentan enfermedades subyacentes con periodos de estancia prolongados en centros asistenciales ameritando el uso de tratamientos antimicrobianos múltiples (Andrade *et al.*, 2002). En este mismo orden de ideas, Keith *et al.* (2004) señala que las UCI constituyen el epicentro de diseminación de gérmenes resistentes a otras aéreas de los hospitales, convirtiéndose los pacientes y el medio ambiente en los principales reservorios.

Hay que resaltar el 32,8% de cepas de *P. aeruginosa* identificadas en pacientes con infecciones comunitarias, lo que difiere de lo reportado por Zambrano *et al.* (2004) quienes señalan que infecciones por esta bacteria rara vez son adquiridas en la comunidad por pacientes inmunocompetentes, no obstante, a pesar de que estas cepas

evidenciaron fenotipos y mecanismos de resistencia en baja frecuencia, son importantes desde el punto de vista epidemiológico por el problema que representa su diseminación. Con respecto a la resistencia antimicrobiana presente en las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas en el Hospital de Carupano, se encontró que la mayor frecuencia dentro de los β -lactámicos probados fue para la piperacilina, seguida de aztreonam, imipenem y meropenem, además se observó resistencia a la quinolona ciprofloxacina y dentro de los aminoglucósidos ensayados la gentamicina fue la más frecuente, seguido de amikacina, netilmicina y tobramicina. Al respecto, Master *et al.* (2011) al evaluar la resistencia en 924.740 aislados de *P. aeruginosa* entre 1997-2009 en Estados Unidos reportan que los aislamientos resistentes a imipenem, aztreonam, gentamicina, ciprofloxacina presentaron las más altas tasas de resistencia cruzada, además la mayor cobertura frente a *P. aeruginosa* fue con la combinación de piperacilina-tazobactam más amikacina (94,00%) seguido por aztreonam y amikacina (90,00%). Mientras que Lim *et al.* (2008) al evaluar 48 aislados de *P. aeruginosa* reportaron la mayor resistencia a tetraciclina (73,00%) y cloranfenicol (60,00%) y en menor grado cefotaxime (40,00%), ceftriazone (31,00%), cefoperazone (29,00%), ticarcilina (25,00%), piperacilina (23,00%) e imipenem (21%), reportando además 33 de las cepas con multiresistencia y dos aislados con betalactamasas de espectro extendido (BLEE), concluyendo que el aztreonam fue el agente más efectivo contra las cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes, evidenciando estas últimas gran diversidad genética al ser evaluadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y campo pulsado.

Con respecto a los fenotipos y mecanismos de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* del Hospital de Carupano, se encontraron 20 fenotipos de resistencia diferentes, donde se identificaron 6 fenotipos multiresistentes, de los cuales, una cepa presentó metalo- β -lactamasas (MBL), enzimas-sistema de expulsión-permeabilidad, mutación *gyrA* + *parC*. Estos últimos mecanismos también estuvieron presentes en otras cepas multiresistentes, además de pérdida de porina OprD, alteración enzimática de la acetiltransferasa, entre otros. En este sentido, *P. aeruginosa* presenta resistencia a una 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. Dentro de estas enzimas se encuentran las β -lactamasas, las cuales son la principal causa de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, de manera que pueden inactivar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemas o distintas combinaciones de estos antibióticos. La existencia de estas enzimas limita de forma importante el uso empírico de antibióticos β -lactámicos en los hospitales. Esto aunado a la transferencia horizontal de plásmidos con genes de resistencia entre las bacterias, de unos organismos a otros, la aparición de nuevos tipos de β -lactamasas, su prevalencia cada vez mayor, así como la aparición de cepas multirresistentes a distintos antibióticos, resultan especialmente problemáticas en la práctica clínica (González *et al.*, 2003; Tanya *et al.*, 2009).

