



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

“ESTUDIO DE METILTRANSFERASAS INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES DE ORIGEN CLÍNICO”

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

P R E S E N T A:

**QBP JHOANA VIANEY MARTÍNEZ
HERNÁNDEZ**

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA RIBAS JAIMES

DR. GERARDO APARICIO OZORES



MÉXICO, DF, 2010

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii

ÍNDICE GENERAL

	Página
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1.0 Bacilos Gram negativos no fermentadores	1
1.2.0 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2.1. Taxonomía de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2.2. Características generales de <i>P. aeruginosa</i>	1
1.2.3. Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.2.4. Epidemiología de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.2.5. Patogénesis de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.2.6. Tratamiento de infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i>	3
1.3.0 <i>Acinetobacter</i> spp.	4
1.3.1. Taxonomía de <i>Acinetobacter</i> spp.	4
1.3.2. Características generales de <i>Acinetobacter</i> spp.	4
1.3.3. El género <i>Acinetobacter</i>	4
1.3.4. Importancia clínica de <i>Acinetobacter</i> spp.	4
1.3.5. Epidemiología de <i>Acinetobacter</i> spp.	5
1.3.6. Patogénesis de <i>Acinetobacter</i> spp.	5
1.3.7. Tratamiento de infecciones causadas por <i>Acinetobacter</i> spp.	6
1.4.0 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6
1.4.1. Taxonomía de <i>S. maltophilia</i>	6
1.4.2. Características generales de <i>S. maltophilia</i>	7
1.4.3. Importancia clínica de <i>S. maltophilia</i>	7
1.4.4. Epidemiología de <i>S. maltophilia</i>	7
1.4.5. Patogénesis de <i>S. maltophilia</i>	8

1.4.6. Tratamiento de infecciones causadas por <i>S. maltophilia</i>	8
1.5.0 Antibióticos	8
1.5.1 Generalidades de los antibióticos	8
1.5.2 Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas	10
1.5.3 Antibióticos que actúan en la subunidad 50S del ribosoma	11
1.5.4 Antibióticos que actúan en la subunidad 30S del ribosoma	11
1.5.4.1 Aminoglucósidos	11
1.5.4.2 Estructura química de los aminoglucósidos	12
1.5.4.3 Mecanismo de acción de los aminoglucósidos.	14
1.6.0 Mecanismos de resistencia	14
1.6.1. Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos	17
1.6.2 Metiltransferasas involucradas con la resistencia a antibióticos	17
1.7 JUSTIFICACIÓN	21
1.8 OBJETIVO	22
1.8.1 Objetivo general	22
1.8.2 Objetivos particulares	22
2.0 MATERIAL Y MÉTODOS	23
2.1. Material biológico	23
2.2. Esquema general de trabajo	24
2.3. Cultivo y conservación de <i>E. coli</i> DH5 α .	24
2.4. Identificación por pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos no fermentadores	25
2.5. Determinación de perfil de resistencia a antibióticos	25
2.6. Extracción de DNA total de las cepas en estudio	25
2.7. Obtención de DNA plasmídico	26
2.8. Utilización y diseño de iniciadores	26
2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
2.10. Electroforesis en geles de agarosa	27
2.11. Secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados	28

2.12. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoácidas, identidad y alineamientos múltiples	28
2.13. Reacciones enzimáticas de restricción	28
2.14. Localización de genes codificantes de metiltransferasas por medio de hibridación tipo Southern.	29
2.15. Clonación de los fragmentos de DNA amplificados	30
2.16. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	31
3.0 RESULTADOS	32
3.1 Determinación de perfil de resistencia a antibióticos.	32
3.2 Amplificación de los genes de metiltransferasas	34
3.3 Caracterización de <i>A. baumannii</i> HI3.	35
3.3.1 Análisis de la secuencia del amplicón de <i>armA</i> de <i>A. baumannii</i> HI3.	35
3.3.2 Amplificación del gen rRNA 16S de <i>A. baumannii</i> HI3.	36
3.3.3 Búsqueda de integrones en <i>A. baumannii</i> HI3.	37
3.3.4 DNA plasmídico de <i>A. baumannii</i> HI3.	38
3.3.5 Amplificación del gen <i>armA</i> empleando DNA plasmídico	39
3.3.6 Localización del gen <i>armA</i> mediante hibridación tipo Southern.	39
3.4 Análisis del amplicón de <i>S. maltophilia</i> .	41
4.0 DISCUSIÓN	47
5.0 CONCLUSIONES	50
6.0 BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los principales aminoglucósidos aminociclitoles empleados en la práctica clínica.	12
Tabla 2. Genes de metiltransferasas analizados en este estudio.	27
Tabla 3. Patrones de resistencia del total de las cepas.	33
Tabla 4. Patrones de resistencia de los microorganismos en estudio.	33
Tabla 5. Ubicación del gen armA dentro de fragmentos de DNA obtenidos con enzimas de restricción.	40
Tabla 6. Metiltransferasas involucradas en la resistencia a antibióticos.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos.	9
Figura 2. Ribosoma procarionte.	10
Figura 3. Anillo estructural de los aminoglucósidos.	13
Figura 4. Aminoglucósidos 4,6-disubstituido 2-desoxiestreptamina	13
Figura 5. Aminoglucósidos 4,5-disubstituido 2-desoxiestreptamina	13
Figura 6. Transferencia horizontal.	15
Figura 7. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.	16
Figura 8. Esquema general de trabajo	24
Figura 9. Mapa genético de PIJ2529	30
Figura 10. Determinación de susceptibilidad a aminoglucósidos	32
Figura 11. Amplificación de una región del gen <i>armA</i> de <i>A. baumannii</i> HI3	34
Figura 12. Análisis de la secuencia de <i>armA</i> .	35
Figura 13. Electroferograma del gen rRNA 16S de <i>A. baumannii</i> HI3.	36
Figura 14 Análisis de la secuencia del rRNA 16S de <i>A. baumannii</i> HI3.	37
Figura 15. Representación esquemática de un integrón clase I.	38
Figura 16. Electroferograma de DNA plasmídico de la cepa <i>A. baumannii</i> HI3	38
Figura 17. Amplificación del gen <i>armA</i> en DNA plásmidico de <i>A. baumannii</i> HI3.	39
Figura 18. Hibridación tipo Southern	40
Figura 19. Análisis del marco de lectura.	41
Figura 20. Búsqueda de la secuencia de nucleótidos de la secuencia Test dentro del genoma de <i>S. maltophilia</i> .	42
Figura 21. Análisis de la secuencia nucleotídica Test.	43
Figura 22. Homólogos obtenidos mediante blastx para la proteína Test.	44
Figura 23. Análisis de metiltransferasas	46

RESUMEN

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) multifármaco-resistentes son patógenos emergentes y una amenaza en todo el mundo debido principalmente a la amplia resistencia a los antibióticos y las opciones terapéuticas cada vez más reducidas. *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter* spp., son patógenos nosocomiales asociados con alta mortalidad y con falla terapéutica. Los aminoglucósidos son potentes antibióticos bactericidas cuyo sitio blanco es el ribosoma bacteriano, donde se unen al A sitio e inhiben la síntesis de proteínas. Recientemente, se ha descrito un importante mecanismo de resistencia a los antibióticos mediado por rRNA 16S metiltransferasas en BGNNF, que confiere un alto nivel de resistencia a casi todos los aminoglucósidos clínicamente importantes. Estas enzimas añaden un grupo metilo a ribonucleótidos específicos en los sitios de unión del antibiótico en el ribosoma, interrumpiendo la unión del antibiótico sin mucha interferencia con otras funciones del ribosoma. Hasta la fecha, se han descrito seis rRNA 16S metiltransferasas en diferentes países: RmtA, RmtB, RmtC, RmD, NpmA y ArmA. A la fecha, en México no hay ninguna investigación publicada sobre este importante mecanismo de resistencia en BGNNF. El objetivo de este estudio fue detectar e identificar genes de rRNA 16S metiltransferasas implicados con la resistencia a aminoglucósidos en BGNNF de origen clínico. Ochenta aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Acinetobacter* spp. provenientes de tres diferentes hospitales, se examinaron en busca de rRNA 16S metiltransferasas con base en su fenotipo de resistencia al menos, a uno de los cuatro aminoglucósidos empleados, los genes de metiltransferasas se identificaron mediante PCR y secuenciación del DNA. En este estudio, reportamos el primer hallazgo de *armA* en un aislado clínico de *Acinetobacter* spp. (HI3) en América Latina, el cual mostró resistencia a amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina. La presencia del gen *armA* en esta cepa explica la resistencia a aminoglucósidos 4, 6-disustituida 2-desoxiestreptamina, pero no a la neomicina, la cual puede ser debida a otro mecanismo de resistencia como bombas de eflujo o cambio de la permeabilidad de la membrana. El análisis genético y la hibridación tipo Southern revelaron que el gen *armA* de *Acinetobacter* spp. HI3 reside en un plásmido de aproximadamente 11, 500pb, en fragmentos de EcoRV ~5.000 bp, PstI ~5.000 bp, BglII ~4.500 bp o de NcoI de ~900bp. Además, se detectó un integrón de clase 1 en el genoma de *Acinetobacter* spp. HI3, que contiene dos genes, *aadA1* y *aacA4*, que codifican dos enzimas modificadoras de aminoglucósidos. De forma interesante, se identificó un posible gen de metiltransferasa en un aislado clínico de *S. maltophilia* INP1 obtenido de un paciente con fibrosis quística, esta cepa bacteriana también presentó resistencia a amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina. La secuenciación del DNA mostró una secuencia nueva que no se encuentra depositada en el GenBank. El análisis bioinformático sugirió que la metiltransferasa putativa traducida de *S. maltophilia* INP1 está relacionada con RmtC, pero es necesario obtener el gen completo para asociar su actividad biológica con la resistencia a los antibióticos cuyo sitio blanco es el ribosoma. Este es el primer informe de la 16S rRNA metiltransferasa ArmA en *Acinetobacter* spp. en América Latina y también el primer hallazgo de una secuencia nueva en *S. maltophilia* que codifica una metiltransferasa hipotética relacionada con RmtC. Nuestros resultados indican que las bacterias que contienen metiltransferasas relacionadas con resistencia a antibióticos están presentes en México, y su asociación con infecciones nosocomiales hace que sea esencial controlar mejor el uso de antibióticos. La vigilancia activa es necesaria para evitar la propagación de clones que contengan genes de metiltransferasas que confieran resistencia y estén asociados con plásmidos.

ABSTRACT

Multidrug resistant nonfermenters Gram negative bacilli (NFGNB) are emerging pathogens and a worldwide threat mainly due to the widespread antibiotic resistance and the increasingly narrow therapeutic options. *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* spp., are nosocomial pathogens associated with high mortality and treatment failure. Aminoglycosides are potent bactericidal antibiotics targeting the bacterial ribosome, where they bind to the A site and disrupt protein synthesis. Recently, an important antibiotic resistance mechanism mediated by 16S rRNA methyltransferases has been described in NFGNB that confer a high level of resistance to almost all clinically important aminoglycosides. These enzymes add a methyl group to specific ribonucleotides in antibiotic-binding sites of the ribosome, thereby disrupting the antibiotic binding without much interference with other functions of the ribosome. To date, six 16S rRNA methyltransferases have been described from different countries: RmtA, RmtB, RmtC, RmD, NpmA and ArmA. Up to the present time, in Mexico there is no published research on this important mechanism of resistance in NFGNB. The aim of this study was to detect and identify 16S rRNA methyltransferases genes involved in aminoglycoside resistance in NFGNB of clinical origin. Eighty *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* or *Acinetobacter* spp. isolates from three different hospitals, were screened for the presence of 16S rRNA methyltransferases based on phenotypes that were resistant to at least one of four tested aminoglycosides, the methyltransferases genes were identified by PCR and DNA sequencing. In this study, we report the first finding of *armA* in a clinical isolate of *Acinetobacter* spp. (HI3) in Latin America, which showed resistance to amikacin, gentamicin, tobramycin and neomycin. The *armA* gene presence in this strain explains the resistance to aminoglycosides 4, 6-disubstituted 2-deoxystreptamines, but not to neomycin, which can be due to another resistance mechanism like efflux pumps or change of permeability of the membrane. Genetic and Southern hybridization analyses revealed that the *armA* gene of *Acinetobacter* spp. HI3 resides on a plasmid of approximately 11,500bp in ~5,000 bp EcoRV, ~5,000 bp PstI, ~4,500 bp BglII or ~900 bp NcoI fragments. In addition, a class 1 integron was detected in *Acinetobacter* spp. HI3 genome containing two genes, *aadA1* and *aacA4*, that encode two aminoglycoside modified enzymes. Interestingly, a possible methyltransferase gene was identified in *S. maltophilia* INP1 clinical isolate obtained from a cystic fibrosis patient, this bacterial strain also presented resistance to amikacin, gentamicin, tobramycin and neomycin. The DNA sequencing showed a novel sequence not deposited in GenBank. The bioinformatics analysis suggested that the translated putative methyltransferase of *S. maltophilia* INP1 is related with RmtC, but is required to obtain the complete gene to associate its biological activity to antibiotic resistance due to ribosome targeting. This is the first report of ArmA 16S rRNA methyltransferase in *Acinetobacter* spp. in Latin America and also the first finding of a novel sequence in *S. maltophilia* encoding a hypothetical methyltransferase related to RmtC. Our results indicate that bacteria carrying methyltransferases related to antibiotic resistance are present in Mexico and their association with nosocomial infections makes it essential to control better the use of antibiotics. Active surveillance is necessary to prevent the spread of clones carrying methyltransferases resistance genes associated with plasmids.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1.0 Bacilos Gram negativos no fermentadores

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) constituyen un grupo de bacilos no esporulados, aerobios, que utilizan carbohidratos como fuente de energía a través de vías metabólicas distintas de la fermentación, muestran un crecimiento abundante a las 24 h sobre la superficie de agar hierro de Kliger o agar triple azúcar-hierro, pero ninguno de ellos utiliza la glucosa presente en el fondo del tubo y por lo tanto no se acidifica en este lugar el medio de cultivo (Winn y col., 2008).

1.2.0 *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Taxonomía de *P. aeruginosa* (URL1)

Reino: *Bacteria*

Filum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Pseudomonadaceae*

Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. aeruginosa*

1.2.2 Características generales de *P. aeruginosa*

Los microorganismos del orden *Pseudomonadales* son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos, aerobios estrictos, generalmente móviles por flagelos polares, catalasa y oxidasa positivos. Su metabolismo respiratorio es estrictamente aerobio utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones; sin embargo, en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor final de electrones permitiendo su crecimiento en anaerobiosis (Henry y col., 2005; Blondel-Hill y col., 2007).

1.2.3 Importancia clínica de *P. aeruginosa*

El género *Pseudomonas* consta de 76 especies, dentro de las cuales, *P. aeruginosa* es la más importante con respecto al número y tipo de infecciones generadas en humanos, principalmente en infecciones intrahospitalarias. Sumado a esta capacidad, se encuentra la emergencia de cepas multirresistentes a la mayoría de antibióticos convencionales (MacFaddin 2004; Castillo-Vera y col., 2006; Paterson 2006).

1.2.4 Epidemiología de *P. aeruginosa*

Las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes húmedos, particularmente *P. aeruginosa* es ubicua en el ambiente hospitalario, encontrándose en casi cualquier lugar en el que exista humedad, incluyendo equipos médicos, soluciones desinfectantes y jabones. La tasa de colonización en individuos sanos es baja, pero en los individuos hospitalizados dicha tasa se incrementa de forma proporcional a la duración del periodo de hospitalización (Henry y col., 2005).

P. aeruginosa puede producir infecciones graves en pacientes con quemaduras, con heridas traumáticas o quirúrgicas, que han sufrido manipulaciones en sus vías urinarias; que padecen enfermedades en los sistemas hematopoyético, retículo endotelial y linfático, y en todos aquellos pacientes que tienen problemas en la respuesta inmunológica ya sea de tipo humoral o celular. Las infecciones pulmonares causadas por este microorganismo aparecen principalmente en pacientes hospitalizados y con fibrosis quística (Henry y col., 2005; Winn y col., 2008).

