

Artículo original

Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas

Carlos Redondo^{a,b,*}, Guillermina Alonso^b

^a Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina

^b Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias
Universidad Central de Venezuela
Caracas - Venezuela

Recibido 25 de julio de 2007; aceptado 10 de septiembre de 2007

Resumen: Los plásmidos conjugativos y movilizables son las estructuras extracromosomales de mayor importancia epidemiológica, responsables de la propagación horizontal de múltiples genes de resistencia. En este trabajo, se evaluaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* para determinar la presencia de plásmidos conjugativos y su relación con la adquisición, estabilización y diseminación de múltiples genes de resistencia. Utilizando ensayos de conjugación, se demostró la presencia de plásmidos conjugativos en el 67% de las cepas analizadas. El análisis del tratamiento con enzimas de restricción demostró que existen cepas bacterianas aisladas en diferentes áreas del mismo hospital que portan plásmidos con idénticos patrones de restricción. Los perfiles de resistencia de las cepas transconjugantes revelaron que se transfirieron determinantes de resistencia contra todas las familias de antibióticos analizadas, evidenciándose la contribución de los plásmidos al fenotipo de múltiple resistencia. Nuestros resultados sugieren que las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana han podido adquirir el fenotipo de multirresistencia mediante la adquisición de plásmidos portadores de múltiples genes que codifican resistencia a diversos agentes antimicrobianos.

Palabras clave: plásmidos, multirresistencia, infecciones intrahospitalarias

Conjugated plasmids isolated from multi resistant strains obtained at four health centers in the Caracas metropolitan area

Abstract: Conjugative and movable plasmids are the extra chromosomal structures of greater epidemiological importance, responsible for the horizontal propagation of multiple resistance genes. In this study we evaluated *E. coli* and *K. pneumoniae* strains to determine the presence of conjugative plasmids and their relationship with the acquisition, stabilization and dissemination of multiple resistance genes. Using conjugation assays we demonstrated the presence of conjugative plasmids in 67% of the strains analyzed. The analysis of restriction enzyme treatments demonstrated that there were bacterial strains isolated from different hospital areas with identical restriction patterns. The resistance profiles of the transconjugating strains revealed that there was transfer of resistance determinants against all the antibiotic families analyzed, demonstrating the plasmid contribution to the multiple resistance phenotype. Our results suggest that the *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated from patients in four health centers of the metropolitan areas may have acquired the multi resistance phenotype through the acquisition of plasmids that bear multiple genes that codify resistance to various antimicrobial agents.

Key words: plasmids, multi resistance, intra hospital infections

* Correspondencia:
E-mail: cfrm1979@yahoo.es

Introducción

La conjugación es considerada como el mecanismo de transferencia de material genético más sofisticado y com-

plejo, y con un mayor espectro de acción sobre el flujo de genes entre las bacterias, siendo una de las principales causas de la evolución y diversidad genética que existe entre los microorganismos bacterianos [1,2].

Los plásmidos movilizados por conjugación pueden ser portadores de una amplia variedad de determinantes genéticos, no esenciales para el crecimiento celular, pero que favorecen la sobrevivencia de la célula hospedadora en un ambiente adverso, o le proporcionan una ventaja competitiva frente a otros microorganismos. De manera general, los determinantes genéticos codificados en los plásmidos se pueden clasificar en cuatro grupos como son: resistencia; energía y metabolismo; virulencia, patogenicidad y simbiosis; y diseminación y perpetuación [2].

Desde el punto de vista de Salud Pública, los determinantes genéticos de mayor importancia que pueden ser codificados por plásmidos son los que codifican para los factores de virulencia y los asociados a la resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos. Los plásmidos portadores de determinantes de resistencia, con capacidad conjugativa o de movilización, son las estructuras extracromosomales de mayor relevancia epidemiológica, por su capacidad de promover la diseminación horizontal de un gran número de genes de resistencia, contribuyendo al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y promoviendo la aparición de cepas patógenas multirresistentes [3].

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos es un problema de Salud Pública a nivel mundial. Tiene un impacto alto sobre las tasas de morbilidad y mortalidad, limita las opciones terapéuticas e incrementa los costos por concepto de terapia alternativa y estadía hospitalaria [4]. Este fenómeno adquiere mayores dimensiones en el ambiente hospitalario, debido a la presión selectiva ejercida por el uso de los antimicrobianos, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas residentes [3]. Con el fin de establecer medidas de prevención y controlar el surgimiento de la resistencia bacteriana, a nivel internacional se ha propuesto estudiar las causas que originan el surgimiento de las cepas resistentes, así como el modo de dispersión de los determinantes de resistencia en áreas particulares [5,6].

