



Artículo original

## Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas

Patricia Narváez<sup>a</sup>, Raquel Pedroza<sup>b,c</sup>,  
Guillermina Alonso<sup>a,c,\*</sup> Vidal Rodríguez Lemoine<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias

<sup>b</sup> Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina

<sup>c</sup> Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos  
Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

<sup>d</sup> Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales

Recibido 15 septiembre, 2005. Aceptado 11 octubre, 2005

**Resumen:** La presencia de plásmidos transmisibles confiere a las bacterias propiedades que complementan su capacidad para colonizar ambientes adversos, favorece el intercambio genético intracelular, y garantiza la diseminación horizontal de genes de resistencia a antibióticos, y de otras funciones, entre géneros distintos. En este trabajo se determinó, en aislados nosocomiales, la presencia de plásmidos auto-transmisibles y co-transferibles que exhiben complejos patrones de resistencia a antibióticos. El análisis del contenido plasmídico reveló la coexistencia de moléculas de diferentes tamaños. Entre las de mayor tamaño se establecieron cinco patrones de restricción diferentes, dos de los cuales se encontraron con alta frecuencia. Estos resultados sugieren que, entre los plásmidos identificados, un grupo bien definido es responsable de la diseminación de un amplio conjunto de genes de resistencia entre la muestra nosocomial estudiada. Plásmidos como los descritos permiten explicar el flujo de genes entre bacterias, y la adaptabilidad de las poblaciones para colonizar nuevos ambientes.

**Palabras claves:** plásmidos, infección nosocomial, resistencia antibióticos

## Characterization of antibiotic resistance plasmids from nosocomial isolates at the Caracas University Hospital

**Abstract:** Plasmids confers to bacteria properties that allow them to colonize adverse environments and to facilitate gene exchange. Plasmids are responsible for horizontal dissemination of resistance genes between bacteria from different genus. In this work auto and co-transferable plasmids exhibiting complex antibiotic resistance patterns were found in nosocomial isolates. Presence of plasmid of diverse sizes was found. The existence of five different plasmid restriction patterns was confirm being two of them the most frequently identified. These results suggest that plasmids carrying antibiotic resistance determinants are responsible for resistance genes dissemination between the nosocomial populations. Presence of these plasmids could explain gene flow among bacteria as well as adaptability to colonize new environments.

**Keywords:** plasmid, nosocomial infection, resistance

\* Correspondencia:

E-mail: [galonso@reacciun.ve](mailto:galonso@reacciun.ve)

### Introducción

Los agentes antimicrobianos ejercen una fuerte presión selectiva sobre las comunidades bacterianas que comparten un nicho particular, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia, dando origen al fenómeno

conocido como resistencia múltiple a los antibióticos. La adquisición de estas propiedades puede deberse a mutaciones en el cromosoma bacteriano (menos del 5% de los casos conocidos) o por la incorporación de genes o conjunto de genes transferidos desde otros organismos por medio de elementos genéticos extracromosómicos o plásmidos.

En general, se asume que los plásmidos codifican funciones consideradas como no esenciales para la actividad fisiológica normal de las bacterias. Sin embargo, estos elementos portan genes para una enorme variedad de funciones que les confieren a los organismos hospedadores ventajas competitivas frente a otros en el proceso de colonización de nuevos ambientes. Los plásmidos mejor estudiados son aquellos capaces de conferir resistencia a una amplia variedad de antibióticos, metales pesados y otros inhibidores del crecimiento [1,2].

En un ambiente hospitalario los pacientes tienen un alto riesgo de contraer infecciones, generalmente producidas por microorganismos que han acumulado, a través de un acelerado proceso selectivo, determinantes de resistencia a los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones causadas por esos agentes, reduciendo la eficacia del tratamiento de las infecciones nosocomiales.