1.2.5 Patogénesis de *P. aeruginosa*

Factores de virulencia de *P. aeruginosa*: (Winn y col., 2008).

- Alginato: Polisacárido capsular que permite a las bacterias infectantes adherirse a la superficie de las células y formar biopelículas que, a su vez, protegen a las bacterias de los antibióticos y del sistema inmune del huésped.

- Pili: Apéndices de la superficie bacteriana que permiten su adherencia a receptores de gangliósido GM-1 localizados en la membrana de las células epiteliales del huésped.
- Neuraminidasa. Elimina los residuos de ácido siálico de los receptores de gangliósido GM-1, lo que facilita la unión de los pilis.
- Lipopolisacárido: Exotoxina que causa síndrome de sepsis.
- Exotoxina A: Provoca destrucción tisular, inhibición de la síntesis proteica; interrumpe la actividad celular y la respuesta de los macrófagos.
- Exoenzima S: Inhibe la síntesis proteica.
- Fosfolipasa C: Destruye la membrana citoplasmática; desnaturaliza la sustancia tensoactiva pulmonar; inactiva las opsoninas.
- Elastasa: Escinde las inmunoglobulinas y los componentes del complemento, interrumpe la actividad de los neutrófilos.
- Leucocidina: Inhibe la función de neutrófilos y linfocitos.
- Piocianinas: Suprime a otras bacterias e interrumpe la actividad de los cilios respiratorios; produce daño oxidativo de los tejidos.
- Resistencia a los antibióticos: favorece la presencia de la bacteria en los hospitales y en los pacientes.

1.2.6 Tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*

El tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* puede ser difícil. Un espectro relativamente estrecho de antibióticos es eficaz e incluye las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), las ureidopenicilinas (mezlocilina, piperacilina), las cefalosporinas antipseudomonas (ceftazidima), los monobactámicos (aztreonam), los carbapenémicos (imipenem, meropenem), las quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina) y los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina). Casi todas las cepas son resistentes a otras penicilinas y a cefalosporinas, incluidas ampicilina, cefuroxima y cefatoxima. *P. aeruginosa* puede contener plásmidos u otros elementos móviles involucrados en multirresistencia y esta característica ha conducido a la aparición de algunas cepas resistentes a todos los antibióticos eficaces (Yokoyama y col., 2003).

1.3.0 *Acinetobacter* spp.

1.3.1 Taxonomía de *Acinetobacter* spp. (URL1)

Reino: *Bacteria*

Filum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Moraxellaceae*

Género: *Acinetobacter*

1.3.2 Características generales de *Acinetobacter* spp.

Los microorganismos de este género son Gram negativos, tienen morfología bacilar, a veces casi cocoide, son inmóviles, catalasa positivos, oxidasa negativos y aerobios estrictos. En los frotis teñidos por la técnica de Gram aparecen a menudo dispuestos en parejas y pueden ser difíciles de decolorar, pudiéndose observar en frotis directos de hemocultivos como cocos Gram positivos, lo que dificulta su identificación (Van Looveren y col., 2004; Pérez y col., 2007; Schreckenberger y col., 2007).

1.3.3 El Género *Acinetobacter*

Desde 1986, la taxonomía del género *Acinetobacter* se encuentra en constante revisión. La original y única especie nombrada *Acinetobacter calcoaceticus* ha sido abandonada, y por lo menos se han propuesto 32 especies genómicas, de las cuales solo 17 están asociadas con padecimientos en el humano, por lo anterior y debido a que la mayoría de los laboratorios realizan la identificación a nivel de género es que se les denomina *Acinetobacter* spp. (Winn y col., 2008).

La correcta identificación de *Acinetobacter* a nivel de especie por el uso de métodos fenotípicos es problemática. Los métodos genotípicos, como el análisis de restricción y secuenciación del DNA ribosomal 16S, así como el mapeo de macro-restricción por campos pulsados del genoma completo, han sido útiles para precisar la identificación de especies. Dentro del género, la inmensa mayoría de las especies de origen clínico, pertenecen a especies genómicas 2

(*Acinetobacter baumannii*), 3, y 13 sensu Tjernberg y Ursing (13TU) (Van Looveren y col., 2004; Lim y col., 2007; Winn y col., 2008).

1.3.4 Importancia clínica de *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter spp. es reconocido como un importante patógeno oportunista principalmente de pacientes inmunocomprometidos. Su contribución como agente causal de infecciones nosocomiales se ha incrementado en las últimas tres décadas (Van Looveren y col., 2004; Siegel 2008).

La persistencia de cepas *A. baumannii* endémicas en cuidados intensivos se ha visto relacionada con su capacidad de sobrevivir largos periodos en superficies inanimadas del ambiente inmediato al paciente (Wisplinghoff, y col., 2000). A pesar de que las especies de este género prevalecen en la naturaleza y se han observado generalmente como comensales en piel y tracto respiratorio de humanos, *Acinetobacter* spp. se ha encontrado como agente etiológico de serias enfermedades infecciosas como neumonía, infección del tracto urinario, endocarditis, infección de heridas, meningitis y septicemia (Van Looveren y col., 2004; Bonomo & Szabo 2006; Pérez y col., 2007).

1.3.5 Epidemiología de *Acinetobacter* spp.

Las especies del género *Acinetobacter* se encuentran habitualmente en el suelo y en el agua, y con mucha menor frecuencia en la piel y mucosas de personas sanas. Aunque son usualmente no patógenas, estas bacterias se han aislado asociadas, cada vez con mayor frecuencia, con septicemia, neumonía, meningitis, bacteriuria e infecciones de heridas en el entorno hospitalario (Vila y col., 1993; Siegel 2008).

A. baumannii ha sido reportado como multidrogorresistente (MDR) en hospitales de Europa, Norte América, Argentina, Brasil, China, Taiwán, Hong Kong, Japón, y Corea y en áreas remotas como Tahití en el Pacífico Sur (Pérez y col., 2007).

1.3.6 Patogénesis de *Acinetobacter* spp.

Aunque *Acinetobacter* spp. es considerado como un patógeno de grado bajo, ciertas características de este organismo pueden aumentar la virulencia de las cepas involucradas en infecciones, estas características incluyen: i) la presencia de polisacárido capsular formado por L-ramnosa, D-glucosa D-ácido glucorónico y D-manosa; ii) la propiedad de adhesión a las células epiteliales humanas por la presencia de fimbrias y/o el polisacárido capsular; iii) la producción de enzimas, las cuales pueden dañar el tejido adiposo, iv) el papel potencialmente tóxico del lipopolisacárido de la pared celular y la presencia del lípido A; y finalmente v) la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996).

1.3.7 Tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter* spp.

Las especies del género *Acinetobacter* son resistentes a la mayor parte de los antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos existentes, son sensibles a doxiciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas, ureidopenicilinas, imipenem, ampicilina-sulbactam y ceftazidima (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996; Wisplinghoof y col., 2000).

El tratamiento combinado con un aminoglucósido y ticarcilina o piperacilina es sinérgico y puede ser eficaz en las infecciones graves. (Bergogne-Bérézin y col., 1996). El antibacteriano con actividad demostrada contra *Acinetobacter* spp. multirresistentes es la colistina (Catchpole y col., 1997; Rodríguez-Hernández y col., 2004).

1.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

1.4.1 Taxonomía de *S. maltophilia* (URL1)

Reino: *Bacteria*

Filum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Xanthomonadales*

Familia: *Xanthomonadaceae*

Género: *Stenotrophomonas*

Especies: *S. maltophilia*

1.4.2 Características generales de *S. maltophilia*

Existe una diversidad genética considerable en *S. maltophilia*, esta especie consiste en al menos 9 grupos genómicos. *S. maltophilia* es un bacilo Gram negativo, aerobio, móvil, de metabolismo oxidativo, posee flagelos multitrícos polares y puede distinguirse con facilidad de otras pseudomonadales en virtud de ser lisina positivo, DNasa positivo y oxidasa negativo. Es una bacteria poco exigente, que se desarrolla en forma rápida en los medios de cultivo comúnmente utilizados (MacFaddin 2004; Winn y col., 2008).

Las colonias son rugosas de 3 a 5 mm de diámetro, color amarillo en MacConkey y café verdoso en gelosa sangre, generalmente no hemolíticas y tienen un olor característico a amoníaco (Juliet & Fernández 2006; LiPuma y col., 2007; Winn y col., 2008).

1.4.3 Importancia clínica de *S. maltophilia*

Siendo un microorganismo de baja patogenicidad, cuyo hábitat natural es el ambiente acuático, su importancia radica en la patología nosocomial, debido fundamentalmente a su alta resistencia a los antimicrobianos, lo que favorece su selección, además es la tercer especie de los bacilos Gram negativo no fermentadores aislado con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos (MacFaddin 2004; Juliet & Fernández 2006).

1.4.4 Epidemiología de *S. maltophilia*

S. maltophilia es ubicua y puede ser aislada de casi cualquier sitio clínico. En ocasiones produce infecciones oportunistas y está surgiendo como un patógeno hospitalario importante. El sitio más frecuente de aislamiento es el aparato respiratorio.

En los últimos años ha aumentado la frecuencia de aislamientos de *S. maltophilia* en algunos centros de referencia en fibrosis quística, y se ha observado asociación entre colonización de *S. maltophilia* y daño pulmonar.

En pacientes que no padecen fibrosis quística, se ha reportado que *S. maltophilia* causa un amplio espectro de enfermedades, como neumonía, bacteriemia, endocarditis, infecciones relacionadas con catéteres, colangitis, infecciones urinarias, meningitis e infecciones graves de heridas, sobre todo en pacientes con cáncer (Winn y col., 2008).

1.4.5 Patogénesis de *S. maltophilia*

S. maltophilia es un patógeno nosocomial importante, los factores de riesgo que incrementan las posibilidades de colonización o de infección por este microorganismo son la respiración asistida, la terapia con antibióticos de alto espectro, la cateterización y el estado de neutropenia (Henry y col., 2005).

1.4.6 Tratamiento de infecciones causadas por *S. maltophilia*

S. maltophilia es intrínsecamente resistente a múltiples familias de antibacterianos, incluyendo antibióticos antipseudomonas de uso frecuente, entre ellos los aminoglucósidos, muchos β -lactámicos y carbapenémicos. El trimetoprim-sulfametoxazol es el antibiótico de elección, aunque las infecciones graves pueden necesitar un tratamiento combinado con diferentes agentes antimicrobianos (Henry y col., 2005; Winn y col., 2008).

1.5.0 ANTIBIÓTICOS

1.5.1 Generalidades de los antibióticos.

Los antibióticos pueden ser clasificados con base en el componente celular o el sistema que afectan, además si éstos inducen la muerte celular (bactericidas) o simplemente inhiben el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos). En general estos mecanismos de acción se agrupan en 4 (Figura 1) (Tenover, 2006; Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Kohanski y col., 2010).

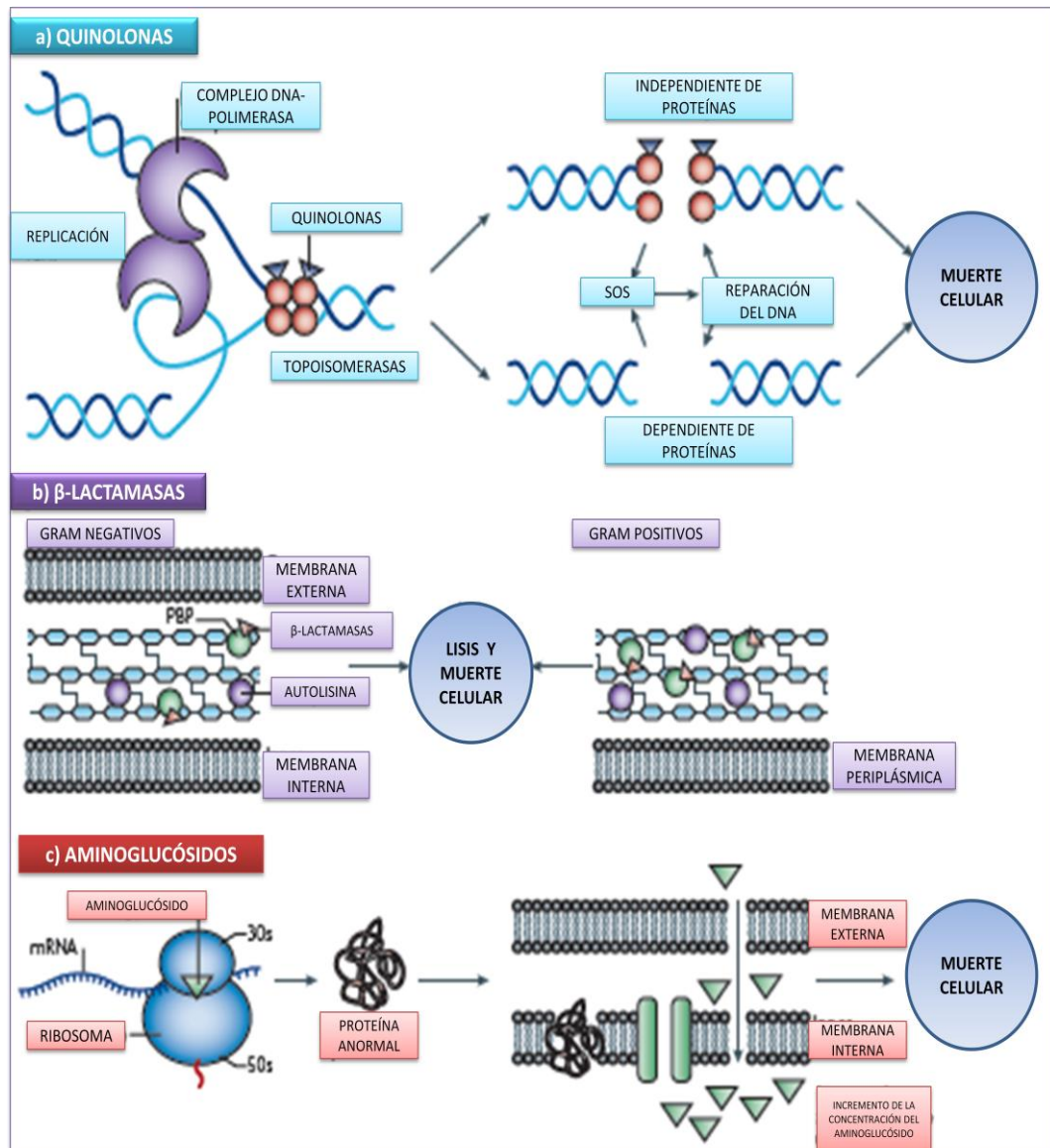


Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos. Los antibióticos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción: i) Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos, ii) Interferencia con la síntesis de pared celular, iii) Inhibición de la síntesis de proteínas. Modificado de Kohanski y col., 2010.

- 1) Interferencia con la síntesis de pared celular, la cual se desarrolla 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplasmática donde se sintetizan los precursores del peptidoglicano (fosfomicina, cicloserina); el transporte a través de la membrana citoplásmica (bacitracina, mureidomicinas) y la organización final de la estructura del peptidoglicano (glucopéptidos, β lactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactames).

- 2) Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas y rifampicina).
- 3) Inhibición de la síntesis de proteínas. Inhibidores de la fase de activación (mupirocina), inhibidores del inicio de la síntesis proteica (oxazolidinones aminoglucósidos); inhibidores de la fijación del aminoacil-tRNA al ribosoma (tetraciclinas, glicilciclinas) e inhibidores de la elongación (anfenicoles, lincosamidas macrólidos y cetólidos, estreptograminas).
- 4) Disrupción de la estructura de la membrana bacteriana. Estos antimicrobianos se comportan como bactericidas, a este grupo pertenecen las polimixinas, los lipopéptidos, los antibióticos poliénicos.

1.5.2 Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas (el proceso de traducción de mRNA) se produce en tres fases secuenciales: iniciación, elongación y terminación.

El ribosoma procarionte (Figura 2) se compone de dos subunidades, la subunidad 50S, formada a su vez por rRNA 23S, rRNA 5S y 31 proteínas ribosomales (L, *large* o grande), y la subunidad 30S, formada por el rRNA 16S y 21 proteínas ribosomales (S, *small* o pequeña). Estas subunidades se ensamblan durante la fase de iniciación, para comenzar la síntesis de proteínas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Kohanski y col., 2010).