E. coli y *K. pneumoniae* son dos géneros bacterianos asociados frecuentemente a pacientes con infecciones, tanto las nosocomiales como las adquiridas en la comunidad. Según el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana, entre los años 1988-2004, las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* reflejaron un aumento en los porcentajes de resistencia frente a varias clases de antimicrobianos [7]. Sin embargo, en nuestro país es escaso el conocimiento sobre los mecanismos por medio de los cuales estas especies bacterianas están adquiriendo los determinantes de resistencia contra los principales agentes antimicrobianos utilizados en la terapéutica médica.

En este estudio se propuso evaluar, en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes aisladas de pacientes hospitalizados, la presencia y caracterización de plásmidos conjugativos o movilizables, como una de las vías de adquisición y diseminación de los determinantes de resistencia frente a varias clases de antimicrobianos, utilizados para el tratamiento de infecciones originadas por estos géneros bacterianos.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se seleccionaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes (resistentes a más de cuatro clases de antimicrobianos) aisladas de pacientes hospitalizados en el Centro Médico de Caracas, Hospital Vargas de Caracas, Policlínica Metropolitana y Hospital "Dr. Domingo Luciani", durante el período 01 de noviembre del año 2004 al 01 de mayo del año 2005. Como cepa control para las pruebas de susceptibilidad se utilizó *E. coli* ATCC-25922, y como receptora para los ensayos de conjugación se utilizó la *E. coli* J-62-2, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM N°-131).

Conjugación bacteriana

El ensayo de conjugación se realizó mediante la técnica sobre filtro, bajo las condiciones establecidas en nuestro laboratorio [3]. Brevemente, cultivos líquidos de las cepas donantes y receptora (crecimiento de 12 horas) fueron diluidos (10^{-2}) y crecidos hasta 60 UK las cepas donantes, y 80 UK la cepa receptora. Se mezclaron con una relación 1:4 (donante:receptora). La mezcla se colocó sobre un filtro de 0,22 μm (Millipore) sobre una placa de LB. Se incubó 12 horas a 37°C, y se sembraron diluciones hasta 10^{-3} en placas de LB suplementadas con los antibióticos de selección.

Pruebas de resistencia a los antimicrobianos

Para evaluar el perfil de resistencia contra los agentes antimicrobianos de las cepas donantes, y el adquirido por las cepas transconjugantes, se empleó el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos propuestos para enterobacterias por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en el año 2006 [8]. Los antimicrobianos ensayados fueron: ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), cefalotina (KF), meropenem (MEN), ampicacina (AMK), cloranfenicol (C), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), nitrofuratoína (F), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE).

Análisis de los plásmidos conjugativos

El DNA plasmídico fue extraído por el método modificado de lisis alcalina y almacenado a -20°C [9]. Para obtener el patrón de bandas, el DNA plasmídico fue digerido con la enzima *EcoRI*, siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Promega). El producto de la digestión enzimática se sometió a electroforesis en geles de agarosa en buffer TBE, visualizados con Bromuro de Etidio en un equipo Gel Doc 1.000 (Bio-Rad). El patrón de bandas fue analizado en el programa Multi-analyst (Bio-Rad).

Resultados

A los fines de evaluar la probable diseminación intra-hospitalaria e interhospitalaria de plásmidos conjugativos, portadores de los determinantes de resistencia, entre dos especies bacterianas asociadas frecuentemente a infecciones adquiridas en las comunidad y hospitalarias, como son *E. coli* y *K. pneumoniae* [10,11], en este estudio se seleccionaron cuatro centros de salud de Caracas, públicos y privados, dos de la zona este (Hospital "Dr. Domingo Luciani" y la Policlínica Metropolitana) y dos de la zona norte (Hospital Vargas de Caracas y el Centro Médico de Caracas).

Se recolectaron un total de 83 cepas multirresistentes, de las cuales 60 pertenecían a la especie *E. coli* y 23 a la especie *K. pneumoniae*, aisladas de pacientes hospitalizados en los cuatro centros de salud, durante un período de seis meses desde el 01 de noviembre de 2004 al 01 de mayo de 2005.