Para lograr un manejo adecuado de este problema es importante tener una clara comprensión tanto de las causas de la aparición del fenómeno como del modo de dispersión de los determinantes de la resistencia en áreas particulares. Esto permite establecer estrategias racionales de prevención [3,4]. Un aspecto esencial de la investigación epidemiológica de las infecciones nosocomiales es la caracterización de las cepas bacterianas involucradas y de los plásmidos responsables de la resistencia. Aunque es bien conocida la asociación entre plásmidos y resistencia a los antibióticos, pocas veces se relaciona la presencia de un plásmido específico con un brote epidémico de resistencia a los antibióticos.

Los métodos de tipificación, tanto para las bacterias como para los plásmidos, se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos, debido a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían. El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación.

En el ámbito internacional, se han realizado numerosos estudios de caracterización de cepas bacterianas y los plásmidos de resistencia a antibióticos que comprometen la salud pública de un país [5,6]. En Venezuela se han elaborado reportes sobre la tendencia de la resistencia bacteriana a diferentes agentes antimicrobianos [7,8], pero son escasos los trabajos relacionados con la identificación de plásmidos de resistencia y la habilidad de un organismo para colonizar un determinado ambiente.

Desde hace mucho tiempo, nuestro grupo de trabajo ha venido realizando estudios sobre la diseminación y predominio de cepas bacterianas causantes de infecciones intrahospitalarias [9,10]. Los estudios preliminares se iniciaron con cepas de Enterobacterias aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales provenientes del Hospital Uni-

versitario de Caracas (HUC) [11]. El estudio inicial abarcó 200 bacilos Gram negativos, utilizando como criterio de selección la resistencia al antibiótico Amikacina. En estas muestras se encontraron cepas con resistencia múltiple hasta a 17 antibióticos distintos [11]. La presencia de plásmidos transmisibles fue puesta en evidencia mediante experimentos de conjugación.

En este trabajo nos hemos propuesto la caracterización de los plásmidos identificados previamente, para tratar de establecer su asociación y grado de distribución en entre bacterias nosocomiales identificadas en el Hospital Universitario de Caracas.

## Materiales y métodos

### *Crecimiento Bacteriano*

Las muestras fueron aisladas e identificadas en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario de Caracas, y transferidas al Laboratorio de Biología de Plásmidos, del Instituto de Biología Experimental. En el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVC), se confirmó la identificación y se almacenaron para estudios posteriores. Las cepas fueron recolectadas entre los años 1997 y 1998 (Tabla 1), y la descripción corresponde al año y orden en que fueron recolectadas. Todas las cepas fueron crecidas en medio Luria-Bertani, a 37° C, en condiciones aeróbicas. Los antibióticos para las pruebas de resistencia se utilizaron a las concentraciones reportadas en la bibliografía.

### *Conjugación Bacteriana*

Los experimentos de conjugación se realizaron en filtros bajo las condiciones establecidas en nuestro laboratorio [11]. Como receptoras se emplearon cepas de *E. coli* con los marcadores apropiados. Las características de las cepas transconjugantes obtenidas se describen en la Tabla 1. Estas cepas transconjugantes fueron utilizadas como base del presente trabajo.

### *Análisis de los Plásmidos*

El DNA plasmídico fue extraído utilizando el método de lisis alcalina [12], y almacenado a -20 °C. Para obtener el patrón de bandas, el DNA fue digerido con la enzima de restricción *Pst*I, siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Promega). El producto de la restricción se sometió a electroforesis en geles de agarosa en buffer TBE [13]. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y se visualizaron en un equipo Gel Doc 1.000 (Bio-Rad), y el almacenamiento de la información y el análisis se realizó con el programa Multi Analyst (Bio-Rad).

**Tabla 1.** Cepas transconjugantes portadoras de los plásmidos pertenecientes a los aislados bacterianos del HUC obtenidos en 1997 y 1998.