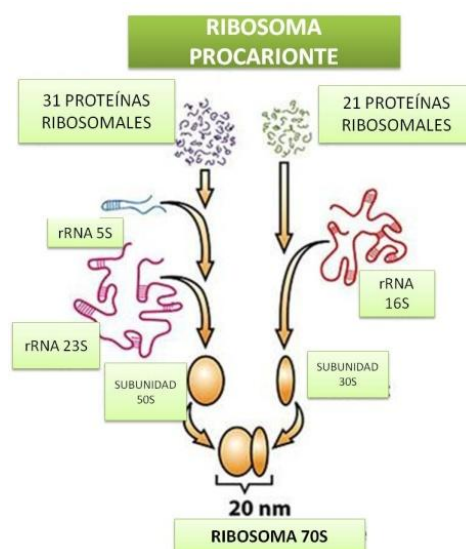


Figura 2. Ribosoma procarionte. Compuesto por la subunidad 50S compuesta por rRNA 23S, rRNA 5S y 31 proteínas ribosomales L, y la subunidad 30S conformada por rRNA 16S y 21 proteínas ribosomales S.

Los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas pueden dividirse en dos subclases: los que actúan a nivel de la subunidad 50S y los que lo hacen en la subunidad 30S.

1.5.3 Antibióticos que actúan en la subunidad 50S del ribosoma

Los antibióticos que tienen como blanco la subunidad 50S del ribosoma incluyen macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina), estreptograminas (dalfopristin– quinupristina), anfenicoles (cloranfenicol) y oxazolidinonas (linezolida), estos actúan físicamente bloqueando el inicio de la traducción de proteínas o la actividad de la enzima peptidiltransferasa (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Kohanski y col., 2010).

1.5.4 Antibióticos que actúan en la subunidad 30S del ribosoma

Los antibióticos que afectan la subunidad ribosomal 30S incluyen las tetraciclinas y los aminociclitolos. Las tetraciclinas funcionan bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-tRNA, e impidiendo la continuación de la síntesis de proteínas. La clase de aminociclitolos comprende espectinomina y aminoglucósidos (por ejemplo, estreptomina, kanamicina y gentamicina), que se unen el componente 16S rRNA de la subunidad ribosomal 30S. La espectinomina interfiere con la estabilidad de enlace del peptidil-tRNA con el ribosoma, inhibiendo la translocación (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Kohanski y col., 2010).

1.5.4.1 Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son antibióticos de amplio espectro, utilizados como tratamiento contra infecciones ocasionadas por bacilos Gram negativos. La mayoría de los aminoglucósidos son sustancias producidas por actinomicetos de los géneros *Streptomyces* o *Micromonospora* (Jana, 2006).

1.5.4.2 Estructura química de los aminoglucósidos.

Su estructura química se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol), por lo tanto, su denominación correcta es “aminoglucósidos aminociclitoles”, no obstante en la práctica solo se emplea el primer nombre para designar este grupo de antibióticos (Palomino & Pachón, 2003).

Dependiendo del núcleo aminociclitol que forme el aminoglucósido, éstos se clasifican a su vez en dos grandes grupos (Tabla 1), el primero de ellos posee como núcleo aminociclitol la estreptidina, y como único miembro de este grupo, se encuentra la estreptomina (Figura 3B), cuya estructura está compuesta solamente por aminociclitol sin componente aminoglucósido. El segundo grupo posee como núcleo la desoxiestreptamina (Figura 3A), y es el grupo más amplio e incluye a la mayoría de los compuestos utilizados en la práctica clínica actual (Mella y col., 2004; Jana, 2006).

Tabla 1. Clasificación de los principales aminoglucósidos aminociclitoles empleados en la práctica clínica.

Núcleo aminociclitol		Ejemplos
Estreptidina		Estreptomina
Desoxiestreptamina	4,5 disustituidos	Neomicinas Paromomicinas Ribostamicina Butirosina Lividomicina A
	4,6 disustituidos	Kanamicina Gentamicina Tobramicina Amikacina Dibekacina Netilmicina

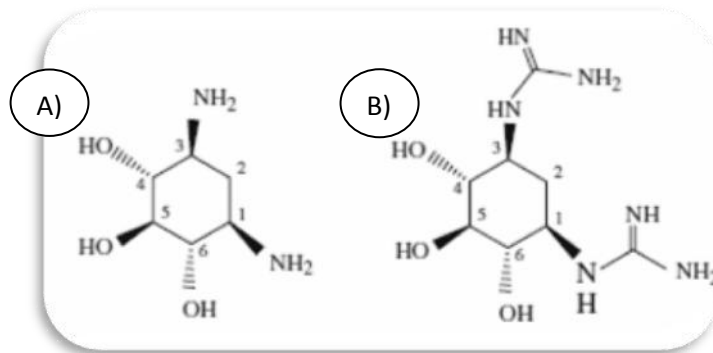
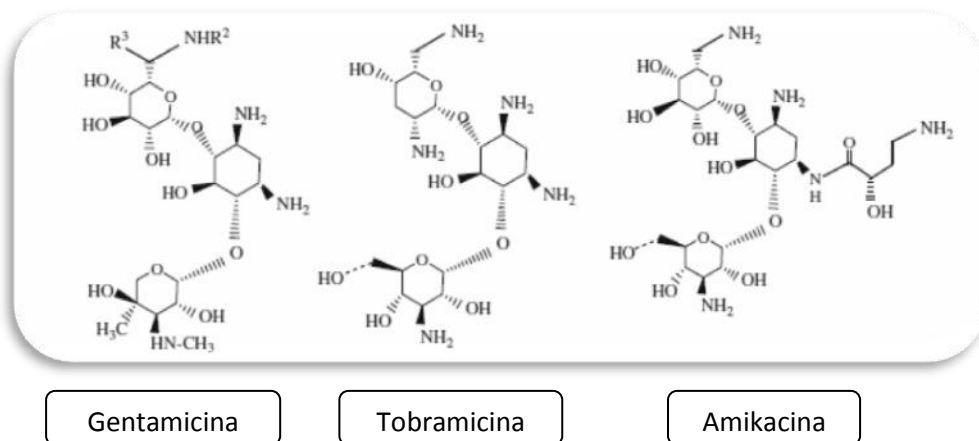


Figura 3. Anillo estructural de los aminoglucósidos.

Núcleo aminociclitol. A) Desoxiestreptamina y B) Estreptidina. Jana, 2006.

Los aminoglucósidos con núcleo aminociclitol de desoxiestreptamina (DOS) se dividen en dos tipos estructurales basados en la posición de sus uniones glicosídicas (Tabla 1): el primer grupo, los aminoglucósidos 4,6-disustituidos 2-DOS (Figura 4), como gentamicina, tobramicina, amikacina, y netilmicina y el segundo grupo comprende los 4,5-disustituidos 2-DOS como neomicina y paromomicina (Figura 5) (Jana, 2006).

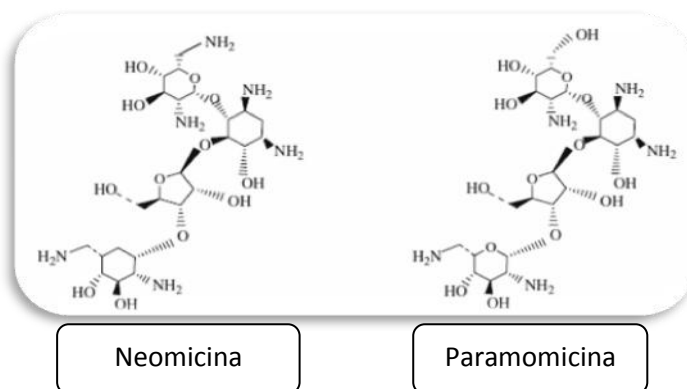


Gentamicina

Tobramicina

Amikacina

Figura 4. Aminoglucósidos 4,6-disustituido 2-desoxiestreptamina



Neomicina

Paramomicina

Figura 5. Aminoglucósidos 4,5 2-desoxiestreptamina

1.5.4.3 Mecanismo de acción de los aminoglucósidos.

El mecanismo de acción antibacteriana de los aminoglucósidos es facilitado por su estructura química, pues es un polication que muestra alta afinidad por residuos de carga negativa en la membrana externa de los bacilos Gram negativos. Su actividad antibacteriana se debe a la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la unión al rRNA 16S y la disrupción de la integridad de la membrana celular bacteriana (Mingeot-Leclercq y col., 1999; Jana, 2006).

Una secuencia altamente conservada del rRNA 16S en el sitio A rige la interacción entre el codón y el anticodón aminoacil-tRNA, la mayoría de los aminoglucósidos se unen a esta región. La unión entre el rRNA 16S y el aminoglucósido es crucial para la actividad antimicrobiana, ya que mutaciones en la región del rRNA 16S del sitio A del ribosoma o modificaciones del antibiótico por enzimas bacterianas que afectan esta interacción, conllevan a la resistencia (Galimand y col., 2003).

1.6.0 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Las bacterias resistentes a antibióticos, genéticamente pueden poseer mecanismos intrínsecos o adquiridos que favorecen esta característica. Los primeros son aquellos que naturalmente se encuentran en genes del huésped, por ejemplo β -lactamasas de bacterias Gram negativas y algunos sistemas de eflujo MDR (Aleksun & Levy, 2007).

Dentro de los mecanismos adquiridos, existen dos formas en que los microorganismos pueden adquirir resistencia contra agentes antimicrobianos, la transferencia vertical y horizontal.

La transferencia vertical se refiere al desarrollo de resistencia adquirida debida a mutaciones cromosomales y la selección de éstas cepas, en tanto que, la transferencia horizontal (Figura 6), el desarrollo de resistencia se da por la adquisición de nuevo material genético proveniente de otros microorganismos resistentes, ya sea mediante conjugación (vía plásmidos y transposones conjugativos), transducción (vía bacteriófagos) y/o transformación (vía incorporación al genoma del huésped, fragmentos de DNA cromosomal o plasmídico libre, proveniente de algún otro microorganismo). Los integrones

son un ejemplo de estos elementos genéticos, pues poseen más de un casete de resistencia a antibióticos, aunado a esto, la mayoría de ellos se encuentran localizados en elementos genéticos móviles como transposones y plásmidos, lo que favorece su diseminación entre diversos microorganismos. Actualmente se conocen 9 clases de integrones, y los miembros de la clase 1, 2 y 3, contienen genes de casete de resistencia a los antibióticos (Sabaté & Prats, 2002; Galimand y col., 2005; Tenover, 2006; Alekshun & Levy, 2007; Allen y col., 2010).

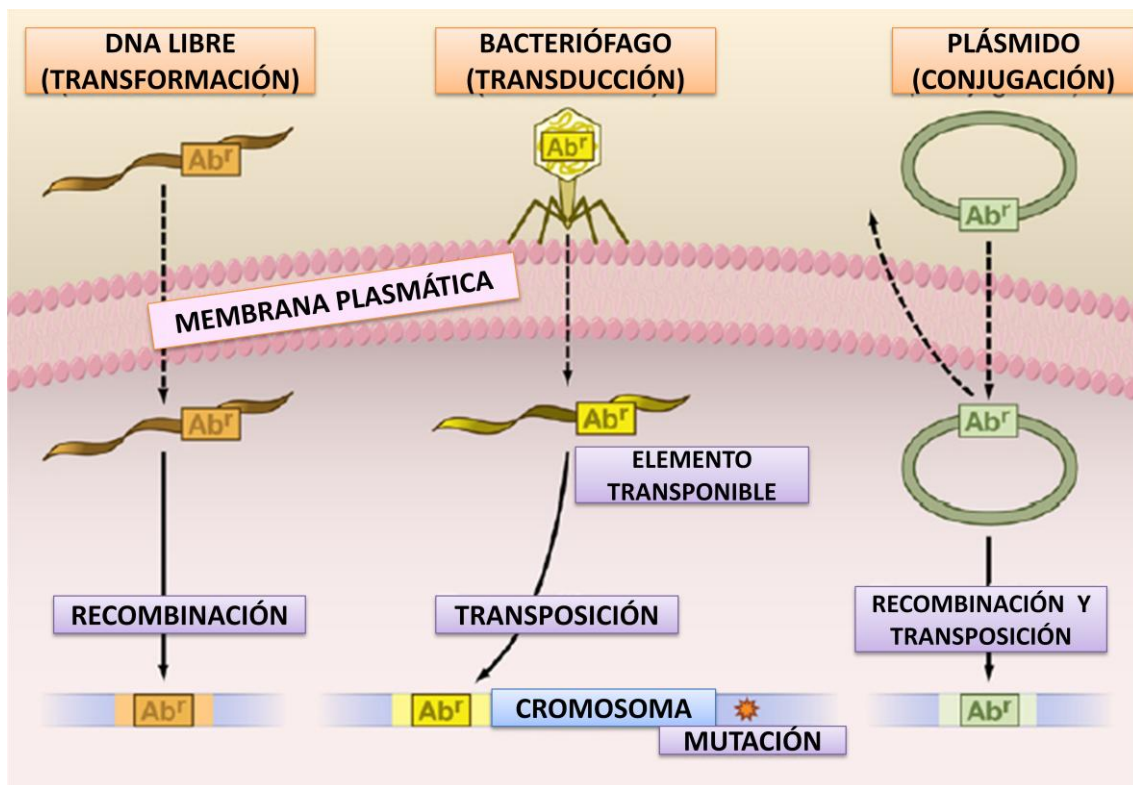


Figura 6. Transferencia horizontal. Adquisición de nuevo material genético mediante conjugación, transducción y/o transformación. Modificado de Alekshun & Levy, 2007.

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos de resistencia a antibióticos (Figura 7), entre los cuales tenemos: (Alekshun & Levy, 2007; Allen y col., 2010).

- Modificación del blanco, al cual se une al agente antibacteriano, por mutación en proteínas ribosomales o en el rRNA 16S.

- b) Producción de enzimas que inactivan el agente antimicrobiano (rRNA metiltransferasa modificadora del sitio blanco de eritromicina en *Staphylococcus*). Donde se incluye la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos como aminoglucósido acetiltransferasas, aminoglucósido fosforilasas y aminoglucósido adeniltransferasas.
- c) Decremento de la acumulación intracelular del antibiótico por alteración de la permeabilidad de la membrana externa, disminución del transporte de la membrana interna o sobre-expresión de bombas que expulsan el antimicrobiano al exterior de la célula, sin permitir que éste pueda realizar su efecto.