Sólo 60 cepas fueron utilizadas como células donantes para los experimentos de conjugación, las cuales fueron seleccionadas por la sensibilidad a rifampicina a una concentración de 100 µg.ml⁻¹. Se evaluó la conjugación en una sola condición de temperatura (37°C), formato del medio de conjugación (sólido), pH (pH 7) y tiempo de incubación (12 horas). En estas condiciones se han reportado altas frecuencias de transferencia [12,13].

Los resultados de los experimentos de conjugación evidenciaron la presencia de plásmidos conjugativos en 25 cepas de *E. coli* y en 15 cepas de *K. pneumoniae*, representando un 67% de todas las cepas estudiadas (Tabla 1). Las moléculas plasmídicas transferidas a las transconjugantes fueron aisladas. El 78% de las cepas transconjugantes que recibieron los plásmidos de las cepas de *E. coli* donantes, presentaron una sola molécula plasmídica, y el 22% restante presentó más de una molécula plasmídica, en un rango de 2 a 7 plásmidos por células, indicando la co-transferencia simultánea de más de una molécula plasmídica. El 56% de las cepas transconjugantes que recibieron plásmidos a partir de cepas de *K. pneumoniae* donantes, evidenciaron la presencia de una sola molécula plasmídica y el 44% presentaba más de una molécula plasmídica, en un rango de 2 a 6 plásmidos por células.

En todas las transconjugantes se observó la presencia de plásmidos de alto peso molecular, con un tamaño mayor a 40 kpb. Para caracterizar y evaluar la homología entre los plásmidos transferidos, se analizó el patrón de restricción del DNA plasmídico aislado a partir de cada una de las 40 cepas transconjugantes examinadas.

El análisis de los patrones de restricción del DNA plasmídico transferido, demostró que 16 de las cepas transconjugantes (40%) presentan patrones únicos, todos diferentes entre sí, identificados con la letra U. El 35% de las cepas transconjugantes presentó plásmidos con cinco patrones de restricción, identificados con las letras A, B, C, D y E (Tabla 1; Figura 1).

El patrón A corresponde a un plásmido conjugativo, presente en dos cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, aisladas en la Unidad de Terapia de Adulto y la Unidad de Hospitalización del Centro Médico de Caracas. El patrón B se origina de un plásmido conjugativo presente en tres cepas de *E. coli* aisladas en el Servicio de Hospitalización de la Policlínica Metropolitana. El patrón D corresponde a un plásmido conjugativo presente en tres cepas de *K. pneumoniae* aisladas en los Servicios de Traumatología y Hospitalización del Hospital "Dr. Domingo Luciani". El patrón E corresponde a un plásmido conjugativo presente en dos cepas de *K. pneumoniae* aisladas en la Unidad de Terapia de Adulto y en la Unidad de Terapia de Niños del Hospital "Dr. Domingo Luciani". El patrón C corresponde a un plásmido conjugativo presente en dos cepas de *K. pneumoniae* y en dos cepas de *E. coli* aisladas en las Unidades de Cuidados Intermedios, Hospitalización y Unidad de Terapia Adulto del Hospital "Dr. Domingo Luciani".

Con base a la suma de los pesos moleculares estimados para los fragmentos de restricción, se calculó el tamaño aproximado de los plásmidos conjugativos. En los cuatro Centros de Salud se observó la presencia de plásmidos de alto peso molecular (Tabla 1). Los plásmidos que generaron los patrones A, B, C, D y E, presentaron un tamaño aproximado de 108, 73, 81, 49 y 58, kbp, respectivamente.

Para evaluar el fenotipo de resistencia adquirido por las cepas transconjugantes y comparar el perfil de resistencia con el perfil de las cepas donantes, se realizaron pruebas de susceptibilidad a 13 agentes antimicrobianos, recomendados por el CLSI para el tratamiento de infecciones originadas por Enterobacterias [8]. Las transconjugantes, cuyos resultados se pudieran interpretar al menos como resistencia intermedia para un antimicrobiano, se consideraron positivas para la transferencia de los determinantes de resistencia.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad revelaron que todas las transconjugantes adquirieron determinantes de resistencia a, por lo menos, tres agentes antimicrobianos. Se obtuvieron transconjugantes con patrones complejos de resistencia, expresando simultáneamente hasta diez determinantes de resistencia (Tabla 1).