Género o especie cepa donante	Origen aislados	Designación <i>E. coli</i> Transconjugante	Patrón de restricción	Perfil de resistencia <i>E. coli</i> transconjugante
<i>Escherichia coli</i>	C1	T-9713	A	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Na, Tic
<i>Enterobacter cloacae</i>	C1	T-9718	U	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Na, Tic
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTIN	T-9728	U	Ak, Gm, Tm, Amo, Cft, Pic, Tic, Na
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P	T-9729	U	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Na, Tic, Ctr
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTIN	T-9734	A	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Na, Tic
<i>Enterobacter spp.</i>	TR	T-9740	B	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Na, Tic, Ctr
<i>Enterobacter cloacae</i>	TR	T-9751	B	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Caz, Atm, Tic, Na, Ctr
<i>Pseudomonas spp</i>	TR	T-9752	B	Ak, Amo, Cft
<i>Escherichia coli</i>	SI	T-9757	B	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Na, Tic
<i>Escherichia coli</i>	NC	T-9758	U	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Ctx, Cro, Caz, Atm, Na, Tic, Ctr
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P	T-9781	U	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Cro, Caz, Atm, Tic, Na, Ctr
<i>Escherichia coli</i>	P	T-9782	U	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Caz, Atm, Tic, Na, Ctr
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RN	T-9784	U	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Caz, Atm, Tic, Na, Ctr
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RN	T-9790	D	Ak, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Ctx, Caz, Atm, Tic, Na
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	T-9792	B	Ak, Tm, Nt, Amo, Amc, Cft, Pic, Caz, Atm, Tic, Na, Ctr
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M1	T-97102	C	Ak, Tm, Amo, Amc, Cft, Pic, Tic, Na
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SI	T-97107	A	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Na, Tic
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M1	T-97114	C	Ak, Tm, Amo, Amc, Cft, Tic, Na
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	T-97127	A	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Tic
<i>Escherichia coli</i>	C2	T-97141	C	Ak, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Tic, Na, Ctr
<i>Enterobacter spp</i>	C2	T-97145	E	Ak, Tm
<i>Providencia rettgeri</i>	C2	T-97146	E	Ak, Amo, Amc, Cft, Na
<i>Klebsiella spp</i>	SI	T-98149	D	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Tic, Na
<i>Klebsiella spp.</i>	SI	T-98165	U	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Na, Tic, Nor, Cip, Ctr
<i>Klebsiella spp</i>	SI	T-98167	U	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Tic
<i>Escherichia spp.</i>	SI	T-98168	A	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Na, Tic, Ctr
<i>Klebsiella spp.</i>	C2	T-98170	A	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Pic, Tic, Na, Ctr
<i>Klebsiella spp.</i>	UTI	T-98189	E	Ak, Gm, Tm, Nt, Amo, Cft, Pic, Caz, Atm, Tic

C1: Cirugía 1. M1: Medicina 1. NC: Neurocirugía. P: Pediatría. RN: Retén neonatal. RT: Radioterapia. TR: Traumatología. UTI: Unidad de Terapia Intensiva. UTIN: Unidad de Terapia Intensiva. Neonatal. SI: Sin información. U: Patrón único. Ak: Amikacina, Gm: Gentamicina, Tm: Tobramicina, Nt: Netilmicina, Amo: Amoxicilina, Amc: Amoxicilina/ácido clavulánico, Cft: Cefalotina, Pic: Piperacilina, Ctx: Cefotaxime, Cro: Ceftriaxone, Caz: Ceftazidime, Atm: Aztreonam, Tic: Ticarcilina, Na: Ácido nalidixico, Nor: Norfloxacin, Cip: Ciprofloxacina, Ctr: cotrimoxazol.

## Resultados

Las cepas de *E. coli* transconjugantes analizadas en este trabajo fueron obtenidas por experimentos de conjugación bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los valores de las frecuencias de transferencia oscilaron entre  $2 \times 10^{-3}$  a  $3 \times 10^{-5}$  transconjugantes por célula donante, demostrándose la presencia de plásmidos transmisibles en las cepas causantes de infecciones nosocomiales. Bajo las condiciones descritas y la selección por Amikacina, se logró la transferencia y co-transferencia de plásmidos de diferentes tamaños moleculares. En la Tabla 1 se describen las características de las cepas nosocomiales estudiadas, el servicio de procedencia en el hospital, y el número que identifica a cada una de las transconjugantes originadas,

portadoras de los plásmidos transferidos. Entre los aislados nosocomiales estudiados se encontró como predominante el género *Klebsiella* (56,6%). Las células receptoras de los plásmidos entrantes adquirieron multiresistencia a diversos antibióticos. La capacidad de estos plásmidos para establecerse en la célula receptora *E. coli*, independientemente del género original en el cual se encontraran, demuestra no solo la capacidad de transferencia de estos plásmidos, sino el rango amplio de hospedador que presentan, el cual les permite diseminarse sin barreras de género.

