



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

TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTES A β – LACTÁMICOS
(Modalidad: Investigación)

KAROL VIRGINIA BOTTARO ORDOSGOITTI

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

CUMANÁ, 2009

TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTES A β – LACTÁMICOS

APROBADO POR:

Profa. Elsa Zuleima Salazar de V.
Asesora

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Cepas bacterianas.....	8
Clínicas.....	8
Receptora	8
Reactivación de las cepas.....	8
Susceptibilidad Antimicrobiana.....	10
Determinación de las concentraciones de ceftazidima y rifampicina a emplear en la conjugación.	11
Conjugación	12
Cálculo de la frecuencia de transferencia.....	12
Verificación de los determinantes transferidos.....	13
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA	28
HOJA DE METADATOS	36

DEDICATORIA

A:

Ti papá por ser mi ejemplo a seguir, fuente de inspiración y admiración, tus consejos son luces que iluminan mi vida; mis alegrías y tristezas son también las tuyas, infinitas gracias por guiarme por este maravilloso camino, por ti soy lo que soy, simplemente gracias por ser mi padre, todo este éxito es para ti. TE ADORO.

AGRADECIMIENTO

A:

Dios todopoderoso, por guiarme y protegerme en cada momento, por llenarme de paciencia y sabiduría para perseverar en todas mis metas.

Mi madre, por darme la vida y su apoyo incondicional.

Mi hermana Cristina, por ser mi motivo de alegría, eres el mejor regalo que me ha dado la vida, espero ser yo tu ejemplo a seguir.

Mi asesora la Dra. Elsa Salazar, por brindarme su apoyo, dedicación y confianza, más que una profesora se convirtió en una amiga. Usted es digna de admiración, que Dios la bendiga.

Mis compañeras de trabajo Sophia Vargas y Suyin Silva, por su excelente desempeño día tras día, forman un excelente equipo de trabajo, mil gracias por su ayuda.

Mis tíos, por siempre estar conmigo y apoyarme en toda mi etapa universitaria.

Mis primos, en especial a Claudia y Patricia, por ser mi ejemplo a seguir, sus palabras fueron muy valiosas en los momentos más difíciles.

Mi novio, Jesús Rodríguez, que con su inmenso amor me ha enseñado a superar todos los obstáculos que me he encontrado en el camino, sin tu apoyo no hubiese podido lograrlo.

Mis amigas: Carmen, Rita, Anto, Marielys, Saray, Dairene y Candy, más que mis amigas mis hermanas, todos estos años compartiendo momentos de alegrías y tristezas, fueron los mejores de mi vida, sin ustedes no hubiese sido lo mismo, nunca las voy a olvidar.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto de investigación individual aprobado por el consejo de investigación de la Universidad de Oriente (N° CI-2-0404-1366/07).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> aisladas de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos y de la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes durante, enero 1998 y abril 1999.....	9
Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para ceftazidima y fenotipos de interés para la conjugación de las 20 cepas donantes de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas de los pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, Mérida – estado Mérida (enero 1998 – abril 1999) y cepa receptora.....	15
Tabla 3. Fenotipo de la cepa donante (<i>A. baumannii</i> PIN 390-2), receptora (<i>E.coli</i> K12 J53-2) y transconjugante (T390-2).....	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conjugación entre bacterias (Tomado de Orman, 2007).....	4
Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los β -lactámicos ensayados, en 20 cepas clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> , aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Método de Kirby y Bauer.14	
Figura 3. Crecimiento de la cepa transconjugante (A,B,C). Donante <i>Acinetobacter baumannii</i> PIN 390-2 (B). Receptora <i>Escherichia coli</i> K12 J53-2 (C) en las diferentes placas de agar MacConkey (AMC) suplementadas con los antimicrobianos utilizados en la conjugación. 1: AMC+CAZ (10 ug ml ⁻¹)+RIF (100 ug ml ⁻¹), 2: AMC+CAZ (10 ug ml ⁻¹), 3: AMC+RIF(100 ug ml ⁻¹), T: transconjugante.	16
Figura 4. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa donante <i>A. baumannii</i> PIN 390-2, cepa Receptora <i>E. coli</i> K12 J53-2 y cepa transconjugante frente a los diferentes antimicrobianos ensayados, AN: amikacina, FOX: cefoxitin, CIP: ciprofloxacina, CRO: ceftriaxone, AM: ampicilina, SXT: trimetropim/sulfametoxazol, C: cloranfenicol, PIP: piperacilina, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina ácido clavulánico, CTX: cefotaxima, IMP: imipenen.	17

RESUMEN

La producción de β -lactamasas puede estar codificada en genes cromosómicos y extracromosómicos, siendo en estos últimos mayormente encontradas. La transferencia de dichos genes, mediante conjugación, a partir de cepas de *Acinetobacter* ha sido escasamente descrita; por ello, con el propósito de demostrar la transferencia de genes de resistencia a β -lactámicos, a partir de cepas de *A. baumannii*, se estudiaron 20 cepas clínicas, identificadas bioquímicamente y molecularmente a partir de muestras procedentes de pacientes reclusos en la unidad de cuidados intensivos y en la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Se reactivaron las cepas preservadas en agar conservación y se le determinó la susceptibilidad antimicrobiana ante 14 β -lactámicos mediante la prueba de difusión en agar. Se confirmó la resistencia de las cepas frente a la ceftazidima, el cual fue el antibiótico de elección para la conjugación a través de placas suplementadas con dicho antimicrobiano. La transferencia del material genético fue evaluada mediante conjugación bacteriana y se aplicó en aquellas cepas resistentes a la ceftazidima y sensible a la rifampicina, utilizándose como cepa receptora *E. coli* K12 J53-2. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a ampicilina, piperacilina y cefoxitin, el 95% fue resistente a cefotetan y cefuroxime y el 85% de las cepas presentó resistencia a la ceftazidima. La frecuencia de conjugación fue alta mostrando un valor de $2,1 \times 10^{-3}$ transconjugante/célula donante. Se obtuvo una cepa transconjugante productora de BLEE y, también, se observó transferencia de resistencia a cloranfenicol.

Palabra y/o Frases Claves: *Acinetobacter baumannii*, Conjugación, *Escherichia coli* K12 J53-2, Transconjugantes

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter es un cocobacilo gramnegativo no fermentador de la glucosa (BGNNF), aerobio estricto, inmóvil, catalasa positivo y oxidasa negativo. La especie más importante, desde el punto de vista clínico, es *Acinetobacter baumannii*, la cual presenta, frecuentemente, resistencia combinada a los β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (Rossau *et al.*, 1991; Bergogne-Bèrèzin y Towner, 1996; Garrity *et al.*, 2002; Carr *et al.*, 2003; Nemeč *et al.*, 2003).

A. baumannii suele ser una bacteria endémica en los hospitales, dada su capacidad para permanecer en el medio ambiente inanimado por largos periodos de tiempo y colonizar pacientes y personal de la salud, además de su habilidad para desarrollar resistencia antibiótica, principalmente, por la adquisición de material genético a través de elementos móviles como plásmidos, transposones o integrones (Seirfert, *et al.*, 1994). Numerosos reportes en la literatura médica científica han documentado altas tasas de resistencia antibiótica en *Acinetobacter* sp. (Silva *et al.*, 2003; Briceño y Suárez, 2006; García *et al.*, 2006; Pinzón *et al.*, 2006; Patwardhan *et al.*, 2008)

Aunque, generalmente, está asociado con la colonización de pacientes hospitalizados, éste es responsable del 10% de la infección nosocomial en pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI), debido a que estos pacientes tienen mayor riesgo de infección, en consideración a su necesidad de procedimientos invasivos (sondas gástrica, intubación, catéteres, sondas vesical), contribuyendo a la aparición de una variedad de infecciones, entre las cuales se encuentran bacteremia, neumonía, infección del tracto urinario, meningitis secundaria, quemaduras e infecciones de heridas. Dichas infecciones son difíciles de tratar debido a la resistencia de esta bacteria a la mayoría de los agentes antimicrobianos, lo cual afecta la selección de los

mismos para el tratamiento adecuado de los pacientes (Shi-Yuan *et al.*, 1996; Seifert *et al.*, 1997; Poirel *et al.*, 1999; Fernández, 2000; Bergogne-Bèrèzin, 2001; Levin *et al.*, 2003).

El incremento de la resistencia bacteriana ha sido atribuido a la combinación de varios factores, entre ellos, 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 (Jones y Pfaller, 1998).

