



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE DOS GENES DE RESISTENCIA A  $\beta$ -LACTÁMICOS  
EN BACTERIAS NOSOCOMIALES, AISLADAS EN HOSPITALES  
VETERINARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE.

**MARCELO DAVID ARROS CORTÉS**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina Preventiva.

PROFESOR GUÍA  
**CARLOS OSVALDO NAVARRO VENEGAS**

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FIV 4602016

SANTIAGO, CHILE  
2010



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## DETECCIÓN DE DOS GENES DE RESISTENCIA A $\beta$ -LACTÁMICOS EN BACTERIAS NOSOCOMIALES, AISLADAS EN HOSPITALES VETERINARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE.

### MARCELO DAVID ARROS CORTÉS

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina Preventiva

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Ma. ANTONIETA JARA OSORIO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: ALICIA VALDES OLGUÍN	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2010

*Dedico este trabajo a mi familia, por ser el pilar fundamental en mi desarrollo como persona. Su apoyo incondicional, cariño y enseñanzas estarán siempre junto a mí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Carlos Navarro Venegas, mi Profesor Guía, por su ayuda, comprensión y largas horas de dedicación en el desarrollo de esta Memoria de Título.

A la Dra. María Antonieta Jara, por su orientación en el mundo de la microbiología y simpatía sin igual.

A la Dra. Alicia Valdés, por sus correcciones precisas, las cuales dieron mayor coherencia a mi trabajo.

Han sido muy importantes mis compañeros de trabajo en el laboratorio, gracias por las explicaciones en diferentes temas relacionados con el proyecto.

A mis padres Miguel y Liliana, que han dado toda su vida por mí, educándome y soportándome sin importar nada.

Te doy gracias hermano por ser mi mejor amigo y darme tu apoyo incondicional, en las buenas y en las malas.

A toda mi familia, tanto Arros como Cortés, por su cariño y enseñanzas.

A mi abuelita Clara gracias por las velitas y cariño.

Agradezco a todos mis amigos del Instituto Nacional, ustedes se han convertido en parte de mi familia, gracias por alegrar mi vida y ser una gran compañía.

Finalmente pero no menos importante, gracias Javiera por todos los momentos hermosos que hemos tenido juntos y que tendremos en el futuro.

Todos son fundamentales en mi desarrollo y los apreciaré eternamente.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>v</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 INFECCIONES NOSOCOMIALES. IMPORTANCIA     EPIDEMIOLÓGICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 AGENTES BACTERIANOS NOSOCOMIALES Y CUADROS     CLÍNICOS</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 FACTORES DE RIESGO, FORMAS DE CONTROL Y     PREVENCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 RESISTENCIA BACTERIANA</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4.1 Desarrollo e importancia de la resistencia en las infecciones         nosocomiales</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4.2 Mecanismos de transferencia de información genética entre         bacterias</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.3 Mecanismo de resistencia en contra de los antimicrobianos ....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5.1 Mecanismos de acción de los antimicrobianos</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6 LOS β-LACTÁMICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.6.1. Resistencia de las bacterias a los β-lactámicos metilina y         ampicilina</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA RESISTENCIA     BACTERIANA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.7.1. Técnicas de genética molecular</b> .....	<b>19</b>

<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Diseño experimental</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2 Muestras</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Obtención del ADN bacteriano</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 Detección de genes mediante la técnica de PCR</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4.1 Partidores</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4.2 Mezcla de la reacción para realizar la prueba de PCR</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4.3 Amplificación del ADN</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5 Visualización de los productos amplificados</b> .....	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1 DETECCIÓN DEL GEN QUE OTORGA RESISTENCIA A AMPICILINA     (BLA<sub>TEM</sub>), EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS Y GRAM-POSITIVAS,     MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1.1 Bacterias Gram-negativas</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1.2 Bacterias Gram positivas</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2 DETECCIÓN DEL GEN QUE OTORGA RESISTENCIA A METICILINA     (mecA), EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS, MEDIANTE LA TÉCNICA DE     PCR CONVENCIONAL</b> .....	<b>29</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>35</b>
<b>8. PROYECCIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>37</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>41</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

## Página

1. Infecciones descritas según bacteria nosocomial .....	6
2. Cepas bacterianas Gram-negativas ordenadas según aislado, especie y sensibilidad, donde se encuentra presente el gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	27
3. Presencia del gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> en bacterias Gram-positivas según especie bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana frente a Ampicilina .....	28
4. Presencia del gen <i>mecA</i> en bacterias Gram-positivas, según especie bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana frente a Oxacilina .....	29
5. Bacterias nosocomiales Gram-negativas obtenidas durante el 2007 (N=13), con su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).....	37
6. Bacterias nosocomiales Gram-negativas obtenidas durante el 2008 (N=15) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).....	38
7. Bacterias nosocomiales Gram-positivas obtenidas durante el 2007 (N=19) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).....	39
8. Bacterias nosocomiales Gram-positivas obtenidas durante el 2008 (N=20) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer) .....	40

## RESUMEN

Las bacterias nosocomiales han tenido gran repercusión en la práctica médica al producir una alta morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, debido principalmente a su capacidad fenotípica de multiresistencia a antimicrobianos.

La información que permite a una bacteria desarrollar un mecanismo de resistencia se encuentra en su material genético, existiendo la posibilidad de traspasarlo en forma horizontal a otras bacterias. Adicionalmente, causan un gran costo para el paciente y los centros de atención al generar complicaciones y una mayor estancia hospitalaria. Así, es necesario realizar un seguimiento dinámico de las especies nosocomiales, para establecer una retroalimentación constante respecto de su existencia y la de los fenómenos medioambientales involucrados en su presentación, con la finalidad de mejorar los protocolos de control de los patógenos asociados a este tipo de infecciones. Este protocolo debe incluir la búsqueda de los genes responsables de la resistencia a los antimicrobianos en distintas especies y analizar su relación epidemiológica, buscando resguardar la salud pública y animal.

El objetivo de este trabajo fue identificar los genes más frecuentemente descritos que otorgan resistencia a los antimicrobianos beta-lactámicos (ampicilina y meticilina), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en sesenta y siete aislados ambientales obtenidos y caracterizados previamente, entre los años 2007 y 2008- desde unidades clínico Veterinarias de la Universidad de Chile.

La implementación de la técnica de PCR permitió la detección de fragmentos de ADN compatibles con los descritos en la detección del gen *bla*<sub>TEM</sub> en bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas y en la detección del gen *mecA*, en bacterias Gram-positivas, encontrando indiscutiblemente un alto porcentaje de bacterias que poseerían estos genes, lo que debe generar una gran preocupación para los encargados de los recintos hospitalarios veterinarios de la Universidad de Chile y como medida preventiva, se deben realizar esfuerzos para controlar esta realidad.



## **SUMMARY.**

Acquisition of multiresistance to antimicrobial agents by nosocomial bacteria has become an important concern in medical practice since high morbidity and mortality in immunocompromised patients that their infections produce. Additionally, they cause an increased cost to the patient and medical centres generating complications and a longer hospital permanency.

The information that allows bacteria to develop a mechanism of resistance is found in its genome, having the ability to be transferred in horizontal way to other bacteria. In order to improve pathogen control protocols associated with this type of infection the development of a procedure for the dynamic tracing of nosocomial species is needed, establishing a constant feedback of information regarding their existence and environmental phenomena involved in its appearance. This method should include identifying the genes responsible for antimicrobial resistance in different species and analyze their epidemiological relationship, looking for safeguarding public and animal health.

The objective of this work is to analyze sixty-seven samples obtained between 2007 and 2008 from clinical veterinary centers of the University of Chile and identify the most frequent genes that conferred resistance to the beta-lactam antimicrobials (ampicillin and methicillin), through a polymerase chain reaction (PCR) assay.

Amplification by PCR detected DNA fragments from the *bla*<sub>TEM</sub> gene in Gram-negative and Gram-positive bacteria. Also the *mecA* gene was detected in Gram-positive bacteria. These findings argue that a high number of bacteria express these genes, which should generate great concern to those responsible for the veterinary hospital locations of the University of Chile. Furthermore, as a preventive measure many efforts should be made in order to solve this problem.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

El uso de antimicrobianos ha tenido una alta repercusión en medicina. Desde el descubrimiento del primer antibiótico (penicilina) y las primeras moléculas quimioterapéuticas (sulfas), estos fármacos han sido utilizados para controlar infecciones, gracias a su capacidad para inhibir o destruir bacterias que amenazan la vida. Sin embargo, las bacterias, a través de información contenida en sus genes, poseen o han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia en contra de los antimicrobianos. Estos mecanismos han limitado el efecto que producen los antimicrobianos sobre las bacterias, transformándose en un desafío muy importante tanto para los médicos que se enfrentan a enfermedades de tratamiento complicado, como para los laboratorios farmacéuticos que deben generar fármacos más eficientes.

El uso indiscriminado de antibióticos, no sólo ha provocado que se seleccionen aquellas bacterias resistentes en las poblaciones microbianas, sino que además causa limitaciones en la terapia antimicrobiana. Es por esta razón que desde el descubrimiento del primer mecanismo de resistencia a penicilinas por Abraham y Chain en 1940, científicos expertos han expuesto su preocupación en cuanto al uso irracional de los antimicrobianos, para así intentar atenuar la presión selectiva que fomenta el desarrollo de mecanismos de resistencia y tener la mayor cantidad de recursos terapéuticos para combatir a las bacterias.

En los recintos hospitalarios el problema de la resistencia se incrementa cada año, debido a la existencia de bacterias nosocomiales, que corresponden a aquellas que son adquiridas dentro de un recinto hospitalario y cuya manifestación, ocurre 48-72 horas después del ingreso del paciente, generando una infección nosocomial (OMS, 2003). Este tipo de infecciones causadas por bacterias ubicuas, oportunistas y altamente resistentes han adquirido gran importancia en la práctica médica y son las que afectan especialmente al paciente inmuno-comprometido, prototipo en las unidades de cuidados intensivos. Así, lo anterior podría explicar su alta tasa de transmisión.

Las bacterias nosocomiales generan infecciones de alta morbilidad y mortalidad debido a que poseen fenotipos de multiresistencia. Es decir, resisten o inhiben la acción de dos o más antimicrobianos, por lo cual su tratamiento y control es muy limitado. Así, afectan entre un 5 y 10% la evolución y recuperación de los cuadros clínicos de los pacientes hospitalizados, generando mayores tiempos de permanencia en los recintos hospitalarios y mayores costos por tratamientos.

En este contexto, los antimicrobianos pertenecientes al grupo de los  $\beta$ -lactámicos han visto limitada su actividad en el tratamiento de infecciones por el incremento de bacterias resistentes. Estos antimicrobianos son indicados para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos susceptibles, llegando a ser el grupo de antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, lo cual se traduce en un gran problema tanto en salud pública humana como salud animal. Además, se ha determinado que los factores que han contribuido en el incremento de infecciones nosocomiales en los hospitales de medicina humana, demuestran semejanzas con los encontrados en medicina veterinaria.

En consecuencia, se han orientado esfuerzos en complementar la vigilancia epidemiológica de resistencia a antimicrobianos, mediante técnicas de diagnóstico molecular, para desarrollar nuevas estrategias de control. Actualmente, en medicina humana se han descrito gran cantidad de estudios muy variados, a diferencia de lo que ocurre en la medicina veterinaria dentro de Chile.

De acuerdo a lo anterior, en esta Memoria de Título y utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se detectaron dos genes (*mecA* y *bla<sub>TEM</sub>*) involucrados en la resistencia a los antimicrobianos meticilina y ampicilina, en bacterias descritas como nosocomiales. Esto permitirá realizar una aproximación de la situación que presentan estos genes en los recintos hospitalarios de la Universidad de Chile y un primer acercamiento del tema en medicina veterinaria dentro del país, para así desarrollar futuros estudios epidemiológicos que determinen el comportamiento de estos genes en las poblaciones bacterianas.