Los diferentes perfiles de resistencia de las transconjugantes revelaron la transferencia de genes cuyos productos ofrecen resistencia contra todos los agentes antimicrobianos probados. Todas las cepas transconjugantes, seleccionadas por ampicilina, presentaron en forma conjunta determinantes de resistencia a por los menos otros dos agentes antimicrobianos estudiados. Los resultados demuestran que los porcentajes mayores de resistencia adquiridos, fueron contra cefalotina (100%), aztreonam (40%), cloranfenicol (43%), tetraciclina (38%) y trimetoprim/sulfametoxazol (35%). Cabe destacar que solo un 5% de las cepas transconjugantes adquirieron resistencia contra ciprofloxacino (Figura 2).

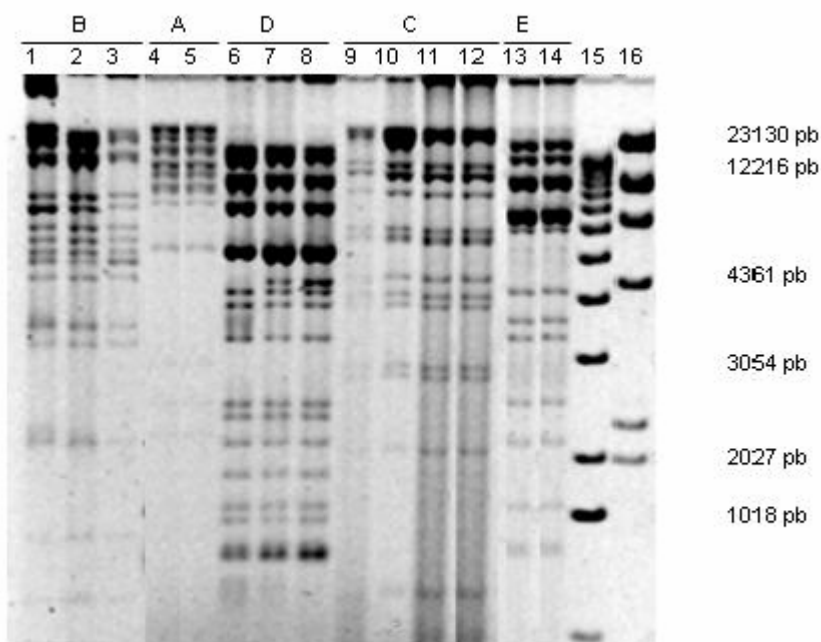


Figura 1. Patrón de digestión de DNA plásmidico obtenido de las cepas transconjugantes. Las letras mayúsculas designan los patrones de restricción obtenidos. Carriles; 1: 60T; 2: 62T; 3: 67T; 4: 39T; 5: 45T; 6: 164T; 7: 165T; 8: 155T; 9: 159T; 10: 178T; 11: 197T; 12: 163T; 13: 168T; 14: 173T; 15/16: Marcador de peso molecular.

Al comparar los niveles de resistencia entre las cepas clínicas y las transconjugantes obtenidas, se observan valores altos en los porcentajes de resistencia para ampicilina (100% vs 100%), cefalotina (100% vs 100%), cloranfenicol (48% vs 43%), amicacina (25% vs 20%). Para aztreonam, trimetoprim/sulfametoxazol y tetraciclina se observó una diferencia mayor en los valores de resistencia, sin embargo más del 50% de los determinantes de resistencia a estos antimicrobianos pareciera tener un origen plasmídico (Figura 2).

Discusión

Desde la introducción de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, a nivel mundial se ha observado un aumento continuo de los porcentajes de organismos patógenos resistentes a los antimicrobianos [4]. El incremento de la resistencia bacteriana ha sido atribuido a la combinación de varios factores, como son las características propias de los microorganismos, la presión selectiva ejercida por el uso de los antimicrobianos, y ciertos cambios sociales y técnicos que contribuyen con la transmisión de los organismos resistentes, tales como el incremento en el uso de dispositivos y los procedimientos invasivos, el incremento en el número de hospederos susceptibles y las inconstantes políticas de control de las infecciones [14]. En los últimos años, este problema de salud pública se ha acentuado debido al surgimiento de cepas bacterianas multiresistentes, restringiéndose seriamente las diferentes opciones terapéuticas [4,15].

Tradicionalmente, la vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana se ha fundamentado en los métodos

fenotípicos, como las pruebas de susceptibilidad. Sin embargo, utilizando estos métodos no se pueden detectar los mecanismos y los eventos genéticos implicados en la adquisición y/o diseminación de los determinantes de resistencia contra los antimicrobianos [5].