Los β -lactámicos, por ser altamente eficaces, tener baja toxicidad y fácil manejo, son los antimicrobianos de primera línea empleados en el tratamiento de las infecciones nosocomiales, causadas con mayor frecuencia por organismos gramnegativos; sin embargo, la efectividad de los mismos ha sido bloqueada por mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias, lo cual ha conllevado a la aparición de cepas resistentes a dichos antibióticos (Thonsom *et al.*, 1996; Livermore, 1997).

Los mecanismos de resistencia ante los β -lactámicos descritos en *Acinetobacter* sp. incluyen: alteración de la proteína de unión a la penicilina, reducción de la permeabilidad de la membrana externa, sistemas de bombeo de agentes antimicrobianos y producción de β -lactamasas; estas últimas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, destruyendo de esta forma la parte activa del antimicrobiano, dando lugar a un compuesto sin actividad antibacteriana. La producción de β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más estudiado en éste microorganismo y el de mayor importancia (Jackson *et al.*, 1998; Fernández, 2000; López y López-Brea, 2000; Martínez, 2001; Suárez, *et al.*, 2006; Pino, *et al.*, 2007).

La resistencia bacteriana, conjuntamente con las infecciones nosocomiales, representan un importante problema de salud pública, que trae como consecuencia un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados (Bush *et al.*, 2000). El origen de la resistencia se puede dar por la expresión de genes cromosómicos, los cuales son, naturalmente, intrínsecos de la bacteria y/o genes extracromosómicos que son adquiridos, generalmente, a través de intercambio genético con otras bacterias (Keith *et al.*, 2000).

La amplia distribución de la resistencia a múltiples agentes antimicrobianos en una población determinada, se debe, en gran parte, a la diseminación de los determinantes de resistencia mediada por plásmidos transmisibles y/o transposones (Hall y Stokes, 1993). Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos de ADN de doble cadena, circulares que se replican de forma independiente del cromosoma de la célula hospedadora y presentan un tamaño que oscila entre menos de 10 a más de 400 masa molar (Mr) (Alonso *et al.*, 2001).

En general, se asume que los plásmidos codifican funciones consideradas como no esenciales para la actividad fisiológica normal de las bacterias. Sin embargo, estos elementos portan genes para una enorme variedad de funciones que les confiere a los organismos hospedadores ventajas competitivas frente a otros en el proceso de colonización de nuevos ambientes (Kado, 1998; Alonso *et al.*, 2002).

El proceso que, esencialmente, permite la transferencia horizontal en la naturaleza es la conjugación, el cual se define como la transferencia de plásmidos desde una bacteria a otra, mediante el contacto directo entre células, dicho fenómeno está determinado por proteínas codificadas en las moléculas plasmídicas (Ayres *et al.*, 1995).

Este mecanismo requiere de una bacteria donante, la cual debe poseer un

plásmido conjugativo, y una bacteria receptora que carece de él. Los genes que regulan la transferencia están situados en una región del plásmido llamada *tra*. Algunos genes de la región *tra* están relacionados con las síntesis del *pilus*. Los *pilis* permiten el apareamiento específico entre ambas bacterias, dando lugar al puente de conjugación a través del cual pasa el ADN de una bacteria a otra (Orman, 2007) (Figura 1).

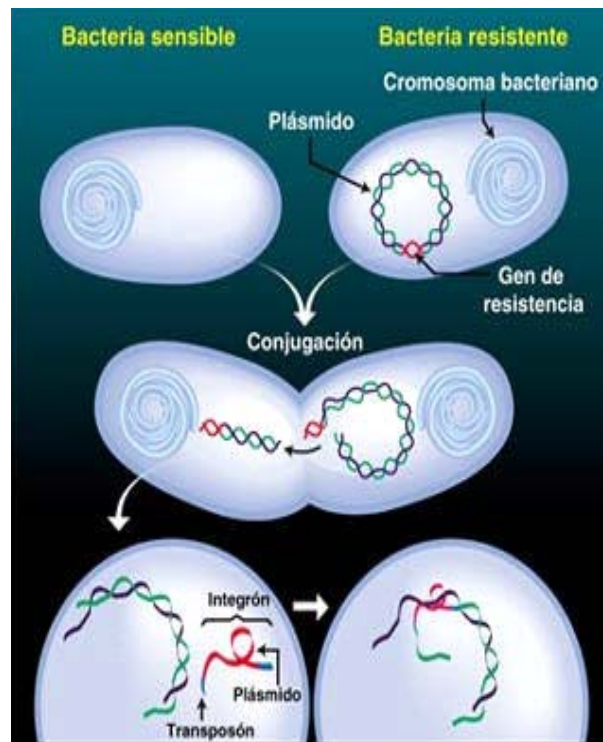


Figura 1. Conjugación entre bacterias (Tomado de Orman, 2007)

Este proceso es considerado como el mecanismo de transferencia de material genético más sofisticado y complejo, 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 (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992).

Los plásmidos que portan genes de resistencia tienen la potencialidad de diseminarse mediante el proceso de conjugación bacteriana a cepas relacionadas o no, confiriéndole, de esta manera, un perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana múltiple a otros microorganismos (Gniadkouski, 2001).

El conocimiento de los diferentes mecanismos de transferencia horizontal permite deducir que los plásmidos son los elementos que mayoritariamente contribuyen al proceso de evolución bacteriana. Ejemplo de esto, lo constituye el rápido incremento en la diseminación de la resistencia a un antimicrobiano dentro de una especie o entre especies, cuando, a menudo, las poblaciones bacterianas están sometidas a la fuerte presión selectiva ejercida por los antimicrobianos empleados en diversos centros hospitalarios (Kado, 1998; Frost *et al.*, 2005).

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

La transferencia por conjugación y la cotransferencia de los plásmidos entre las bacterias, son mecanismos que promueven la diseminación de un gran número de genes, que le permite a las mismas sobrevivir en cualquier momento. Estos genes pueden capacitar a la célula receptora de funciones genéticas que inicialmente no estaban presentes, tales como la resistencia a drogas, la producción de antibióticos, la resistencia a metales pesados y la producción de bacteriocinas (Davies, 1996).

Algunas células bacterianas pueden portar varios tipos diferentes de plásmidos, la habilidad de dos plásmidos de replicarse y mantenerse en una misma célula, sin

presión selectiva, depende de las regiones del control de la replicación, y ha llevado a la clasificación de los plásmidos en grupos de incompatibilidad. Los plásmidos de un mismo grupo se excluyen entre sí, pero pueden coexistir con plásmidos de otro grupo de incompatibilidad (Narváez, 1999; Alonso *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2002).

Se han descrito alrededor de 30 grupos de plásmidos de incompatibilidad. El grupo de plásmidos más estudiado, y quizás el más difundido, es el de los plásmidos de resistencia (plásmidos R), en el cual llevan determinantes de resistencia a uno o más agentes antimicrobianos. Muchos de los genes de resistencia portados por el plásmido se encuentran en elementos transponibles y en integrones (Couturier *et al.*, 1988).

Varios trabajos se han publicado, tanto a nivel nacional como internacional, sobre la conjugación de plásmidos en enterobacterias (Araque *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2005; Redondo y Alonso, 2007); sin embargo, en cuanto a BGNNF, es importante resaltar que son escasos los estudios realizados sobre el proceso de conjugación, incluyendo *A. baumannii*. Al respecto, Pedroza *et al.* (2002) realizaron un estudio comparativo en tres hospitales de la región capital, donde analizaron preliminarmente ADN plasmídico; estos investigadores encontraron que todas las cepas bacterianas estudiadas, entre ellas, las cepas de *A. baumannii*, portaron plásmidos de alta masa molar. No obstante, en dicho trabajo no se aclara si fue posible o no la conjugación entre las cepas de *A. baumannii* y las cepas utilizadas como receptoras.

González *et al.* (2003), en Cuba, encontraron que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, por parte de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH positivos y fibroquísticos se encontraban mediada por plásmidos conjugativos.

Por otro lado, Salazar *et al.* (2006), en Mérida, reportaron sobre un brote epidémico producido por *Acinetobacter* RUH 1139, en el que dichas cepas mostraron fenotipos de resistencia ante los β -lactámicos ensayados. También incluyeron cepas de *A. baumannii* con características de multirresistencia. En dicho estudio se destaca que más del 95% de las cepas portaron plásmidos.