## **2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.- INFECCIONES NOSOCOMIALES. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA.**

Las infecciones tienen diferentes agentes etiológicos: bacterias, virus, parásitos y hongos. En el caso de las bacterias, éstas pueden transmitirse constantemente entre animales, sin constituir necesariamente un riesgo para la salud. Sin embargo, en el medioambiente intrahospitalario se establecen poblaciones bacterianas que coexisten bajo un medioambiente altamente variable y exigente, que las expone a diversas situaciones de estrés, lo cual como fuerza de presión selectiva, ha sido la causa fundamental en la aparición de cepas bacterianas altamente resistentes (Vali *et al.*, 2008).

Esta situación se produce generalmente bajo un régimen de antimicrobianos o procedimientos invasivos con la utilización de antisépticos por largos periodos de tiempo. Esto favorece la multiplicación de aquellas bacterias infectantes, con el potencial genético-molecular para resistir terapias antimicrobianas, pudiendo generar infecciones graves que comprometen la sobrevivencia y recuperación de los pacientes por la naturaleza del proceso infeccioso y su deficiente respuesta al tratamiento (Stickler, 2002).

La adquisición de agentes bacterianos multiresistentes como comensales es la primera etapa en la patogénesis de la infección nosocomial. Dentro de esto, el sistema inmune del hospedero juega un rol esencial, pues las bacterias no sólo deben utilizar su energía para resistir la acción de los antimicrobianos, sino que además moléculas propias del hospedero (DHQP, 2001). Por lo tanto, la adquisición de estas infecciones ocurre principalmente en individuos inmuno-comprometidos (Stickler, 2002).

El Centro de Prevención y Control de Enfermedades de E.E.U.U. (CDC, 2008), define la infección nosocomial como una reacción adversa resultante de una condición sistémica o localizada debido a la presencia de un agente infeccioso o su toxina. No debe existir evidencia que el agente infeccioso se encontraba presente o se estaba incubando antes de la entrada del paciente al recinto hospitalario.

Para ser clasificada como una infección, esta condición debe manifestarse como una enfermedad clínica y no como una simple colonización, la cual significa que existen microorganismos presentes, pero éstos no ejercen efectos adversos en el hospedero. Sin embargo, un paciente asintomático puede considerarse infectado si los microorganismos patógenos son encontrados en algún sitio del cuerpo que normalmente es estéril, como el líquido cerebroespinal o la sangre (Emori y Gaynes, 1993).

Se ha descrito que más del 70% de las bacterias causantes de infecciones nosocomiales son resistentes a uno o más de los antibióticos comúnmente usados en su tratamiento. Estos microorganismos son causantes de un incremento en los costos de cuidados médicos y de estadía en el hospital (Muto *et al.*, 2003) y además pueden ser transmitidos por los pacientes al personal de atención de salud, a los visitantes y a la comunidad después del alta hospitalaria, existiendo la posibilidad de causar graves enfermedades en la comunidad. (OMS, 2003).

La incidencia de las infecciones nosocomiales es altísima en gran parte de los países en desarrollo, debido a la falta de supervisión, a las escasas prácticas preventivas de infecciones y a la alta densidad poblacional que existe en algunos de los hospitales (Tietjen *et al.*, 2003a). Algunos estudios han indicado que las infecciones nosocomiales ocurren en un 5% a 10% de todas las hospitalizaciones en Europa y Norteamérica, y en más de un 40% de las hospitalizaciones en diferentes partes de Asia, Latinoamérica y Sudáfrica (Raka *et al.*, 2006). A su vez, una encuesta de prevalencia realizada en 55 hospitales de 14 países diferentes, mostró que un promedio de 8,7% de los pacientes hospitalizados presentan infecciones nosocomiales (OMS, 2003).

## **2.2.- AGENTES BACTERIANOS NOSOCOMIALES Y CUADROS CLÍNICOS.**

Las bacterias causantes de infecciones nosocomiales han sufrido grandes cambios a lo largo del tiempo y en un inicio, los patógenos predominantes detectados fueron principalmente Gram positivos. Luego, con la introducción de los antibióticos se produjo una disminución de estas infecciones, pasando a ser producidas mayoritariamente por bacterias Gram negativas (Alpuche y Daza, 2002). Sin embargo, en algunos países los patógenos Gram

positivos predominan por sobre el 60% mientras que los Gram negativos no alcanzan el 30% (Morfin *et al.*, 2002).

Los agentes bacterianos, descritos como nosocomiales, más abundantes -tanto en medicina humana como en medicina veterinaria- son los siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*; *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y otros enterococos: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Proteus spp.* (OPS, 2005) (Cuadro 1)

Todas las bacterias mencionadas tienen cuadros clínicos descritos: neumonías asociadas a ventilación mecánica, infecciones sanguíneas asociadas a catéteres intravenosos e infecciones del tracto urinario asociado a sondas urinarias (Rosenthal *et al.*, 2006). Además de éstas, se ha determinado que las infecciones de sitios intervenidos quirúrgicamente también son una importante causa de infección nosocomial, y tienen una alta frecuencia en los hospitales humanos (Tietjen *et al.*, 2003b). En el caso de la medicina veterinaria las publicaciones son escasas, pero los estudios revelan resultados similares a los de medicina humana, mencionando a las infecciones del tracto urinario e infecciones de heridas quirúrgicas como las más importantes (Ogeer-Gyles *et al.*, 2006).

En general, las bacterias nosocomiales son consideradas microorganismos multiresistentes, es decir son resistentes a dos o más antimicrobianos. Se describe gran cantidad de organismos multiresistentes que tienen importancia epidemiológica. Entre ellos destacan: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y enterococos resistentes a vancomicina (ERV), aunque su nombre sugiere resistencia sólo a un antimicrobiano, éstos además poseen resistencia a otros antimicrobianos, por lo que su hallazgo ó detección debe ser una preocupación constante en hospitales y clínicas (CDC, 2008).

**Cuadro 1.- Infecciones descritas según bacteria nosocomial.**

Especie bacteriana	Cuadros clínicos descritos (Referencias)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriemia, infección de heridas quirúrgicas, endocarditis, endoftalmitis, meningitis. (Yamamoto <i>et al.</i> , 1988).
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	Pioderma, endocarditis, infección de heridas quirúrgicas, otitis. (Sasaki <i>et al.</i> , 2007).
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infección de heridas quirúrgicas, peritonitis (Lee <i>et al.</i> , 2003a; Lee <i>et al.</i> , 2003b; Roberts <i>et al.</i> , 2006).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infección del tracto urinario asociado a catéteres, neumonías asociadas a ventiladores respiratorios o máquinas de anestesia inhalatoria, bacteriemia (Hosein <i>et al.</i> , 2002; Sekiguchi <i>et al.</i> , 2005).
<i>Escherichia coli</i>	Infección del tracto urinario bajo e infección de heridas quirúrgicas (Nolan <i>et al.</i> , 1987; Sánchez <i>et al.</i> , 2002).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, infección del tracto urinario, infección de heridas, bacteriemia (Fang <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 2008).
<i>Serratia marcescens</i>	Bacteriemia, endocarditis, osteomielitis, meningitis, infección de heridas e infección de tractos respiratorio y urinario (Matsuo <i>et al.</i> , 2008).
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>	Infecciones del tracto respiratorio y urinario, bacteriemia, endocarditis, infección de heridas, peritonitis, meningitis, enteritis, osteomielitis (Kim <i>et al.</i> , 2003).
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio y urinario bajo, infecciones a la piel, endocarditis, peritonitis, infecciones de sistema nervioso central y ojo, osteomielitis y artritis séptica (Sanders y Sanders, 1997).
<i>Proteus mirabilis</i>	Infecciones del tracto urinario bajo, pielonefritis, cálculos vesicales y/o renales asociados y bacteriemia (Stickler, 2002).
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Neumonías asociadas a ventiladores o máquinas de anestesia, bacteriemia, infecciones de la piel y tejidos blandos asociados a heridas o quemaduras, infecciones del tracto urinario bajo, endocarditis, meningitis y queratitis (Peleg <i>et al.</i> , 2008).

Entre otros agentes bacterianos que poseen características de multiresistencia se encuentran: *Streptococcus pneumoniae* multiresistentes (SPM) que resisten la acción de las penicilinas y a un gran espectro de agentes antimicrobianos como: macrólidos y fluoroquinolonas; algunos bacilos Gram-negativos multiresistentes (BGN-MR) especialmente los productores de betalactamasas de espectro extendido (BLsEE) (Jacoby y Munoz-Price, 2005), y por último *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (SARV) que han desarrollado gran preocupación en la práctica médica (Pascual *et al.*, 2001), pues la vancomicina es un antimicrobiano de resguardo para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* (CDC, 2008).

Así, entre las bacterias con mayor importancia clínico-epidemiológica se encuentran los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y algunos *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV), que han generado una gran preocupación en la práctica médica. Dentro de los *Enterococcus* spp., son especialmente importantes los *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, ambos Gram-positivos (Boerlin *et al.*, 2001). Finalmente, entre las bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* indiscutiblemente ha desarrollado una gran importancia, y a su vez, las Enterobacterias le siguen en interés (DHQP, 2001).

### **2.3.- FACTORES DE RIESGO, FORMAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN**

Dentro de los recintos hospitalarios las bacterias nosocomiales, pueden ser adquiridas por los pacientes a través de un mecanismo de transmisión cruzada, es decir, desde otros animales hospitalizados que constantemente liberan microorganismos al medio ambiente. Otra forma de transmisión es a través de los objetos inanimados como estetoscopios, sondas de ultrasonido, catéteres urinarios e intravenosos. Sin embargo, la principal fuente de infección nosocomial corresponde a las manos del personal médico, lo que se debería a la inadecuada desinfección de sus manos entre la manipulación de los distintos pacientes (OMS, 2003).



Los factores de riesgo que favorecen la adquisición y diseminación de este tipo de patógenos en el ambiente intrahospitalario son (Hosein *et al.*, 2002):

- Escaso control del movimiento de pacientes y personal entre las salas y hospitales.
- Paciente inmunocomprometido o con enfermedad subyacente grave.
- No adopción de prácticas de higiene y desinfección por parte del personal.
- Admisión de pacientes bajo tratamiento antibiótico inadecuado para un patógeno de la comunidad altamente resistente.
- Inadecuada toma y procesamiento de muestras para identificar el patógeno causal de un brote, a su vez procedimientos invasivos.
- Instauración de tratamiento antimicrobiano incorrecto en términos de molécula terapéutica, dosis, ritmo horario, vía de administración y patógeno objetivo.
- Uso inadecuado de biocidas considerando lugar de aplicación, concentración, tiempo e interacción con otros agentes.
- Omisión de medidas mínimas de desinfección de alto nivel y esterilización en el instrumental médico y quirúrgico.

Considerando que las bacterias nosocomiales son oportunistas, que infectan y causan complicaciones de procesos patológicos ya existentes, deben ser abordadas estratégicamente. Por lo tanto, es importante que para la prevención y control de estas bacterias se tomen las medidas de bioseguridad necesarias. Un paso fundamental es tener medidas de control rigurosas en cuanto al uso clínico de antimicrobianos y medidas que prevengan la transmisión de patógenos que ya son resistentes (Alpuche y Daza, 2002).

Sin duda, la prevención es el factor más importante para el control de estas infecciones. A pesar del enorme esfuerzo realizado por el equipo médico y asistencial de los hospitales, por disminuir la prevalencia de infecciones nosocomiales, se ha visto que éstas siguen manifestándose en los pacientes hospitalizados y que además, pueden afectar al personal del lugar. Lo anterior se ha reflejado en que gran parte de los profesionales que trabajan en los hospitales algunas veces actúan como vectores de la enfermedad, diseminando la infección (Saloojee y Steenhoff, 2001).