A los aislados originales (utilizados como donantes, Figura 1) y a las cepas de *E. coli* transconjugantes (Figura 2) se les realizó el aislamiento de DNA plasmídico. En todos los casos fue posible detectar la presencia de plásmidos, y en algunas cepas se observó la presencia de más de

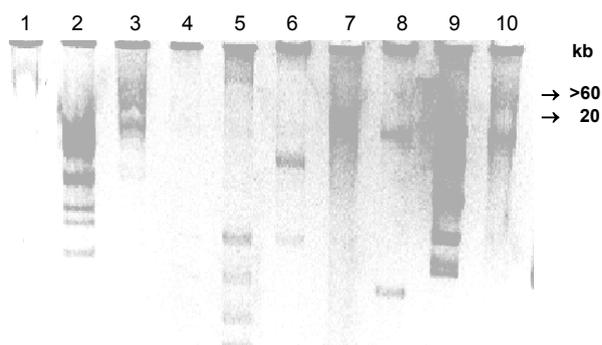


Figura 1. Aislamiento de DNA plasmídico obtenido de las muestras clínicas del HUC. Carriles: 1: 9713; 2: 9718; 3: 9728; 4: 9740; 5: 9752; 6: 9758; 7: 9781; 8: 9782; 9: 97107; 10: 97127.

una molécula extracromosomal. El 37% de las cepas transconjugantes presentan mas de un plásmido. Estos resultados indican que ocurrió co-transferencia simultánea de más de una molécula plasmídica. Al comparar el contenido plasmídico de las cepas donantes con el de las transconjugantes respectivas, se observó que no todos los plásmidos detectados en las cepas donantes fueron co-transferidos durante el proceso de conjugación. Sin embargo, siempre fueron transferidas las moléculas de alto peso molecular (mayores a 60 kpb).

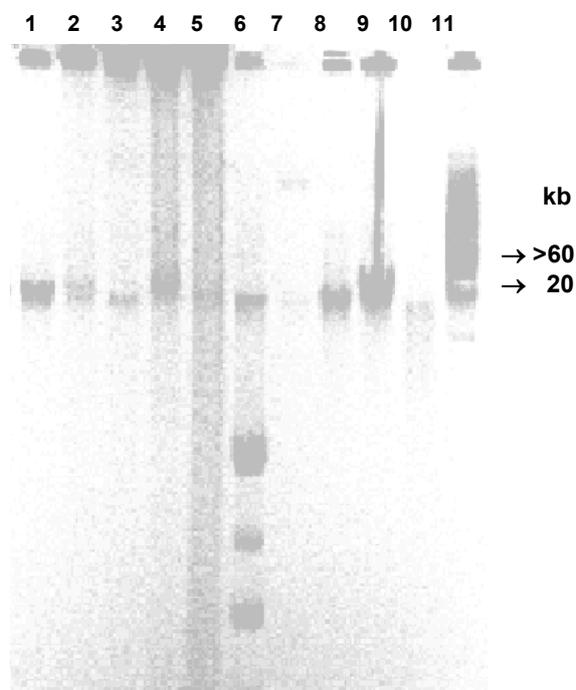


Figura 2. Aislamiento de DNA plasmídico de las transconjugantes obtenidas en este trabajo. Carriles: 1: 9713; 2: 9728; 3: 9740; 4: 9751; 5: 9718; 6: 9782; 7: 9752; 8: 9758; 9: 9781; 10: 97127; 11: 97107.