En Venezuela, son escasas las investigaciones realizadas que asocian la resistencia presente en cepas de *A. baumannii* con la presencia de plásmidos conjugativos; sin embargo, se ha reportado que la resistencia antimicrobiana en otras bacterias, es transferible por conjugación. Por ello, el presente trabajo de investigación tuvo como finalidad demostrar la transferencia de genes de resistencia a β -lactámicos presentes en cepas de *A. baumannii* de origen nosocomial, mediante la conjugación.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Clínicas

Se utilizaron 20 cepas de *Acinetobacter baumannii*, dichas cepas fueron obtenidas de pacientes hospitalizados de la unidad de cuidados intensivos de adultos (UCI-A) y de la unidad de alto riesgo neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), durante enero de 1998 y abril de 1999, previamente identificadas bioquímica y molecularmente (Salazar *et al.*, 2006) (Tabla 1). Las cepas se encuentran conservadas en el laboratorio de bacteriología clínica del Departamento de Bioanálisis de la Escuela de Ciencias de la Universidad de Oriente Núcleo de Sucre.

Receptora

Se utilizó como cepa receptora de plásmidos a *Escherichia coli* K12 J53-2, la cual carece de *pili* de conjugación y es resistente a la prolina, metionina y rifampicina (F⁻; pro^r, met^r, rif^r), esta cepa se encuentra preservada y disponible en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM 128).

Reactivación de las cepas

Con el propósito de determinar la homogeneidad y viabilidad de las cepas, a partir del medio conservación, éstas se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C, durante 18 horas, posteriormente, se sembraron en agar Mac Conkey (AMC) con la finalidad de verificar su pureza y observar las características macroscópicas de las colonias, así como la no fermentación de la lactosa por parte del género *Acinetobacter*.

Tabla 1. Características de las cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos y de la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes durante, enero 1998 y abril 1999.

Cepas	Muestra	Terapia previa	Servicio
PIN 082-C1	Asp. Bronq.	Claforam, Amp/sulb	UCI-A
PIN 085-B1	Sec. Herida	Claforam, Amp/sulb	UCI-A
PIN 274-2	Sangre	AM, CTX	UARN
PIN 296-2	LCR	AM, CXM	UARN
PIN 341-B	Asp. Bronq.	CTX, PEF	UCI-A
PIN 390-2	Sec. Herida	CLI, CAZ, CIP	UCI-A
PIN 404	Asp. Bronq.	_____	UCI-A
PIN 428-B1	Sec. Herida	AM, GM, VAN	UARN
PIN 434-B2	Asp. Bronq.	CTX, OXA, MTR,FLUC	UCI-A
PIN 538-A	Asp. Bronq.	CEP, AMK	UCI-A
PIN 544-B	Sec. Herida	MAN	UCI-A
PIN 544-C	Sec. Herida	MAN	UCI-A
PIN 550-B	Asp. Bronq.	IMP, AMK	UCI-A
PIN 562	Asp. Bronq.	IMP, PEF	UCI-A
PIN 596-D2	Asp. Bronq.	CTX, UNASYM	UCI-A
PIN 597-1	Asp. Bronq.	CAZ, AMK	UCI-A
PIN 653-A	Sangre	OXA, AMK, MTR	UCI-A
PIN 653-B1	Sec. Herida	OXA, AMK, MTR	UCI-A
PIN 682	LCR	AM, AMK	UARN
PIN 7HU	Humidif.	_____	UARN

LCR: líquido cefalorraquídeo, Humidif: humidificador, Sec.: secreción, Asp. bronq.: aspirado bronquial, AM: ampicilina, Amp/sulb: ampicilina sulbactam, CAZ: ceftazidima, CTX: ceftriazone, PEF: plefoxacina, CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, OXA: oxacilina, MTR: metronidazol, FLUC: fluconazol, CEP: cefalotina, MAN: cefamandol, GM: gentamicina, AMK: amikacina, CXM: cefuroxime, VAN: vancomicina, UCI-A: unidad de cuidados intensivos adultos, UARN: unidad de alto riesgo neonatal.

Susceptibilidad Antimicrobiana

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó mediante la prueba de difusión del disco en agar (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, del inglés: Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2009). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas sembrado en agar tripticosa de soya (ATS), ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Una vez obtenida la turbidez requerida, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión, ejerciendo presión sobre las paredes interiores del tubo con el fin de eliminar el exceso de líquido. La suspensión bacteriana se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton contenido en placas de Petri, dejando secar para luego proceder a colocar los discos de los antibióticos seleccionados: ampicilina (10 µg), ampicilina/sulbactam (20 µg), amoxicilina-acido clavulámico (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefotetan (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), ceftriazona (30 µg), imipenem (10 µg), cefoperazona (30 µg), piperacilina (30 µg) y aztreonam (30 µg), todos de la marca comercial OXOID. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas, en aerobiosis.

Los halos de inhibición presentados por cada antimicrobiano se interpretaron siguiendo los valores de referencia señalados en la tabla del CLSI (2009) como sensible, resistente intermedio y resistente.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la ceftazidima ante las cepas estudiadas, se utilizaron tiras Etest (AB Boidisk, Solna, Swden), siguiendo las recomendaciones de CLSI (2009) para el método de difusión en agar. Se interpretó como CIM el punto donde se inhibió aproximadamente el 80% del crecimiento bacteriano.

Para el control de calidad de los discos de antibióticos utilizados se emplearon las cepas controles *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

La presencia fenotípica de BLEE en las cepas transconjugantes se determinó mediante la técnica de sinergismo de doble disco (Jalier *et al.*, 1988) y siguiendo los lineamientos establecidos por CLSI (2009), M100-S19 (M3); se procedió a inocular una placa de agar Mueller Hinton con una suspensión bacteriana preparada en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril y ajustada al patrón 0,5 de MacFarland. Luego, se colocó en medio de la placa un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg), posteriormente, se colocaron los discos de cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg), a una distancia lineal de 15 mm del disco de ácido clavulánico. La presencia de un sinergismo entre alguna de las cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico se interpretó como producción de BLEE.

Determinación de las concentraciones de ceftazidima y rifampicina a emplear en la conjugación.

Para determinar la concentración de cada agente antimicrobiano a utilizar en la conjugación, se procedió a preparar soluciones patrones de ceftazidima y rifampicina a una concentración de 50 y 60 µg ml⁻¹, respectivamente. A partir de estas concentraciones se prepararon placas de AMC suplementadas con ceftazidima a las concentraciones de 10, 15 y 20 µg ml⁻¹ y placas del mismo con rifampicina a 50, 80 y 100 µg ml⁻¹. Las cepas donantes y receptora se crecieron en 2 ml de LB a 37°C, durante toda la noche, luego se sembraron mediante rayado en cada una de las placas de AMC suplementadas con el antimicrobiano respectivo, estas placas se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 18 horas. Se consideraron sensibles aquellas cepas que no crecieron en la placa a las diferentes concentraciones y resistentes las que crecieron en las diferentes concentraciones.

Conjugación

El proceso de conjugación bacteriana se realizó mediante el empleo de la técnica sobre filtro descrita por Pedroza *et al.* (2001), con modificaciones. Cada cepa clínica que resultó resistente a ceftazidima se procedió a sembrar en caldo LB que contenía ceftazidima a una concentración de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ y la receptora, *E. coli* J53-2 (rifampicina resistente a una concentración de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ en 2 ml de caldo LB, durante toda la noche. Luego, se inocularon 5 ml de medio LB con 0,1 ml de dichos cultivos permitiendo el crecimiento hasta 4 horas (Fase logarítmica de crecimiento). Se mezclaron 0,5 ml de la cepa donante con 2,5 ml de la cepa receptora, seguidamente, se centrifugó la mezcla durante 1 minuto a $6\ 000\ g$ y el sedimento se colocó sobre un filtro millipore estéril de $0,22 \mu\text{m}$, previamente colocado sobre una placa de AMC. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C en aerobiosis. Finalizado el tiempo de incubación, se resuspendió la mezcla de conjugación en 1 ml de NaCl 0,85% y se sembraron por rastrilleo tanto directamente de la mezcla como diluciones desde 10^{-1} a 10^{-7} en placas de AMC suplementadas con ceftazidima ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) más rifampicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Se consideraron cepas transconjugantes aquellas colonias lactosa positivas que crecieron en placas de agar AMC que contenía la combinación de ambos antimicrobianos.

Cálculo de la frecuencia de transferencia

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

El DV se calculó sembrando 50 ul de diluciones seriadas (desde 10^{-1} a 10^{-7}) de la cepa donante al momento de realizar la mezcla de conjugación. El título de donantes viables y de las transconjugantes se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

Verificación de los determinantes transferidos

Para confirmar los determinantes de resistencia transferidos a la cepa receptora, se realizaron antibiogramas, como se describió anteriormente en la sección de susceptibilidad antimicrobiana, para las cepas de *A. baumannii* incluidas en el presente estudio, pero en este caso se utilizaron la cepas transconjugantes y receptora.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos, los cuales se representaron en tablas y figuras, según Jiménez (2000).