Las medidas instauradas como parte de un programa de control buscan limitar la transmisión de microorganismos entre los pacientes por medio de: 1) prácticas adecuadas de lavado de manos, uso de guantes y mascarillas, 2) estrategias de aislamiento, 3) limitar el riesgo de infecciones endógenas reduciendo al mínimo los procedimientos invasivos y fomentando el uso apropiado de antimicrobianos y 4) vigilar las infecciones, identificando los brotes y controlando a los agentes responsables (DHQP, 2001; Ducel *et al.*, 2003).

En general se recomienda al equipo médico y asistencial de los hospitales implementar un protocolo de limpieza, considerando la frecuencia de aseo, tipos de desinfectantes, práctica de lavado de manos y el uso de técnicas asépticas en el manejo de dispositivos invasivos. Además, se deben establecer barreras de protección entre animales, disminuir los tiempos de hospitalización y determinar los posibles vectores de microorganismos (Johnson, 2002).

## **2.4- RESISTENCIA BACTERIANA**

### **2.4.1.- Desarrollo e importancia de la resistencia en las infecciones nosocomiales.**

Históricamente, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos se definía como la infección bacteriana persistente, a pesar de la administración de una dosis adecuada de un antimicrobiano específico. Más tarde, se modificó esta definición al relacionar la resistencia con la concentración del antimicrobiano en el sitio de acción. Así, la resistencia podría ser parcial o relativa.

La resistencia bacteriana representa la capacidad de los microorganismos de inhibir la acción de los antimicrobianos. Actualmente, una bacteria se considera resistente cuando las concentraciones de un antimicrobiano necesarias para inhibir el crecimiento de ella *in vitro*, son mayores que las concentraciones alcanzadas en suero o en tejidos, medidos por la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Sussmann *et al.*, 2003).

La información que permite que una bacteria desarrolle un mecanismo de resistencia se encuentra en su material genético. La aparición y diseminación de mecanismos de resistencia se ve favorecida por la capacidad que poseen las bacterias de modificar su

material genético o de recibir material genético de forma horizontal por parte de otras bacterias (Alpuche y Daza, 2002, Sussmann *et al.*, 2003).

Es sabido que todo fenómeno de resistencia tiene una base genética, ya sea por mutaciones, por adquisición de genes de resistencia que se transfieren entre bacterias o por una combinación de ambos mecanismos. Los genes de resistencia pueden estar presentes en bacterias patógenas, comensales o zoonóticas, pero la incidencia de estos genes varía considerablemente entre las especies bacterianas e incluso entre subespecies. Por ejemplo, las bacterias Gram-positivas, exceptuando a estafilococos y enterococos, a menudo carecen de la habilidad de adquirir plásmidos que contengan genes de resistencia (plásmidos-R) (EMEA, 1999).

La presencia de un gen de resistencia no necesariamente conduce al fracaso del tratamiento (Milatovic y Bravendy, 1987), pues el nivel de expresión puede ser bajo. Así, la producción de  $\beta$ -lactamasa por parte de una bacteria es conocida, pero el desarrollo de resistencia es dependiente del modo y el nivel de expresión del gen responsable (Livermore, 1987; Lui *et al.*, 1992).

El uso masificado de antimicrobianos, irracional y sin justificación, permite que poco tiempo después de su utilización, surjan cepas resistentes de varias especies bacterianas (Poole, 2005; Cabrera *et al.*, 2007). Según Johnson (2002), los organismos nosocomiales en hospitales humanos y el patrón de resistencia antimicrobiana dentro de estos establecimientos cambian cuando el uso de antibióticos específicos es restringido. Es por esta razón que se ha hecho necesario utilizar los antimicrobianos con un criterio mayor, que englobe tanto la experiencia médico/profesional, como el marco teórico en cada alternativa terapéutica. En la actualidad, moléculas tan novedosas como el moxifloxacino, las cefalosporinas de espectro extendido, los derivados carbapenémicos y monobactámicos, se muestran inefectivos al momento de tratar infecciones bacterianas, especialmente las nosocomiales (DHQP, 2001).

Los microorganismos resistentes a cierto antimicrobiano pueden también adquirir resistencia a otros antimicrobianos que comparten un mecanismo de acción. Tales relaciones, conocidas como resistencia cruzada, ocurren frente a agentes que están estrechamente relacionados en su fórmula química, como por ejemplo neomicina-kanamicina. También puede existir resistencia cruzada entre químicos no relacionados (como eritromicina-lincomicina). La resistencia cruzada, junto a la posibilidad de adquisición de material genético que confiera resistencia a más de un tipo de antimicrobiano, posibilita la aparición de bacterias multiresistentes, frente a las cuales se reduce la cantidad de antimicrobianos efectivos (Borneman, 2002).

La resistencia múltiple a antimicrobianos ha sido demostrada en bacterias nosocomiales en hospitales veterinarios y es más frecuente en pacientes que han sido tratados previamente con dichos antibióticos (Johnson, 2002).

En hospitales, donde el uso de antimicrobianos es común, bacterias con resistencia a los antibióticos tienen una ventaja selectiva en comparación a otras poblaciones bacterianas. Es la amplia aplicación de antimicrobianos en la práctica de la medicina veterinaria, el uso de antibióticos en agricultura (antibióticos como avoparcina o tetraciclina) y el uso de antisépticos y desinfectantes, los que provocarían esta presión selectiva en las bacterias (Johnson, 2002).

El desarrollo de resistencia bacteriana está basado, principalmente, en la prevalencia de genes de resistencia en las poblaciones bacterianas y en el mal uso de los antimicrobianos, que generan una presión selectiva sobre las bacterias con fenotipos de resistencia. Es decir, los medicamentos antimicrobianos no generan resistencia, pero sí favorecen la supervivencia de microorganismos resistentes, por un proceso de selección natural (OMS, 2003).

Generalmente, este fenómeno ocurre en países en desarrollo, en donde no sólo se utilizan mal los antimicrobianos sino que con frecuencia se emplean de modo insuficiente a causa de las limitaciones financieras (OMS, 2003).

Los fenómenos de resistencia bacteriana no sólo amenazan el éxito de nuevos tratamientos antibióticos y la efectividad de las medidas de bioseguridad, también lo hacen afectando directamente la inocuidad de diversos productos de origen animal. Se han descrito casos de transmisión hacia la especie humana, desde bacterias potencialmente peligrosas, a través de alimentos y por contacto directo (Duquette y Nuttall, 2004).

#### **2.4.2.- Mecanismos de transferencia de información genética entre bacterias.**

En general, existen dos formas diferentes de adquirir resistencia, la intrínseca (vertical) y la adquirida. La resistencia intrínseca a un antimicrobiano en algunas especies es de carácter natural, ya sea porque carecen de los mecanismos celulares en los cuales el fármaco ejerce su acción o porque la pared celular bacteriana es impermeable a esa droga (Ayats, 2003; Errecalde, 2004).

La resistencia adquirida, por otra parte, se puede originar mediante mutación o por la transferencia de material genético que codifique resistencia a un determinado antimicrobiano. Las mutaciones pueden ser transferidas verticalmente a las células hijas, mientras que la transferencia horizontal, que permite la transferencia de material genético entre bacterias de la misma especie o de especies distintas, se da a través de los mecanismos de conjugación, transducción y transformación. Dentro de éstos, la conjugación es la forma de transferencia más común, y consiste en el traspaso de material genético gracias a la presencia de pilis sexuales (Ayats, 2003; Errecalde, 2004).

La conjugación es un sistema de transferencia fundamental para los procariontes, que permite el traspaso de elementos conjugativos como plásmidos y transposones. Estos requieren grupos complejos de genes que codifican el sistema de transferencia y subsiguiente establecimiento en la célula receptora de dichos elementos. Este fenómeno se sustenta en el reconocimiento celular y establecimiento de un apareamiento estable, facilitado por elementos especializados, dentro de los que se describe un pili sexual para bacterias Gram-negativas y una sustancia agregante (SA) de naturaleza proteica en Gram-positivas. Una vez conseguido este apareamiento, se forma un poro conjugativo, a través del cual se transfiere ADN de hebra simple sólo o un complejo nucleoprotéico (relaxoma).

El proceso finaliza con la síntesis de hebras complementarias a la hebra simple en el donante y receptor (Wilkins y Frost, 2002).

Los pilis reconocen a la célula receptora y establecen contacto por retracción, existiendo sistemas sin esta propiedad, y al igual que Gram-positivas necesitan colisionar para aparearse de forma estable. La SA reconoce el ácido lipoteicoico del receptor gracias a que forma una película en la superficie del donante. En el proceso se pueden transferir una serie de entidades genéticas como transposones conjugativos e integrones (incluidos en plasmidos conjugativos o movilizables) e incluso la transferencia de grandes segmentos genéticos (Wilkins y Frost, 2002).

Los elementos movilizables sólo codifican los genes del relaxoma y no los correspondientes al poro conjugativo (transferoma), en consecuencia, deben movilizarse junto a otros elementos conjugativos en un mismo evento, aprovechando el puente intercelular generado por éstos (Salyers *et al.*, 1995).

Los transposones conjugativos son elementos auto-transferibles incorporados en el genoma con características únicas en sus mecanismos de escisión e integración, esenciales para la transferencia. Su escisionasa (Xis) corta cada extremo del elemento dejando secuencias de acoplamiento, que se unen covalentemente para formar un intermediario circular (transferible intacto o como una estructura monocatenaria), mientras que la integrasa (int) corta e incorpora las secuencias de acoplamiento al sitio blanco (Salyers *et al.*, 1995).

Los integrones son unidades genéticas móviles que poseen en sus extremos secuencias altamente conservadas que abrazan una región variable en la que se insertan “cassettes” génicos. En el extremo 5´ se encuentra codificada la ADN integrasa, enzima responsable de la integración sitio-específica de este elemento en el ADN bacteriano, determinando según sus características cuatro clases de integrones (I-IV). En el extremo 3´ se encuentra codificado el gen *qacE* o su variante defectuosa *qacEΔ1*. Estos elementos son capaces de incorporar varias unidades génicas e inducir su expresión conjunta a modo de unidad transcripcional (operón). Esto último determina que el elemento posea distintas longitudes

y codifique distintos fenotipos, según el número y naturaleza de los genes insertados (Stokes y Hall, 1989).

#### **2.4.3.- Mecanismo de resistencia en contra de los antimicrobianos.**

En relación a los mecanismos de resistencia, desde el punto de vista molecular y bioquímico, se han descrito a lo menos cuatro (Sussmann *et al.*, 2004; Jenkinson, 1996), pudiendo una cepa bacteriana utilizar uno, varios combinados o todos. Estos mecanismos son:

**A) Inactivación de la droga:** este mecanismo de resistencia consiste en la producción de enzimas que destruyen el antimicrobiano mediante hidrólisis, como por ejemplo las  $\beta$ -lactamasas producidas por una gran variedad de bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas como estafilococos y estreptococos. Por otro lado, algunas bacterias tienen la capacidad de producir enzimas que modifican la estructura de los antimicrobianos, como es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, las que se han detectado en bacilos Gram-negativos del grupo de las enterobacterias.

**B) Alteración del sitio blanco del antimicrobiano:** este mecanismo consiste en la modificación del sitio de acción del fármaco, de manera tal que ya no es significativamente afectada por la droga (Ej.: proteínas fijadoras de penicilina [PBPs]), o bien, alternativamente, la producción de dicha molécula puede estar amplificadas a niveles tales que la dosis es insuficiente.

**C) Eflujo activo de la droga:** es un tipo especial de exclusión, en el que la molécula que inicialmente ingresa a la célula bacteriana, a través de la membrana celular, es transportada de vuelta al medio extracelular, evitando así que la molécula alcance su sitio de acción. Este mecanismo ha sido descrito como el responsable de la resistencia a tetraciclina entre bacilos Gram-negativos y también en cocos Gram-positivos del género *Staphylococcus*.