Las MBL han sido reportadas principalmente en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y otros bacilos gram negativos no fermentadores; también han sido reportadas con menos frecuencia, en enterobacterias (Queenan *et al.*, 2007; Cejas *et al.*, 2008). Otro mecanismo común en la resistencia a los carbapenemes, incluyendo imipenem en *P. aeruginosa*, es la pérdida o alteración en la proteína porina de membrana externa OprD, la cual no provee altos niveles de resistencia como se observa en cepas productoras de MBL, no obstante la pérdida de función de las OprD es el mayor determinante de resistencia en cepas no-MBL, y puede operar en conjunto con otros mecanismos, como por ejemplo desrepresión de AmpC o hiperproducción MexAB-OprM (Keith, 2011). Por otra parte, una mutación puntual en el gen *gyrA* localizado en el motivo QRDR (quinolone-resistance-determining-region) da lugar a la síntesis de una ADN girasa o topoisomerasa II con baja afinidad por las fluoroquinolonas (Jalal *et al.*, 1997). Un único cambio en un aminoácido sería responsable de un nivel de resistencia moderado mientras que mutaciones que afectan al gen *gyrA* y al gen *parC* (subunidad A de la topoisomerasa IV) condicionan un elevado grado de resistencia (Nakano *et al.*, 1997).

Debido a que la resistencia en *P. aeruginosa*, es frecuente y considerando que distintos mecanismos pueden contribuir a ello, es probable que su detección en aislamientos clínicos sea subestimada debido a que en los laboratorios bacteriológicos no se aplican métodos moleculares de rutina (Pagniez *et al.*, 2006). También, se han descrito casos de multirresistencia a todos los antibióticos disponibles, motivando esto los estudios de susceptibilidad en cepas de *Pseudomonas*, ya que los patrones de resistencia de esta especie pueden presentar variaciones geográficas, e incluso pueden variar entre hospitales de una misma región en función de las características de la población y del uso de los antibióticos (Ferrero, 2005).

Por ello, las investigaciones sobre la epidemiología intrahospitalaria de *P. aeruginosa* se han visto obstaculizadas por la disminuida capacidad discriminadora de los métodos clásicos como: pruebas fenotípicas, de serotipificación, tipificación de piocianina y biotipificación (Kersulyte *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996). Las técnicas basadas en el ADN, como las secuencias repetitivas intergénicas de consenso de enterobacterias (ERIC-PCR) y ribotipificación, han sido ampliamente utilizados en la investigación epidemiológica de muchos microorganismos, incluyendo *P. aeruginosa* (Speijer *et al.*, 1999).

Respecto a los resultados de la ERIC-PCR aplicada en las cepas de *P. aeruginosa* de este estudio se encontró gran variabilidad genética de los diferentes aislados clínicos evaluados, demostrando clonalidad solo en pocas cepas de los servicios de cirugía y pediatría, por lo que no se pueden definir como brotes epidémicos. Al respecto C al evaluar la diversidad genotípica y características biológicas de *P. aeruginosa* en Brasil, encuentran que la ERIC-PCR fue capaz de discriminar todos los aislados, observando cuatro grupos de cepas con baja diversidad y las cepas más infectivas se localizaron en dos grupos, sugiriendo que no hay una fuerte selección por genotipos específicos. Por su parte, Nagaveni *et al.* (2011) al evaluar 53 aislados de *P. aeruginosa* para evaluar la multiresistencia de estas cepas a partir de fluidos cerebroespinal, reportan 80,00% de cepas multidrogoresistentes y 32,00% de los aislados fueron imipenem resistentes, señalando que este patógeno oportunista ha incrementado la resistencia constituyendo una amenaza para la vida de los pacientes, y los análisis de ERIC-PCR de estas cepas

revelaron pocas variaciones genéticas entre las mismas. Mientras que Janam *et al.* (2011), al estudiar 500 cepas de *P. aeruginosa* ambientales y clínicas por ERIC-PCR, reportan que en este último grupo los aislamientos presentaron resistencia elevada en comparación con las cepas medioambientales, observando una clonalidad débil en las cepas clínicas, concluyendo que en estas últimas la resistencia a los antimicrobianos es causada por acumulación basada en la presión de selección.

