



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



DETECCIÓN DE GENES DE METALOBETALACTAMASAS
ASOCIADOS A INTEGRONES 1 y 2 EN CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa DE ORIGEN HOSPITALARIO



Seminario presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título Profesional de Biólogo

Marcela Amada Alcorta Huenchullán

Concepción, 2007

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo oportunista que se comporta, principalmente, como un patógeno nosocomial. Produce infecciones cuando el huésped tiene alteradas las defensas, en especial en pacientes con quemaduras extensas, leucémicos, transplantados, etc. Se caracteriza por presentar resistencia intrínseca a diversos antibióticos y, frecuentemente, las cepas que causan infecciones nosocomiales expresan mecanismos que generan resistencia a diversos agentes antimicrobianos, entre éstos los carbapenémicos.

Los antibióticos carbapenémicos son agentes antimicrobianos generalmente activos contra bacterias multiresistentes y tienen la actividad más amplia de todos los antibióticos de uso en humanos. La resistencia a estos compuestos es un problema global emergente, ya que se han descrito en diversas regiones del mundo. El principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos en bacilos Gram negativos es la producción de betalactamasas de la clase B, denominadas metalobetalactamasas, ya que requieren iones zinc para su actividad enzimática. Hasta el momento se han descrito 4 familias de metalobetalactamasas IMP, VIM, SPM y GIM, siendo IMP y VIM los dos grupos dominantes.

Los integrones son los principales elementos genéticos de evolución de plásmidos y transposones, participando en la movilización de genes que codifican diversos mecanismos de resistencia bacteriana, entre los que se encuentran genes de enzimas betalactamasas.

En esta tesis se realizó un estudio de la actividad antibacteriana cualitativa de antibióticos betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos sobre 24 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en hospitales de la Octava Región y Región Metropolitana entre los años 1998 y 2005, que presentaban susceptibilidad disminuida o resistencia a antibióticos carbapenémicos. La actividad antibacteriana cuantitativa, es decir, la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada para los antibióticos imipenem y meropenem. En todos los estudios de actividad antibacteriana se siguieron las recomendaciones del CLSI (2005). Además, a este grupo de cepas se les determinó la capacidad de sintetizar enzimas metalobetalactamasas de las familias IMP y VIM, los dos grupos principales de enzimas en esta especie bacteriana. Para esto se realizó detección fenotípica de estas enzimas determinando la susceptibilidad bacteriana a carbapenémicos (meropenem e imipenem) en presencia y ausencia de EDTA. La identificación de las enzimas sintetizadas se realizó a través de la detección de los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}*

mediante la técnica de PCR, empleando partidores específicos para cada una de las familias de enzimas. Por otra parte, la presencia de integrones de las clases 1 y 2, elementos genéticos que se relacionan con la dispersión de estos genes de resistencia, se investigó mediante PCR utilizando partidores específicos para cada una de las clases anteriormente señaladas. Posteriormente, se relacionó la presencia de estos elementos genéticos con los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* empleando distintas parejas de partidores específicos para los genes *bla* e integrón.

Los resultados de la actividad antibacteriana permiten concluir que las cepas de *P. aeruginosa* son multiresistentes, ya que presentan como mínimo resistencia a 5 antimicrobianos. De acuerdo a la detección fenotípica de metalobetalactamasas, 7 cepas sintetizan estas enzimas, las que fueron identificadas mediante PCR como pertenecientes a la familia VIM. No se detectaron enzimas de la familia IMP.

Con respecto a la presencia de integrones, en 10 cepas se pesquisaron integrones clase 1 y no se detectaron integrones clase 2. El tamaño de la zona variable de los integrones clase 1 se determinó en las 7 cepas en las cuales se detectaron los genes *bla_{VIM}*. En todas las cepas se detectaron dos amplicones de 1.000 pb 1.700 pb. El tamaño de esta región sugiere que en los integrones clase 1 podría estar inserto más de un gen de resistencia y, además, la presencia de dos amplicados sugiere la presencia de más de un integrón clase 1 en estas cepas. La relación entre la presencia de integrón clase 1 en estas cepas y los genes *bla_{VIM}* detectados indicó que éstos se encuentran a la forma de *cassettes* genéticos inserto en los integrones. Finalmente, a las cepas que presentaron resistencia o resistencia intermedia a carbapenémicos, y no se les detectó enzimas metalobetalactamasas, se les realizó una prueba para estudiar si el mecanismo de impermeabilidad celular jugaba un rol como posible mecanismo de resistencia. Para esto se determinó la CMI de los antibióticos carbapenémicos en presencia y ausencia de EDTA, no encontrándose diferencia en los valores de las CMI, concluyendo que la impermeabilidad no estaría implicada en la resistencia a estos compuestos y, que probablemente, la resistencia podría estar dada por sistemas de expulsión como son las bombas de eflujo inespecíficas (bombas multidroga)