**D) Disminución de la entrada del fármaco a la bacteria:** la célula bacteriana puede impedir que un antimicrobiano alcance una concentración adecuada en el sitio de acción, evitando su entrada al medio intracelular, a través de tres mecanismos:

- 1) Permeabilidad de la membrana externa: claramente definida en los microorganismos Gram-negativos, que poseen una membrana externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de algunas drogas antimicrobianas.
- 2) Permeabilidad de la membrana interna: otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico, que lleva al antimicrobiano hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.
- 3) Porinas: son canales de difusión presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-positivas. De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antimicrobiano.

## **2.5.- ANTIMICROBIANOS**

Los antimicrobianos son productos químicos naturales, semi sintéticos o sintéticos que matan o enlentecen el crecimiento de los microorganismos (CDC, 2008). Los antibióticos (del griego: anti, “contra”; bios, “vida”) son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (como bacterias y hongos) o sintetizados por métodos de laboratorio, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente de sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Cordies *et al.*, 1998).

**2.5.1.- Mecanismos de acción de los antimicrobianos:** Se pueden clasificar básicamente en 5 tipos (Hosein, 2002):

**A.- Inhibición de la síntesis de la pared celular:** la pared celular proporciona, entre otras cosas, protección ante la gran presión osmótica en el interior de la célula, por lo que al ser inhibida o encontrarse defectuosa, la célula sufrirá lisis. Las penicilinas y cefalosporinas



son antimicrobianos que utilizan este mecanismo, siendo efectivos contra bacterias Gram-positivas por la alta presión osmótica en el interior de este tipo de bacterias y tener una gran proporción de peptidoglicano en la pared celular, a diferencia de las bacterias Gram-negativas que, además de tener baja presión osmótica, poseen estructuras en la pared que los protegen de estos antimicrobianos.

**B.- Alteración de la membrana celular:** las sustancias que alteran esta estructura, como las polimixinas, modifican la permeabilidad, permitiendo la salida de iones K y macromoléculas, con el consiguiente efecto lítico.

**C.- Inhibición de la síntesis proteica:** por ejemplo, los aminoglucósidos se unen a subunidades ribosómicas lo que lleva a una síntesis errónea de proteínas.

**D.- Alteración de la síntesis de ácidos nucleicos:** producen inhibición de enzimas que son necesarias para la replicación, recombinación y reparación del ADN. Por ejemplo, las quinolonas y fluoroquinolonas inhiben la enzima girasa, lo que trae como consecuencia la fragmentación del ADN bacteriano y la consiguiente muerte celular.

**E.- Inhibidores del metabolismo intermediario:** como las sulfonamidas, que compiten con el ácido p-aminobenzoico, bloqueando la síntesis del ácido fólico bacteriano, inhibiendo el crecimiento y reproducción del germen.

## **2.6.- LOS $\beta$ -LACTÁMICOS**

Bajo esta denominación se agrupa un número continuamente creciente de antimicrobianos, cuyo origen se remonta a 1928, cuando Alexander Fleming descubrió una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Forman el grupo de antimicrobianos más usados en clínica, entre los cuales destacan las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e inhibidores de la beta-lactamasa, entre otros (Mediavilla y García-Lobo, 2004). Dentro de su estructura molecular, tienen en común el anillo  $\beta$ -lactámico, asociado a otro anillo tiazolidínico, formando el ácido 6-aminopenicilánico responsable de la actividad

biológica. A él se le asocia una cadena lateral que otorga las características antimicrobianas y farmacocinéticas a los diferentes derivados antimicrobianos (Mediavilla y García-Lobo, 2004).

La acción de los  $\beta$ -lactámicos se desarrolla mediante la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, actúan en la etapa final de la formación de peptidoglicano, llamada “transpeptidación”. Los  $\beta$ -lactámicos son análogos de un aminoácido precursor de la barrera de peptidoglicano, la D-alanil-D-alanina, por lo tanto compiten por el sitio activo de una enzima llamada “Proteína Ligadora de Penicilina” (PLP), la cual actúa en el entrecruzamiento del peptidoglicano. Entonces los  $\beta$ -lactámicos se unen covalentemente al sitio activo de las PLP, lo que produce la inactivación irreversible de la enzima, deteniendo la formación de peptidoglicano y produciendo la lisis osmótica de la célula bacteriana (Mediavilla y García-Lobo, 2004).

La introducción de un grupo dimetoxifenil a la cadena lateral de las penicilinas dio origen a la meticilina, que es resistente a la inactivación enzimática producida por las beta-lactamasas de *Staphylococcus aureus*. Al agregar un grupo amino a la cadena lateral de las bencilpenicilinas, se crearon las aminopenicilinas, a razón de ampliar el espectro de acción de las penicilinas. La ampicilina, que pertenece a este grupo, es efectiva en contra de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae* (Mediavilla y García-Lobo, 2004).

### **2.6.1.- Resistencia de las bacterias a los $\beta$ -lactámicos meticilina y ampicilina**

El mecanismo más importante de resistencia a  $\beta$ -lactámicos es la producción de  $\beta$ -lactamasas, que consisten en enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de estos antimicrobianos y los convierten en compuestos biológicamente inactivos. Son producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Mediavilla y García-Lobo, 2004) y en la actualidad se conoce una gran variedad de  $\beta$ -lactamasas que se dividen en cuatro clases moleculares: 1) clase A, representada por  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM; 2) clase B, representada por metaloenzimas poco frecuentes; 3) clase C, representadas por cefalosporinasas de enterobacterias, y 4) clase D, representada por las cloxacilinasas.

El gen *bla*<sub>TEM</sub> codifica las β-lactamasas más importantes en cuanto al desarrollo de resistencia a β-lactámicos. El término TEM fue nombrado gracias a Temoniera, paciente desde donde fue aislada la primera bacteria con características de resistencia a β-lactámicos (Mediavilla y García-Lobo, 2004).

El caso más característico de resistencia por alteración de los sitios de acción, es la resistencia a meticilina en *S.aureus*. La meticilina se une con gran afinidad a la PBP 2 de *S.aureus* produciendo la lisis de la bacteria. Son frecuentes los aislamientos de cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina que, además de su PBP2 normal, presentan una PBP2a, que tiene muy baja afinidad por meticilina, siendo resistentes a este antimicrobiano (Mediavilla y García-Lobo, 2004). Esta PBP2a puede desarrollar todas las funciones celulares requeridas pero no permite la unión de los β-lactámicos. Por lo tanto los aislados de *S. aureus meticilino resistentes* (SAMR), son resistentes a todos los β-lactámicos y frecuentemente resistentes a otras clases de antimicrobianos. La PBP2a está codificada por el gen *mecA* que se encuentra en un elemento genético móvil y largo denominado *cassette cromosomal de staphylococcus mec* (CCS *mec*) (Weese, 2005).

## **2.7. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA**

Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de antimicrobianos trae implícito el riesgo de inducir resistencia en las bacterias expuestas, por lo que se hace necesario tomar las medidas pertinentes para disminuir la aparición de este fenómeno. Sin embargo, para que estas medidas sean eficientes, son necesarios estudios previos en lo que se refiere al tipo y cantidad de antimicrobianos utilizados. Además, se debe conocer los niveles de resistencia bacteriana frente a fármacos específicos, caracterizando a las bacterias y sus genes de resistencia, lo que se traduciría en el desarrollo de un sistema de vigilancia constante (OMS, 2003).

Una de las organizaciones internacionales que más se ha esmerado en difundir el uso adecuado de los antimicrobianos ha sido la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el año 1997, realizó un informe entregando una serie de recomendaciones que deberían

cumplir los países para controlar el fenómeno de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria (OMS, 2003).

En enero de 1999, la Organización Panamericana de Salud (OPS) elaboró un programa destinado a países de Latinoamérica, con el fin de crear una base de datos actualizada para determinar la magnitud y repercusión de la resistencia a antimicrobianos, proponiendo medidas eficaces y dinámicas de control, apoyándose en registro de datos precisos y procedimientos diagnósticos estandarizados por laboratorios de referencia nacionales e internacionales (OPS, 1999).

El proyecto de la OMS para el 2005 incorporó la vigilancia de varias especies de interés médico de las cuales podemos mencionar *Campylobacter spp.*; *E. coli uropatógena*, *Salmonella spp.*; *Shigella spp.*; *Vibrio cholerae* O1 y O139 (enterobacterias), *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, más los  $\beta$ -hemolíticos (patógenos adquiridos en la comunidad); junto a *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*; *E. faecium*, *E.faecalis* y otros enterococos, *E. cloacae*, *K pneumoniae*, *S. marcescens* y *Proteus spp.* (Patógenos nosocomiales) (OPS, 2005).

### **2.7.1. Técnicas de genética molecular**

El estudio y seguimiento de estos genes que otorgan resistencia se ha realizado gracias a la implementación de técnicas de genética molecular. Estas técnicas permiten detectar zonas de interés en el genoma del microorganismo.

Los métodos de análisis de ácidos nucleicos han atraído la atención del mundo científico en forma creciente en los últimos años y cada día se usan más en los laboratorios como pruebas de diagnóstico rutinario. Dentro de las ventajas de estas técnicas están: no necesitan largos procesos de aislamiento bacteriano, son capaces de detectar organismos no viables, e incluso encuentran alteraciones del material genético (Wolcott, 1992).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consiste en la síntesis *in vitro* de una secuencia blanco de ADN de manera repetitiva, gracias al uso de partidores (secuencia de

nucleótidos altamente específica) que reconocen pequeñas secuencias complementarias que flanquean el segmento del genoma a amplificar. Esto se logró mediante el uso de la *Taq polimerasa*, enzima de la bacteria *Thermophilus aquaticus* que es capaz de incorporar nucleótidos libres al extremo 3' del partidor, generando copias de la secuencia blanco de manera exponencial, en intervalos cortos de tiempo y a temperaturas elevadas. Se caracteriza por su termoestabilidad, alta procesividad y fidelidad (Mullis y Faloona, 1987).

La técnica de PCR consiste en la repetición consecutiva de 3 pasos básicos, que en conjunto conforman un ciclo. Primero, el ADN blanco se denatura, generándose dos hebras simples. Este proceso se lleva a cabo a temperaturas que varían entre los 90 y 96°C. El segundo paso es la hibridación o “annealing” en el cual los partidores, se unen a ésta. La temperatura de esta etapa es específica de cada partidor. La tercera y última etapa es la síntesis del ADN gracias a la acción de una polimerasa termoestable, la cual comenzando desde los partidores, “lee” la hebra blanco, y va uniendo nucleótidos que formarán la hebra complementaria a ésta. El resultado son dos hebras dobles de ADN, conformadas por la hebra original, y la nueva hebra formada, las cuales serán la hebra blanco o molde del ciclo siguiente. Este proceso se repite entre 20 y 40 veces (Wolcott, 1992; Powledge, 2004).

Al finalizar la serie de ciclos se han generado millones de copias de una zona del ADN original, las cuales son visualizadas como bandas al realizar una electroforesis, en la que el ADN se separa de acuerdo a su peso molecular y su carga eléctrica negativa. Las moléculas de ADN son depositadas en un gel de poliacrilamida o agarosa inmerso en una solución buffer, que es sometido a un campo eléctrico. La concentración del gel determina la densidad de la solución, y por tanto, la velocidad con la que se desplazan las moléculas de interés. Efectivamente, mientras menor es el tamaño de los productos de la reacción, más concentrado debe utilizarse el gel, de esta forma, para PCR diagnóstico generalmente se utilizan concentraciones de agarosa al 2% (Danchin y Yuen, 2002; Pennington, 2002; Powledge, 2004).

La contaminación de la muestra con ADN externo, es un problema importante al realizar la prueba de PCR, ya que lleva a la amplificación de material genético inespecífico que es

irrelevante para la prueba. Por esto, en los laboratorios donde se practica esta metodología diagnóstica deben tomarse medidas precautorias para evitar el ingreso de moléculas de ADN contaminantes, especialmente moléculas que provengan de experiencias anteriores a la que se está realizando (Wolcott, 1992; Powledge, 2004).