En esta investigación se observó la presencia de clones idénticos por ERIC-PCR en aislados clínicos de diferentes servicios del hospital de Carúpano, lo que permite inferir que el personal del centro asistencial y/o los pacientes pudieran estar participando en la diseminación y transporte de clones de un lugar a otro. En este orden de ideas, se ha reportado que una pequeña proporción de individuos sanos portan *P. aeruginosa*, en la piel, garganta y heces, pero las cifras de individuos sanos portadores no se conoce (Bertrand *et al.*, 2001; Blanc *et al.*, 1998), mientras que en hospitales los reservorios de este microorganismo incluyen equipo de respiración, broncoscopios, antisépticos, desinfectantes, cremas de manos, jabón, lavamanos, uñas artificiales y piscinas de fisioterapia e hidroterapia (Struelens *et al.*, 1993; Trautmann *et al.*, 2001; Blanc *et al.*, 2004). Muchos brotes hospitalarios de *P. aeruginosa* han sido identificados por contaminación con algunos de estos reservorios, además el suministro de agua en los hospitales puede ser una importante fuente para la colonización y la infección en pacientes susceptibles (Trautmann *et al.*, 2001; Blanc *et al.*, 2004)

Pseudomonas aeruginosa se ha convertido en un patógeno intrahospitalario dominante con tasas de mortalidad elevadas. El uso generalizado de los antimicrobianos de amplio espectro ha dado lugar a la aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos y nuevos mecanismos de resistencia están siendo continuamente identificados, dejando un número limitado de opciones terapéuticas. La compleja epidemiología de cepas resistentes necesita ser más estudiada con el fin de diseñar medidas para controlar su propagación. El manejo óptimo de las infecciones con las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos requiere conocimiento de la epidemiología local y

aplicación de vigilancia epidemiológica con disponibilidad de métodos de tipificación molecular para determinar la diversidad de las cepas e identificar posibles brotes.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, F. 1998. Impacto de las resistencias bacterianas sobre política antibiótica. *Medicina Intensiva*, 22: 17-23.

Andrade, E.; Navarro, P.; Rodríguez, J.; Rodríguez y Villarroel, E. 2002. Evaluación bacteriológica de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibióticos e Infecciones*, 10: 29-32.

Annette, C.; Houston, E.; Monteforte, J.; Wood, C. y Hamill, R. 1994. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 2635-2640.

Araque, M. y Velazco, E. 1998. In vitro activity of fleroxacin against multiresistant gram-negative bacilli isolated from patients with nosocomial infections. *Intensive Care Medical*, 24: 839-844.

Araque, G. y Nieves, B. 1993. Microbiological study of nosocomial lung infections. *Revista Latinoamericana Microbiología*, 35: 147-152.

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

Bellais, S.; Mimos, O. y Leotard, S. 2004. Efficacy of betalactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2032-2034.

Bertrand, X.; Thouverez, M. y Talon, D. 2001. Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Medical*, 27:1263-1268.

Blanc, D.; Nahimana, I. y Petignat, C. 2004. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/ infections in intensive care units. *Intensive Care Medical*, 30: 1964-1968.

Bouza, E.; García, F. y Cercenado, E. 2003. *Pseudomonas aeruginosa*: Estudio multicéntrico en 136 hospitales españoles. *Revista Española Quimioterapia*, 16: 41-52.

Brooks, G.; Morse, S. y Butel, J. 1999. *Pseudomonas*. Segunda edición. Microbiología Médica. México.

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

Carmeli, Y.; Troillet, N.; Eliopoulos, G. y Samore, M. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*? comparison of risk associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1379-1382.

Cejas, D.; Almuzara, M.; Santaella, G.; Tuduri, A.; Palombarani, S.; Figueroa, S.; Gutkind, G. y Radice, M. 2008. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 238-245.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee Clinical Laboratory Standards (CLSI) M100-S172012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement. Wayne: National Committee Clinical Laboratory Standards.