RESULTADOS

Todas las cepas fueron recuperadas del agar conservación, ya que estas se mantuvieron viables.

En la figura 2 se muestran los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos de las cepas de *A. baumannii* frente a los antimicrobianos ensayados, el 100% de las mismas resultó resistente a ampicilina, piperacilina y cefoxitin. Por su parte, el 90% y el 95% de la resistencia se obtuvo frente a cefotetan, cefuroxima, cefotaxima, cefoperazona y aztreonam, a su vez, un 80% de las cepas mostró resistencia frente a amoxicilina-ác.clavulánico; para ceftazidima se obtuvo un 85% de resistencia, mientras que, solo un 10% de cepas resistentes se observó frente a imipenem y ninguna sobrevivió ante meropenem.

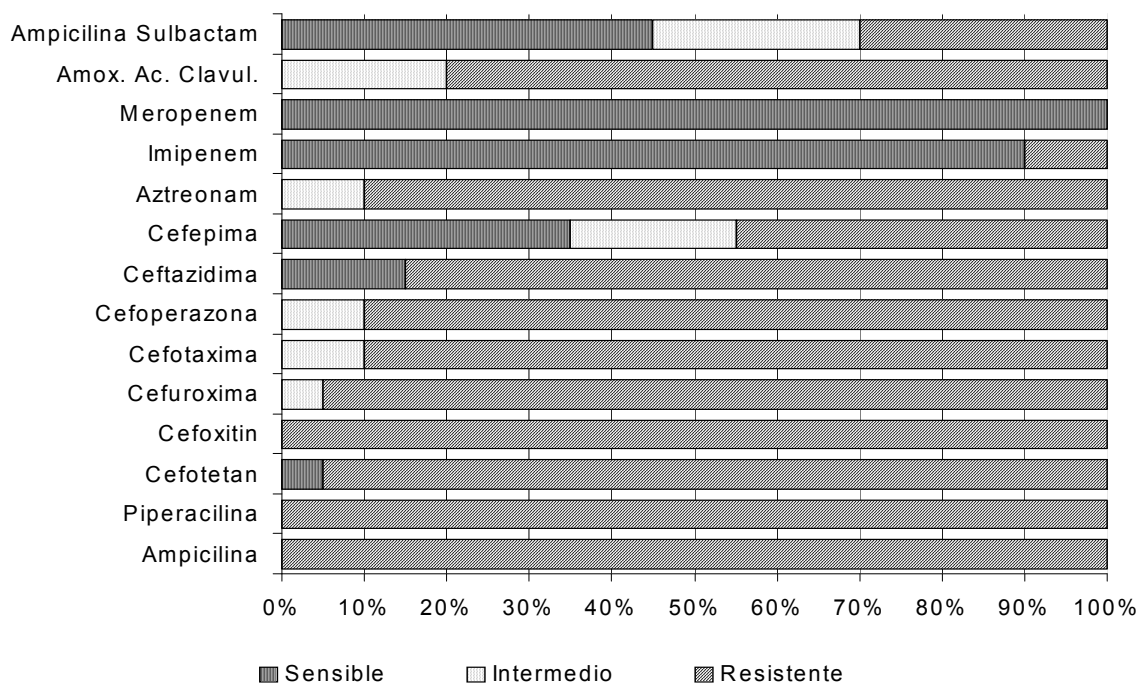


Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana frente a los β -lactámicos ensayados, en 20 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Método de Kirby y Bauer.

En la tabla 2 se presenta la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada cepa de *A. baumannii* y su crecimiento frente a las diferentes concentraciones de ceftazidima y rifampicina respectivamente, la CIM para cada cepa oscilaron entre 8 y 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se puede observar que 17 cepas cumplían con la condición de ser resistente a ceftazidima y sensible a rifampicina, mientras que sólo 3 cepas presentaban total sensibilidad a ambos antimicrobianos.

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para ceftazidima y fenotipos de interés para la conjugación de las 20 cepas donantes de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de los pacientes hospitalizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, Mérida – estado Mérida (enero 1998 – abril 1999) y cepa receptora.

CEPA	Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para CAZ	Ceftazidima (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	Rifampicina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)
PIN 082-C1	32	R	S
PIN 085-B1	8	S	S
PIN 274-2	24	R	S
PIN 296-2	12	R	S
PIN 341-B	48	R	S
PIN 390-2	16	R	S
PIN 404	16	R	S
PIN 428-B1	32	R	S
PIN 434-B2	24	R	S
PIN 538-A	12	R	S
PIN 544-B	16	R	S
PIN 544-C	16	R	S
PIN 550-B	32	R	S
PIN 562	64	R	S
PIN 596-D2	12	R	S
PIN 597-1	8	S	S
PIN 653-A	16	R	S
PIN 653-B1	12	R	S
PIN 682	8	S	S
PIN 7HU	16	R	S
E.coli K-12 J53-2	----	S	R

PIN: proyecto de investigación nosocomial, S: sensible, R: resistente, CAZ: ceftazidima.

Con respecto al estudio de conjugación bacteriana, una (1) de las diecisiete (17) cepas de *A. baumannii* fue capaz de transferir espontáneamente la resistencia de CAZ a la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2, esto se deduce después de observar el crecimiento de la cepa transconjugante en las diferentes placas de agar AMC suplementadas con Rif+CAZ, CAZ y RIF, respectivamente (figura 3). La frecuencia de transferencia para esta cepa (PIN 390-2) fue de $2,1 \times 10^{-3}$ transconjugante/célula donante resistente a CAZ.

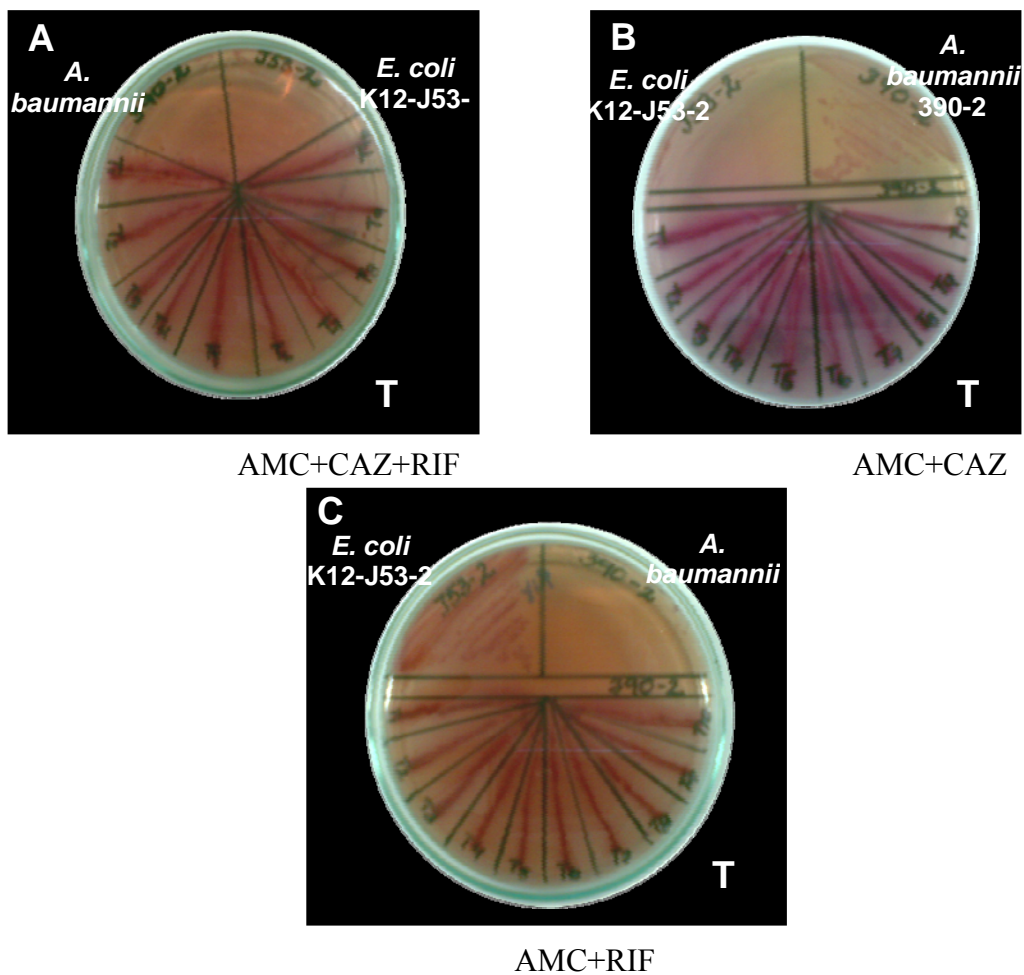


Figura 3. Crecimiento de la cepa transconjugante (A,B,C). Donante *Acinetobacter baumannii* PIN 390-2 (B). Receptora *Escherichia coli* K12 J53-2 (C) en las diferentes placas de agar MacConkey (AMC) suplementadas con los antimicrobianos utilizados en la conjugación. 1: AMC+CAZ (10 ug ml^{-1})+RIF (100 ug ml^{-1}), 2: AMC+CAZ (10 ug ml^{-1}), 3: AMC+RIF(100 ug ml^{-1}), T: transconjugante.