La detección de los genes de resistencia a antimicrobianos en cepas endémicas permite establecer su relación con elementos genéticos móviles y la relevancia epidemiológica que este fenómeno posee, considerando los mecanismos de recombinación genética que existen (Salyers *et al.*, 1995). En la actualidad, diversos investigadores han realizado seguimientos de los genes de resistencia a antimicrobianos, determinando que los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *mecA* poseen gran relevancia epidemiológica y son detectados con mayor frecuencia en cepas con características fenotípicas de resistencia (Tenover *et al.*, 1994; Wichelhaus *et al.*, 1999; Mediavilla y García-Lobo, 2004)

En Chile, no existen aún investigaciones orientadas a detectar este tipo de genes en medicina veterinaria, y los estudios realizados por el Instituto de Salud Pública (ISP) y otras entidades exponen un incremento de resistencia en antimicrobianos mediante técnicas de microbiología clásica (Pinto, 2002).

En vista del riesgo latente que trae consigo la transmisión de bacterias entre humanos y animales, el aumento de la resistencia bacteriana, la ausencia de programas permanentes de vigilancia y el elevado uso que se hace de los antimicrobianos en Chile, es que este estudio buscó detectar los genes que han sido descritos con mayor frecuencia en medicina humana y que otorgan resistencia a los antimicrobianos previamente descritos, utilizando la técnica de PCR para realizar una primera aproximación a la realidad de la medicina veterinaria en nuestro país.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Detectar dos genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en bacterias nosocomiales mediante técnicas de diagnóstico molecular.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Detectar el gen que otorga resistencia a ampicilina (*bla*<sub>TEM</sub>), en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.
- Detectar el gen que otorga resistencia a meticilina (*mecA*), en bacterias Gram-positivas.

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Esta investigación se realizó en el contexto del proyecto FIV 4602016: “Detección de genes de resistencia a antibióticos y biocidas en bacterias nosocomiales aisladas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile”, desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

##### 4.1 Diseño experimental

Desde diferentes dependencias (salas de hospitalización, consultas, pabellones quirúrgicos y salas de rayos X) de los hospitales clínicos veterinarios de la Universidad de Chile, se tomaron 380 muestras desde diferentes superficies (jaulas, mesones de trabajo, muebles, máquinas de anestesia y de toma de radiografías).

La recolección de muestras se realizó mediante torulados estériles, que se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento, según metodología de microbiología clásica, que brevemente se describe a continuación: **cultivo y aislamiento bacteriano** por diseminación o agotamiento, mediante el método del reloj, en medios de cultivos especiales para dichos fines. Posterior a la incubación de las placas sembradas se procedió al **estudio morfológico y microscópico de las colonias**, el cual permitió conocer el tipo de bacteria desarrollada, (cocáceas o bacilos, Gram positivos o negativos), lo que indicó si la colonia era de interés para el estudio. De ser así, se sembró en un medio de cultivo especial, para asegurar un desarrollo completamente puro de esa cepa. Luego, se replicó en agar semitendido (cepario) y posteriormente se mantuvo en refrigeración hasta la **identificación de la cepa bacteriana**, utilizando un kit diagnóstico comercial (BBL Crystal®). La **determinación de susceptibilidad antimicrobiana**, se realizó mediante el método de difusión en placa de Kirby Bauer, según las normas del “National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 1997), empleando: Ampicilina (A), Amoxicilina+ácido clavulánico (Amc), Oxacilina (Ox), Sulperazona (Sul), Gentamicina (G), Vancomicina (V), Tetraciclina (T), Doxiciclina (D), Enrofloxacino (Enr), Ciprofloxacino (Cip) y Sulfa/trimetoprin (Stx).



## **4.2 Muestras**

Las cepas bacterianas de interés para este estudio cumplieron los siguientes requerimientos: ser bacterias descritas como nosocomiales, cocáceas Gram-positivas y bacilos Gram-negativos, cuyo perfil de susceptibilidad por el método de Kirby Bauer indicó sensibilidad, sensibilidad intermedia y/o resistencia a ampicilina y meticilina, y además de ser multiresistentes (ver 9. ANEXOS). Sesenta y siete cepas bacterianas fueron consideradas como nosocomiales: Gram-negativas (n=28) y Gram-positivas (n=39) y fueron obtenidas desde los hospitales veterinarios de la Universidad de Chile (sedes Bilbao y Facultad) entre los años 2007 y 2008.

## **4.3 Obtención del ADN bacteriano**

La extracción de ADN bacteriano se realizó mediante la utilización de un kit comercial para extracción y purificación (Genomic DNA Purification kit, Fermentas®), desde cultivos de  $10^6$  UFC/ml, concentración obtenida con un refractómetro de McFarlane. Brevemente, a 200  $\mu$ L de cultivo bacteriano, se agregaron 400  $\mu$ L de solución de lisis, se incubó por cinco minutos a 65° C, homogenizando manualmente cada 1,5 minutos. Inmediatamente, se agregaron 600  $\mu$ L de cloroformo mezclando suavemente e invirtiendo cinco veces. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos (Heraus Sepatech Biofuge®).

Al finalizar la centrifugación, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf y se agregaron 800  $\mu$ L de solución de precipitación, se mezcló suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos. El pellet obtenido se resuspendió por adición de 100  $\mu$ L de solución 1,2 M de cloruro de sodio. A esta mezcla, se le agregó 300  $\mu$ L de etanol frío y se mantuvo a -20° C por diez minutos. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por cuatro minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Winkler®). Finalmente, este ADN se usó inmediatamente para realizar la prueba de PCR o bien, se almacenó a 4° C por no más de un mes.

#### 4.4 Detección de genes mediante la técnica de PCR

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 ml y un protocolo que incluyó las temperaturas, el tiempo estimado para cada etapa y el número de ciclos aplicables, según el gen a detectar.

##### 4.4.1 Partidores

- **Gen *mecA***. Se amplificaron segmentos de tamaño conocido de 533 pares de bases (Wichelhaus *et al.*, 1999):

5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C -3'
---------------------------------------

5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C -3'
---------------------------------------

- **Gen *bla*<sub>TEM</sub>** : Se amplificaron segmentos de tamaño conocido de 526 pares de bases (Tenover *et al.*, 1994).

5'- TGG GTG CAC GAG TGG GTT AC -3'
------------------------------------

5'- TTA TCC GCC TCC ATC CAG TC -3'
------------------------------------

##### 4.4.2 Mezcla de la reacción para realizar la prueba de PCR.

Se utilizó un kit 2X PCR Master Mix (Fermentas®), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl<sub>2</sub>. En un tubo Eppendorf de 0,2 mL se adicionó 12,5 µL del Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores y 5 µL de la muestra de ADN, obteniendo un volumen total de 27,5 µL. Se procedió a su homogenización utilizando un vortex para asegurar la mezcla de los reactivos.

#### 4.4.3 Amplificación del ADN

La amplificación de ADN se realizó según los siguientes protocolos:

- **Gen *mecA***: 30 ciclos (94° C por un minuto, 57° C por un minuto y 72° C por dos minutos. Extensión final a 72° C por cinco minutos). El tamaño de banda esperado fue de 533 pares de bases (Wichelhaus *et al.*, 1999).
- **Gen *bla*<sub>TEM</sub>**: 30 ciclos (94° C por dos minutos, 57° C por un minuto y 72° C por dos minutos. Extensión final a 72° C por diez minutos). El tamaño de banda esperado fue de 526 pares de bases (Tenover *et al.*, 1994).

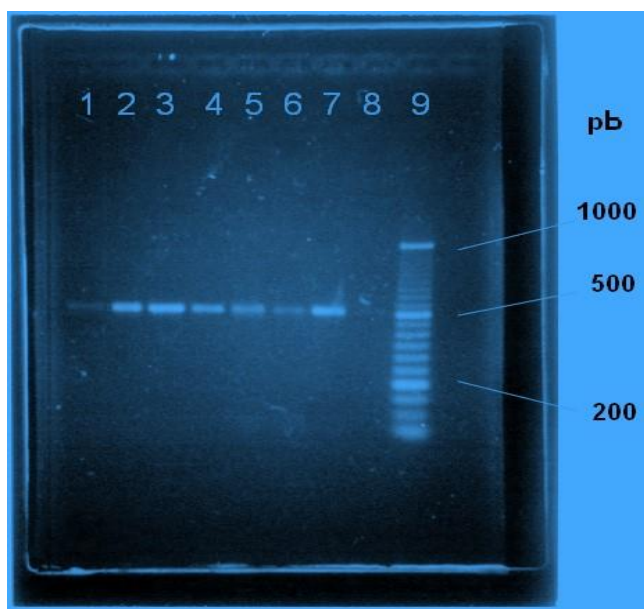
#### 4.5 Visualización de los productos amplificados

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler®) en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas ®). El producto de PCR se mezcló con 1 µL del producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas ®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para verificar el progreso de la migración de las bandas de ADN. Una alícuota de 6 µL de esta mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V aproximadamente por noventa minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 1000 pb DNA ladder (Fermentas ®). Luego de la electroforesis, el gel se sometió a inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo ®) y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®), y fotografiado con película Polaroid ®. Como control de reacción PCR negativo se utilizó agua destilada y las muestras positivas se enviarán a secuenciar para la obtención de controles positivos.

## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- DETECCIÓN DEL GEN QUE OTORGA RESISTENCIA A AMPICILINA (*bla*<sub>TEM</sub>), EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS Y GRAM-POSITIVAS, MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL.

**5.1.1 Bacterias Gram-negativas.** El gen *bla*<sub>TEM</sub> fue detectado en 2/14 de las cepas sensibles, en 1/2 de las cepas con sensibilidad intermedia y en 8/11 de las cepas resistentes a ampicilina, determinado mediante el método de Kirby –Bauer, como se muestra en la Figura 1 y en el Cuadro 2.



**Figura 1.**

Gel de Agarosa al 2%. Amplicones de 526 pb (*bla*<sub>TEM</sub>)

Carril 1: Muestra **26**

Carril 2: Muestra **11**

Carril 3: Muestra **13**

Carril 4: Muestra **1**

Carril 5: Muestra **62**

Carril 6: Muestra **59**

Carril 7: Muestra **67**

Carril 8: Control negativo

Carril 9: Marcador de Tamaño Molecular (100-1000 pb)

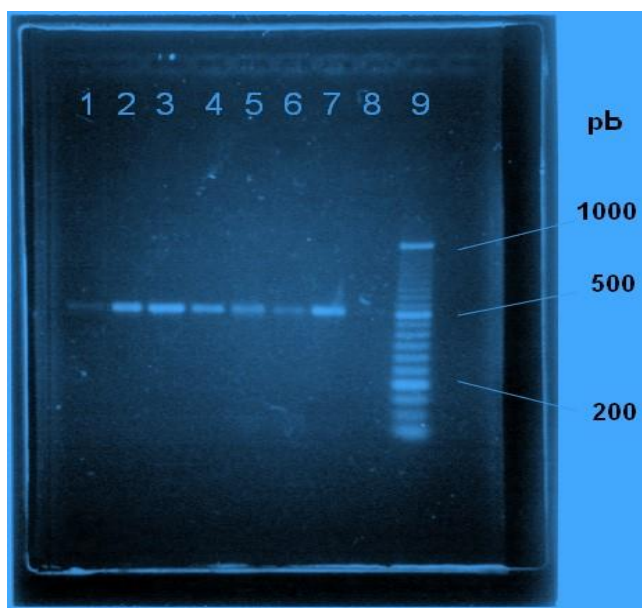
**Cuadro 2.**

Cepas bacterianas Gram-negativas ordenadas según aislado, especie y sensibilidad, donde se encuentra presente el gen *bla*<sub>TEM</sub>.