Cunhan, B. 1995. Antibiotic treatment of sepsis. *Clinical Medical of North America*, 79: 551-558.

Dawson, S. y Robert, G. 1997. *Bioestadística medical*. Editorial el manual Moderno. México.

Díaz, P.; López, M. y Garrido, S. 2002. Infecciones causadas por *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativas no fermentadores. *Medicina*, 8: 398-407.

Dieckhaus, K. y Cooper, B. 1998. Infection control concepts in critical care. *Critic Care Clinical*, 14: 55-70.

Docquier, J.; Luzzaro, F.; Amicosante, G.; Toniolo, A. y Rossolini, G. 2001. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing Per-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and Vim-2 metallo-beta-lactamase. *Emergency Infectious Diseases*, 7: 910-1.

Ferrero, S. 2005. Incidencia y resistencia de bacilos Gram negativos no fermentadores. Universidad nacional del nordeste comunicaciones científicas y tecnológicas <<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/3-Medicina/M-136.pdf>>(09/10/2011).

Fogon, F. y Chostre, I. 1996. Mortality due to ventilator-associated *Pseudomonas* or colonization with *Pseudomonas* o *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*, 23: 538-554.

Galani, I.; Souli, M.; Chryssouli, M.; Katsala, D. y Giamarellou, H. 2004. First identification of an *Escherichia coli* clinical isolates producing both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *Clinical Microbiology and Infectious*, 10: 757-760.

García, N.; Barnadas, M.; Dalmau, J.; Coll, P.; Gurguí, M. y Alomar, A. 2008. Mycobacterium abscessus infection secondary to mesotherapy. *Clinical Experimental Dermatology*, 9:33:658.

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 Pharmacology*, 22: 231-238.

Gould, I. 1994. Risk factor for acquisition of multiply drug-resistant Gram negative bacteria. *Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 13: 30-38.

Gunjan, A.; Arti, K.; Susheel, K.; Bimal, K. y Sada N. 2005. Caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de niños con infección crónica con fibrosis quística en la India. *Biology Medical Central Microbiology*, 5: 43-43.

Guedes, E.; Stehling, D. y Wanderley, S. 2010. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *Braz Journal Infectious Diseases*, 14: 462-467.

Guerrero, C. y Cesteros, R. 2003. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Murcia, Spain. *Revista Española de Quimioterapia* 16: 444-449.

Guevara, A.; Waard, J. y Araque, M. 2009. blaVIM-2 gene detection in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in an intensive care unit in Ciudad Bolívar, Venezuela. *Revista Chilena Infectología*, 26: 336-341.

Hancock, R. y Speert, D. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistant Updat*, 4: 247-255.

Herrera, K.; Espinoza, M.; Mejía, Y.; Zambrano, L.; Silva, E.; Rojas, J.; Gadea, W.; Chavarría, S.; Hernández, M.; Ramírez, M.; Membreño, J.; Lara, M.; Sáenz, J.; Valle, S.; Torres, A. y Carera, E. 2007. Resistencia antimicrobiana en Hospitales nor-occidentales de Nicaragua. *Universitas*, 1: 27-32.

Hooper, D. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolona resistance. *Emergency Infectious Diseases*, 7: 337-341.

Hsueh, P.; Teng, L. y Yang, P. 1998. Resistance of a multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* clone in intensive care burn unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1347.

Husni, R. 1999. Risk factor for outbreak of multidrug resistance *Acinetobacter* nosocomial among intubated patients. *Chest*, 115: 1226-1228.

Hyunseok, P. y Weingel, M. 2003. Stability of Repetitive-Sequence PCR Patterns with Respect to Culture Age and Subculture Frequency. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2694-2696.

Iyobe, S.; Yamada, H. y Minami, S. 1996. Insertion of a carbapenemase gene cassette into a integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 38: 1114-1115.

Jacoby, G. y Archer G. 1991. New mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Journal Medical*, 324: 601-612.

Jalal, S. y Wretlind, B. 1998. Mechanisms of quinolones resistance in Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Drug Resistant*, 4: 257-61.