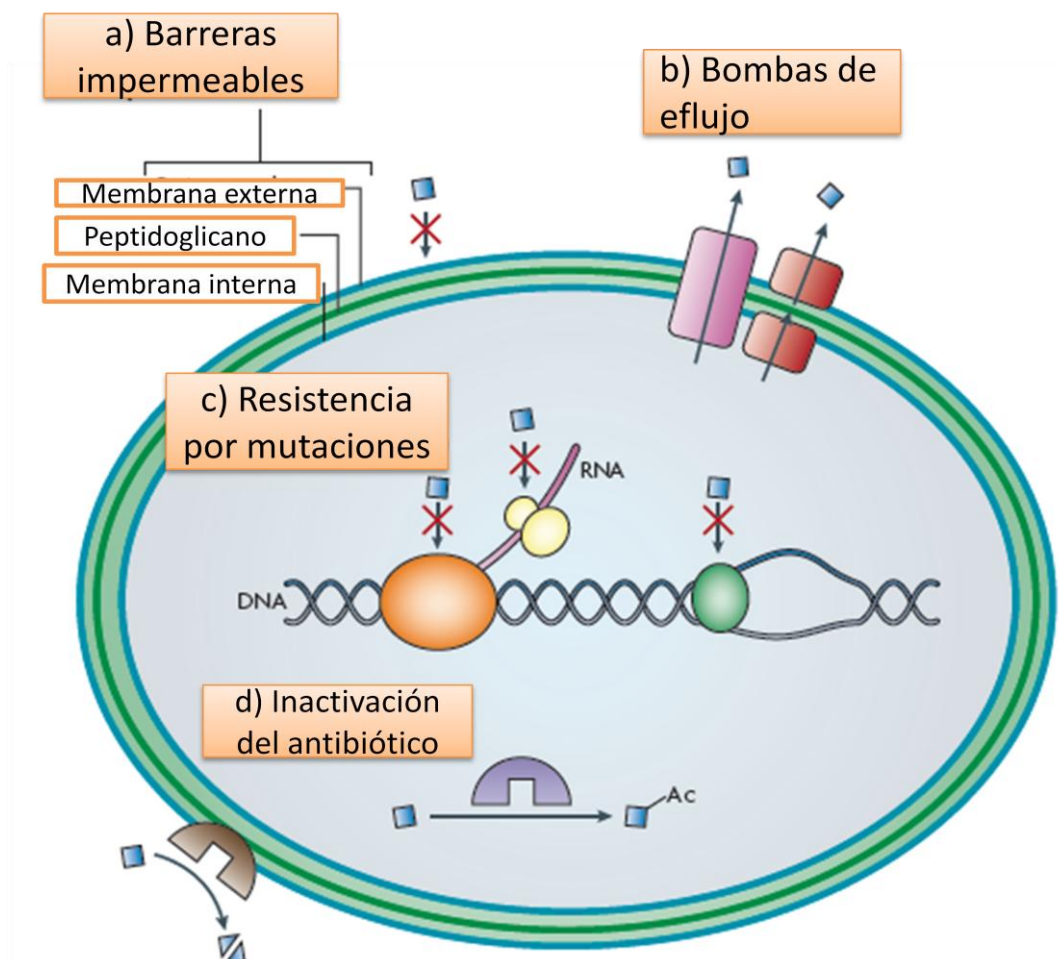


Figura 7. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. Los mecanismos de resistencia se basan modificación del sitio blanco, producción de enzimas que inactivan el antibiótico, decremento de la acumulación intracelular del antibiótico y secuestro del mismo. Modificado de Allen y col., 2010

Recientemente, como un nuevo mecanismo de resistencia contra antibióticos cuyo sitio de acción son los ribosomas, entre bacterias patógenas de importancia clínica, se ha encontrado la modificación del rRNA 16S y 23S por metiltransferasas codificadas principalmente en plásmidos (Kehrenberg y col., 2005; Wachino y col., 2006; Périchon y col., 2007,).

1.6.1 Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos

Se han reportado cuatro mecanismos de resistencia a aminoglucósidos en bacterias patógenas. El mecanismo más frecuente es la modificación estructural del aminoglucósido por enzimas específicas (acetilación, fosforilación y/o adenilación). El segundo mecanismo es la reducción de la concentración intracelular del aminoglucósido (alteración en la permeabilidad de la membrana externa, reducción en el transporte de la membrana interna o un incremento de la excreción por las bombas de eflujo). El tercer mecanismo es la modificación del sitio blanco por mutaciones en las proteínas ribosomales o en el rRNA 16S. Y el último mecanismo, recientemente descubierto, que confiere altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos clínicamente disponibles, excepto la estreptomicina, se asocia con la metilación post-transcripcional del rRNA por medio de metiltransferasas que usan como cofactor a la S-adenosil-L-metionina (SAM), (Bogaerts y col., 2007; Fritsche y col., 2008; Schmitt y col., 2009).

1.6.2 Metiltransferasas involucradas en la resistencia.

Las metiltransferasas (MTasas) son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo metilo del cofactor SAM al nucleótido blanco en una forma muy específica. La sustitución o metilación de bases en el rRNA en regiones involucradas en la unión entre éste y el aminoglucósido pueden llevar a la pérdida de la afinidad del antibiótico y a la resistencia del microorganismo (Galimand y col., 2003; Chow y col., 2007).

La familia Agr (del inglés, *aminoglycoside resistance*) de rRNA 16S metiltransferasas se encuentra naturalmente en organismos productores de aminoglucósidos como *Streptomyces* spp. y *Micromonosporas* spp. A diferencia de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que varían su intervalo de sustratos, las metilasas adquiridas, confieren altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos de importancia clínica (Yokoyama y col., 2003; Liou y col., 2006).

A la fecha se han encontrado 6 genes que codifican para rRNA 16S metiltransferasas designadas como: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD y NpmA, las cuales pertenecen a la familia Agr.

ArmA (del inglés, *aminoglycoside resistance methylase*) fue la primera rRNA 16S metiltransferasa reportada, la cual metila la posición 7 del nucleótido G1405 en el rRNA 16S y confiere resistencia a aminoglucósidos 4,6-disustituidos DOS. Se encontró en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada de una infección de tracto urinario en Francia formando parte del transposón Tn1548, que a su vez estaba localizado en un plásmido conjugativo que codifica para β -lactamasas de espectro extendido CTX-M-3. En estudios posteriores sobre la diseminación de esta enzima en varios países, se demostró su presencia en *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Shigella flexneri* (Galimand y col., 2003; Galimand y col., 2005; Liou y col., 2006; Lee y col., 2006; Park y col., 2006).

El producto del gen *rmtA*, RmtA, fue identificado en la cepa *P. aeruginosa* AR-2, que mostró altos niveles de resistencia contra aminoglucósidos 4,6-disustituidos DOS en Japón (Yokoyama y col., 2003; Yamane y col., 2004)

El gen *rmtB* fue encontrado en un aislado de *S. marcescens*, de un paciente en Japón, esta cepa exhibía un alto grado de resistencia a algunos aminoglucósidos, incluyendo arbekacina. RmtB presentó una similitud del 82% con la RmtA de *P. aeruginosa* (Doi y col., 2004), esta enzima metila la posición 7 del nucleótido G1405 del rRNA 16S (Périchon y col., 2007).

El gen que codifica para la metilasa RmtC fue identificado por primera vez en un plásmido de un aislado clínico de *Proteus mirabilis* en Japón, el cual presentó un alto nivel de resistencia principalmente a aminoglucósidos 4,6-disustituidos 2-DOS, pero no contra aminoglucósidos no 4,5-disustituidos 2-DOS, como estreptomina y neomicina, al igual que RmtA, RmtB y ArmA (Wachino y col., 2006).

RmtD es la primera rRNA 16S metiltransferasa de *P. aeruginosa* reportada en América Latina, específicamente en Brasil, posteriormente se encontró en *K. pneumoniae* y otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Confiere resistencia a aminoglucósidos 4,6-disustituidos DOS, como arbekacina, amikacina, tobramicina y gentamicina, pero no confiere resistencia contra apramicina, neomicina, o estreptomina, que son aminoglucósidos estructuralmente diferentes (Doi y col, 2007; Doi y col., 2008).

NpmA es una rRNA 16S metiltransferasa que fue descrita recientemente en cepas de *E. coli* aisladas en Japón, esta enzima confiere resistencia tanto a aminoglucósidos 4,6-disustituidos DOS, como a aminoglucósidos 4,5-disustituidos DOS, incluyendo neomicina y ribostamina, debido a una metilación en la posición N-1 del nucleótido A1408 (Wachino y col., 2007).

La adquisición de rRNA 16S metiltransferasas puede conferir a las bacterias Gram negativas una gran ventaja en ambientes clínicos donde se prescriben una gran variedad de aminoglucósidos semisintéticos (Yamane y col., 2005).

Dentro de nuestro equipo de investigación se abordan diferentes aspectos sobre mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Entre éstos, la resistencia bacteriana a aminoglucósidos reviste una gran importancia ya que va en aumento en el ámbito mundial, lo que representa un serio problema de salud pública. El mecanismo mediado por la metilación del rRNA 16S puede resultar en un amplio nivel de resistencia bacteriana a combinaciones específicas de aminoglucósidos. A pesar de su impacto, este mecanismo ha sido poco estudiado en el mundo y en nuestro país no se ha abordado. Este trabajo es el primero en estudiar las rRNA 16S metiltransferasas en bacilos Gram negativos no fermentadores de interés clínico en México.

1.7 JUSTIFICACIÓN

El aumento en el número de infecciones intrahospitalarias causadas por bacilos Gram negativos no fermentadores multirresistentes es un problema de salud pública, lo que lleva a estudiar los diferentes mecanismos de resistencia. Los aminoglucósidos son ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas, pero el incremento de cepas resistentes se ha reportado desde finales de la década de 1970. La creciente preocupación sobre la presencia y dispersión de genes involucrados en la resistencia contra aminoglucósidos, en particular los que codifican las metiltransferasas, es porque éstos tienen una presentación expansiva entre los bacilos Gram negativos no fermentadores como *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*. La expresión de rRNA 16S metiltransferasas ha emergido recientemente como un mecanismo de resistencia a todos los aminoglucósidos 4,6-disustituídos 2-DOS, como la amikacina, tobramicina y gentamicina, y ocasionalmente a los aminoglucósidos 4,5-disustituídos 2-DOS, como neomicina. Se han encontrado diferentes genes de metiltransferasas alrededor del mundo, como en Japón (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC* y *armA*), Taiwán (*rmtB* y *armA*), Corea (*armA* y *rmtB*), Europa (*armA*), Estados Unidos (*armA* y *rmtB*) y Brasil (*rmtD*) en diversos microorganismos aislados de infecciones nosocomiales. Sin embargo, en México no se ha realizado un estudio para evaluar la presencia y distribución de estos genes entre los bacilos Gram negativos no fermentadores de interés clínico.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo General

- Identificar y determinar el tipo de metiltransferasas involucradas en la resistencia a aminoglucósidos en cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores de origen clínico.

1.8.2 Objetivos Particulares

- Seleccionar de nuestra colección de cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores de origen clínico, aquellas que presenten resistencia a los aminoglucósidos amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina.
- Determinar los tipos de metiltransferasas presentes en los BGNNF en estudio, a partir del análisis bioinformático de los genes que las codifican.

2.0 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

Se incluyeron 139 cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores de la colección de cepas del Laboratorio de Producción y Control de Biológicos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 63 son provenientes del Instituto Nacional de Pediatría, 11 provienen del Instituto Nacional de Nutrición (Salvador Zubirán), 5 del Hospital General de Zona No. 25 del IMSS, 5 fueron aisladas en un brote en el Hospital General de Chilpancingo, 7 del hospital General del Centro Médico la Raza del IMSS y finalmente 48 fueron obtenidas del Hospital de Infectología del IMSS. Esta colección de 139 cepas está conformada por 131 cepas *P. aeruginosa*, 6 cepas *A. baumannii* y dos cepas de *S. maltophilia*.

Escherichia coli DH5 α Φ 80*lacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(*r_{k-1}*_{mk+}), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169. Cepa utilizada para los experimentos de clonación y a partir de la cual se obtuvo el DNA plasmídico recombinante.

Plásmido pIJ2925 *amp^r*, *β gal*, vector de expresión con el promotor *lac*, se utilizó para la clonación de regiones génicas de los bacilos Gram negativos no fermentadores de estudio y para los ensayos de expresión de metiltransferasas.

E. coli ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 como cepas controles de calidad para la prueba de sensibilidad a antibióticos por la técnica de difusión en disco.

2.2 Esquema general de trabajo

En la Figura 8 se muestra la estrategia experimental que se abordó para cumplir los objetivos de este trabajo.

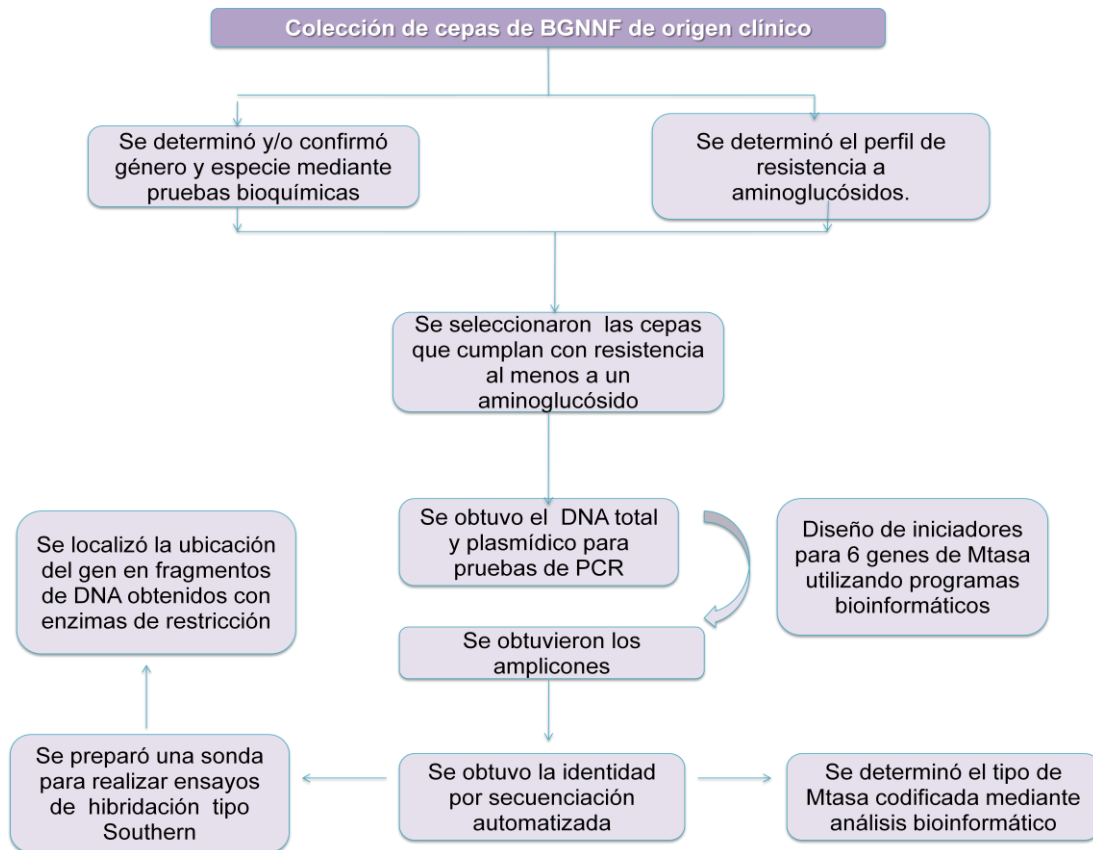


Figura 8. Esquema general de trabajo

2.3 Cultivo y conservación de *E. coli* DH5 α .

Los cultivos de *E. coli* DH5 α se realizaron utilizando el medio de cultivo LB (10g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y 1000 mL agua c.b.p., en el caso de la preparación de medio sólidos, se agregó a la mezcla 15 g de agar). La conservación de las cepas y de las clonas recombinantes se llevó a cabo cultivando las cepas en 10 mL de medio LB en agitación a 37°C durante 24 h, se centrifugaron los cultivos a 3100 x g a 4°C durante 15 min y el sobrenadante se decantó. El paquete celular de cada una se disgregó y se adicionaron 2 mL de medio LB con glicerol al 20%, se homogenizaron las células en el medio y se almacenaron en microtubos estériles en alícuotas de 500 μ L, los viales se conservaron a -70°C (Sambrook y Russell, 2001).

2.4 Identificación por pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos no fermentadores

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el Manual of Clinical Microbiology 9^a Ed (Blondel-Hill y col., 2007; LiPuma y col., 2007; Schreckenberger y col., 2007).

2.5 Determinación de perfil de resistencia a antibióticos

Se determinó el perfil de resistencia por el método de difusión en disco de papel siguiendo las instrucciones y criterios del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

2.6 Extracción de DNA total de las cepas en estudio

Se obtuvieron cultivos de las cepas en estudio y de las de *E. coli* recombinantes en 3 mL de medio LB, incubando a 37°C durante 16-24 h. A continuación cada uno de ellos se centrifugó a 3000 x g durante 10 min, posteriormente se resuspendió la pastilla o sedimento bacteriano en 100 µL de STE con lisozima (10 mg/mL) y se homogenizó e incubó a 37°C entre 30-45 min. Terminado este tiempo de incubación se adicionaron 300 µL de una solución Tris HCl (50 mM), EDTA (1 mM), SDS (1%), proteinasa K (50 µg/mL), se homogenizó e incubó durante 60 min a 50°C.