#	Especie	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	#	Especie	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
26	<i>P. agglomerans</i>	S	+	6	<i>E. cloacae</i>	R	+
27	<i>Ps. Aeruginosa</i>	S	+	16	<i>E. cloacae</i>	R	+
11	<i>E. coli</i>	SI	+	7	<i>E. coli</i>	R	+
13	<i>A. baumannii</i>	R	+	8	<i>E. coli</i>	R	+
1	<i>E. cloacae</i>	R	+	10	<i>E. coli</i>	R	+
				22	<i>E. coli</i>	R	+

A: ampicilina; S: sensible; SI: sensibilidad intermedia; R: resistente;  
(+): Presencia del gen

**5.1.2 Bacterias Gram positivas.** El gen *bla*<sub>TEM</sub> fue detectado en 4/14 de las cepas sensibles, 4/5 de las cepas con sensibilidad intermedia y en 16/20 de las cepas resistentes a ampicilina, determinado mediante el método de Kirby –Bauer (Figura 1 y Cuadro 3).



**Figura 1.**  
Gel de Agarosa al 2%. Amplicones de 526 pb (*bla*<sub>TEM</sub>)  
Carril 1: Muestra 26  
Carril 2: Muestra 11  
Carril 3: Muestra 13  
Carril 4: Muestra 1  
Carril 5: Muestra 62  
Carril 6: Muestra 59  
Carril 7: Muestra 67  
Carril 8: Control negativo  
Carril 9: Marcador de Tamaño Molecular (100-1000 pb)

**Cuadro 3**

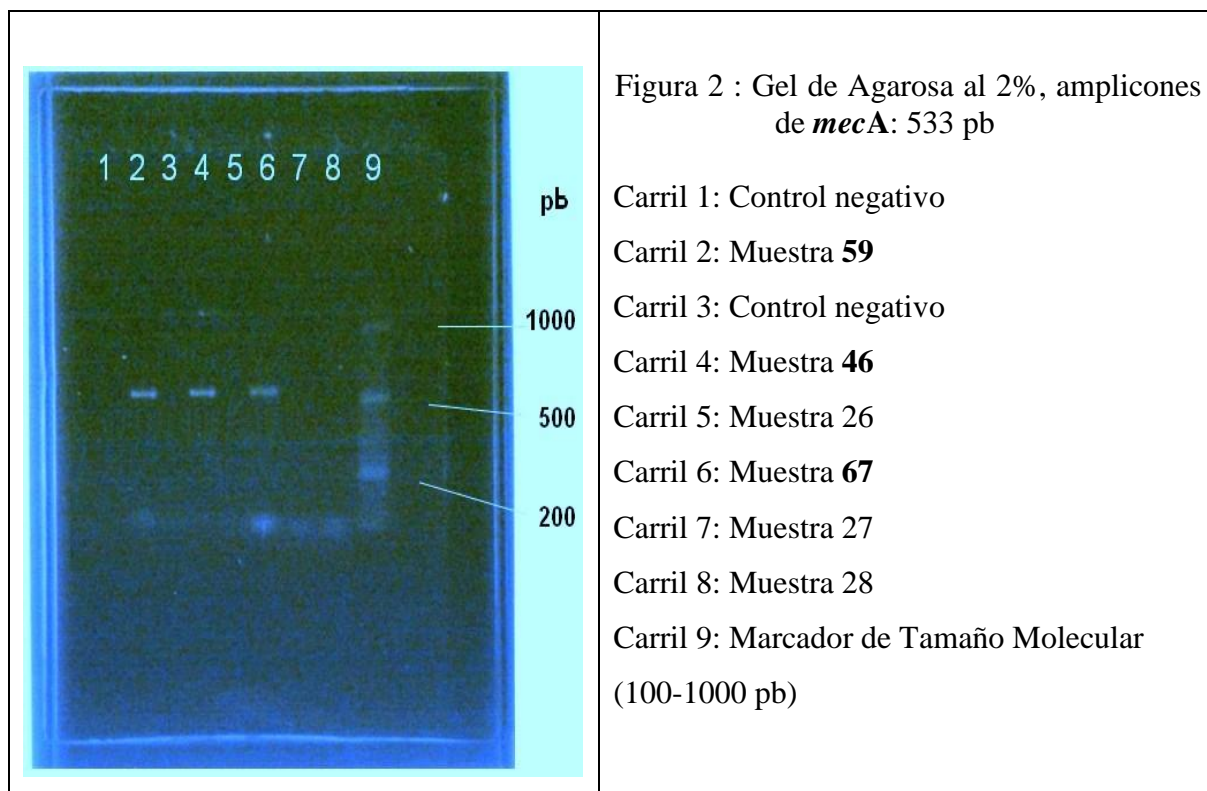
Presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> en bacterias Gram-positivas según especie bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana frente a Ampicilina.

#	Especie	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	#	Especie	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
58	<i>E. faecium</i>	S	+	35	<i>E. faecium</i>	R	+
62	<i>E. faecalis</i>	S	+	36	<i>E. faecium</i>	R	+
63	<i>E. durans</i>	S	+	37	<i>E. faecium</i>	R	+
64	<i>E. durans</i>	S	+	38	<i>E. faecium</i>	R	+
48	<i>E. faecium</i>	SI	+	49	<i>E. faecium</i>	R	+
53	<i>E. faecium</i>	SI	+	50	<i>E. faecium</i>	R	+
59	<i>E. faecium</i>	SI	+	51	<i>E. faecium</i>	R	+
43	<i>S. kloosi</i>	SI	+	52	<i>E. faecium</i>	R	+
29	<i>E. faecium</i>	R	+	57	<i>E. faecium</i>	R	+
30	<i>E. faecium</i>	R	+	67	<i>S. kloosi</i>	R	+
32	<i>E. faecium</i>	R	+	45	<i>St. Porcinus</i>	R	+
33	<i>E. faecium</i>	R	+	46	<i>M. sendentarius</i>	R	+

A: ampicilina; S: sensible; SI: sensibilidad intermedia;  
R: resistente; (+): Presencia del gen

## 5.2.- DETECCIÓN DEL GEN QUE OTORGA RESISTENCIA A METICILINA (*mecA*), EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS, MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL.

El gen *mecA* fue detectado en 3/32 de las cepas resistentes (Figura 2) y no se detectó en las 2 cepas con sensibilidad intermedia ni en las 5 cepas sensibles a oxacilina, determinado mediante el método de Kirby –Bauer (Cuadro 4).



**Cuadro 4.-** Presencia del gen *mecA* en bacterias Gram-positivas, según especie bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana frente a Oxacilina.

#	Especie	Ox	<i>mecA</i>
59	<i>E. faecium</i>	R	+
46	<i>M. sendentarius</i>	R	+
67	<i>S. kloosi</i>	R	+

## **6. DISCUSIÓN**

Las bacterias nosocomiales han generado gran preocupación -tanto en la salud pública como animal- debido a diversas características: gran ubicuidad en los recintos hospitalarios, invasividad en pacientes inmunocomprometidos, alta capacidad para intercambiar y adquirir genes que otorgan resistencia y además un desarrollo fenotípico de multiresistencia a diferentes tipos de fármacos, por lo que su tratamiento y control cada día se hace más complicado (OMS, 2003).

El aumento en el número de conferencias y publicaciones realizadas por médicos humanos y veterinarios en el último tiempo, promoviendo el uso racional de antimicrobianos y generando conciencia sobre este tema, es un reflejo de la inquietud que generan las infecciones producidas por bacterias multiresistentes (Saloojee y Steenhoff, 2001). Por esta razón, se ha hecho necesario utilizar los antimicrobianos con un criterio mayor, que englobe tanto la experiencia clínica, como el marco teórico en cada alternativa terapéutica aplicada, pues en la actualidad moléculas tan novedosas como el moxifloxacino, las cefalosporinas de espectro extendido, los derivados carbapenémicos y monobactámicos, se muestran inefectivos al momento de tratar infecciones bacterianas, especialmente las nosocomiales (DHQP, 2001).

En Chile, existen estudios en Medicina Humana sobre este tema (García, 2003), a diferencia de lo que ocurre en Medicina Veterinaria, donde no existen datos publicados (Pinto, 2002). Por lo tanto es fundamental completar la información que tenemos hoy en día en el país y conocer la situación de los recintos hospitalarios en la Universidad de Chile.

Los datos obtenidos en esta Memoria de Título tras someter a los diferentes agentes infecciosos descritos como nosocomiales, a la detección de genes que les otorgan resistencia a antimicrobianos, concuerdan con los descritos en la literatura consultada (Tenover *et al.*, 1994; Wichelhaus *et al.*, 1999).

Así, tras el cultivo y aislamiento bacteriano, el estudio morfológico y microscópico de las colonias, la identificación de las cepas bacterianas y por último la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de las muestras obtenidas desde los hospitales Veterinarios de la Universidad de Chile, se seleccionaron las cepas bacterianas de interés para este estudio. Observando los resultados, queda en manifiesto y es importante resaltar la alta frecuencia de bacterias nosocomiales encontradas en el ambiente hospitalario, las cuales poseen elevados niveles de resistencia para la mayoría de los antimicrobianos estudiados. Esto refleja que nuestro país no está ajeno a la problemática mundial del aumento de resistencia bacteriana, en donde las infecciones nosocomiales porcentualmente ocurren en un 5% a 10% de todas las hospitalizaciones en Europa y Norteamérica, y en más de un 40% de las hospitalizaciones en diferentes partes de Asia, Latinoamérica y Sudáfrica (Raka *et al.*, 2006).

Existen muchas formas mediante las cuales las bacterias pueden adquirir genes de resistencia, aquellos mecanismos que involucran genes de resistencia transmisibles son de particular importancia, debido fundamentalmente a que éstos pueden diseminarse rápidamente (Alpuche y Daza, 2002, Sussmann *et al.*, 2003). Se ha visto que más del 70% de las bacterias causantes de infecciones nosocomiales son resistentes a uno o más de los antibióticos comúnmente usados en su tratamiento. Esto explicaría la gran cantidad de cepas bacterianas en las cuales podemos encontrar genes de resistencia (Muto *et al.*, 2003).

Considerando la presión de selección del ambiente, y que gran parte de estos mecanismos de resistencia son transmisibles entre bacterias, se hace factible pensar que es previsible un aumento en la incidencia de bacterias nosocomiales multiresistentes refractarias a tratamientos (Poole, 2005; Cabrera *et al.*, 2007).

Algunas cepas bacterianas presentan resistencia intrínseca a ciertos antimicrobianos, otras progresivamente han adquirido resistencia frente a otros (CDC, 2008), como *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (SARV) que ha desarrollado gran preocupación en la práctica médica, pues la vancomicina es un antimicrobiano de resguardo para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* y existe la posibilidad que esta bacteria haya adquirido los genes de resistencia desde *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV).



Por lo que su hallazgo ó detección debe ser una preocupación constante en hospitales y clínicas (CDC, 2008).

La detección del gen *bla*<sub>TEM</sub> en bacterias del género *Enterococcus* spp como *E.faecalis* y *E.faecium* representa una alta preocupación si consideramos que son de gran importancia clínico-epidemiológica (Boerlin *et al.*, 2001) y además tienen la mayor frecuencia de aislamiento en los recintos hospitalarios de la Universidad de Chile. Adicionalmente, en *E.fecalis* la detección del gen *bla*<sub>TEM</sub> se realizó en 17 muestras, que significa un 44% de las cepas Gram-positivas analizadas.

Es de suma importancia relacionar en una cepa bacteriana, la presencia de un gen que otorga resistencia, detectado mediante la técnica de PCR, con el perfil de susceptibilidad antimicrobiana observado mediante el método de Kirby Bauer, ya sea sensible, con sensibilidad intermedia, y/o con resistencia a un fármaco.

En relación a lo anterior, el resultado esperado de este análisis sería detectar un gen de resistencia, en cepas bacterianas donde se observa resistencia para un determinado fármaco mediante el método de Kirby Bauer, y de la misma forma, no detectar genes que otorguen resistencia, en cepas sensibles. Sin embargo, según los resultados de esta Memoria de Título, se observó que una cepa bacteriana que presenta resistencia frente a un determinado fármaco mediante el método de Kirby Bauer, puede resultar negativa a la detección del gen de resistencia respectivo. De similar forma, en una cepa sensible o con sensibilidad intermedia a un fármaco se detectó la presencia del gen involucrado en resistencia antimicrobiana.