En todas las transconjugantes se observó la presencia de un plásmido de alto peso molecular, el cual pudiera ser común y estar presente en los géneros identificados en las

muestras analizadas. Para demostrar si se trata de un plásmido único, residente en los aislados nosocomiales sin distinción de género, se obtuvo y comparó el patrón de restricción (*fingerprinting*) del DNA plasmídico aislado a partir de cada una de las 28 cepas transconjugantes examinadas. Para el análisis de restricción se empleó la enzima *Pst*I (Figura 3, Tabla 1). El 36% de las cepas demostró la presencia de patrones únicos, diferentes entre sí y no compartidos entre los aislamientos. Basándose en la similitud entre las bandas obtenidas, en el resto de las bacterias (64%) se pudieron diferenciar cinco patrones de restricción, identificados con las letras A, B, C, D y E (Figura 3, Tabla 1). El análisis de estos patrones reveló un predominio de los patrones A (20%) y B (17%) entre los plásmidos de las transconjugantes. El plásmido de alto peso molecular que generó el patrón de restricción B, se encontró en cuatro de los géneros identificados en los diversos servicios del Hospital: *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Tabla 1), mientras que el plásmido que generó el patrón A se encontró en los géneros *Klebsiella* y *Escherichia*.

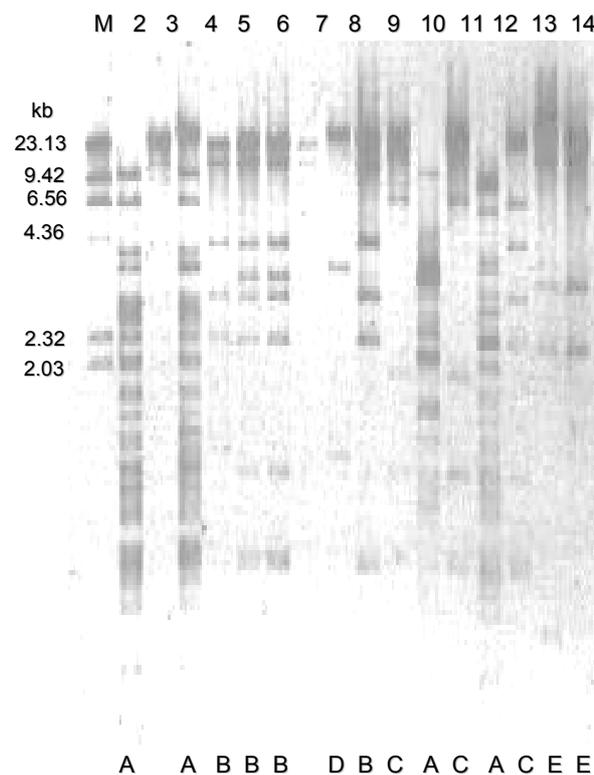


Figura 3. Patrón de digestión del DNA plasmídico obtenido de las cepas transconjugantes. Con las letras mayúsculas se designan los patrones de restricción obtenidos. Carriles: 1: M, marcador de Peso Molecular; 2: 9713; 3: 9729; 4: 9734; 5: 9740; 6: 9751; 7: 9752; 8: 9784; 9: 9790; 10: 9792; 11: 97102; 12: 97107; 13: 97114; 14: 97127; 15: 97141; 16: 97145; 17: 97146.

Con base a la suma de los pesos moleculares estimados de los fragmentos generados por la restricción, se calculó en 60 kpb el tamaño molecular aproximado de estos plásmidos.

## Discusión

En los estudios epidemiológicos se consideran cuatro puntos de interés primordial: el paciente, el organismo, la droga y el ambiente. Nuestro estudio está centrado en la caracterización de los organismos. Las bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos resultan de un proceso de selección positiva ejercido por la presencia de estos compuestos tóxicos en el medio ambiente, ya que al eliminarse a la población sensible, pasan a dominar el nicho ecológico antes compartido. En los centros hospitalarios este patrón de selección es habitual, ocasionando que las bacterias multiresistentes sean las causantes principales de infecciones intrahospitalarias. En nuestro país, como en el resto del mundo, se presentan reincidentemente problemas de resistencia antimicrobiana en los ambientes hospitalarios [7,8,14].