Janam, R.; Anil, K. y Gopal, N. 2011. Antibioqram and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human, animal, plant, water and soil suorces in north india. Department of Microbiology, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi, India. *Journal Microbiology*, 42: 1477.

Keith, K.; Engemann, J. y Fraimow, H. 2004. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Clinical Microbiology and Infection*, 4: 467-511.

Kersulyte, D.; Struelens, M.; Deplano, A. y Berg, D. 1995. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-fieldgel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Journal Clinical Microbioogy* 33:2216-9.

Keith, P. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 65: 1-13.

Kinsa, D. y Guillen, P. 1999. *Pseudomonas*. En: Manual of Clinical Microbiology. Murry, P. (ed). Washintong. Págs 517- 5205.

Kiska, D. 2003. *Pseudomonas*. En: Manual of Clinical Microbiology. Yolken, R. (ed). Págs 719-728.

Kluytmans, J. 1997. Surgical infeccion including burns .En: Prevention and control of Nosocomial Infections .Wenzel, R. (ed). Págs 841- 65.

Kogan, S.; Doherty, M. y Gitschier, J. 1987. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *Journal of Medical*, 317: 985-990.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 2004. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Médica Panamericana. Buenos Aires.

- Levesqué, C.; Pyche, L.; Larose, C. y Roy, PH. 1995. PCR Mapping of integrones reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 185-191.
- Liu, Y.; Regli, A. y Bosi. 1996. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial bacteraemia isolates by PCR-based DNA fingerprinting analysis. *Journal Medical Microbiology*, 45:359-65.
- Lim, K.; Rohani, Yeo, C.; Savithri, P.; Ganeswrie, B.; Nurahan, M.; Zubaidah, A.; Noraini, I.; Tana, A.; Mustafa, A. y Thong, K. 2009. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *Journal Microbiology Immuno Infections*, 42:197.
- Liste, P.; Wolter, D. y Hanson, D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology*, 22: 582–610.
- 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. Carbapenemases: a problem in waiting?. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 3: 489-495.
- Livermore, D.; Winstanley, T. y Shannon, K. 2001. Interpretative reading: Recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 87-102.
- López, S.; Tuhay, N.; Gauna, A. y Ramírez, H. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas (piperacilina/tazobactam). *Boletín Del Instituto de Medicina Regional*, 9: 89-93.
- MacFaddin, J. 2003. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana.
- 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.
- Martín, G.; Carmona, O. y Guzmán, M. 2003. Resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* en centros médicos de Venezuela durante el año 2000. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(2): 30-34.

- Maslow, J.; Mulligan, M. y Arbeit, R. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infectious Diseases*, 17: 153-164.
- Master, R.; Richard, B.; Clarka, J.; Karlowskyb, A.; Ramirez, J. y Bordond, M. 2011. Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38 :291– 295.
- Melanie, W.; Syrmis, N.; Mark, R.; O'Carroll, T.; Sloots, C.; Coulter, C.; Wainwright, S.; Bell, C. y Nissen, M. 2004. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and pediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 1089-1096.
- Michael, D. y Bean, P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1661-1669.
- Nagaveni, H.; Rajeshwari, A.; Kumar, S.; Patil, R. y Kelmani, C. 2011. Emergence of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from CSF Samples. *Indian Journal Microbiology*, 51: 2–7.
- Nakano, M.; Deguchi, T.; Kawamura, T.; Yasuda, M.; Kimura, M. y Okano, Y. 1997. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 2289–2291.
- Nicolau, C. y Olive, A. 2010. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28:19-28.
- Nordmann, P. y Poirel, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. 2002. *Clinical Microbiology and Infectious*, 65: 321-331.
- Okamoto, K.; Gotoh, N. y Nishino, T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: Imipenem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2001, 45: 1964-1971.
- Olive, D. y Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal Clinical Microbiology*, 37: 1661-1669.
- Pagniez, G.; Radice, M.; Cuirolo, A.; Rodríguez, O.; Rodríguez, H. y Vay, C. 2006. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina Microbiología*, 38: 33-7.
- Paterson, D. 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infections*, 2: 43–48.