En la figura 4 se muestra la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa donante, receptora y transconjugante, frente a otros β -lactámicos ensayados, la cepa transconjugante presentó un perfil de resistencia compatible con el de la célula donante, es decir, también se transfirió resistencia a ampicilina, piperacilina y cefotaxima. Por otra parte, se puede observar que la cepa receptora es visiblemente sensible a todos los antibióticos. Al analizar el comportamiento de la cepa transconjugante ante otros agentes antimicrobianos de diferentes familias se observa la resistencia adicional al cloranfenicol. (Figura 4 y tabla 3).

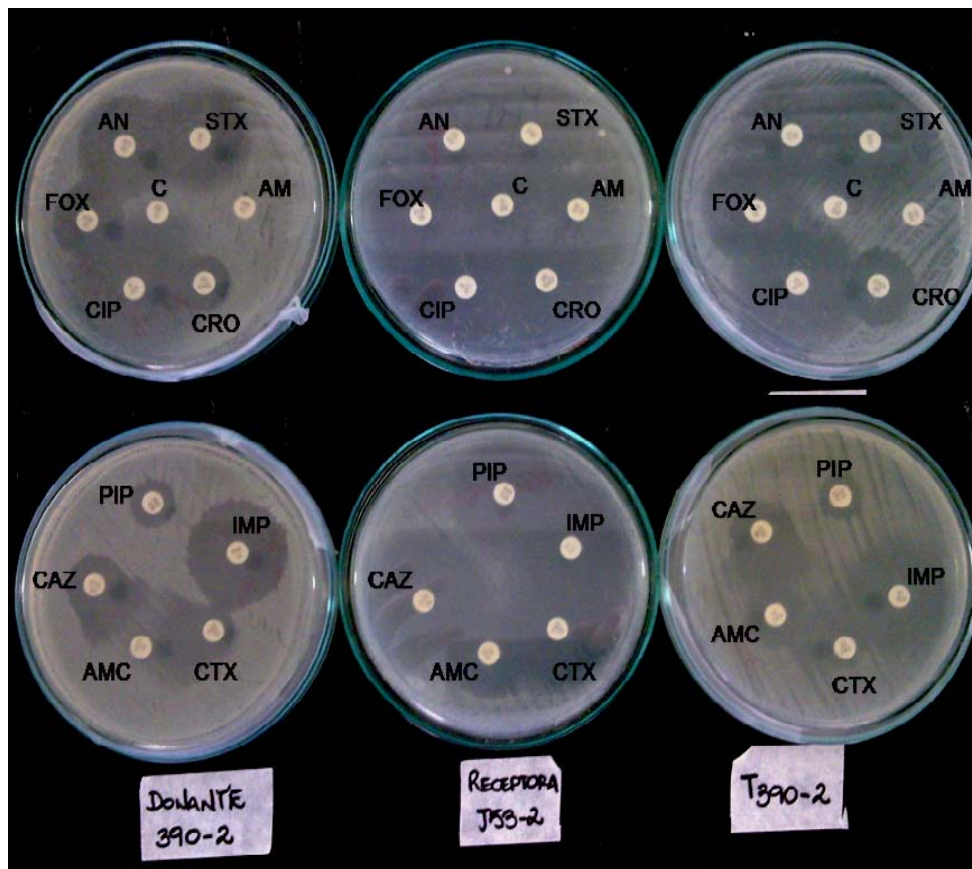


Figura 4. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa donante *A. baumannii* PIN 390-2, cepa Receptora *E. coli* K12 J53-2 y cepa transconjugante frente a los diferentes antimicrobianos ensayados, AN: amikacina, FOX: cefoxitin, CIP: ciprofloxacina, CRO: ceftriaxone, AM: ampicilina, SXT: trimetropim/sulfametoxazol, C: cloranfenicol, PIP: piperacilina, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina ácido clavulánico, CTX: cefotaxima, IMP: imipenem.

Tabla 3. Fenotipo de la cepa donante (*A. baumannii* PIN 390-2), receptora (*E.coli* K12 J53-2) y transconjugante (T390-2).

Cepa	Fenotipo
Donante	AM ^R , PIP ^R , FOX ^R , CRO ^R , CAZ ^R , CTX ^R , CL ^R , RIF ^S
Receptora	AM ^S , PIP ^S , FOX ^S , CRO ^S , CAZ ^S , CTX ^S , CL ^S , RIF ^R
Transconjugante	AM ^R , PIP ^R , FOX ^S , CRO ^S , CAZ ^R , CTX ^R , CL ^R , RIF ^R

AM:ampicilina, PIP: piperacilina, FOX: Cefoxitin, CRO: ceftriaxone, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, CL: cloranfenicol, RIF: rifampicina. R: resistente, S: sensible.

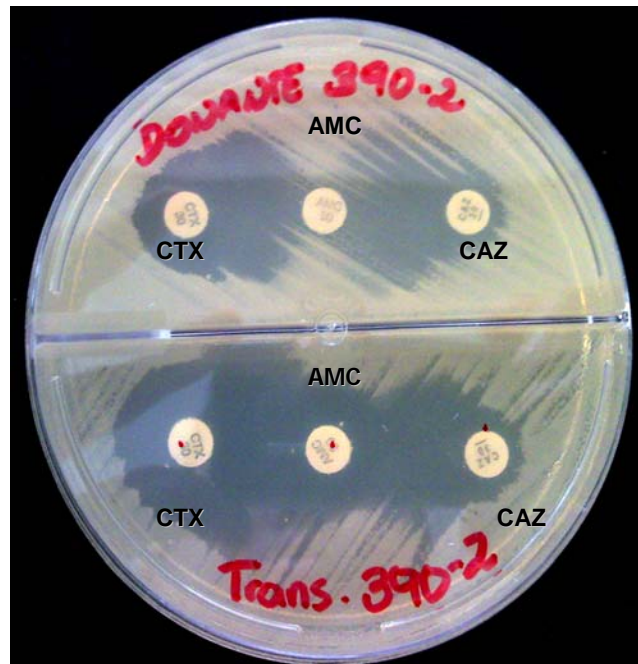


Figura 5. Producción de β -lactamasa de espectro extendido en la cepa de *Acinetobacter baumannii* PIN 390-2 y en la cepa transconjugante, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina ácido clavulánico, CTX: cefotaxima.

En la figura 5 se muestra el antibiograma realizado a la cepa donante y transconjugante, allí se puede observar que las mismas son productoras de BLEE, se destaca que la cepa receptora carece de este mecanismo enzimático enzimático como se observa en la figura 4.

DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana representa un importante problema de salud pública, que ha traído como consecuencia un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados (Gupta *et al.*, 2003). Actualmente, *A. baumannii* se considera un patógeno emergente de gran importancia clínica, ya que es la causa de numerosas epidemias en hospitales de varios continentes y es el responsable, entre 2% y 10%, de todas las infecciones ocasionadas por bacterias Gramnegativas en las unidades de cuidados intensivos (Hanberger *et al.*, 1999; Bergogne-Bèrèzin, 2001; Villegas y Hartstein, 2003; Abbo *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 2006).

La notable resistencia a la desecación y a las diferentes condiciones del medio, y su habilidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo cual está marcado, principalmente, por la adquisición de material genético, a través de elementos móviles como plásmidos, transposones o integrones, confieren a *Acinetobacter* sp. gran facilidad para sobrevivir en los medios inanimados bajo condiciones de sequedad o humedad, durante largos periodos de tiempo, lo que favorece, a la vez, su diseminación en el medio hospitalario (Landman *et al.*, 2002; Nordmann *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005; Giordano *et al.*, 2007).