La adquisición y estabilización de múltiples genes de resistencia, puede ser producto de diversos eventos genéticos, tales como, acumulación de mutaciones, la adquisición de plásmidos, de transposones y/o integrones, portadores de múltiples genes de resistencia, o por la adquisición de un gen (casete génico) cuyo producto confiere resistencia a varias clases de antimicrobianos, relacionados o no químicamente [16]. De estos mecanismos, la adquisición de plásmidos es el más frecuente.

La tipificación plasmídica, junto a los experimentos de conjugación y las pruebas fenotípicas de susceptibilidad antimicrobiana, han sido utilizadas a nivel nacional en algunos estudios epidemiológicos con el fin de evaluar la presencia de plásmidos transferibles, portadores de determinantes de resistencia [3,17,18,19]. La presencia de múltiples determinantes de resistencia en plásmidos movilizables, implica una alta probabilidad del surgimiento y selección de cepas multiresistentes a los antimicrobianos en un área determinada, reduciendo así las opciones terapéuticas locales [20].

En esta investigación, el análisis de 60 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* multiresistentes aisladas de pacientes hospitalizados en varios servicios de diferentes centros de salud, evidenció que el 67% de los aislados poseían plásmidos de alto peso molecular, conjugativos o movilizables en las condiciones ensayadas, capaces de transferir desde 3 hasta 10 determinantes de resistencia contra diferentes

clases de antimicrobianos. Estos resultados ponen de manifiesto la alta capacidad de transferencia horizontal, con la concomitante diseminación de múltiples genes de resistencia entre las cepas clínicas provenientes de los cuatro cen-

tros de salud de la ciudad de Caracas, en correlación con otros reportes nacionales realizados con gérmenes Gram negativos [3,21,22,23].

Tabla 1. Cepas transconjugantes portadoras de plásmidos bacterianos presentes en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* procedentes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas.

Centro de Salud	Género donante	Unidad de procedencia	Denominación cepa transconjugante	*Patrón de restricción	Tamaño aproximado (pb)	Determinantes de resistencia adquirida por transconjugantes
Centro Médico de Caracas	<i>E. coli</i>	HP	17T	N.D	N.D	AMP, CTX, KF
	<i>K. pneumoniae</i>	UTA	39T	A	108.00	AMP, KF, SXT
	<i>E. coli</i>	HP	45T	A	108.000	AMP, KF, SXT, TE
	<i>E. coli</i>	UTA	46T	U	73.000	AMP, ATM, KF, SXT
Hospital Vargas de Caracas	<i>E. coli</i>	MI	105T	U	104.000	AMP, KF, C, SXT
	<i>E. coli</i>	MI	106T	U	65.000	AMP, ATM, CTX, FEP, KF, SXT
	<i>K. pneumoniae</i>	MI	107T	N.D	N.D	AMP, ATM, KF, TE
	<i>K. pneumoniae</i>	MI	109T	U	51.000	AMP, KF, TE
	<i>E. coli</i>	CIR	115T	U	62.000	AMP, ATM, KF,
	<i>E. coli</i>	CIR	117T	U	73.000	AMP, KF, AMK, C, SXT
Hospital "Dr. Domingo Luciani"	<i>E. coli</i>	HP	155T	D	49.000	AMP, CAZ, KF, C
	<i>K. pneumoniae</i>	HP	156T	N.D	N .D	AMP, KF, C
	<i>K. pneumoniae</i>	HP	158T	N.D	N.D	AMP, KF, C
	<i>E. coli</i>	UCIN	159T	C	81.000	AMP, KF, C, TE
	<i>E. coli</i>	UTA	163T	C	81.000	AMP, ATM, CAZ, KF, C, SXT, TE
	<i>K. pneumoniae</i>	TRA	164T	D	49.000	AMP, ATM, CAZ, KF, AMK, C
	<i>K. pneumoniae</i>	TRA	165T	D	49.000	AMP, ATM, CAZ, KF, AMK, C,
	<i>K. pneumoniae</i>	OBS	167T	N.D	N.D	AMP, KF, ATM
	<i>K. pneumoniae</i>	UTIP	168T	E	58.000	AMP, ATM, CAZ, CTX, KF, AMK
	<i>K. pneumoniae</i>	UTA	173T	E	58.000	AMP, KF, AMK, C
	<i>K. pneumoniae</i>	UCIN	175T	N.D	N.D	AMP, KF, AMK, C, SXT
	<i>K. pneumoniae</i>	HP	178T	C	81.000	AMP, CTX, KF, C, TE
	<i>K. pneumoniae</i>	UCIN	182T	U	90.000	AMP, ATM, CAZ, KF, AMK, SXT, TE
	<i>E. coli</i>	EA	184T	N.D	N.D	AMP, ATM, CAZ, CTX, KF, C, SXT, F, CIP, TE
	Policlínica Metropolitana	<i>E. coli</i>	HP	194T	U	45.000
<i>E. coli</i>		EA	195T	U	102.000	AMP, ATM, CAZ, CTX, FEP, KF, AMK, C, SXT
<i>K. pneumoniae</i>		HP	196T	U	40.000	AMP, KF, TE
<i>K. pneumoniae</i>		HP	197T	C	81.000	AMP, KF, C, TE
<i>E. coli</i>		HP	54T	U	72.000	AMP, KF, C
<i>E. coli</i>		UTI	55T	N.D	N.D	AMP, ATM, CTX, FEP, KF
<i>E. coli</i>		UTI	57T	U	63.000	AMP, ATM, CTX, KF, TE
<i>E. coli</i>		UTA	58T	U	53.000	AMP, KF, TE
<i>E. coli</i>		HP	60T	B	73.000	AMP, CTX, FEP, KF, CIP
<i>E. coli</i>		HP	61T	U	84.000	AMP, ATM, CTX, KF, SXT, TE
	<i>E. coli</i>	HP	62T	B	73.000	AMP, KF, TE
	<i>E. coli</i>	HP	64T	N.D	N.D	AMP, KF, TE
	<i>E. coli</i>	HP	65T	U	75.000	AMP, ATM, CTX, KF, TE
	<i>K. pneumoniae</i>	HP	66T	N.D	N.D	AMP, ATM, CAZ, KF, C, TE
	<i>E. coli</i>	HP	67T	B	73.000	AMP, KF, C, TE