- Page, R. 1996. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 4: 357-358.
- Phongpaichit, S.; Liamthong, S.; Mathew, A. y Chethanond, U. 2007. Prevalence of class I integron in commensal *Escherichia coli* from pigs and pig farmers in Thailand. *Journal Food Protection*, 70: 292-299.
- Pinna, A.; Usai, D.; Sechi, L.; Zanetti, S. y Kaliamurthy, J. 2008. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with post-operative endophthalmitis. *Acta Ophthalmologica*, 86: 1755-3768.
- Pirnay, J.; De Vos, D.; Mossialos, D.; Vanderkelen, A.; Cornelis, P. y Zizi, M. 2002. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environmental Microbiology*, 12: 872-882.
- Pollack, M. 2002. *Enfermedades infecciosas: Principios y prácticas*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Polloc, M. 2000. *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell, G. y Bennett, J. (eds). *Principles and practice of infectious diseases*, Philadelphia. Págs 2310-2335.
- Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal Clinical Microbiology*, 3: 255-264.
- Promega. 2002. *Quick Protocol Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Promega Corporation. Chicago, Illinois, USA.
- Quale, J.; Bratu, S.; Gupta, J. y Landman, D. 2006. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemother*, 50: 1633-1641.
- Queenan, A. y Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile betalactamases. *Clinical Microbiology*, 20: 440-58.
- Reboli, A.; Houston, E.; Monteforte, J.; Wood, A. y Hamill, R. 1994. Discrimination of Epidemic and Sporadic Isolates of *Acinetobacter baumannii* by Repetitive Element PCR-Mediated DNA Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 2636-2640.
- Restrepo, A.; Robledo, J.; Leiderman, E.; Restrepo, M. y Botero, D. 2003. *Enfermedades infecciosas*. Cuarta edición. Editorial Bedoya. Medellín.
- Rivas, J.; Redondo, C. y Alonso, G. 2006. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especializados*, 9: 3-7.

Rodríguez, G.; Bastidas, P.; Rivero, M.; Flores, L.; Villarroel, E. y Andrade, E. 2005. "Detección de cepas productoras de betalactamasas inducibles en el Hospital Universitario de Caracas". "Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Metropolitano. Caracas.

Rodríguez, C.; Rodríguez, A.; García, A.; Pastran B. y Meijomil, P. 2006. Antimicrobial and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical infections in a 7-year period at a general hospital in Venezuela. *Surg Infectious*, 7:269-73.

Sakyo, S.; Timita, H.; Tanimoto, K.; Fujimoto, S. y Ike, Y. 2006. Potency of carbapenemes for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antibiotic*, 59:220–8.

Sánchez, A.; Salso, E. y Picazo, J. 2004. Resistencia a carbapenemes por Metalo enzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Española Quimioterapia*, 17 (4): 336-340.

Singh, A.; Goering, R.; Simjee, S.; Foley, S, y Zervos, M. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Review*, 19: 512 - 30.

Slabbinek, B.; De Baets, B.; Dawyndt, P. y De vos, P.2010. Analisis de *Pseudomonas* fitopatogenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: Un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *pseudomonas*. *Revista Mexicana Fitopatología*, 28 (1): 1-16.

Schlüter, P. y Harris, S. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes*, 6: 569-572.

Soulica, E.; Neonakis, I.; Gicas, A. y Tselentis, Y. 2004. Spread of bla (VIM-1) – producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla (VIM-1) metallo-betalactamase gene. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 48: 167-172.

Stein, A. y Raoult, D. 2003. Colistin: An antimicrobial for the 21st century?. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 901-902.

Strateva, T. y Yordano, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal Medical Microbiology*, 58:1133–48.

Struelens, M.; Rost, F. y Deplano, A. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Journal Medical*, 95: 489–498.