Este fenómeno podría ser explicado si consideramos que el desarrollo de resistencia es dependiente del modo y el nivel de expresión del gen responsable, determinado por las condiciones ambientales en las cuales se encuentra la determinada cepa bacteriana (Livermore, 1987; Lui *et al.*, 1992). Además, la ausencia de un gen en una cepa bacteriana, no limita el desarrollo de resistencia frente a un determinado fármaco, ya que los mecanismos de resistencia son muy numerosos y pueden utilizar uno, varios combinados o todos (Jenkinson, 1996; Sussmann *et al.*, 2004).

En relación al gen *mecA*, en esta Memoria de Título se logró identificar tres cepas bacterianas positivas, todas resistentes a oxacilina, fármaco análogo a la meticilina, utilizado para determinar susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de Kirby - Bauer. Aunque la incidencia de este gen resultó ser baja en comparación con el gen *bla*<sub>TEM</sub>, su presencia, es preocupante debido principalmente a que el gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil y largo denominado *cassette cromosomal de Staphylococcus mec* (CCS *mec*), el cual es adquirido fácilmente por cepas bacterianas en el ambiente hospitalario (Weese, 2005).

Esto sugiere que existe una gran cantidad de bacterias con estos genes de resistencia y a su vez, destaca la preocupación e interés que se debería otorgar a este problema en un futuro cercano, debido fundamentalmente a la alta probabilidad que estas bacterias actúen como reservorios de genes que otorgan resistencia y puedan emerger paulatinamente como patógenos comunitarios y no solamente en los recintos hospitalarios (Duquette y Nuttall, 2004).

Un punto de interés lo constituyen los aislados *M. sendentarius* (46), *E. faecium* (59) y *S. kloosi* (67) pues poseen tanto el gen *bla*<sub>TEM</sub> como el gen *mecA*, lo cual posiblemente se deba a la facilidad que tienen las bacterias para transferir y adquirir genes. A su vez, en el medioambiente intrahospitalario se establecen poblaciones bacterianas que coexisten bajo condiciones altamente variables y exigentes, que las exponen a diversas situaciones de estrés, lo cual como fuerza de presión selectiva, ha sido la mayor causa del surgimiento de cepas bacterianas altamente resistentes (Vali *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos sugieren que la PCR convencional, es una técnica que presenta grandes ventajas en la identificación de los genes en estudio. Es un método rápido, ya que el proceso de obtención de ADN, amplificación del mismo y electroforesis pueden ser llevados a cabo dentro de 24 horas, lo que disminuye en forma sustancial el tiempo que toma el realizar un diagnóstico mediante los métodos tradicionales; examen directo de colonias y cultivo (Wolcott, 1992). La sensibilidad del método es alta, porque permite detectar bajas concentraciones del ADN que se desea amplificar y tiene una especificidad

elevada, determinada especialmente por la secuencia de los partidores utilizados y por las condiciones de la hebra blanco de ADN (Powledge, 2004). Adicionalmente, nuestros resultados se están complementando actualmente con la secuenciación posterior de los fragmentos de ADN obtenidos, lo cual permitirá la obtención de controles positivos nativos.

Por último, es importante que para la prevención y control de estas bacterias, en los recintos hospitalarios en la Universidad de Chile, se tomen medidas de bioseguridad necesarias, donde los pasos fundamentales a seguir deberían ser: tener medidas de control rigurosas en cuanto al uso clínico de antimicrobianos, desarrollar medidas que prevengan la transmisión de patógenos que ya son resistentes (Alpuche y Daza, 2002) y finalmente generar un registro de datos preciso, con la ayuda de procedimientos diagnósticos estandarizados por laboratorios de referencia nacional e internacional (OPS, 1999) complementada por la búsqueda activa de los genes responsables de la resistencia observada en antibióticos, antimicrobianos y biocidas en distintas especies, analizando su relación epidemiológica, para así intentar detener el aumento de cepas bacterianas con características de multiresistencia, buscando resguardar la salud pública y animal.

## 7.- CONCLUSIONES

Se logró detectar los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *mecA*, que en bacterias nosocomiales otorgan resistencia con mayor frecuencia a ampicilina y meticilina, en muestras obtenidas en hospitales veterinarios de la Universidad de Chile (sedes Bilbao y Facultad) entre los años 2007 y 2008.

En particular, el gen *bla*<sub>TEM</sub> fue detectado en 11/28 de las cepas Gram-negativas y en 24/39 de las bacterias Gram-positivas. Por su parte, el gen *mecA* se detectó en 3/39 de las cepas Gram-positivas.

Finalmente, la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos mediante la técnica de PCR convencional permitirá confirmar lo descrito en la literatura existente.

## **8.- PROYECCIONES**

Es de suma importancia que una vez obtenidos los controles positivos, se siga realizando un seguimiento dinámico de las especies bacterianas nosocomiales, haciendo énfasis en sus características fenotípicas de multiresistencia, para establecer una retroalimentación constante sobre su existencia y la de los fenómenos involucrados en su presentación, con el fin de mejorar los protocolos de control de éste tipo de infecciones. Este protocolo debe incluir la búsqueda de los genes responsables de la resistencia observada a los antibióticos, antimicrobianos y biocidas en distintas especies y analizar su relación epidemiológica, buscando resguardar la salud pública y animal.

## 9.- ANEXOS

**Cuadro 5.-** Bacterias nosocomiales Gram-negativas obtenidas durante el 2007 (N=13), con su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

#	Especie	A	Amc	Sul	G	Enr	Cip	D	T	Sxt
1	<i>E.cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	SI	S	S
2	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	<i>E.cloacae</i>	S	SI	S	S	S	S	SI	S	S
4	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
5	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	SI	S	SI
6	<i>E.cloacae</i>	R	SI	S	S	S	S	S	SI	SI
7	<i>E.coli</i>	R	SI	S	R	R	R	R	R	R
8	<i>E.coli</i>	R	SI	R	R	R	R	R	R	R
9	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	SI	S	R
10	<i>E.coli</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R
11	<i>E.coli</i>	SI	SI	S	S	S	S	S	SI	R
12	<i>Ps.aeruginosa</i>	R	R	S	S	R	S	R	R	R
13	<i>A.baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S

A: ampicilina; Amc: amoxicilina+ácido clavulánico; Sul: sulperazona; G: gentamicina; Enr: enrofloxacino; Cip: ciprofloxacino; D: doxiciclina; T: tetraciclina; Sxt: sulfa+trimetoprin.  
R: resistente; SI: sensibilidad intermedia; S: sensible

**Cuadro 6.-** Bacterias nosocomiales Gram-negativas obtenidas durante el 2008 (N=15) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

#	Especie	A	Ox	G	Enr	Cip	D	T	Sxt
14	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	R	SI	SI	R
15	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	R	SI	S	S
16	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	SI	R	R	SI	R
17	<i>E.cloacae</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
18	<i>E.cloacae</i>	S	R	S	S	S	S	S	R
19	<i>E.cloacae</i>	S	R	S	S	S	S	S	SI
20	<i>E.cloacae</i>	SI	R	S	S	S	S	S	S
21	<i>E.coli</i>	S	R	S	S	S	S	S	SI
22	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
23	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	R
24	<i>E.coli</i>	S	R	S	S	S	S	S	SI
25	<i>E.coli</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
26	<i>P.agglomerans</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
27	<i>Ps.aeruginosa</i>	S	R	S	S	S	S	S	S
28	<i>A.baumannii</i>	S	R	S	S	S	S	SI	SI

A: ampicilina; Ox: oxilina; G: gentamicina; Enr: enrofloxacino;  
 Cip: ciprofloxacino; D: doxiciclina; T: tetraciclina; Sxt: sulfa+trimetoprin.  
 R: resistente; SI: sensibilidad intermedia; S: sensible.

**Cuadro 7.-** Bacterias nosocomiales Gram-positivas obtenidas durante el 2007 (N=19) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

	<b>Especie</b>	<b>A</b>	<b>Amc</b>	<b>Ox</b>	<b>G</b>	<b>Van</b>	<b>Enr</b>	<b>Cip</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Sxt</b>
29	<i>E. faecium</i>	R	SI	R	SI	S	R	SI	R	R	S
30	<i>E. faecium</i>	R	SI	R	S	S	R	R	S	S	S
31	<i>E. faecium</i>	S	S	R	SI	S	S	SI	SI	R	S
32	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	R	SI	R	SI	S
33	<i>E. faecium</i>	R	R	R	SI	S	SI	SI	R	R	S
34	<i>E. faecium</i>	S	S	R	SI	S	SI	S	R	R	S
35	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
36	<i>E. faecium</i> )	R	SI	R	R	S	R	R	R	R	R
37	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
38	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
39	<i>E. faecium</i>	S	S	R	SI	S	R	R	R	R	S
40	<i>E. faecium</i>	S	S	R	SI	S	SI	SI	R	R	S
41	<i>E. faecium</i>	S	S	S	S	S	R	SI	S	S	S
42	<i>E. hirae</i>	S	SI	R	S	S	R	SI	S	S	R
43	<i>S. kloosi</i>	SI	S	S	S	S	S	S	R	R	S
44	<i>S. kloosi</i>	SI	S	S	S	S	S	S	S	S	R
45	<i>St. Porcinus</i>	R	SI	R	S	SI	S	SI	S	S	S
46	<i>M. sendentarius</i>	R	SI	R	S	R	S	S	S	SI	S
47	<i>E. durans</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S

**A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Ox:** oxicilina; **G:** gentamicina; **Van:** vancomicina; **Enr:** enrofloxacino; **Cip:** ciprofloxacino; **D:** doxiciclina **T:** tetraciclina; **Sxt:** sulfa+trimetoprin. R: resistente; SI: sensibilidad intermedia; S: sensible.



**Cuadro 8.-** Bacterias nosocomiales Gram-positivas obtenidas durante el 2008 (N=20) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

	<b>Especie</b>	<b>A</b>	<b>Ox</b>	<b>G</b>	<b>Van</b>	<b>Enr</b>	<b>Cip</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Sxt</b>
48	<i>E. faecium</i>	SI	SI	S	S	SI	SI	R	R	S
49	<i>E. faecium</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	S
50	<i>E. faecium</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	S
51	<i>E. faecium</i>	R	R	S	S	R	R	R	R	R
52	<i>E. faecium</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R
53	<i>E. faecium</i>	SI	R	S	S	R	R	R	S	S
54	<i>E. faecium</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R
55	<i>E. faecium</i>	S	R	R	S	SI	R	R	R	R
56	<i>E. faecium</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R
57	<i>E. faecium</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R
58	<i>E. faecium</i>	S	R	S	S	R	SI	R	R	R
59	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	S	R	R	R	R	R
60	<i>E. faecium</i>	S	R	R	S	S	SI	SI	SI	S
61	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	R	R	R	SI	R
62	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	SI	R	S	S	S
63	<i>E. durans</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S
64	<i>E. durans</i>	S	SI	S	S	S	S	R	R	S
65	<i>E. durans</i>	R	R	S	R	R	R	S	R	R
66	<i>S. intermedius</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	R
67	<i>S. kloosi</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S

**A:** ampicilina; **Ox:** oxilina; **G:** gentamicina; **Van:** vancomicina; **Enr:** enrofloxacino;  
**Cip:** ciprofloxacino; **D:** doxiciclina **T:** tetraciclina; **Sxt:** sulfa+trimetoprin.  
R: resistente; SI: sensibilidad intermedia; S: sensible.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

**ALPUCHE, C.; DAZA, C.** 2002. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enf Infec Microbiol* 22: 192-199.

**AYATS, J.** 2003. Resistencia a la vancomicina en el género *Enterococcus*. [En línea] [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/envancor.html](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/envancor.html) [Consulta: 20-07-2009].

**BOERLIN, P.; EUGSTER, S.; GASCHEN, F.; STRAUB, R.; SCHAWALDER, P.** 2001. Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol* 82: 347-359.