N.D. no determinado.

*Las letras A, B, C, D y E identifican el tipo de patrón de restricción obtenido. La letra U identifica un patrón único de restricción

UTA: unidad de terapia de adulto, HP: hospitalización, TRA: traumatología, UTIP: unidad de terapia intensiva pediátrica, UCIN: unidad de cuidados intermedios, MI: medicina interna, EA: emergencia adulto, UTI: unidad terapia intensiva

AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, FEP: cefepime, KF: cefalotina, MEM:meropenen, AMK:amicacina, C:cloranfenicol, SXT: trimetoprima/sulfametoxazole, F: nitrofurantoina, CIP: ciprofloxacino, TE: tetraciclina

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad evidenciaron que se transfirieron determinantes de resistencia contra todos los antimicrobianos probados, en particular contra los β -lactámicos, antimicrobianos de primera línea en los tratamientos terapéuticos. En los bacilos Gram ne-

gativos, el principal mecanismo reportado de resistencia contra los β -lactámicos es la inactivación enzimática del antimicrobiano por las β -lactamasas, las cuales se encuentran frecuentemente codificadas en plásmidos [24]. Los porcentajes de resistencia obtenidos de las transconjugan-

tes frente a aztreonam (40%), ceftazidima (17,5%) y cefotaxima (27,5%) sugieren la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas capaces de hidrolizar eficientemente las cefalosporinas de tercera generación y los monobactámicos. Los valores de porcentajes de resistencia obtenidos para amicacina (20%), cloranfenicol

(42,5%), tetraciclina (42,5%) y trimetoprim/sulfametoxazol obtenidos en las cepas transconjugantes, sugieren que los diferentes genes de resistencia deben estar asociados con la presencia de plásmidos portadores simultáneamente de los genes BLEE. Esto ha sido previamente reportado en otros centros de salud [25,26].