Particularmente, las infecciones causadas por *A. baumannii* representan un problema terapéutico difícil de abordar, debido a que muchos aislamientos clínicos muestran incremento progresivo de la resistencia antimicrobiana (Liang *et al.*, 1996; López y López-Brea, 2000; Pinzón *et al.*, 2006; Karishma *et al.*, 2007).

En el presente estudio, los resultados obtenidos de susceptibilidad antimicrobiana ante los β -lactámicos ensayados, muestran que el 100% de los aislados de *A. baumannii* presentaron resistencia a ampicilina, piperacilina y

cefexitin, resultados similares fueron reportados por López-Hernández *et al.* (2001) en España. Las cefalosporinas de segunda generación no presentaron actividad antimicrobiana, estos resultados se correlacionan con los publicados por Pedroza (2001), en dos hospitales de Caracas. Con respecto a las cefalosporinas de tercera generación, la actividad fue moderada a excepción de la ceftazidima que presentó un patrón de resistencia de 85%, estos resultados se asemejan a los publicados por Briceño y Suárez (2006), quienes reportaron que un elevado porcentaje de cepas de *A. baumannii* de origen nosocomial mostraron resistencia frente a la ceftazidima. Otros investigadores, tanto a nivel nacional como internacional, han reportado datos similares a los aquí encontrados, aunque en cepas identificadas como *Acinetobacter* sp. (Vila *et al.*, 1993; Comegna *et al.*, 2000; Pedroza, 2001; Carmona *et al.*, 2003, Pinzón *et al.*, 2006).

Según los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes incluidos en este estudio, el 94,2% se encontraba recibiendo una terapia antimicrobiana, destacando que los mismos recibían, por lo menos, un β -lactámico, específicamente, en algunos casos se administraba cefalosporinas de tercera generación para el momento de la toma de la muestra, hecho que pudo haber contribuido en parte a la selección de cepas resistentes.

En muchos casos el desconocimiento de la flora prevalente en un servicio médico determinado conlleva a la utilización innecesaria de tratamientos antimicrobianos, el cual, generalmente, es aplicado según las condiciones del paciente, sin tomar en cuenta la existencia de estudios microbiológicos previos (Ambrose, 1998; Cuhan, 1998; Harmut, 1998; Fridkin y Gaynes, 1999).

Al respecto, Prada (2006) describe que el abuso y mal uso de los agentes antimicrobianos ha provocado el incremento en la aparición de cepas alarmantemente resistentes, específicamente, en las áreas de cuidados intensivos.

Se ha descrito en *Acinetobacter* sp. que la resistencia a ampicilina, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas se ha relacionado con la presencia de betalactamasas plasmídica tipo TEM-1 o TEM-2. Sin embargo, resultados recientes sugieren que la sobreexpresión de una cefalosporinasa cromosómica del tipo AmpC es un mecanismo frecuente de resistencia a β -lactámicos y genera un fenotipo de resistencia caracterizado por resistencia a ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima e incluso puede afectar a ceftazidima (Fernández, 2000; Burke, 2000; Bou y Martínez-Beltrán, 2000; Danes *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2003; Pino, 2007).

La coexistencia de múltiples genes de resistencia en una bacteria puede ser producto de diversos eventos tales como, la acumulación de mutaciones, adquisición de plásmidos, transposones, integrones portadores de múltiples determinantes de resistencia y/o de cassettes genéticos, cuyo producto confiere resistencia a varias clases de antimicrobianos. Es conocido que los plásmidos son los principales vectores de diseminación de estos genes (Mazel y Davies, 1999). Diversos investigadores afirman que los genes de resistencia a β -lactámicos, aminoglicósidos y tetraciclina en cepas de *Acinetobacter* sp. puedan estar ubicados en transposones, integrones o plásmidos (Vila, 1998; Ramírez *et al.*, 2000; Chopra y Robert, 2001; Vila, 2002).

En la presente investigación fue posible la transferencia plasmídica, mediante conjugación entre una cepa de *A. baumannii* y la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2, obteniéndose una transconjugante resistente a la ceftazidima, lo cual permite afirmar que la resistencia a esta familia de antimicrobianos está asociada a un plásmido conjugativo o movilizable en las condiciones ensayadas. Al analizar el antibiograma de la transconjugante ante otros antibióticos β -lactámicos se encontró que la cepa resulto resistente a la mayoría de estos, excepto a las carbapenemasas, y allí se evidenció la expresión del gen que codifica para la producción de BLEE. Este hecho explica la resistencia que se observa ante los diferentes β -lactámicos, ya que la

presencia de una BLEE inactiva penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos. Resultados similares fueron reportados por Suresh *et al.* (2003), quienes demostraron que un plásmido conjugativo codificaba para la producción de BLEE en cepas de *A. baumannii*, el cual fue transferido a la cepa de *E. coli* DH5 α . Así mismo, González, *et al.* (2003) estudiaron cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico, las mismas albergaban plásmidos que codificaba para la producción de β -lactamasas, los cuales fueron transferibles mediante conjugación, las transconjugantes obtenidas fueron productoras de BLEE.

Con este hallazgo, se demuestra que los pacientes recluidos en la UCI-A del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, han sido afectados por cepas de *A. baumannii* productoras de BLEE, cuya enzima se encuentra codificada en un gen albergado en un plásmido conjugativo, lo cual tiene gran relevancia desde el punto de vista clínico-epidemiológico, ya que limita el espectro terapéutico al momento de colocar tratamiento antimicrobiano a los pacientes infectados con esta especie bacteriana, a si mismo incrementa los costos por concepto de terapia alternativa y estadía hospitalaria (Medeiros, 1997).

Al analizar el comportamiento de la transconjugante, ante otros agentes antimicrobianos de diferentes familias, se observó la resistencia adicional al cloranfenicol, este hecho permite inferir que la resistencia a este antimicrobiano podría estar codificada en el mismo plásmido transferido, el cual es capaz de llevar esta información a otro género bacteriano, capacitando a la célula receptora de funciones de resistencia que inicialmente carecía. Se han descrito los mecanismos de resistencia de tipo enzimático tales como BLEE, enzimas modificantes de aminoglucósidos y cloranfenicolacetiltransferasas, son normalmente codificadas por elementos extracromosomales, tales como plásmidos y transposones (Gilbert, 2000). Al respecto, Machado *et al.* (2005) señalan que la resistencia a los aminoglucósidos, cloranfenicol y β -lactámicos, está relacionada por el hecho de que los genes

codificantes para estos mecanismos suelen estar presentes en un mismo plásmido.

Experimentos de conjugación han sido utilizados a nivel nacional en algunos estudios epidemiológicos, con el fin de evaluar la presencia de plásmidos transferibles, portadores de determinantes de resistencia, sin embargo, la mayoría de estos trabajos se han realizado, en cepas de enterobacterias (Araque *et al.*, 1997; Pedroza *et al.*, 2002; Narváez *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005; Guzmán, 2006; Redondo y Alonso, 2007) y, en el caso particular de *A. baumannii*, se han caracterizado plásmidos pero no se han reportado hasta ahora resultados evidentes de conjugación plasmídica, por lo que los hallazgos de esta investigación estarían entre los primeros reportes que se hacen en el país, de allí la importancia de este estudio, ya que demuestra que dicho microorganismo es capaz de diseminar genes de resistencia a través del proceso de conjugación.

La frecuencia de transferencia horizontal se ubicó en el orden de 10^{-3} transconjugante/célula donante, dicho valor pone de manifiesto la alta transmisibilidad plasmídica que puede haber entre dos bacterias, en este caso particular, la conjugación tuvo lugar entre dos géneros bacterianos diferentes. Por su parte, Patwardhan *et al.* (2008) lograron transferir el plásmido PuPI281 proveniente de una cepa de *A. baumannii* a la cepa receptora *E.coli* HB101, pero en este estudio se aplicó la transformación, en el cual emplearon el método de choque térmico. Estos investigadores obtuvieron una frecuencia de transferencia de 10^{-4} transformantes/ μ g ADN plasmídico, lo cual representó una frecuencia un poco menor comparándola con la obtenida en el presente estudio.

Con respecto a las cepas de *A. baumannii* que no lograron conjugarse, pudo deberse a diversas causas, entre ellas, la utilización de una temperatura de trabajo de 37°C, ya que la transferencia de algunos plásmidos, específicamente los plásmidos termosensibles, pueden ser inhibidos a esta temperatura, debido a que pueden

reprimir la expresión de los genes de la transferencia, inhibir la formación del pilu sexual o puede provocar la inestabilidad de, al menos, una de las proteínas que participan en el acoplamiento para la transferencia del material plasmídico (Forns, 2006).