En nuestro laboratorio hemos venido estudiando la presencia y diseminación de los determinantes de resistencia en cepas de bacterias Gram negativas, multiresistentes a agentes antimicrobianos [9,10,11], evidenciando la asociación de la resistencia múltiple a los antibióticos con la presencia de plásmidos transmisibles, convirtiéndose estos en los agentes responsables de la diseminación de la resistencia entre diferentes especies bacterianas en un ambiente hospitalario.

Por el uso y abuso de los antibióticos como agentes profilácticos y terapéuticos, los hospitales funcionan como agentes selectores y reservorios de organismos resistentes, aumentando la incidencia de las infecciones nosocomiales. Las cepas analizadas en el presente trabajo fueron localizadas diseminadas en diversas zonas del Hospital. El análisis de los resultados no demostró ninguna relación estadísticamente significativa entre el género aislado, el lugar de procedencia de las muestras, el año de aislamiento, ni los antibióticos a los cuales ofrecen resistencia. Esto podría sugerir una diseminación estable de estas bacterias portadoras de multiresistencia, en todas las áreas del Hospital, representando un problema clínico importante.

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene como uno de sus objetivos principales el determinar la relación clonal que pueda existir entre varios aislados de una misma especie. Esta información puede ser muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multiresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva. El problema en estos estudios es que frecuentemente se obvia la presencia de plásmidos que pueden ser los responsables de la multiresistencia de los agentes causantes de la infección.

La transferencia y la cotransferencia de los plásmidos entre las bacterias son mecanismos que promueven la diseminación de un gran número de genes, y que pueden permitir a las bacterias sobrevivir en ambientes adversos. La transferencia puede producirse entre células de especies

y/o géneros diferentes, y capacita a la célula receptora de funciones que inicialmente no estaban presentes, tales como la resistencia a drogas, la producción de antibióticos, la resistencia a metales pesados, la producción de bacteriocinas, entre otros [15,16].

En las cepas multiresistentes analizadas en este trabajo observamos en todos los casos la presencia de plásmidos de diferente tamaño molecular. No todos los plásmidos residentes en las cepas donantes fueron cotransferidos durante el proceso de conjugación, pero siempre fueron transferidas las moléculas de alto peso molecular. Estos resultados demuestran que las bacterias causantes de infecciones intrahospitalarias en el HUC. portan plásmidos conjugativos, siendo capaces de transferirle a la cepa receptora hasta 14 determinantes de resistencia a diversos antibióticos, lo cual representa un serio problema de Salud Pública.

La identificación y clasificación de los plásmidos presentes en bacterias aisladas de ambientes hospitalarios es un rasgo de interés particular en Medicina, ya que estas moléculas extracromosomales pueden portar genes que codifiquen para diversos determinantes de resistencia a drogas, a metales pesados, factores de virulencia, etc. La identificación del plásmido y/o gen predominante en un área en particular puede ayudar al desarrollo de una quimioterapia más racional. Una manera sencilla, eficiente y confiable para caracterizar los plásmidos que se encuentran en algún ambiente en particular, es mediante el uso de endonucleasas de restricción, enzimas que cortan el DNA en secuencias específicas, generando un patrón determinado, característico y único para cada molécula. Estos patrones de restricción (*fingerprinting*) proporcionan información acerca de la diseminación de los plásmidos dentro del hospital, ya que su análisis permite observar posibles similitudes, discriminar entre diferentes moléculas en un área particular y establecer relaciones entre plásmidos de diferente origen, y discernir la posible ocurrencia del proceso de conjugación entre géneros poco relacionados. Igualmente nos permite estudiar la evolución de los plásmidos en el ambiente hospitalario, incluyendo la adquisición y diseminación de secuencias tipo transposones e integrones.

En las muestras analizadas en el presente trabajo, se evidenció la presencia de cinco diferentes patrones de restricción predominantes, dos de los cuales se encuentran considerablemente diseminados. Estos plásmidos son mediadores de la multiresistencia a los antibióticos, y con un amplio rango de hospedador, ya que pueden transferirse y mantenerse, independientemente del género bacteriano involucrado. Los plásmidos de este tipo son los candidatos ideales para explicar el flujo de genes entre diferentes bacterias, pero también son los candidatos ideales para explicar la multiresistencia de las bacterias a los diversos antibióticos de uso habitual en clínica.