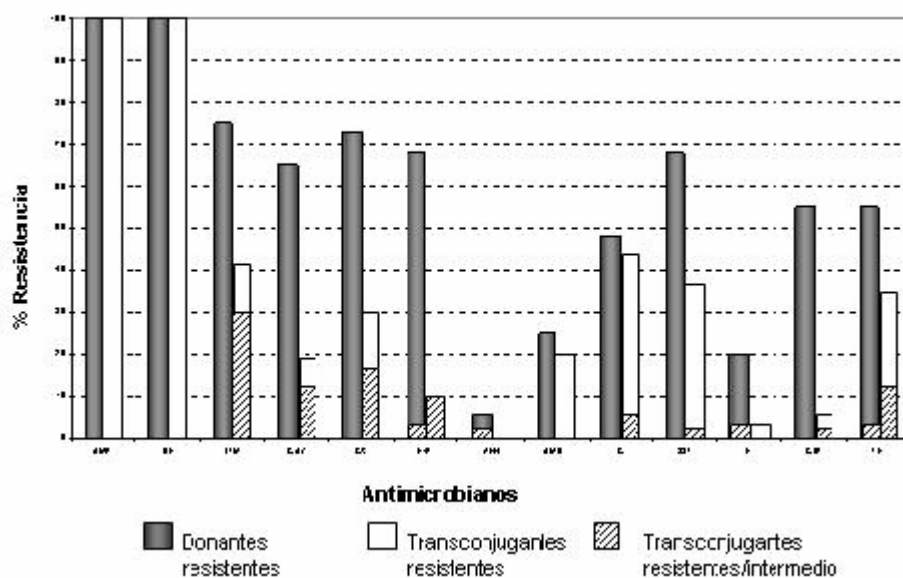


Figura 2: Porcentajes de perfiles de resistencia entre las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* donantes y las transconjugantes obtenidas en este trabajo. AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, KF: cefalotina, MEM: meropenem, AMK: amicacina, C: cloranfenicol, SXT: trimetoprima/sulfametoxazol, F: nitrofuratoína, CIP: ciprofloxacino, TE: tetraciclina.

Un 5% (2 cepas) de las cepas transconjugantes adquirieron determinantes de resistencia contra ciprofloxacino. En las bacterias Gram negativas la resistencia a quinolonas se produce predominantemente por mutaciones en genes cromosómicos. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado la presencia del gen *qnr*, de ubicación plasmídica, cuyo producto proteico es capaz de conferir resistencia frente a las quinolonas. La presencia de este gen plasmídico podría indicar la emergencia y diseminación de este nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas entre las cepas clínicas [27]. Análisis posteriores nos permitirán determinar la presencia de este gen en los plásmidos presentes en las muestras analizadas.

El análisis comparativo de los valores de los porcentajes de resistencia entre las cepas clínicas y las transconjugantes demostró la naturaleza plasmídica de los determinantes de resistencia frente a los antimicrobianos ensayados, como ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, amicacina, aztreonam, trimetoprim/sulfametoxazol y tetraciclina. Estos resultados evidencian que las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* causantes de infecciones nosocomiales, mediante la transferencia de plásmidos conjugativos, pueden adquirir determinantes genéticos que confieren resistencia a varios de los antimicrobianos empleados en el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por estos microorganismos.

Algunas de las transconjugantes que presentan el mismo perfil plasmídico no presentan el mismo perfil de resistencia. Tal es el caso de los plásmidos presentes en las cepas 159T y 197T (patrón C), con respecto a las cepas 163T y 178T (Tabla 1). Estas diferencias pueden deberse a la adquisición de material genético móvil, como transposones e integrones, portadores de determinantes de resistencia, que alteran el patrón de restricción del plásmido, pero no lo suficiente para ser detectado en nuestros ensayos [28,29].

Nuestros resultados mostraron variabilidad en el patrón de restricción de los plásmidos conjugativos multiresistentes presentes en las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*. En las muestras aisladas de pacientes hospitalizados en el Centro Médico de Caracas, en el Hospital "Dr. Domingo Luciani" y en la Policlínica Metropolitana, se encontraron, intrahospitalariamente, plásmidos con igual patrón de restricción, aun cuando provenían de pacientes de diferentes servicios en el mismo centro de salud respectivo. Esto puede ser producto de la transferencia intrahospitalaria de plásmidos entre las diferentes cepas y/o por la presencia de clones bacteriana que portan el mismo plásmido. En las cepas aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital "Dr. Domingo Luciani" se detectó la presencia de un plásmido de 81 kpb, en los dos géneros bacterianos (cepas