Posteriormente se adicionaron 200 µL de fenol equilibrado o saturado con Tris pH 8.0. La mezcla anterior se centrifugó para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se recolectó la fase acuosa y se adicionaron 200 µL de fenol-cloroformo y se mezcló por inversión. Nuevamente se centrifugó a 3000 x g durante 10 min, se separó la fase acuosa, y se adicionó 1 µL de RNasa, se incubó 37°C durante 30 min. Se adicionó 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M y muy lentamente se adicionaron 500 µL de etanol absoluto frío y se homogenizó suavemente por inversión, dejó durante una noche a -20°C. Al siguiente día se centrifugó a 3000 x g durante 10 min y se decantó el etanol, el resto de etanol se eliminó al vacío a temperatura ambiente en un equipo SpeedVac (Savant) durante aproximadamente 15 min. Finalmente se resuspendió el DNA en 50 µL de agua tipo I estéril y se conservó a -20°C hasta su uso (Modificado de Sambrook y Russell, 2001).

En forma alternativa, se obtuvo el DNA total mediante el estuche de reactivos ZR Genomic DNA II, de Zymo Research, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

2.7 Obtención de DNA plasmídico

Se centrifugaron 3 mL de un cultivo por 10 min a 3000 x g, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en 100 μ L de GTE (glucosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM) frío. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y después se agregaron 200 μ L de solución de lisis (SDS 10%, NaOH 10 N).

Se sometió la mezcla a una ligera agitación por inversión y se dejó en baño de hielo durante 5 min, posteriormente se adicionaron 150 μ L de CH₃OOK 3M y se agitó ligeramente por inversión, inmediatamente se dejó en baño de hielo por 5 min más.

Posteriormente, se centrifugó a 12000 x g por 5 min, se tomó el sobrenadante y se le adicionó una mezcla de fenol-cloroformo volumen a volumen, agitando por inversión. Se centrifugó nuevamente a 12000 x g durante 5 min; se extrajo la fase acuosa a un tubo limpio previamente esterilizado y se le adicionó etanol absoluto frío para precipitar el DNA a -20°C durante una noche.

Se centrifugó a 12000 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, los restos de alcohol se eliminaron colocando las muestras en un desecador de la marca Savant, tipo Seed Vac (DNA110-120) durante 10 min.

Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 μ L de agua estéril desionizada y se conservó a -20°C (Sambrook y Russell, 2001). En forma alternativa, se obtuvo el DNA total mediante el estuche de reactivos Zyppy Plasmid Miniprep, de Zymo Research, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

2.8 Utilización y diseño de iniciadores

Para amplificar fragmentos los genes de las metiltransferasas de interés (Tabla 2), de la región conservada del gen rRNA 16S, y de los integrones clase I, clase II y clase III, se utilizaron iniciadores previamente reportados, y en algunos casos se requirió diseñar otros por medio de herramientas

bioinformáticas, tales como el programa BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) y Primer-BLAST del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los EE.UU.

Tabla 2. Genes de metiltransferasas analizados en este estudio.

Gen	Tamaño del amplicón	Confiere resistencia a aminoglucósidos:
<i>armA</i>	315 pb	4,6 disustituidos 2-DOS
<i>rmtA</i>	635 pb	
<i>rmtB</i>	173 pb	
<i>rmtC</i>	711 pb	
<i>rmtD</i>	401 pb	
<i>npmA</i>	415 pb	4,5 disustituidos 2-DOS

2.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μL , como molde se utilizó DNA total o DNA plasmídico. La mezcla para esta reacción incluyó ≈ 100 ng de DNA molde, 30 pmol de cada uno de los iniciadores correspondientes, 1.25 U de Pfx DNA polimerasa (Invitrogen), 5 μL de regulador 10X, 5 μL de optimizador, 1 μL de MgCl_2 (50 mM), 5 μL de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (2 mM) y 29.5 μL de agua estéril desionizada. Las mezclas fueron sometidas a 35 ciclos de amplificación en un termociclador GeneAmp 9700, de Perkin-Elmer®, la temperatura inicial fue de 94°C por 5 min y cada ciclo de amplificación comprendió 94°C por cada 45 s para desnaturalización, temperatura de alineamiento por un minuto, 72°C por 2 min y finalmente 10 min a 72°C para extensión (Sambrook y Russell, 2001).

2.10 Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de los productos de PCR, del DNA total, plasmídico y de los productos de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% o al 1.5%, utilizando como regulador TBE 0.5X (0.045 M Tris-Borato,

0.001 moles EDTA), las muestras se sometieron a electroforesis de 85 a 100 volts, se revelaron con bromuro de etidio a 10 µg/mL (Sambrook y Russell, 2001) y se observaron con un transiluminador de luz ultravioleta (High Performance Ultraviolet Transiluminator, Ultra-Violet Products®). Los marcadores de tamaño molecular para DNA que se utilizaron en los ensayos electroforéticos fueron la escalera de 100 pb y λPstI-DNA (Invitrogen y Fermentas).

2.11 Secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados

Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el sistema de Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems® y los productos se analizaron en un secuenciador automático 3100 ABI en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2.12 Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoácidicas, identidad y alineamientos múltiples

Las secuencias de nucleótidos y las metiltransferasas inferidas a partir de éstas se analizaron con ChromasPro 1.5 (Technelysium Pty Ltd). La búsqueda de identidad con secuencias depositadas en GenBank se realizó con Blast (*Basic Local Alignment Tool*) disponible en el servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU; URL2), Los alineamientos múltiples se realizaron con BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.2 (URL 3), T-coffee (URL 4) y Clustal W 1.83. (URL 5).

2.13 Reacciones enzimáticas de restricción.

Las reacciones de restricción utilizando una o más enzimas, de los productos de amplificación, del vector plasmídico (pIJ2925), del DNA plasmídico silvestre y del DNA total, se realizaron en general en un volumen final de 20 µL o 50 µL, en el primer caso la mezcla de reacción incluyó 2 µL del regulador 10X. 1 µL de BSA (50 µg/mL), 1-3 µg de DNA a digerir con 1 U de la enzima de restricción correspondiente y 12.5 µL de agua estéril desionizada, la mezcla se incubó a 37°C por 5 h (Sambrook y Russell, 2001). La purificación de los productos de amplificación o del vector plasmídico para las reacciones de ligación u otras, se

realizó con el sistema comercial DNA Clean & Concentrator- 5TM (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.14 Localización de genes codificantes de metiltransferasas por medio de hibridación tipo Southern

Se realizaron digestiones enzimáticas de DNA total o plasmídico, con una o más enzimas de restricción, en forma independiente y en mezclas de reacción con dos de ellas. Después se incubaron 12 h a 37°C, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% a 80 voltios durante aproximadamente 3 h, utilizando un marcador de tamaño molecular adecuado.

Terminado esto, se tomó una fotografía en el documentador de geles, se recortó el gel eliminando el exceso de agarosa y se marcó la esquina superior izquierda indicando el primer carril. El gel se colocó en un recipiente con una solución de depurinación (HCl 0.5 M) durante 15 min con agitación intermitente. Luego se enjuagó con agua desionizada, posteriormente se cubrió con regulador alcalino (NaCl 1.5 M y Tris HCl 0.5 M pH 7.5) y se agitó por 40 min, nuevamente se enjuagó con agua desionizada y finalmente se cubrió con regulador neutro y se mantuvo en agitación durante 40 min.

Mientras tanto, se recortó una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE) y 4 hojas de papel Whatman de las mismas dimensiones del gel.

Se transfirió el DNA localizado en el gel a la membrana con una solución de transferencia ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ 0.3 M, NaCl 3M, pH 7), luego se colocó un soporte de transferencia en un recipiente, el cual se cubrió con papel Whatman, se colocó el gel, la membrana de nitrocelosa y posteriormente 2 hojas de papel Whatman de las mismas dimensiones del gel, así como una torre de toallas de papel de aproximadamente 10 cm de altura.

Se dejó la transferencia del DNA toda la noche. Al día siguiente se retiraron las toallas de papel y el papel Whatman y se retiró con mucho cuidado la membrana de nailon. Se marcó la membrana con un lápiz de manera que pueda ser identificada la cara de la membrana que se encontró en contacto con el DNA y se fijó con luz UV durante 5 min.

Posteriormente, se realizó la hibridación utilizando como sonda un fragmento de DNA obtenido por PCR, previamente secuenciado, de una región del gen de una metiltransferasa de interés (Sambrook y Russell, 2001).

2.15 Reacciones de Ligación

Las reacciones de ligación del vector plasmídico con las regiones génicas de interés se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche, la mezcla contenía 3.0 U de T4 DNA ligasa, 3 μ L del regulador 5X, la concentración del producto de PCR digerido y purificado y la concentración del DNA del vector (pIJ2925) digerido y purificado se colocaron en una relación de 2:1 o bien 3:1 (Sambrook y Russell, 2001).

2.16 Clonación de los Fragmentos de DNA Amplificados

Los productos de PCR y los fragmentos de DNA obtenidos mediante análisis de restricción fueron purificados empleando el estuche de reactivos DNA Clean & Concentrator-5TM (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se utilizó el plásmido pIJ2925 (Figura 9) como vector para insertar los fragmentos amplificados por PCR efectuándose posteriormente la clonación en *E. coli* DH5 α .

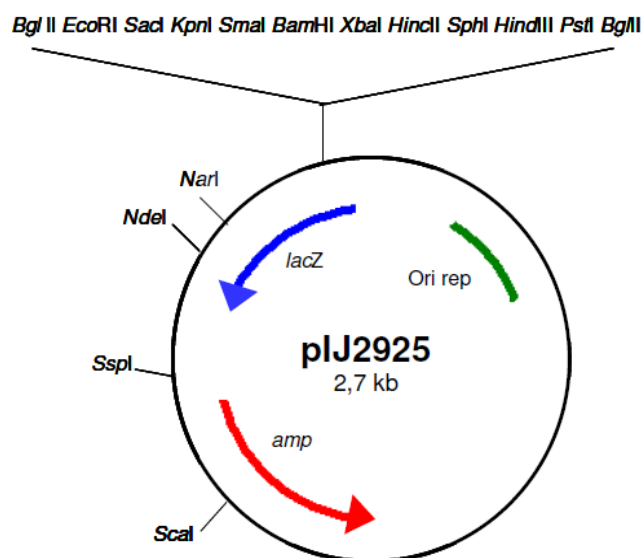


Figura 9. Mapa genético de pIJ2925. El sitio de clonación múltiple se encuentra flanqueado por secuencias de corte por *BglIII* en el gen *lacZ*, además contiene como marcador de selección el gen de resistencia a ampicilina.

2.17 Transformación de *E. coli* DH5 α

Se adicionó a una alícuota de 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α \approx 80 ng de DNA plasmídico recombinante (producto de la ligación) y se mantuvo en hielo de 30 min a 1 h, posteriormente se aplicó un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C durante exactamente 90 s, sin agitación, inmediatamente se colocó en baño de hielo durante 1 min y pasado este tiempo se agregaron 500 μ L de medio LB y se incubó durante 45-60 min a 37 $^{\circ}$ C con agitación de 100 rpm.

Se depositaron alícuotas de 50 y 100 μ L en placas de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL), IPTG 100 mM y X-Gal 40 mg/mL, se distribuyó la alícuota en la placa con varilla acotada hasta la completa absorción. Se incubaron a 37 $^{\circ}$ C durante 24 h y las colonias blancas obtenidas se pasaron con la ayuda de un palillo estéril a un tubo con 3 mL de medio LB con ampicilina 100 μ g/mL, y se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}$ C con agitación de 100 rpm. El análisis de las colonias recombinantes se realizó mediante la extracción de DNA plasmídico (Sambrook y Russell, 2001).

3.0 RESULTADOS.

3.1 Determinación del perfil de resistencia a antibióticos.

Se determinó la resistencia para los aminoglucósidos: amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina (Figura 10);

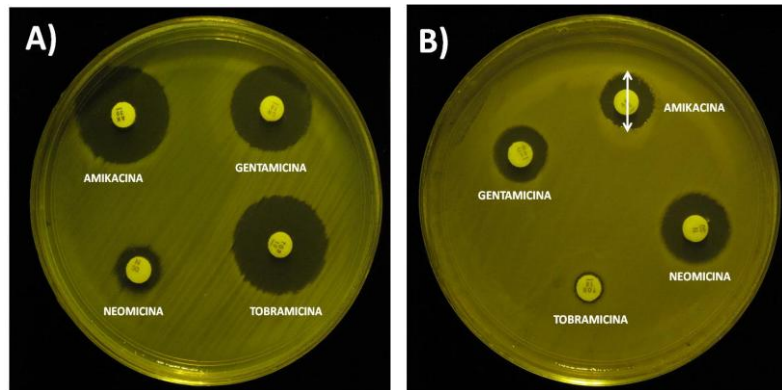


Figura 10. Determinación de susceptibilidad a aminoglucósidos. Con base a los diámetros de inhibición generados por el antibiótico se determinó si las cepas son resistentes, intermedias o susceptibles. A) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cepa sensible a amikacina, gentamicina y tobramicina, pero resistente a neomicina. B) Cepa resistente a amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina.

De la colección formada por 139 cepas de origen clínico, 62 fueron resistentes a amikacina, 58 a gentamicina, 62 a tobramicina y 63 fueron resistentes a neomicina, presentando diferentes patrones de resistencia (Tabla 3). Se identificaron cepas resistentes a los cuatro aminoglucósidos empleados, así como cepas que presentaron diferentes combinaciones de resistencia a dichos aminoglucósidos. De acuerdo a los resultados anteriores se puede inferir que las cepas que presentaron solo resistencia al grupo de aminoglucósido 4,6 disustituido 2-DOS, como amikacina, gentamicina y tobramicina, probablemente presenten metiltransferasas como ArmA, RmtA, RmtB, RmtC y RmtD; mientras que las cepas resistentes a aminoglucósidos tanto 4,6 disustituido 2-DOS como 4,5 disustituido 2-DOS (neomicina), probablemente presenten metiltransferasas tales como la NpmA (Wachino y col., 2007; Doi y col., 2008).

Tabla 3. Patrones de resistencia del total de las cepas.

Patrón de resistencia	Número de cepas
Resistentes a los cuatro aminoglucósidos empleados.	47
Resistentes a amikacina, gentamicina y tobramicina	8
Resistentes a amikacina, gentamicina y neomicina	1
Resistentes a amikacina y tobramicina.	4
Resistentes a gentamicina y tobramicina.	1
Resistentes a tobramicina y neomicina	1
Resistentes solo a amikacina	2
Resistentes solo a gentamicina	1
Resistentes solo a tobramicina	1
Resistentes solo a neomicina	14
Sensibles a los cuatro aminoglucósidos	59
Total de cepas resistentes	80
TOTAL DE CEPAS	139

En la tabla 4, podemos observar los diferentes patrones de resistencia de acuerdo al microorganismo en estudio, en el caso de las cepas de *P. aeruginosa* (n=131) presenta 10 patrones de resistencia diferentes, las cepas de *A. baumannii* (n=6) presentan solo 4 patrones diferentes y las cepas *S. maltophilia* (n=2) presenta un solo patrón de resistencia.

Tabla 4. Patrones de resistencia de los microorganismos en estudio.

Patrón de resistencia	Número de cepas		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. maltophilia</i>
Resistentes a los cuatro aminoglucósidos empleados.	44	1	2
Resistentes a amikacina, gentamicina y tobramicina	7	1	0
Resistentes a amikacina, gentamicina y neomicina	1	0	0
Resistentes a amikacina y tobramicina.	1	3	0
Resistentes a gentamicina y tobramicina.	1	0	0
Resistentes a tobramicina y neomicina	1	0	0
Resistentes solo a amikacina	1	1	0
Resistentes solo a gentamicina	1	0	0
Resistentes solo a tobramicina	1	0	0
Resistentes solo a neomicina	14	0	0
Sensibles a los cuatro aminoglucósidos	59	0	0
Total de cepas resistentes	72	6	2
TOTAL DE CEPAS	131	6	2

3.2 Amplificación de los genes de rRNA 16S metiltransferasas.

De la colección de BGNNF de origen clínico, se seleccionaron las 80 cepas que resultaron resistentes al menos a un aminoglucósido, dentro de las cuales contamos con 72 cepas de *P. aeruginosa*, 6 cepas de *A. baumannii* y 2 cepas de *S. maltophilia*.