Estos plásmidos con múltiples determinantes de resistencia han sido seleccionados en los ambientes clínicos por el abuso de los agentes antimicrobianos. Como consecuencia, la mayoría de estos antibióticos no son funcionales para combatir las infecciones causadas por las bacterias

que portan estos plásmidos. Asimismo, es preocupante la capacidad de estos plásmidos de transferirse entre distintas bacterias, sin importar el género.

El recurso más eficaz para combatir una infección nosocomial sigue siendo el uso adecuado y selectivo de los agentes antimicrobianos. Estos deben ser administrados racionalmente, y su selección adecuada para un tratamiento empírico exitoso dependerá de un análisis pormenorizado de los factores clínicos, microbiológicos y farmacológicos.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) a GA (03-33-5417-2004 y 03-33-5416-2004); y por FONACIT, a VRL (LAB97000677) y a GA (S1-98000843).

### Referencias

- [1] Kado, C I. Origen and evolution of plasmid. *Antonie van-Leeuwenhoek*. 1998; 73:117-126.
- [2] Alonso G., Vilchez G., Bruzual I., Rodríguez Lemoine V. Characterization of plasmid MIP233 (InchI3) of the H complex. *Res. Microbiol* 2002; 153:149-153.
- [3] Blanc DS: The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infection, Gen Evol* 2004; 4:193-197.
- [4] Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Nitzschke-Tiemann F, Zuschneid I, Groneberg K, Ruden H. How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: analysis of 1,022 outbreaks. *Infec Cont Hosp Epidemiol* 2005; 26:357-61.
- [5] Struelens MJ, Denis O, Rodriguez-Villalobos H. Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microbes Infect* 2004; 6:1043-1048.
- [6] Gastmeier P. Nosocomial infection surveillance and control policies. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:295-301.
- [7] De la Parte-Pérez, MA, Brito A, Guzmán M *et al*. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela: Análisis de una década. *Rev Soc Ven. Microbiol* 2001; 21:14-22.
- [8] Martín G, Carmona O, Comegna, M *et al*. Tendencia de la Resistencia a  $\beta$ -lactámicos y otros antimicrobianos de *Pseudomonas Aeruginosa* en Hospitales de Venezuela. Resistencia Nosocomial y Comunitaria. *Rev Soc Ven. Microbiol* 2003; 23:21-29.
- [9] Alonso G, Narváez P, Toba F, Gomes C, Pedroza R, Rodríguez Lemoine V. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *MIBE* 2001; 3:93-96.
- [10] Pedroza R, Torres L, Narváez P, Alonso G, Rodríguez Lemoine V. Multiresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram Negativos de origen hospitalario. *MIBE* 2001; 3:97-100.
- [11] Pedroza R, Ramírez A, Alonso G, Rodríguez Lemoine V. Plasmid-encoded resistance to arsenic compounds in Gram-negative bacteria isolated from a hospital environment in Venezuela. *Inter J Antimicrob Agents* 1997; 8:97-102.
- [12] Birnboim H, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7:1513-1523.
- [13] Sambrook I, Russell, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001. 3<sup>a</sup> Edition. Cold Spring Harbor, New York. Vol. 1-3.
- [14] Valenzuela P, Santos JR, Guzmán Blanco M, Comegna M: Evolución de la susceptibilidad a los antimicrobianos de bacilos Gram Negativos en Venezuela: Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana, 1988-2004. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. 2005. Disponible en: [www.caibco.ucv.ve](http://www.caibco.ucv.ve).
- [15] Alonso G, Vilchez G, Rodríguez Lemoine V. How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. *Inter Microbiol* 2000; 3:81-88.
- [16] Alonso G, Gomes C, González C, Rodríguez Lemoine V. On the mechanism of resistance to channel forming colicins (PacB) and tellurite encoded by plasmid Mip233 (Inch HI3). *FEMS Microbiol Letters*. 2000; 192:257-261.