**BORNEMAN, E.** 2002. Bacterial infections: a response to recent ref. notes columns. [En línea] <http://www.reefkeeping.com/translations/spanish/2002-05/eb/> [Consulta: 14-06-2009].

**CABRERA, C.; GÓMEZ, R.; ZUÑIGA, A.** 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colom. Med.* 38: 149-158.

**CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).** 2008. CDC/NHSN Surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. [En línea] <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/nmis/NosInfDefinitions.pdf> [Consulta: 20-11-2009].

**CORDIES, L.; MACHADO, L.; HAMILTON, M.** 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. [En línea] [http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8\\_1\\_98/act03198.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act03198.htm) [Consulta: 20-07-2009].

**DANCHIN, A.; YUEN, K.** 2002. Bacterial Genomics in the Study of Virulence. *In: SUSSMAN, M.* Molecular Medical Microbiology. Barcelona, España. Academic press. pp. 341-353.

**DIVISION OF HEALTHCARE QUALITY PROMOTION (DHQP).** 2001. Antimicrobial resistance prevention campaign. [presentación power point]. Atlanta, Georgia, United States of America. Center for Disease Control and Prevention (CDC). 63 diapositivas.

**DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L.** 2003. Prevención de infecciones nosocomiales GUIA PRÁCTICA. Segunda edición. Organización Mundial de la Salud. 65 p.

**DUQUETTE, R.; NUTTALL, T.** 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *J Small Anim Pract* 45: 591-597.

**EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA).** 1999. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines: Report and Qualitative Risk Assessment by Committee for Veterinary Medical Products. London 79 p.

**EMORI, G.; GAYNES, R.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6: 428-442.

**ERRECALDE, J.** 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo, desarrollo de resistencia, su incidencia en salud pública. [En línea] <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm> [Consulta: 20-8-2009].

**FANG, CH-T.; CHEN, H-CH.; CHUANG, Y-P.; CHANG, S-CH.; WANG, Y-T.** 2002. Cloning of a Cation Efflux Pump Gene Associated with Chlorhexidine Resistance in *Klebsiella Pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2024-2028.

**GARCÍA, P.** 2003. Resistencia bacteriana en Chile. *Rev Chil Infect* 20: S11-S23.

**HOSEIN, I.; HILL, D.; JENKINS, L.; MAGEE, J.** 2002. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. *J Appl Microbiol* 92: 90S-97-S.

**JACOBY, G.; MUNOZ-PRICE, S.** 2005. The new  $\beta$ -lactamases. *N Engl J Med* 352: 380-391.

**JENKINSON, H.** 1996. Ins and Outs of Antimicrobial Resistance: Era of the Drug Pumps. *J Dent Res* 75: 736-742.

**JOHNSON, J.** 2002. Nosocomial infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 32: 1101-1126.

**KIM, B-N.; WOO, J-H.; RYU, J.; KIM, Y.** 2003. Resistance to extended-spectrum cephalosporins and mortality in patients with *Citrobacter freundii* bacteremia. *Infection* 31: 202-207

**LEE, E-W.; CHEN, J.; HUDA, M.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIDA, T.** 2003a. Functional cloning and expression of emeA, and characterization of EmaA, a multidrug efflux Pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol Pharm Bull* 26: 266-270.

**LEE, E-W.; CHEN, J.; HUDA, M.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIDA, T.** 2003b. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3733-3738.

**LI, D-W.; ONISHI, M.; KISHINO, T.; MATSUO, T.; OGAWA, W.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T.** 2008. Properties and expression of a Multidrug efflux pump AcrAB-KocC from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol Pharm Bull* 31: 577-582.

**LIVERMORE, D.** 1987. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods. *Eur J Clin Microb* 6:439-445

**LUI, P.; HALL, L.; LIVERMORE D.** 1992. Survey of the prevalence of beta-lactamases among 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J Antimicrob Chemother* 30: 429-447.

**MATSUO, T.; CHEN, J.; MINATO, Y.; OGAWA, W.; MIZUCHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T.** 2008. SmdAB, a heterodimeric ABC-type Multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 190: 648-654.

**MEDIAVILLA, A.; GARCÍA-LOBO, J.** 2004. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. **In:** Flores, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, A. Farmacología Humana, 4.<sup>a</sup> edición. Masson, S.A. Barcelona (España). Pp. 1105-1128.

**MILATOVIC, D.; BRAVENY, I.** 1987. Development of resistance during antibiotic therapy. *Eur J Clin Microbiol* 6: 234-244.

**MORFIN, R.; DONIS, J.; ARREDONDO, J.; SORIANO, D.; HERMIDA, C.; HEREDIA, J.; ESPARZA, S.; RODRIGUEZ, E.** 2002. Infecciones nosocomiales por bacterias grampositivas multirresistentes: La actividad de nuevos antimicrobianos. *Enf. Infec y Micro.* 22: 55-61.

**MULLIS, K.; FALOONA, F.** 1987. Specific synthesis of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.

**MUTO, C.; JERNIGAN, J.; OSTROWSKY, B.; RICHET, H.; JARVIS, W.; BOYCE, J.; FARR, B.** 2003. SHEA Guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24:362-386.

**NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.** 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standards. NCCLS document. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

**NOGUCHI, N.; SUWA, J.; NARUI, K.; SASATSU, M.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; SONG, J.** 2005. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *J Med Microbiol* 54: 557-565.

**NOLAN, L, WOOLEY, R.; BROWN, J.; BLUE, J.; CAMP, M.** 1987. Comparison of virulence factors and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* strains from humans and dogs with urinary tract infections. *J Vet Int Med* 1: 152-157.

**OGGER-GYLES, J.; MATHEWS, K.; BOERLIN, P.** 2006. Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 16: 1-18.

**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2003. Epidemiología de las infecciones nosocomiales. [En línea] cap.1. **In:** Prevención de las infecciones nosocomiales.< <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/PISpanish3.pdf> > [consulta: 20-07-2009].

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS), DIVISIÓN DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES, PROGRAMA DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES.** 1999. Prevención y control de la Resistencia a los antimicrobianos en las Américas: Plan estratégico de vigilancia de la resistencia a los antibióticos. 45p.

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS).** 2005. Informe anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la resistencia a los antibióticos -2004-. Brasilia, Brasil. 115p.

**PASCUAL, A.; RODRIGUEZ-BAÑO, J.; RAMIREZ DE ARELLANO, E.; MOLA, J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.** 2001. Sensibilidad disminuida a vancomicina en cepas isogénicas de *Staphylococcus aureus* aisladas del mismo paciente. *Med. Clin.* 117: 416-418.

**PELEG, A.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 21: 538-582.

**PENNINGTON, T.** 2002. Electrophoretic Typing. **In:** SUSSMAN, M. Molecular Medical Microbiology. Barcelona, España. Academia press. pp. 535-547.

**PINTO, M.** 2002. Resistencia antimicrobiana en Chile hoy. *Rev Chil Infect.* 19: 213-218.

**POOLE, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56: 20-51.

**POWLEDGE T.** 2004. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 28: 44-50.

**RAKA, L.; ZOUTMAN, D.; MULLIQI, G.; KRASNIQI, S.; DEDUSHAJ, I.; RAKA, N.; AHMETI, S.; SHALA, M.; VISHAJ, A.; ELEZI, Y.** 2006. Prevalence of nosocomial infections in high-risk units in the University Clinical Center of Kosova. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 27: 421-423.

**ROBERTS, A.; DAVIS, I.; SEVILLE, L.; VILLEDIEU, A.; MULLANANY, P.** 2006. Characterization of the ends and target site of a novel tetracycline resistance-encoding conjugative transposon from *Enterococcus faecium* 664.1H1. *J Bacteriol* 188: 4356-4361

**ROSENTHAL, V.; MAKI, D.; SALOMAO, R.; ALVAREZ-MORENO, C.; MEHTA, Y.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L.; ARIKAN, Ö.; ABOUQAL, R.; LEBLEBICIOGLU, H.** 2006. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Ann. Intern. Med.* 145: 582-591.

**SALYERS, A.; SHOEMAKER, N.; STEVENS, A.; LI, L-Y.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 59: 579-590.

**SALOOJEE, H.; STEENHOFF, A.** 2001. The health professional's role in preventing nosocomial infections. *Postgrad. Med. J.* 77: 16-19.

**SÁNCHEZ, S.; STEVENSON, M.; HUDSON, C.; MAIER, M.; BUFFINGTON, T.; DAM, Q.; MAURER, J.** 2002. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. *J Clin Microbiol* 40: 3586-3595.

**SANDERS, W.; SANDERS, C.** 1997. *Enterobacter spp.*: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 10: 220-241.

**SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* in a veterinary teaching hospital. *J Clin Microbiol* 45:1118-1125.

**SEKIGUCHI, J.; ASAGI, T.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; FUJINO, T.; KOBAYASHI, I.; MORITA, K.; KIKUCHI, Y.; KURATSUJI, T.; KIRIKAE, T.** 2005. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain that Caused an Outbreak in Neurosurgery Ward and its *aac(6')-Iae* Gene Cassette Encoding a Novel Aminoglycoside Acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3734-3742.

**STICKLER, D.** 2002. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *J Appl Microbiol* 92: 163S-170S.

**STOKES, H.; HALL, R.** 1989. A novel family of potentially mobile genetics DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3: 1669-1683.

**SUSSMANN, O.; JOHNSON, J.; HARRIS, P.; FURUNO, J.; PERENCEVICH, E.; MORRIS, J.** 2003. Assessing risk for a pre-emergent pathogen: virginiamycin use and the emergence of strptogramin resistance in *Enterococcus faecium*. *The Lancet* 3: 241-249.

**TENOVER, F.; HUANG, M.; RASHEED, J.; PERSING, D.** 1994. Development of PCR Assay To Detect Ampicillin Resistance Genes in Cerebrospinal Fluid Samples Containing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*; 32: 2729-2737.

**TIETJEN, L.; BOSSEMEYER, D.; MCINTOSH, N.** 2003a. Preventing nosocomial infections. [en línea] cap.20. **In:** Infection Prevention. Guidelines for healthcare facilities with limited resources < [http://www.reproline.jhu.edu/video/hiv/tutorials/English/tutorials/IP/references/pdf/IP\\_manual/IP\\_manual\\_TOC.htm](http://www.reproline.jhu.edu/video/hiv/tutorials/English/tutorials/IP/references/pdf/IP_manual/IP_manual_TOC.htm) > [consulta: 22-02-2009].

**TIETJEN, L.; BOSSEMEYER, D.; MCINTOSH, N.** 2003b. Preventing surgical site infections. [en línea] cap.23. **In:** Infection Prevention. Guidelines for healthcare facilities

with limited resources < [http://www.reproline.jhu.edu/video/hiv/tutorials/English/tutorials/IP/references/pdf/IP\\_manual/IP\\_manual\\_TOC.htm](http://www.reproline.jhu.edu/video/hiv/tutorials/English/tutorials/IP/references/pdf/IP_manual/IP_manual_TOC.htm) > [consulta: 22-02-2009].

**VALI, L.; DAVIES, S.; LAI, L.; DAVE, J.; AMYES, S.** 2008. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 61: 524-532.

**WANG, M.; SAHM, D.; JACOBY, G.; HOOPER, D.** 2004. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1295-1299.

**WEESE, J.** 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Emerging Pathogen in Small Animals. *J Amer Anim Hosp Assoc* 41: 150-157.

**WICHELHAUS, T.; KERN, S.; SCHAFER, V.; BRADE, V.** 1999. Rapid Detection of Epidemic Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 37: 690-693.

**WILKINS, B.; FROST, L.** 2002. Mechanisms of gene exchange between bacteria. **In:** **SUSSMAN, M.** Molecular Medical Microbiology. Barcelona. España. Academic Press. pp. 335-400.

**WOLCOTT, M.** 1992. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev* 5: 370-386.

**YAMAMOTO, T.; TAMURA, Y.; YOKOTA, T.** 1988. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 932-935.