Se analizaron las 80 cepas seleccionadas, para la búsqueda de los genes que codifican para las metiltransferasas ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD y NpmA, mediante amplificación por PCR de regiones de los genes que las codifican.

Se identificó el gen *armA* en una cepa de *A. baumannii* de origen intrahospitalario denominada como *A. baumannii* HI3 (Figura 11), esta cepa, presenta un patrón de resistencia a los cuatro aminoglucósidos empleados (amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina).

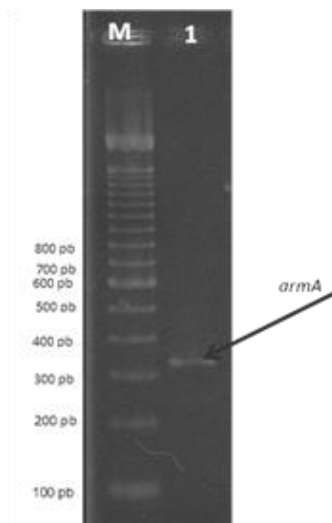


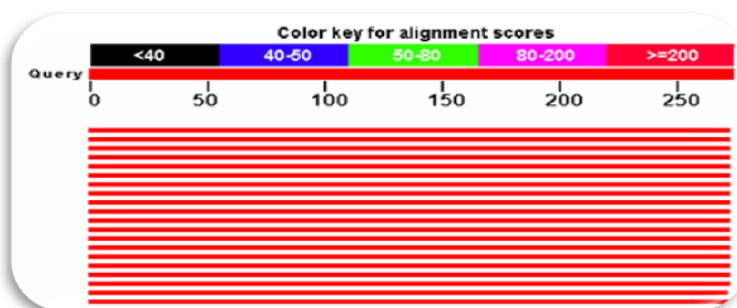
Figura 11. Amplificación de una región del gen *armA* de *A. baumannii* HI3 . Electroferograma del producto de PCR del gen *armA*, carril M, marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 1, fragmento de aproximadamente 315 pb del gen *armA*, en una cepa de *A. baumannii* proveniente de una infección intrahospitalaria.

3.3 Caracterización de *A. baumannii* HI3.

3.3.1 Análisis de la secuencia del amplicón de *armA* de *A. baumannii* HI3.

Se determinó la secuencia nucleotídica del amplicón de *armA* en ambos sentidos y las secuencias generadas se editaron y analizaron mediante el programa Chromas Pro 1.5 y la herramienta bioinformática BLAST del NCBI, comprobando su identidad y similitud con respecto a secuencias de *armA* depositadas en el GenBank (FJ917355, FJ788923, FJ715937, FJ539136, FJ384365, FJ187822, FJ410928, EU140571, EU014811, EF158302, EF158297, EF158296, AY522431, AF550415, DQ177329, AY220558, AB117519, AB116388, GQ227508, entre otras) como puede observarse en la Figura 12A, la secuencia obtenida tiene gran similitud con otras *ArmA* reportadas en otros microorganismos (Figura 12B), entre ellos, *S. marcescens*, *S. enterica subsp. enterica serovar Stanley*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. amalonaticus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

A)



B)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ917355.1	Serratia marcescens plasmid pKSM40710 putative transposase gen	481	481	99%	9e-133	98%
FJ788923.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Stanley strain AM0486:	481	481	99%	9e-133	98%
FJ715937.1	Klebsiella pneumoniae plasmid pKTS1748, partial sequence	481	481	99%	9e-133	98%
FJ539136.1	Escherichia coli plasmid pRNA putative transposase gene, partial cd	481	481	99%	9e-133	98%
FJ384365.1	Klebsiella pneumoniae strain SCHC1 plasmid pIMP-4, partial sequen	481	481	99%	9e-133	98%
FJ187822.1	Escherichia coli plasmid pCOP1 dihydropterate synthase (sul1) oer	481	481	99%	9e-133	98%
FJ410928.1	Klebsiella pneumoniae transposon Tnp (tnp) gene, partial cds, and i	481	481	99%	9e-133	98%
EU140571.1	Acinetobacter baumannii strain HZ01 16S rRNA methylase (armA) c	481	481	99%	9e-133	98%
EU014811.1	Acinetobacter baumannii transposon Tn1548 insertion sequence ISC	481	481	99%	9e-133	98%
EF158302.1	Citrobacter amalonaticus plasmid pMG007 16S ribosomal RNA meth	481	481	99%	9e-133	98%
EF158297.1	Enterobacter aerogenes plasmid pMG002 aminoglycoside resistance	481	481	99%	9e-133	98%
EF158296.1	Escherichia coli plasmid pMG001 aminoglycoside resistance 16S ribi	481	481	99%	9e-133	98%
AY522431.4	Escherichia coli plasmid pMUR050, complete sequence	481	481	99%	9e-133	98%
AF550415.2	Citrobacter freundii plasmid pCTX-M3, complete sequence	481	481	99%	9e-133	98%
DQ177329.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Oranienburg ArmA (an	481	481	99%	9e-133	98%
AY220558.1	Klebsiella pneumoniae strain BM4536 plasmid pIP1204 recombinase	481	481	99%	9e-133	98%
AB117519.1	Escherichia coli orfS13, tnpAcp1, armA genes for putative transpos	481	481	99%	9e-133	98%
AB116388.1	Serratia marcescens orfS13, tnpAcp1, armA, orf1 genes for putativ	481	481	99%	9e-133	98%
GQ227508.1	Pseudomonas aeruginosa strain HSPA06-761 ArmA (armA) gene, p	479	479	99%	3e-132	98%
FJ3754717.1	Acinetobacter baumannii strain YH01 16S rRNA methylase gene, pa	470	470	99%	2e-129	97%

Figura 12. Análisis de la secuencia de *armA*. A) Tabla de aciertos (Hits) arrojados por BLAST, en donde el color rojo indica un puntaje alto y por lo tanto alta similitud entre la secuencia obtenida y la secuencias reportadas en el GenBank. B) Secuencias con las que se obtuvieron alineamientos significativos.

3.3.2 Amplificación del gen rRNA 16S de *A. baumannii* HI3.

Se realizó la amplificación de la región conservada del gen rRNA 16S, para corroborar el género y especie de la cepa de *A. baumannii* HI3, en la cual fue identificado el gen que codifica para ArmA. Se obtuvo un fragmento aproximadamente de 1500 pb (Figura 13).

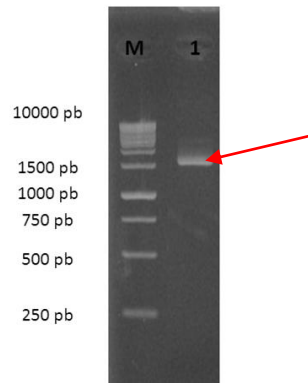
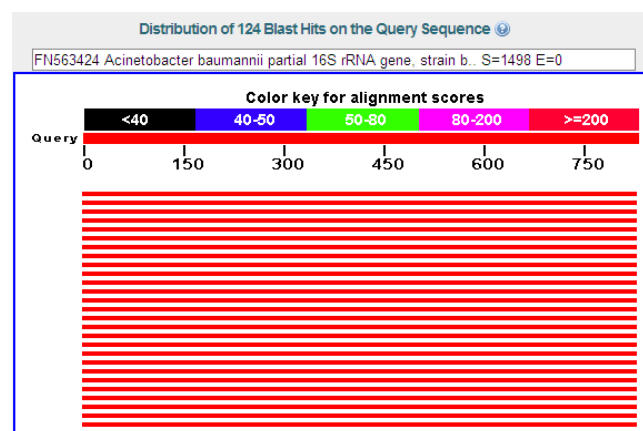


Figura 13. Electroferograma del gen rRNA 16S de *A. baumannii* HI3.
Carril M: Marcador de tamaño molecular de 1 kb; Carril 1: amplicón obtenido mediante amplificación por PCR del gen rRNA 16S.

Se determinó la secuencia nucleotídica del amplicón y se editó mediante el programa Chromas Pro 1.5. Se analizó con la plataforma BLAST del NCBI, comprobando su identidad y similitud con respecto a secuencias depositadas en el GenBank (Figura 14), donde obtuvimos 99% de identidad con las secuencias de rRNA 16S de *A. baumannii*, con las siguientes claves de acceso FN563424, FN563423, FN563422, FN563420, GO289381, GO289378, FJ867361, entre otras.

A



B

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FN563424.1	Acinetobacter baumannii partial 16S rRNA gene, strain bpoe1353	1498	1498	99%	0.0	99%
FN563423.1	Acinetobacter baumannii partial 16S rRNA gene, strain bpoe1352	1498	1498	99%	0.0	99%
FN563422.1	Acinetobacter baumannii partial 16S rRNA gene, strain bpoe1351	1498	1498	99%	0.0	99%
FN563420.1	Acinetobacter baumannii partial 16S rRNA gene, strain bpoe1349	1498	1498	99%	0.0	99%
GU004018.1	Uncultured bacterium clone 16SN35 16S ribosomal RNA gene, parti	1498	1498	99%	0.0	99%
GQ289381.1	Acinetobacter sp. 117 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1498	1498	99%	0.0	99%
GQ289378.1	Acinetobacter sp. 40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ867361.1	Acinetobacter baumannii strain LUH 7493 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ867360.1	Acinetobacter baumannii strain RUH 1752 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ867359.1	Acinetobacter baumannii strain LUH 5684 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ867358.1	Acinetobacter baumannii strain RUH 1093 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ867357.1	Acinetobacter baumannii strain RUH 3414 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ867355.1	Acinetobacter baumannii strain RUH 0875 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ860867.1	Acinetobacter baumannii strain LUH 8225 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ860866.1	Acinetobacter baumannii strain LUH 6639 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
FJ860865.1	Acinetobacter baumannii strain LUH 8088 16S ribosomal RNA gene,	1498	1498	99%	0.0	99%
CP001172.1	Acinetobacter baumannii AB307-0794 complete genome	1498	8992	99%	0.0	99%

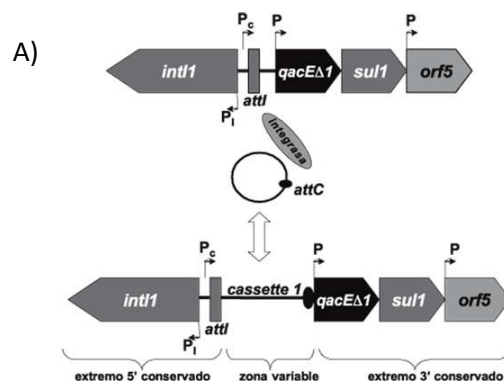
Figura 14 Análisis de la secuencia del rRNA 16S de *A. baumannii* HI3.

A) Tabla de aciertos arrojados por BLAST, en donde el color rojo indica un puntaje alto y por lo tanto alta similitud entre la secuencia obtenida y la secuencias reportadas en el GenBank. B) Secuencias con las que se obtuvieron alineamientos significativos.

3.3.3 Búsqueda de integrones en *A. baumannii* HI3.

Se realizó la búsqueda de integrones clase I, clase II y clase III, pero no se obtuvo amplificación con los iniciadores y las condiciones empleadas, para los integrones clase II y clase III.

Se realizó la amplificación de las secuencias conservadas de integrones clase I, tanto del gen de la integrasa, *intI* como del gen de *qacEΔ1*, mediante PCR, obteniendo un fragmento de aproximadamente de 3000 pb, el cual fue secuenciado, editado y analizado mediante los programas Bioedit, Chromas Pro 1.5 y BLAST. Hasta el momento se han secuenciado 2000 pb de las 3000 pb que conforman este integrón, en la figura 15B, se observa la estructura del integrón clase I encontrado en *A. baumannii*, donde observamos que la región variable está compuesta por un gen que codifica una acetil-aminoglucósido-transferasa (*aacA4*), un gen que codifica para una adenil-aminoglucósido-transferasa (*aadA1*) y entre estas dos secuencias se encuentra una secuencia de aproximadamente 1000 pb, la cual está por determinarse.



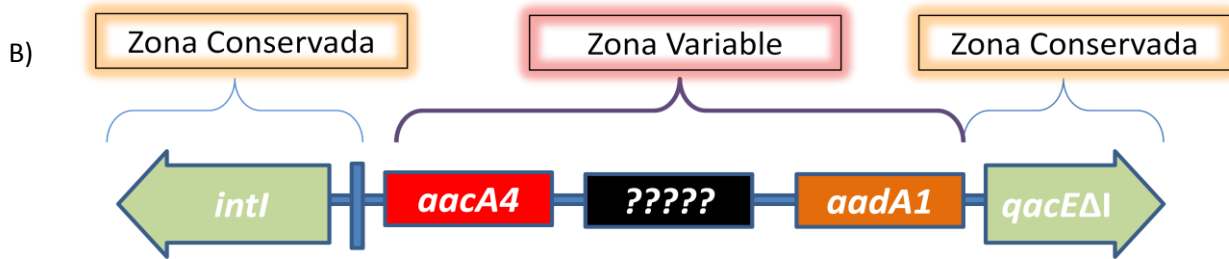


Figura 15. Representación esquemática de un integrón clase I.
 A) Estructura común de los integrones clase I. Extremo 5' conservado: gen codificante de la integrasa (*intI1*), sitio de recombinación específico (*attI*), y un promotor (P), que permite la expresión los casetes insertados en el *attI* del integrón. Extremo 3' conservado: genes de resistencia a sales cuaternarias de amonio (*qacEΔI*). En la zona variable se encuentran los diferentes casetes de resistencia. B) Representación del integrón encontrado en un aislado clínico de *A. baumannii*, donde en la zona variable se encuentran los genes que codifican para una acetil aminoglucósido transferasa y otro para una adenil aminoglucósido transferasa, además de una secuencia de aproximadamente 1000 pb aún desconocida.

3.3.4 DNA plasmídico de *A. baumannii* HI3.

Se extrajo el DNA plasmídico de *A. baumannii* HI3 con el estuche de reactivos Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo), (Figura 16), se obtuvo un plásmido >11,500 pb.

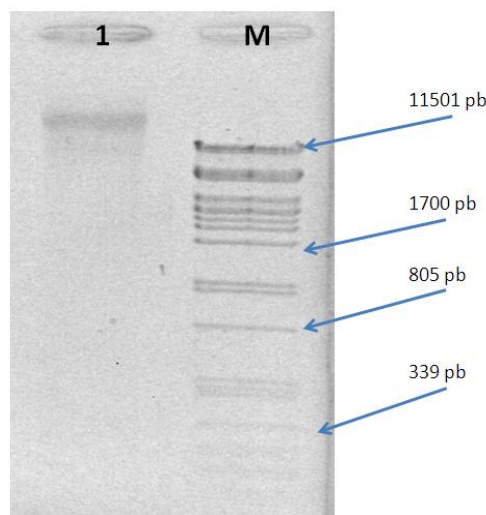


Figura 16. Electroferograma de DNA plasmídico de la cepa *A. baumannii* HI3. Carril 1: DNA plasmídico; carril M: λ PstI.

3.3.5 Amplificación del gen *armA* empleando DNA plasmídico

Se realizó la amplificación del gen *armA*, empleando como molde DNA plasmídico de la cepa *A. baumannii* HI3, y se obtuvo un amplicón de aproximadamente 315 pb (Figura 17), correspondiente al fragmento del gen *armA*.

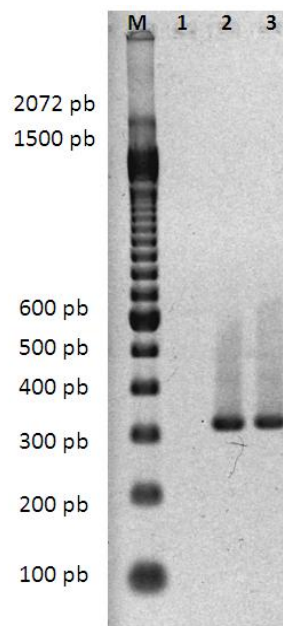


Figura 17. Amplificación del gen *armA* en DNA plasmídico de *A. baumannii* HI3. Carril M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 1: blanco de reactivos; carril 2: producto de PCR de *armA* obtenido con DNA total; carril 3: producto de PCR de *armA* obtenido con DNA plasmídico.