159, 163, 178 y 197), provenientes de diferentes servicios del centro de salud.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados en diversos centros de salud del área metropolitana de Caracas, pueden adquirir multirresistencia frente a varias clases de antimicrobianos, mediante la adquisición de plásmidos conjugativos o movilizables portadores de múltiples genes de resistencia. Estos resultados deben representar una voz de alarma al personal del sector salud, ya que demuestran la capacidad de transferencia de los plásmidos entre géneros bacterianos, con la consecuente diseminación de los determinantes de resistencia en diferentes áreas del hospital. Además, nuestros resultados pueden sugerir la transmisión de las cepas bacterianas por contacto persona-persona, y la posterior selección de las cepas resistentes por la presión selectiva ejercida por el uso de los antimicrobianos [3]. El análisis de estos resultados permite un mejor entendimiento de la diseminación de los determinantes de resistencia inter e intrahospitalario. La difusión de este estudio orientará sobre el uso racional de los antimicrobianos y sobre el diseño e implementación de las medidas de prevención adecuadas que permitan controlar el surgimiento de cepas multirresistentes.

Agradecimientos

A los Licenciados, Alberto Calvo y Nicolás Rodríguez (Policlínica Metropolitana), Adela Rizzi (Centro Médico de Caracas), José Luis Rodríguez (Hospital Vargas de Caracas), Ninoska Montilla (Hospital Dr. Domingo Luciani); Dr. Manuel Guzmán (Centro Médico de Caracas), y Mg. Sc. Jomar Rivas, por el apoyo brindado para la realización de este estudio. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) a GA (03-33-5417-2004 y 03-33-5416-2004).

Referencias

1. Amábile-Cuevas CF, Chicurel ME. Bacterial plasmids and genes flux. *Cell* 1992; 70: 189-199.
2. Kado CI. Origen and evolution of plasmid. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998; 73:117-126.
3. Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25:29-34.
4. Levy SB. Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(1): 1446-1450.
5. Pfäller MA, Acar J, Jones N, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis* 2001; 32: S156-167.
6. Blanc D. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol* 2004; 4:193-197.
7. Valenzuela P, Santos JR, Guzmán M, Comegna M (2005). Evolución de la susceptibilidad a los antimicrobianos de bacilos Gram negativos en Venezuela: Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana 1988-2004. VI-TAE Academia Biomédica Digital, N°22. Disponible por

<http://caibco.ucv.ve/caibco/caibco/vitae/VitaeVeintidos/Congreso/ArchivosPDF/codigo125.pdf>. Acceso 12 de Diciembre 2006.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth Informational Supplement, January. 2006; 26 (3).
9. Sambrook I, Russell D. Molecular cloning a laboratory manual. 3^a ed. New York; Cold Spring Harbor; 2001.
10. Koneman EW, Allen S, Schreckenber P, Winn W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5^{ta} ed. Philadelphia; Lippincott; 1999.
11. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:589-603.
12. Gauthier MJ, Cauvin F, Breittmayer JP. Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from a marine pseudomonad to *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 50: 38-40.
13. Fernández-Astorga A, Muela A, Cisterna R, Iriberrí J, Barcina I. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 1992;58: 392-398.
14. Jones RN, Pfäller MA. Bacterial resistance; a worldwide problem. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31: 379-88.
15. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004;10: S122-129.
16. Mazel D, Davies J. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56:742-754.
17. Araque M, Nieves B, Ruiz O, Dagert M. Characterization of plasmids which mediate resistance to multiple antibiotics in gram-negative bacteria of nosocomial origin. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15: 299-305.
18. Alonso G, Narváez P, Toba F, Gomes C, Pedroza R, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *MIBE* 2001; 3: 93-96.
19. Alonso G, Malaver E, Guzmán M, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multiresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. *MIBE* 2005; 4: 81-84.
20. Zaidi N, Konstantinos K, Zervos M. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1098-1105.
21. Pedroza R, Torres L, Narváez P, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram negativos de origen hospitalario. *MIBE* 2001; 3:97-100.
22. Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benítez M, Domínguez M, Pedroza R. β -Lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev Soc Ven Microb* 2006; 26:80-88.
23. Guzmán M. Caracterización de los determinantes que codifican β -lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*; (Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias mención Biología Celular. Instituto de Biología Celular. Universidad Central de Venezuela; 2006.
24. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.

25. Araque M, Rivera I. Simultaneous presence of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Am J Med Sci 2004; 327: 118-122.
26. Machado E, Canton R, Baquero F, Galan JC, Rollan A, Peixe L, Coque T. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:1823-1829.
27. Rodríguez-Martínez JM. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 25-31.
28. Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, Goesmann A, Puhler A, Schuler A. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. Microbiology 2004; 150:3613-3630.
29. Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisio AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A. Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. Antimicrob Agents and Chemother 1998; 42: 3053-3058.