Otras de las posibles causas de la no conjugación de las cepas de *A. baumannii* es la presencia de plásmidos pertenecientes a la subfamilia IncF, ya que estos producen pilis flexibles y largos, los cuales llevan a cabo la transferencia del ADN plasmidial más eficiente en medio líquido, mientras que la subfamilia IncP, es productora de pilis cortos y rígidos y la transferencia se da mejor en medio sólido (Forns, 2006). Es importante destacar que en este estudio se realizó la conjugación en un medio sólido, por ende si el pilu formado en la conjugación pertenece a la subfamilia IncF es muy probable que la conjugación en las cepas de *A. baumannii* sea aún más exitosa aplicando una metodología que utilice un medio líquido.

La presencia de plásmidos mediadores de resistencia a los antimicrobianos y el hallazgo de cepas portadoras de β -lactamasas codificadas en plásmidos conjugativos, que han demostrado su capacidad de transferencia entre bacterias sin importar el género, constituyen factores de riesgos y de gran impacto clínico a considerar, ya que cada día se ve más limitada la cantidad de antibióticos disponibles para tratar las infecciones causadas por *A. baumannii*, debido al incremento progresivo de su resistencia, por ello, se hace indispensable el uso racional de los distintos agentes antimicrobianos en el ambiente hospitalario, para así evitar la aparición y diseminación de microorganismos altamente resistentes.

CONCLUSIONES

Fue posible transferir plásmidos, mediante conjugación, entre una cepa de *A. baumannii* de origen clínico resistente a ceftazidima y *E. coli* K12 J53-2.

La frecuencia de conjugación entre la cepa de *A. baumannii* de origen clínico y la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2, fue alta $2,1 \times 10^{-3}$ transconjugante/célula donante.

En la cepa transconjugante se detectó la producción de BLEE y la cotransferencia de un gen que codifica para la resistencia a cloranfenicol.

RECOMENDACIONES

Controlar el uso de antimicrobianos de amplio espectro en el ambiente hospitalario, especialmente, en las unidades de cuidados intensivos y alto riesgo neonatal, ya que de esta manera se puede prevenir la diseminación y prevalencia de plásmidos que han ido acumulando determinantes de resistencia.

Mantener una vigilancia continua de los niveles de resistencia y de los mecanismos que la confieren.

Continuar con el estudio a fin de aislar y caracterizar el plásmido conjugado y así mismo la asociación de este con otros elementos genéticos de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

Abbo, A.; Navon-Venezia, S.; Hammer-Muntz, O.; Krichali, T.; Siegman-Igra, Y. y Carmell, Y. 2005. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emergency Infection Disease*, 11: 22-29.

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

Alonso, G.; Vílchez, G.; Bruzual, I. y Rodríguez, L. 2002. Characterization of plasmid MIP 233 (IncHI3) of the H complex. *Research in Microbiology*, 153: 149-153.

Amábile-Cuevas C. y Chicurel M. 1992. Bacterial plasmids and genes efflux. *Cellular*, 70: 189-199.

Ambrose, P. 1998. Antibiotic in the critical care unit. *Critical Care Clinical*, 14: 283-308.

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

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

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

Bergogne - Bèrèzin, E. y Towner, K. 1996. *Acinetobacter* sp., as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 148-165.

Bergogne-Bèrèzin, E. 2001. The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Current Infectious Disease Reports*, 3: 440-444.

Bou, G. y Martínez-Beltrán J. 2000. Cloning, nucleotide sequencing and analysis of the genes encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*,

Antimicrobial Agents Chemoter, 44: 428-432.

Briceño, I. y Suárez, M. 2006. Resistencia bacteriana en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de los Andes. *Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica*. 3(2): 30-42.

Burke, A. 2000. Antibiotic resistance. *Medical Clinics of North American*, 84: 6.

Bush, K.; Jacoby, G. y Madeiros, A. 2000. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.

Carmona, O.; Guzmán, M.; Comegna, M.; Castro, J. y Grupo Venezolano de Vigilancia de Resistencia Bacteriana. 2003. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Periodo Julio 2001-Diciembre 2002. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1): 89-97.

Carr, E.; Kämpfer, P.; Patel, B.; Gürtler, V. y Serviour, R. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 953-963.

Chopra, I. y Robert, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 232-260.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. *Performance standards for Antimicrobial Susceptibility testing*. Nineteenth Informational Supplement M100-S19. Vol.29. N°3.

Comegna, M.; Guzmán, M.; Carmona, O.; Molina, M. y Grupo Colaborativo del Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana. 2000. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela-nuevos hallazgos. *Sociedad. Venezolana de Microbiología*, 20: 58-63.

Couturier, M.; Bex F.; Bergquist, P. y Maas, W. 1988. Identification and classification of bacterial plasmid. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 52: 375-395.

Cuhan, B. 1998. Antibiotic resistance: control strategies. *Critical Care Clinical*, 14: 309-328.

Danes, C.; Navia, M.; Ruiz, J.; Marco, F.; Jurado, A.; Jimenez, A. y Vila, J. 2002. Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) in the MIC_S of different beta-lactamase antibiotics [en prensa], *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

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

Fernández, F. 2000. Actividad de inhibidores de betalactamasas frente a *Acinetobacter baumannii*. *Revista Española de Quimioterapia*, 13: 31-36.

Forns, N. 2006. Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació global de l'expressió gènica a *Escherichia coli* i paper en la conjugació plasmídica. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

Fridkin, S. y Gaynes, R. 1999. Antimicrobial resistance in intensive care units. *Clinical Chest Medical*, 20: 303-316.

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

García, E.; Aznar, E.; Alarcón, T. y López-Brea, M. 2006. Patrón de sensibilidad de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* en Madrid vs. Hong Kong. *Revista Española de Quimioterapia*, 19(1):45-50.

Garrity, G.; Winters, M. y Searles, D. 2002. Taxonomic outline of the prokaryotic. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Second edition. Springer, New York.

Gilbert, D. 2000. Aminoglycosides. Principles and practice of infectious diseases. Mandell, Douglas and Tenet eds. 4th edition. Churchill Livingstone, New York.

Giordano, A.; Varesi, P.; Bertini, A.; Villa, L.; Dionisi, A.; Venditti, M.; Carfagna, P.; Luzzi, I.; Mancini, C. y Carattoli, A. 2007. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Roma, Italy. *Microbial Drug Resistance*, 13: 37-43.

Gniadkowski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Infection Microbiology Clinical*, 7: 597-608.

González, A.; Salazar, D.; Rojas, N. y Hernández, Y. 2003. Resistencia a β -lactámicos mediada por plásmidos en cepas de *Pseudomona aeruginosa* de origen clínico. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3): 231-238.

Gupta, A.; Ampolo, K.; Rubenstein, D.; Saiman, L. 2003. Extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *Journal of Perinatology*, 23: 439-443.

Guzmán, M. 2006. Caracterización de los determinantes que codifican β -lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae* en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela.

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

Hanberger, H.; Garcia, J.; Gobernado, M.; Goossens, H.; Nilsson L. y Struelens, M. 1999. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 european countries. French and portuguese ICU study Groups. *Journal of the American Medical Association*, 281: 67-71.

Harmut, L. 1998. Nosocomial pneumonia in the critical care unit. *Critical Care Clinical*, 14: 119-134.

Jackson, L.; Machado, L. y Hamilton, M. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*, 8: 13-27.

Jalier, V.; Nicolás, M; Fournier, G. y Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamasas conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Archive of Microbiology*, 10: 867-877.

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

Jones, N. y Pfaller, M. 1998. Bacterial resistance; a worldwide problem. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 31: 379-388.

Kado, C. 1998. Origin end evolution of plasmid. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 73: 117-126.

Karishma, P.; Supriya, Y. y Balu, C. 2007. Plasmid distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter* genospecies from healthy skin

ofa tribal population in western India. *Indian Journal of Medical Research*, 125: 79-88.

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

Landman, D.; Quale, J.; Mayorga, D.; Addeji, A.; Vangala, K.; Ravishankar, J.; Flores, C. y Brooks, S. 2002. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York. *Archives International Medical*, 162: 1515-1520.

Levin, A.; Levy, C.; Manrique, A.; Medeiros, E. y Costa, S. 2003. Severe nosocomial infections with imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *International Journal Antimicrobial Agents*, 21: 58-62.