3.3.6 Localización del gen *armA* en el genoma de *A. baumannii* HI3 mediante hibridación tipo Southern.

Se realizaron digestiones enzimáticas del DNA total de la cepa *A. baumannii* HI3 con BglII, PstI, EcoRV, NcoI, EcoRI y SpeI y se realizó una hibridación tipo Southern utilizando como sonda un fragmento interno de *armA* de 315pb (Figura 18). Los resultados mostraron que el gen *armA* se ubica dentro de fragmentos de DNA de diferentes tamaños, dependiendo de la enzima de restricción empleada (Tabla 5), donde las digestiones obtenidas con EcoRI y SpeI, no son útiles para obtener el gen completo, pues éste se encuentra en fragmentos demasiado grandes (>11,500 pb).

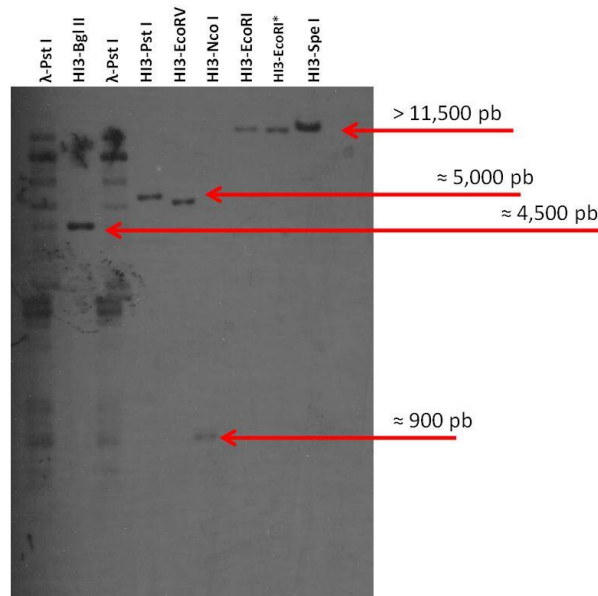


Figura 18. Hibridación tipo Southern. Se evidencia la presencia del gen *armA*, dentro de los fragmentos de DNA obtenidos con diversas enzimas de restricción.

Tabla 5. Ubicación del gen *armA* dentro de fragmentos de DNA obtenidos con enzimas de restricción.

Enzima de restricción	Tamaño aproximado del fragmento en el cual se ubica el gen <i>armA</i>
NcoI	~900 pb
BglII	~4,500 pb
PstI	~5,000 pb
EcoRV	~5,000 pb
EcoRI	>11,500 pb
SpeI	>11,500 pb

Las enzimas NcoI (900 pb), BglII (1,700pb), PstI (2000pb) y EcoRV (2000pb), pueden ser empleadas para obtener el gen completo, así como las secuencias que lo flanquean y posteriormente poner de manifiesto la actividad de metiltransferasa del producto codificado por el gen *armA*. Mediante la clonación de este gen en *E. coli* DH5α utilizando un vector de expresión.

3.4 Análisis del amplicón de *S. maltophilia*.

A partir del DNA total de la cepa de *S. maltophilia* INP1, aislada de un paciente con fibrosis quística y que mostró resistencia a los cuatro aminoglucósidos probados, se obtuvo un amplicón de aproximadamente 600pb, el cual se secuenció de forma automatizada en ambas orientaciones. Para el análisis inicial de esta secuencia (denominada Test, únicamente para algunos aspectos del estudio bioinformático) se emplearon los programas bioinformáticos BioEdit y ChromasPro versión 1.5.

Se identificó el marco de lectura correcto mediante la plataforma de ORF finder del NCBI, como puede observarse en la Figura 19, el transcrito de mayor tamaño y por lo tanto el correcto, se obtiene utilizando el marco de lectura +3, con el cual se obtuvo una secuencia de DNA de 544 nucleótidos.

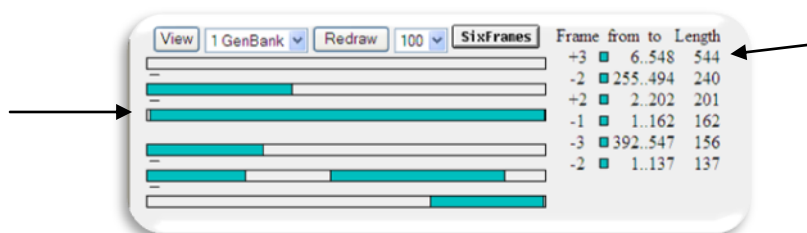


Figura 19. Análisis del marco de lectura de un amplicón de *S. maltophilia* INP1. Búsqueda de marco de lectura correcto mediante la plataforma ORF del NCBI, que muestra que el marco de lectura que proporciona el mayor transcrito es el marco de lectura +3.

Con base en este marco de lectura, se realizó la traducción de la secuencia con la utilización del programa BioEdit. Posteriormente, se llevó a cabo la búsqueda de homólogos en el genoma de *S. maltophilia* mediante la plataforma de blastn (Figura 20), y no se encontró similitud significativa entre esta secuencia y el banco de secuencias nucleotídicas reportadas para el genoma de *S. maltophilia*, por lo que se trata de una secuencia no reportada en el GenBank del NCBI.

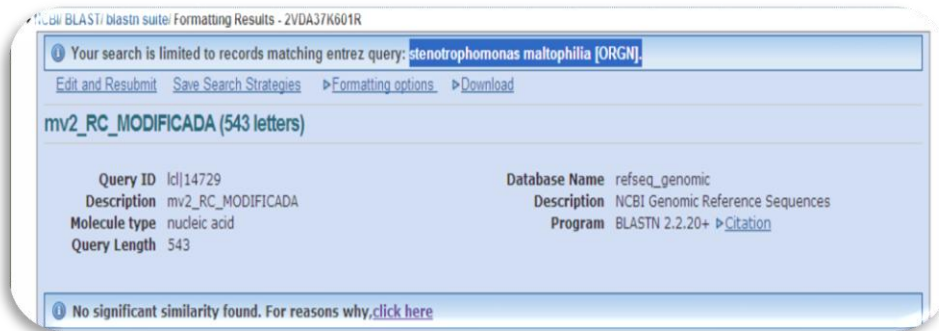
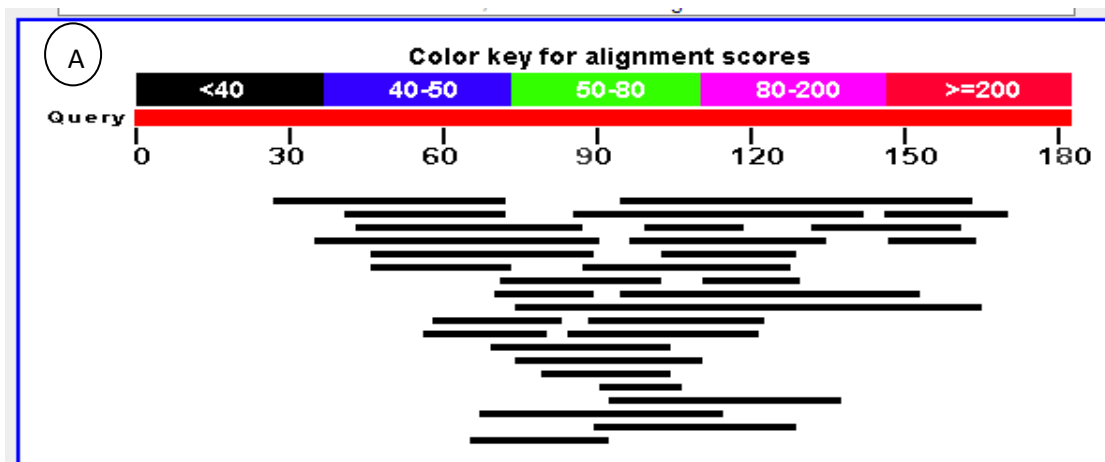


Figura 20. Búsqueda de la secuencia de nucleótidos de la secuencia Test dentro del genoma de *S. maltophilia*. No se encontró similitud significativa entre la secuencia Test y la secuencia nucleotídica del genoma de *S. maltophilia*.

Posteriormente, se llevó a cabo la búsqueda de homólogos dentro del genoma de *S. maltophilia* mediante la plataforma de blastp, empleando la secuencia de aminoácidos (Figura 21A), encontrando que esta secuencia, presenta baja similitud con las proteínas reportadas en el genoma de *S. maltophilia* (Figura 21B)



B

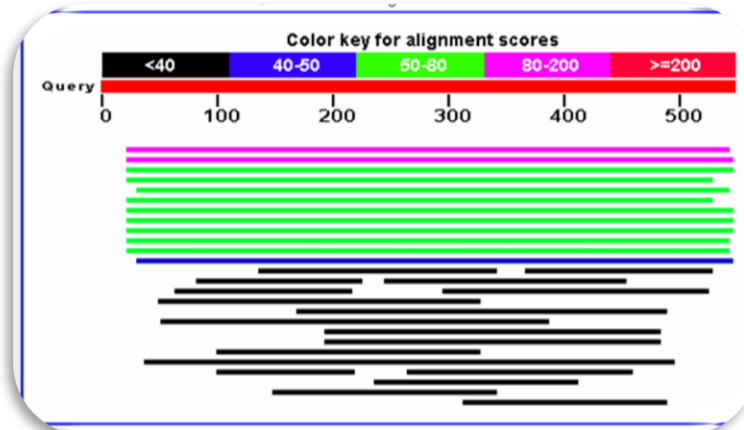
Sequences producing significant alignments:		Score	E	
		(Bits)	Vali	
ref YP_002029768.1 	hypothetical protein Smal_3386 [Stenotrop...	28.5	3e-05	G
ref YP_002029311.1 	Endoribonuclease L-PSP [Stenotrophomonas ...	26.9	8e-05	G
ref YP_002026735.1 	Haloacid dehalogenase domain protein hydr...	25.4	3e-04	G
ref YP_002028494.1 	hypothetical protein Smal_2107 [Stenotrop...	25.4	3e-04	G
ref YP_002029282.1 	ribonuclease, Rne/Rng family [Stenotropho...	25.0	4e-04	G
ref YP_002029384.1 	amino acid permease-associated region [St...	24.3	5e-04	G
ref YP_002030273.1 	aldo/keto reductase [Stenotrophomonas mal...	24.3	6e-04	G
ref YP_002028005.1 	protein-export membrane protein SecD [Ste...	23.9	8e-04	G
ref YP_002028814.1 	transcriptional regulator, Hx1R family [S...	23.1	0.001	G
ref YP_002028446.1 	MaoC domain protein dehydratase [Stenotro...	23.1	0.001	G
ref YP_002030267.1 	TatD-related deoxyribonuclease [Stenotrop...	22.7	0.002	G
ref YP_002027557.1 	methyl-accepting chemotaxis sensory trans...	22.7	0.002	G
ref YP_002028393.1 	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase [...	22.7	0.002	G
ref YP_002029266.1 	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreduc...	22.7	0.002	G
ref YP_002030355.1 	putative secreted protein [Stenotrophomon...	22.7	0.002	G
ref YP_002027946.1 	NHL repeat containing protein [Stenotroph...	22.3	0.002	G
ref YP_002029822.1 	hypothetical protein Smal_3440 [Stenotrop...	22.3	0.002	G
ref YP_002027087.1 	protein of unknown function DUF1631 [Sten...	21.9	0.003	G
ref YP_002030380.1 	methyltransferase [Stenotrophomonas malto...	21.9	0.003	G
ref YP_002027127.1 	TonB-dependent receptor [Stenotrophomonas...	21.6	0.004	G
ref YP_002028410.1 	acriflavin resistance protein [Stenotroph...	21.2	0.004	G

Figura 21. Análisis de la secuencia nucleotídica Test de *S. maltophilia* INP1. A) Tabla de aciertos (Hits) arrojados por BLAST, en donde el color negro indica un puntaje bajo y por lo tanto poca similitud entre la secuencia Test traducida y la secuencias reportadas en el GenBank. B) Proteínas homólogas a la proteína Test dentro del genoma de *S. maltophilia*

Sin embargo, haciendo un análisis global con el banco de secuencias del GenBank, Test mostró similitud con metiltransferasas de otros microorganismos, lo cual indica que probablemente la secuencia Test sea una región de un gen que codifica una metiltransferasa, la cual podría estar involucrada con la resistencia a antibióticos (Figura 22).

Para ello, se realizó la búsqueda de homólogos mediante el programa BLAST. Primero se realizó la búsqueda empleando la plataforma *nucleotide blast*, con la base de datos *Nucleotide collection (nr/nt)*, pero no se encontró similitud significativa. Por lo cual se realizó la búsqueda empleando BLAST traducido (*blastx*) con la base de datos *reference proteins (refseq protein)* (Figura 22A), con la que se obtuvo mayor grado de similitud con metiltransferasas de diversos organismos (figura 22B), entre las que se encuentran metiltransferasas de sistemas de restricción modificación y metiltransferasas modificadoras de DNA, lo cual sugiere fuertemente que la secuencia analizada es parte de un gen que codifica una metiltransferasa.

A



B

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
ref YP_001893512.1 DNA restriction methylase [Burkholderia p...]	87.4	4e-16
ref NP_640100.1 putative restriction methylase [Proteus vulg...]	82.8	1e-14
ref NP_943180.1 putative DNA modification methylase [Pseudom...]	75.9	1e-12
ref YP_002519348.1 putative DNA modification methylase [Esch...]	75.5	2e-12
ref YP_001202149.1 putative DNA restriction/recombination me...	73.9	5e-12
ref NP_569576.1 putative DNA modification methylase [Salmon...]	72.8	1e-11
ref NP_058256.1 putative DNA restriction methylase [Salmonel...]	67.0	6e-10
ref NP_569282.1 hypothetical protein HCM1.57c [Salmonella en...]	67.0	6e-10
ref NP_640023.1 recombination methylase [Proteus vulgaris]	53.5	7e-06
ref YP_001481573.1 DNA restriction methylase [Escherichia co...]	52.8	1e-05
ref NP_941364.1 putative DNA restriction methylase [Serratia...]	51.6	3e-05

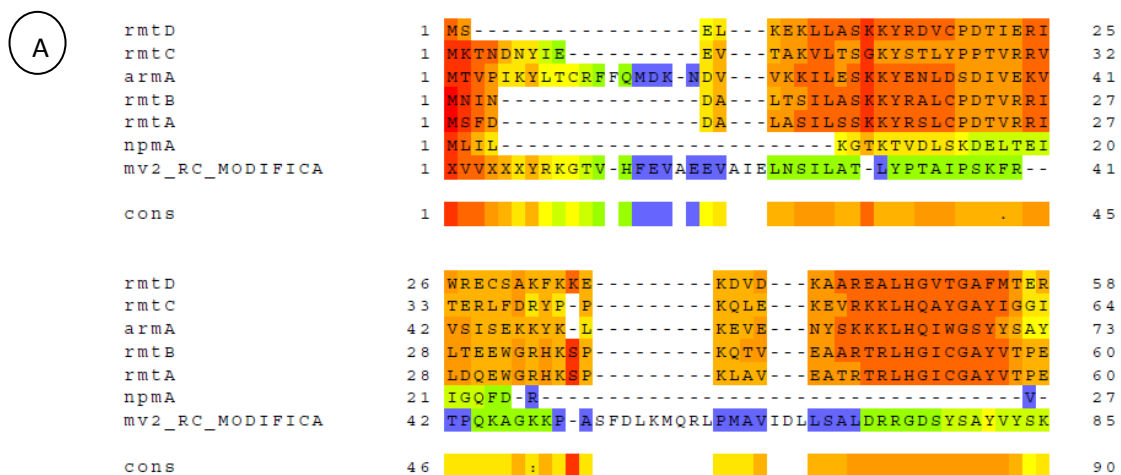
Figura 22. Homólogos obtenidos mediante blastx para la proteína Test de *S. maltophilia* INP1 A) Tabla de aciertos (Hits) arrojados por BLAST, en donde el color rosa y verde indica un puntaje alto y por lo tanto gran similitud entre la secuencia Test traducida y la secuencias traducidas reportadas en el GenBank.B) Proteínas homólogas a la proteína Test y otras metiltransferasas de diversos microorganismos.