- Speijer, H.; Savelkoul, P. y Bonten, M. 1999. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal Clinical Microbiology*, 37:3654-61.
- Syrmis, M.; Carrol, M.; Sloots, P.; Coulter, C.; Waingrigh, C. y Bell, S. 2004. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and pediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *Journal Medical Microbiology*, 53: 1089-96.
- Tanya, S. y Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1133–1148.
- Tenover, F.; Arbeit, R.; Goering, R.; Mickelsen, P.; Murray, B.; Persing, D. y Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal Clinical Microbiology*, 33: 2233–2239.
- Tobes, R. y Pareja, E. 2006. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *Clinical Microbiology Review*, 10: 7- 62.
- Trautmann, M.; Michalsky, T. y Wiedeck, H. 2001. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infections Control Hospital Epidemiology*, 22: 49–52.
- Triantafilo, V. 1997. E-test para determinar concentraciones inhibitorias mínimas, para estimar la adversidad bacteriana e identificar presuntivamente β -lactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* asociadas a infecciones intrahospitalarias. *Revista Médica Chile*, 125: 149-60.
- Van, B. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use PCR. *Clinical Microbiology Review*, 7: 174-8.
- Vicent, J.; Bihari, D. y Suter, P. 1995. The prevalence of nosocomial infection in the intensive care units in Europe. *JAMA*, 274: 639-644.
- Walsh, T.; Toleman, M.; Poirel, L. y Nordmann, P. 2005. Metallo- β -lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology*, 18: 306-25.
- Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M. y Mitsuhashi, S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 147–151.

Wolter, D.; Hanson, N. y Lister, P. 2004. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance *FEMS.Microbiology Letters*, 236: 137–143.

Wolska, K. y Szweda, P. 2008. A comparative Evaluation of PCR Ribotyping and ERIC-PCR for determining the Diversity of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Polish Journal of Microbiology*, 57: 157-163

Woods, D.; Shafer, M.; Rabin, H.; Campbell, G. y Sokol, P. 1986. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a variety of clinical sites. *Journal Clinical Microbiology*, 24: 260-264.

Yan, J.; Hsueh, P.; Lu, J. y Chang, F. 2006. Characterization of acquired b-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrones. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 530-6.

Zambrano, A. y Herrera, N. 2004. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta. *Revista Chilena de Infectología*, 2: 117-124.

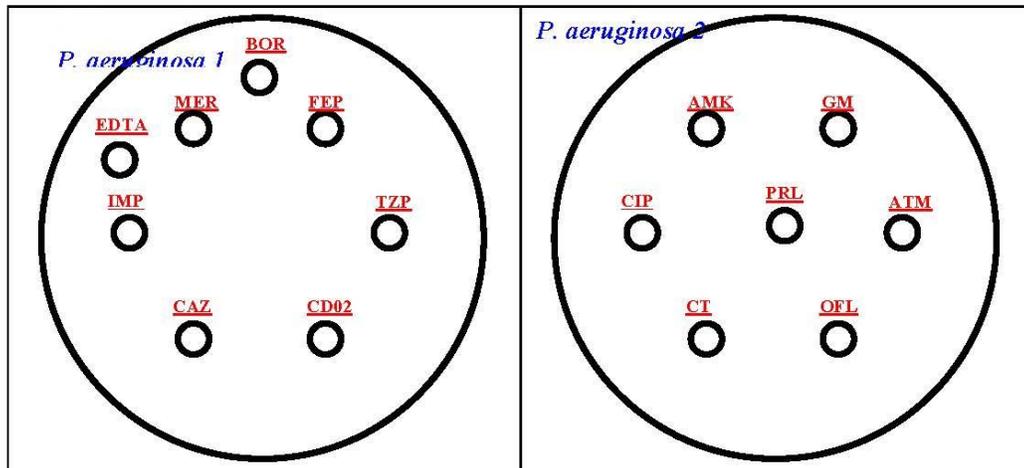
APENDICE



Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Ciudad Universitaria UCV, Los Chaguaramos,
Caracas - República Bolivariana de Venezuela Cod. 1041
Teléfono: (0058-0212) 219.1622
<http://www.inhrr.gob.ve>
RIF: G-20000101-1