Liang, J.; Cheng, K.; Cheng, A. y Norrby, R. 1996. Susceptibilities to 23 antimicrobial agents and β -lactamase production of blood culture isolate of *Acinetobacter* sp in Hong Kong. *Scand Journal Infection Disease*, 101: 21-25.

Livermore, D. M. 1997. β -lactamases: quantity and resistance. *Journal clinical Microbiology*, 8: 557-584.

López, S. y López-Brea, M. 2000. ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18: 153-158.

López-Hernández, S.; Alarcón, T.; Delgado, T.; De las Cuevas, M., y López-Brea, M. 2001. Actividad in Vitro de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. <<http://diariomédico.com/microbiología/n281299.html>> (10/02/02).

Machado, E.; Canton R.; Baquero, F.; Galan, J.; Rollan, A.; Peixe, L. y Coque, T. 2005. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 1823-1829.

Martínez, J. 2001. Inhibición de mecanismos de permeabilidad y bombeo. On line: <<http://www.altavista.com>> (25/02/07).

Mazel D. y Davies J. 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56:742-754.

Medeiros, A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infection Disease*, 24 (suppl.1): 19-45.

Narváez, P.; Pedroza, R.; Alonso, G. y Rodríguez-Lemoine, V. 1999. Patrones de restricción de plásmidos que confieren resistencia a la amikacina en bacterias aisladas del hospital universitario de Caracas. XXIV Jornadas Nacionales de Microbiología. Valencia, 1-5 noviembre.

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

Nemec, A.; Dijkshoorn, L.; Cleenwerck, L.; De Baere, T.; Jassens, D.; Van der Reijden, T.; Jezek, P. y Vaneechoutte, M. 2003. *Acinetobacter parvus*. Nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 53: 1563-1567.

Nordmann, P. y Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clinical Microbiology Infectious*, 8: 321-31.

Orman, B. 2007. La resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión. *Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires*, 21(50/51): 13-19.

Patwardhan, R.; Dhakephalkar, P.; Niphadkar, K. y Chopade, B. 2008. A study on nosocomial pathogens in ICU with special referente to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian Journal Medical Reviews*, 128: 178-187.

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

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

Pino, C.; Domínguez, M.; González, G.; Bello, H.; Sepúlveda, M.; Mella, S.; Zemelman, C. y Zemelman, R. 2007. Producción de β -lactámicas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales VIII^a región, Chile. *Revista Médica de Chile*, 24(2): 137-141.

Pinzón, J.; Mantilla, J. y Valenzuela, E. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Asociación Colombiana de Infectología*, 10(2): 78-85.

Poirel, L.; Karim, A.; Mercat, A.; Le Thomas, I.; Vahaboglu, H.; Richard, C. y Nordmann, P. 1999. Extended-spectrum β -lactamase producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 157-158.

Prada, G. 2006. *Acinetobacter baumannii*: problemático además de multirresistente. *Asociación Colombiana de Infectología*, 10(2): 61-63.

Ramírez, C.; Pino, C.; González, G.; Bello, H.; Domínguez, Y.; Mella, S.; Zemelman, R.; Young, H.; Amyes, S. 2000. Presencia de integrones y su relación con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen nosocomial. *Revista Médica de Chile*, 128(8): 863-867.

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

Rossau, R.; Van Landschoot, A.; Gillis, M. y De Ley, J. 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. Nov. a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *International Journal Systematic Bacteriology*, 41: 310-319.

Salazar, E.; Nieves, B.; Aráque, M.; Velásco, E.; Ruíz, J. y Vila, J. 2006. Outbreak caused by *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27: 397-403.

Seifert, H.; Dkshoorn, L.; Gerner-Smidt, P.; Pelzer, N.; Tjernberg, I. y Vancechoutte, M. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2819-2825.

Shi-Yuan, S.; Yuk-Fong Liu, P.; Yen- Jun, L.; Yu-Hui, L.; Bor-Shen, H. y Jainn-Ming, S. 1996. Antimicrobial Susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 24: 81-85.

Silva, J.; Avello, C.; Matamoro, F.; Villagra, L.; Rojas, V. y Sandomal, L. 2003. Resistencia a antimicrobianos en diferentes biotipos de *Acinetobacter baumannii* aislados en el norte de Chile. *Revista médica de Chile*, 127: 926-934.

Suárez, C.; Catan, J.; Guzmán, A. y Villegas, M. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectious*, 10(2): 85-93.

Suresh, J.; Geetanjali, L.; Vikram, G. y Krishnarau, N. 2003. Plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*, 10: 1125-1127.

Thonsom, K.; Prevan, A. y Sanders C. 1996. Novel plasmid – mediated β -lactamases in *Enterobacteriaceae*: emerging problem for new β -lactam antibiotic. In Remington, J. S., M. N. Swartz. Current clinical topics in infectious diseases. 16° ed. Blackwell Science, Inc., Cambridge, Mass.

Torres, L.; Benítez, M.; Domínguez, M.; Torres, O.; Gagliota, V.; Calvo, A.; Rodríguez, N.; Ardils, J. y Pedroza, R. 2005. Detección de integrones clase 1 en cepas de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido tipo SHV y CTX-M grupo 2. "VITAE" <<http://www.caibco.ucv.ve>> (01/01/07).

Vila, J. 1998. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Reviews Medical Microbiology*, 9: 87-97.

Vila, J. y Marco, F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativas no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(6): 304-312.

Vila, J.; Marcos, A.; Marcos, F.; Abdalla, S.; Vergara, Y.; Reig, R.; Gómez-Luz, R. y Jimenez, T. 1993. In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 138-141.

Villegas, M. y Hartstein, A. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 24: 284-295.

Walsh, T.; Toleman, M.; Poirel, L. y Nordmann, P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical Microbiology Reviews*, 18: 306-325.

HOJA DE METADATOS

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

Título	Transferencia de Plásmidos en Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> Resistentes A β -Lactamicos
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bottaro O. Karol V.	CVLAC	16 817 966
	e-mail	Karol_bottaro@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Acinetobacter baumannii, Conjugación, Escherichia coli K12 J53-2, Transconjugantes

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Microbiología	Bacteriología

Resumen (abstract):

La producción de β -lactamasas puede estar codificada en genes cromosómicos y extracromosómicos, siendo en estos últimos mayormente encontradas. La transferencia de dichos genes, mediante conjugación, a partir de cepas de *Acinetobacter* ha sido escasamente descrita; por ello, con el propósito de demostrar la transferencia de genes de resistencia a β -lactámicos, a partir de cepas de *A. baumannii*, se estudiaron 20 cepas clínicas, identificadas bioquímicamente y molecularmente a partir de muestras procedentes de pacientes recluidos en la unidad de cuidados intensivos y en la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA). Se reactivaron las cepas preservadas en agar conservación y se le determinó la susceptibilidad antimicrobiana ante 14 β -lactámicos mediante la prueba de difusión en agar. Se confirmó la resistencia de las cepas frente a la ceftazidima, el cual fue el antibiótico de elección para la conjugación a través de placas suplementadas con dicho antimicrobiano. La transferencia del material genético fue evaluada mediante conjugación bacteriana y se aplicó en aquellas cepas resistentes a la ceftazidima y sensible a la rifampicina, utilizándose como cepa receptora *E. coli* K12 J53-2. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a ampicilina, piperacilina y cefoxitin, el 95% fue resistente a cefotetan y cefuroxime y el 85% de las cepas presentó resistencia a la ceftazidima. La frecuencia de conjugación fue alta mostrando un valor de $2,1 \times 10^{-3}$ transconjugante/célula donante. Se obtuvo una cepa transconjugante productora de BLEE y, también, se observó transferencia de resistencia a cloranfenicol.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Salazar, Elsa	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	elsasul2003@yahoo.com
	e-mail	
Guzmán, Militza	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	miltzaguz@yahoo.com
	e-mail	
Antón, Dina	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	danton@cantv.net
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	01	29

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_KVBO.DOC	Word

Alcance:

Espacial : Universal

Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

Área de Estudio:

Bioanálisis

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

Universidad de Oriente (UDO), Núcleo de Sucre

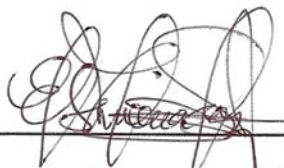
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

El autor garantiza en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar a la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. El autor se reserva los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.



Autor
Bottaro O, Karol V.



Asesora
Salazar, Elsa



Jurado
Guzmán, Militza



Jurado
Antón, Dina

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