Por otra parte, se descargaron las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos de la base de datos del PubMed de las metiltransferasas reportadas: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD y NmpA, las cuales codifican para 16s rRNA metiltransferasas involucradas con la resistencia a antibióticos cuyo sitio de acción son los ribosomas.

Tabla 6. Metiltransferasas involucradas en la resistencia a antibióticos.

Gen	Nucleótidos Tamaño/Clave	Proteínas Tamaño/Clave	Organismo
<i>armA</i>	816 pb/FJ410928	217 aa/ACJ47802.1	<i>K. pneumoniae</i>
<i>rmtA</i>	756 pb/ AB120321	251 aa/BAB12551	<i>P. aeruginosa</i>
<i>rmtB</i>	756 pb/AB103506	251 aa/BAC81971	<i>S. marcescens</i>
<i>rmtC</i>	846 pb/EU144360	281 aa/ABX39521.1	<i>P. mirabilis</i>
<i>rmtD</i>	744 pb/DQ914960	247 aa/ABJ53409.1	<i>P. aeruginosa</i>
<i>nmpA</i>	660 pb/AB261016	219 aa/BAF80809	<i>E. coli</i>

Finalmente, se realizó el alineamiento con metiltransferasas reportadas en la bibliografía, y que están involucradas con la resistencia a antibióticos, primero se realizó un alineamiento múltiple con T-Coffee, la Figura 23A muestra solo un fragmento del alineamiento y en el árbol guía (Figura 23B), podemos observar que la secuencia Test, presenta cierta similitud con la metiltransferasa RmtC, pues ambas forman un subgrupo dentro del árbol el cual a su vez forma un grupo con *armA*, indicando similitud con esta última Mtasa.



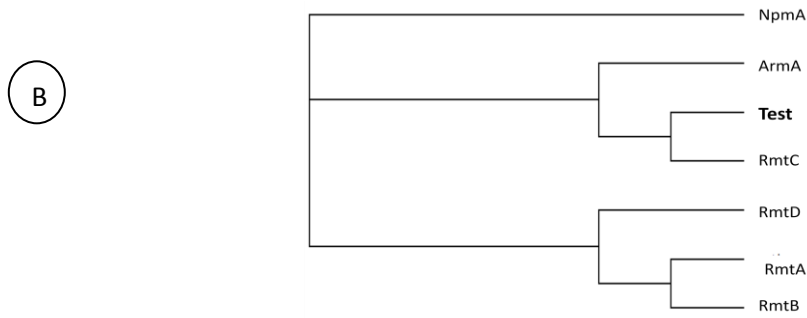


Figura 23. Análisis de metiltransferasas involucradas con la resistencia a aminoglucósidos y Test de *S. maltophilia* INP1. A) Alineamiento con T-coffe de las metiltransferasas previamente reportadas y la proteína Test, en el cual se puede apreciar, el cual se utilizó como plataforma para crear un árbol filogenético. B) Árbol filogenético, se observa que la proteína Test tiene relación con la MTasa RmtC, y el grupo formado por estas dos proteínas, está estrechamente relacionado con la metiltransferasa ArmA.

4.0 DISCUSIÓN.

De las seis RNA 16S metiltransferasas previamente descritas por otros investigadores, en este trabajo se identificó una codificada por el gen *armA* en la cepa de origen intrahospitalario *A. baumannii* HI3. También se encontró una región génica que codifica una posible metiltransferasa en la cepa de *S. maltophilia* INP1, la cual fue aislada de un paciente con fibrosis quística y cuya secuencia nucleotídica no está reportada en GenBank; sin embargo, el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos inferida por la región génica en estudio, sugiere su relación con RmtC, por lo que será importante obtener el gen completo y demostrar si su actividad biológica está asociada a resistencia a antibióticos cuyo blanco es el ribosoma.

Estos dos hallazgos son importantes porque no hay reportes de la presencia de ninguna de estas metiltransferasas, la metiltransferasa ArmA no ha sido reportada en México, ni en América Latina, pues solo existe el reporte de esta metiltransferasa en cepas de enterobacterias en Estados Unidos de Norteamérica, específicamente en *E. cloacae* y *K. pneumoniae* (Fritsche y col., 2008). La identificación en este trabajo de una cepa de *A. baumannii* portadora de ArmA constituye el primer reporte de metiltransferasa del rRNA 16S en nuestro país y el segundo en América Latina, ya que en Brasil, fue reportada la metiltransferasa RmtD, en *P. aeruginosa* (Doi y col., 2007), mientras que la posible metiltransferasa de *S. maltophilia* INP1 no ha sido reportada en ninguna parte del mundo y su caracterización es muy importante para conocer si está involucrada con la resistencia a aminoglucósidos u otro tipo de antibióticos cuyo blanco sea el ribosoma bacteriano.

La cepa de *A. baumannii* HI3, proveniente de una muestra de orina de un paciente hospitalizado en el área de neumología del Hospital de Infectología del Centro Médico la Raza del IMSS y que presentó complicaciones por una infección en vías urinarias asociada al uso de catéter.

Este aislado presentó un patrón de resistencia a los cuatro aminoglucósidos empleados (amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina), esto concuerda con lo reportado en la bibliografía, donde se menciona que la rRNA 16S metiltransferasa ArmA, confiere resistencia a los aminoglucósidos 4,6 disustituidos 2-DOS (Liu *et al.*, 2009). Interesantemente, en esta cepa no se detectó el gen *npmA* cuya presencia hubiera explicado la resistencia también a la neomicina, que es un aminoglucósido 4,5-disustituido. (Doi y col., 2007; Liu y col., 2009).

Se realizó la búsqueda de integrones clase I, clase II y clase III en la cepa de *A. baumannii* HI3, pero solo se obtuvo un Integrón clase I de 3,000 pb, la secuencia parcial de dicho integrón, indica que adicionalmente presenta dos genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, *aacA4* y *aadA1*, acetil y adenil aminoglucósido-transferasas respectivamente. El producto del gen *aacA4*, confiere resistencia a kanamicina, netilmicina y tobramicina, y en el caso de la enzima codificada por el gen *aadA1*, confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina, lo cual indica que esta cepa no solo contiene metiltransferasas que confieren resistencia al grupo de aminoglucósidos 4,6 disustituidos 2-DOS, sino también enzimas modificadoras de aminoglucósidos, como ya ha sido reportado por Bogaerts y colaboradores en el 2007.

Se encontró que el gen *armA*, se encuentra ubicado dentro de un plásmido mayor a 11500 pb, lo que puede favorecer su diseminación hacia otros microorganismos. No se descarta la presencia de *armA* dentro del integrón clase I, encontrado en la cepa de *A. baumannii* HI3, pues se esperan resultados de secuenciación, para tener la secuencia completa de dicho integrón. Aunque esto es posible, también existe la posibilidad de que *armA* se encuentre en otro lugar, por ello se hicieron experimentos de hibridación tipo Southern (Figura 18), que nos permitieron localizar este gen en fragmentos de DNA NcoI (~900), BglII (~4,500 pb); EcoRV (~5,000 pb) y PstI (~5,000 pb); lo que nos permitirá obtener las secuencias que flanquean a *armA* con mayor facilidad, lo cual permitirá obtener el gen completo, y posteriormente mediante ensayos de transformación nos permitirá poner de manifiesto la actividad de

gen *armA*, al conferir resistencia a los aminoglucósidos 4,6 disustituidos 2-desoxiestreptamina, a *E. coli* DH5 α originalmete sensible a dichos antibióticos. También, se ha reportado la presencia de genes de MTAsas dentro elementos genéticos móviles como son transposones, integrones y plásmidos, lo que favorece su diseminación, más aún, en el ambiente hospitalario, donde las estancias prolongadas, el alto consumo de antibióticos y la inmunosupresión de los pacientes favorecen la selección de cepas multirresistentes (Kang y col., 2009, Wu y col., 2009).

En este estudio y con las condiciones empleadas, se obtuvo una cepa positiva para la MTasa *armA*, de 55 cepas resistentes a aminoglucósidos 4,6 disustituidos 2-DOS, de un total de 139 cepas, lo que representa el 1.81% del total de cepas resistentes, que es un valor semejante al encontrado en otros reportes como en Korea, donde se encontró un 2.1% (153/7127) de cepas *armA* positivas en enterobacterias (Kang y col., 2009), o en China, donde se encontró en *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *E. cloacae*, 0.6%, 3% y 10% respectivamente (Wu y col., 2009).

5.0 CONCLUSIONES

- ✓ Se identificó el gen *armA*, que codifica una rRNA 16S metiltransferasa involucrada con resistencia a aminoglucósidos, en una cepa de *A. baumannii* de origen intrahospitalario (HI3), resistente a amikacina, gentamicina, tobramicina y neomicina.
- ✓ El gen *armA* se localizó dentro de un plásmido de >11,500 pb, y a su vez dentro de fragmentos de DNA NcoI de ~900 pb, BglII ~1,700 pb; EcoRV ~2,000 pb y PstI ~2,000 pb .
- ✓ Se identificó un integrón de clase I en la cepa de *A. baumannii* HI3, el cual contiene adicionalmente por lo menos 2 genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, *aacA4* y *aadA1*.
- ✓ Se aisló e identificó una secuencia parcial de un posible gen que codifica para una metiltransferasa en la cepa de *S. maltophilia* INP1, aislada de un paciente con fibrosis quística, la cual presentó resistencia a los cuatro aminoglucósidos empleados en estudio.

8.0 BIBLIOGRAFÍA

- Alekshun M.N. & Levy S.B., 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**:1037-1050.
- Allen H.K., Donato J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J. & Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* **8**:251-259.
- Andersson D.I. & Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010 **8**:260-271.
- Bergogne-Bérézin E. & Towner K.J. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens. *Clin Microbiol Rev.* **9**:148-165
- Bogaerts P., Galimand M., Bauraing C., Deplano A., Vanhoof R., De Mendonca R., Rodriguez-Villalobos H., Struelens M. & Glupczynski Y. 2007. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* **59**:459-464.
- Bonomo R.A. & Szabo D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* **1**;43 Suppl 2:S49-S56.
- Calvo J. & Martínez-Martínez L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.***27**:44-52.
- Castillo Vera J., Ribas-Aparicio R., Osorio-Carranza L. & Aparicio G. 2006. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes a 21 antibióticos. *Bioquímica* **51**:41-48.
- Catchpole C.R., Andrews J.M., Brenwald N. & Wise R. 1997 A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother.* **39**:255-260.
- Chow C., Lamichhane T. & Mahto S. 2007. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS Chem Biol* **21**:610-619
- Doi Y., Adams-Haduch J.M. & Paterson D.L. 2008. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD*. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:2270-2272.

- Doi Y., de Oliveira Garcia D., Adams J. & Paterson D. 2007. Coproduction of novel 16s rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:852-856.
- Doi Y., Yokoyama K., Yamane K., Wachino J., Shibata N., Yagi T., Shibayama K., Kato H. & Arakawa Y. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:491-496
- Fritsche T., Castanheira M., Miller G., Jones R. & Armstrong E. 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:1843-1845
- Galimand M., Courvalin P. & Lambert T. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:2565-2571
- Galimand M., Sabtcheva s., Courvalin P. & Lambert T. 2005. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:2949-2953
- Henry J., Davey F., Herman C., McPherson R., Pincus M., Threatte G. & Woods G. 2005. *Bacteriología Médica en Henry el Laboratorio en el Diagnóstico Clínico.* Editorial Marbán pp. 1107-1109.
- Jana S. & Deb J. K. 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**:140–150
- Juliet L. & Fernández V. 2006. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Rev Chil Infectol.* **23**:247-248.
- Kang H.Y., Kim J., Seol S.Y., Lee Y.C., Lee J.C. & Cho D.T. 2009. Characterization of conjugative plasmids carrying antibiotic resistance genes encoding 16S rRNA methylase, extended-spectrum beta-lactamase, and/or plasmid-mediated AmpC beta-lactamase.. *J Microbiol.* **47**:68-75.

- Kehrenberg C., Schwarz S., Jacobsen L., Hansen L.H. & Vester B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular Microbiology* **57**:1064–1073
- Kohanski M.A., Dwyer D.J. & Collins J.J. 2010 How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* **8**:423-35.
- Lee H., Yong D., Yum J.H., Roh K.H., Lee K., Yamane K. Arakawa Y. & Chong Y. 2006. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **56**:305-312
- Lim Y.M., Shin K.S. & Kim J. 2007. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol.* **45**:902-905
- Liou G., Yoshizawa S., Courvalin P. & Galimand M. 2006. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol.* **359**:358-364
- Liu Y., Zhang B., Cao Q., Huang W., Shen L. & Qin X. 2009. Two clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* carrying plasmid-borne *blaIMP-4*, *blaSHV-12*, and *armA* isolated at a Pediatric Center in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. **53**:1642-4.
- MacFaddin J. 2004. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial médica Panamericana pp 595-596, 632-634 y 638-639.
- Mella S.M., Sepúlveda M.A., González G.R. 2004. Aminoglycosides-aminocyclitols: Structural characteristics and new aspects on resistance. *Rev Chil Infect.* **21**:330-338.
- Mingeot-Leclercq M.P. Glupczynski Y. & Tulkens P.M. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:727-737
- NCCLS/CLSI. 2005b National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M02-A8. CLSI, Wayne, Philadelphia, U.S.A.

- Palomino J. & Pachón J. 2003. Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microb Clin* **21**:105-115.
- Park Y.J., Lee S., Yu J.K., Woo G.J., Lee K. & Arakawa Y. 2006. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother.* **58**:907-908.
- Paterson D. 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Clin Infect Dis.***43**:S43-S48.
- Perez F., Hujer A., Hujer K., Decker B., Rather P. & Bonomo R. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:3471–3484
- Périchon B., Courvalin P. & Galimand M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:2464-2469
- Rodríguez-Hernández M.J., Jiménez-Mejías M.E., Pichardo C., Cuberos L., García-Curiel A. & Pachón J. 2004. Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* **10**:581-584
- Sabaté M. & Prats G. 2002. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **20**:341-5.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. 3^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Schmitt E., Galimand M., Panvert M., Courvalin P. & Mechulam Y. 2009. Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J Mol Biol.* **388**:570-582.
- Siegel R.E. 2008. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. *Respir Care.* **53**:471-479.
- Tenover F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* **119**:S3-S10

- Van Looveren M. & Goossens H. 2004 Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **10**:684-704
- Vila J., Marcos A., Marco F., Abdalla S., Vergara Y., Reig R., Gómez-Lus R. & Jimenez De Anta T. 1993. In Vitro Antimicrobial Production of β -Lactamases, Aminoglycoside-Modifying Enzymes, and Chloramphenicol Acetyltransferase by and Susceptibility of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:138-141
- Wachino J., Shibayama K., Kurokawa H., Kimura K., Yamane K., Suzuki S., Shibata N., Ike Y. & Arakawa Y. 2007. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:4401-4409
- Wachino J., Yamane K., Shibayama K., Kurokawa H., Shibata N., Suzuki S., Doi Y., Kimura K, Ike Y. & Arakawa Y. 2006 Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:178–184
- Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P. & Woods G. 2008. Bacilos Gram negativos no fermentadores En Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. 6ª Edición. Editorial Panamericana. pp 301-305, 337-339
- Wisplinghoff H., Edmond M. B., Pfaller, M.A., Jones R.N., Wenzel R.P. & Seifert H. 2000. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis.* **31**:690-697.
- Wu Q., Zhang Y., Han L., Sun J., Ni Y. 2009. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:271-272.
- Yamane K., Doi Y., Yokoyama K., Yagi T., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Kato H. & Arakawa Y. 2004. Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:2069-2074.

- Yamane K., Wachino J., Doi Y., Kurokawa H. & Arakawa Y. 2005. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis.* **11**:951-953
- Yokoyama K., Doi Y., Yamane K., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Yagi T., Kato H. & Arakawa Y. 2003 Acquisition of 16s rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* **362**:1888-1893.

URL (*Uniform Resource Locator*) consultados:

1. The top level of the taxonomy database maintained by NCBI/GenBank.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax>
2. Basic Local Alignment Search Tool. NCBI.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
3. T-Coffee
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>
4. BioEdit
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
5. Clustal W
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>