Pseudomonas aeruginosa



Apéndice A. Plantillas para la realización de antibiogramas en *Pseudomonas aeruginosa*

HOJA DE METADATOS

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

Título	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> POR ERIC-PCR, PROVENIENTES DE MUESTRAS CLINICAS AISLADAS DEL HOSPITAL “SANTOS ANIBAL DOMINICCI”
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Madrid, Yenny	CVLC	14.910.817
	e-mail	yennymercedesmadrid@gmail.com
	e-mail	
	CVLC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Amplificación de elementos genéticos repetitivos por (ERIC-PCR)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias Biológicas	Biología molecular

Resumen (abstract):

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos intrahospitalario más importante, debido a que está presente principalmente en pacientes inmunodeprimidos. Los reportes de multi-drogoresistencia en esta especie representan un grave problema en centros hospitalarios, debido al difícil control en la transmisión de esta bacteria por presentar resistencia natural a diferentes antimicrobianos. En este sentido, los métodos empleados para subtipificar cepas de *P. aeruginosa* han mostrado gran potencial en estudios epidemiológicos. Por ello el objetivo de esta investigación fue caracterizar mediante antibiograma y técnica molecular ERIC-PCR cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas en el Hospital "Santos Aníbal Domínguez" de Carúpano, Estado Sucre. Se evaluaron 61 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el laboratorio bacteriológico de dicho hospital, las cuales fueron reidentificadas según esquema para bacilos Gram negativos no fermentadores. La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos del CLSI. El ADN genómico de las cepas se extrajo utilizando el Kit Wizard Genomic de Promega. La caracterización de los aislamientos y determinación de su variabilidad genética fue llevada a cabo a través de la amplificación de elementos genéticos repetitivos por (ERIC-PCR). El análisis de los patrones de la ERIC-PCR hecho por inspección visual, considerando la similitud de todas las bandas visibles de los aislados que mostraron la misma distancia de migración, sin considerar la intensidad de las mismas. Los resultados demostraron igual número de aislamientos de *P. aeruginosa* en los servicios de cirugía y unidad de cuidados intensivos UCI (16,39%), seguido de nefrología (14,75%) y pediatría (13,11%) a partir de secreciones de diferente índole (68,82%). El perfil de susceptibilidad evidenció mayor resistencia a la piperacilina (21,43%), ciprofloxacina (17,14%) aztreonam y gentamicina (ambos con frecuencia de 14,29%), además de imipenem (12,86%) y meropenem (11,43%), mostrando las cepas diferentes fenotipos y mecanismos de resistencia. Las cepas mostraron en general gran variabilidad genética por ERIC-PCR, sin embargo, en pediatría y cirugía se detectaron clones idénticos de *P. aeruginosa*, además de clones relacionados, estos últimos también fueron detectados en nefrología y UCI. Estos resultados indican la necesidad de aplicación de este tipo de estudio en hospitales para determinar fuentes de infección, reconocimiento de brotes y cepas particularmente virulentas, entre otros, con la finalidad de implementar medidas preventivas que contribuyan a disminuir la transmisión y propagación de infecciones bacterianas y su resistencia en centros asistenciales.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
De Donato, Marcos	ROL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	CVLAC	7259865
	e-mail	marcosdedonato@yahoo.com
	e-mail	
	ROL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	A <input type="text"/> S <input type="text"/> U <input type="text"/> U <input type="text"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	08	06
------	----	----

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis=madridy.doc	Aplication!worl

Alcance:

Espacial: NACIONAL (Opcional)

Temporal: TEMPORAL (Opcional)

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

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIADA

Área de Estudio: Biotecnología.

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA

RECIBIDO POR *[Firma]*

FECHA 05/08/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLAÑOS CUNTELO
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

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”.



Yenny Madrid

Autor



Marcos de Donato

Asesor