



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**Estudio de la diversidad de β -lactamasas e integrones
en cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*
de origen hospitalario**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR

P R E S E N T A

M. EN C. JANE CASTILLO VERA

**Directores de Tesis:
Dra. Rosa María Ribas Jaimes
Dr. Gerardo Aparicio Ozores**



México, D.F., diciembre 2010

Dr. Gerardo Aparicio-Ozores
National School of Biological Sciences, IPN
Microbiology
Carpio y Plan de Ayala S/N
Mexico, Distrito Federal 11340
Mexico

Re: Unusual Diversity of Acquired β -lactamases in Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Mexican Hospital (AAC01669-10 Version 1)

Dear Dr. Aparicio-Ozores:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is AAC01669-10 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL:

http://www.asm.org//components/com_php/files/editors.php

In submitting your manuscript to Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication.

Corresponding authors who are ASM members are entitled to discounted page charges, reprint fees, and color figure fees. If your manuscript is accepted for publication in a 2011 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$67 per printed page for the first eight pages and \$125 for each page in

excess of eight for a corresponding author who is an ASM member or \$80 per printed page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight for a nonmember corresponding author. A corresponding author who is not a member may join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including types of articles not charged, see the Instructions to Authors. Color charges for 2011 issues are \$170 per figure for a member corresponding author and \$375 per figure for a nonmember corresponding author.

To offset the costs associated with posting journal article supplemental material, ASM charges a flat fee for authors who wish to post supplemental material as an adjunct to their published article. The 2011 fee is \$190, with a limit of 10 supplemental files per article. (Exceptions: Minireviews and Commentaries are exempt from this fee.)

ASM is also now offering authors the option of paying a fee to allow immediate open access to both the preliminary "Accepts" version and the final, typeset version of their articles. The 2011 fee is \$2,000, which is in addition to current publication charges. The open access provided through NIH's PubMed Central repository is separate and will continue regardless; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication. You may contact the ASM production editor if you wish to pay the optional open access fee.

IMPORTANT NOTICE: For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "AAC Accepts" and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They are posted "As Is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes are NOT accepted. Accordingly, there may be differences between the AAC Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts remain listed on the AAC Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they are removed from the AAC Accepts page and become available only through links from the final, typeset version. Any supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Noel Lin
Production Editor
Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)

24 **ABSTRACT**

25 The production of acquired β -lactamases by *Pseudomonas aeruginosa*, especially
26 the extended spectrum β -lactamases (ESBLs) and metallo β -lactamases (MBLs), is a
27 growing threat in hospitals world-wide. The aim of this work was to study the potential
28 presence of ESBLs and MBLs in 14 *P. aeruginosa* strains resistant to imipenem and
29 ceftazidime, which were isolated in a hospital of Mexico. Over 70% of the isolates showed
30 resistance to nearly all 21 antibiotics tested, including β -lactams, aminoglycosides,
31 quinolones and tetracycline. Pulsed field gel electrophoresis revealed the presence of four
32 clonal types. Cloning and analysis by PCR and sequencing revealed the presence of genes
33 *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}*bla*_{GES-5} and *bla*_{OXA-2}. Interestingly, all these genes were found alone or
34 simultaneously in the *P. aeruginosa* strains in five different ways: *<bla*_{GES-5}*>*, *<bla*_{GES-5},
35 *bla*_{VIM-11}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{OXA-2}*>* and *<bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2},
36 *bla*_{VIM-11}, *bla*_{OXA-2}*>*. Class 1 integrons were detected; two of them harboring *bla*_{GES-5} or
37 *bla*_{OXA-2} cassettes, but none of them contained *bla*_{VIM}. The *bla*_{VIM} genes occurred only in
38 the chromosome, while *bla*_{GES-5} was located on the chromosome and native plasmids. This
39 is the first report of clinical isolates of *P. aeruginosa* in North America carrying *bla*_{GES-5}
40 and/or *bla*_{VIM-11}, in addition to the simultaneous presence of *bla*_{VIM-2} and the *bla*_{OXA-2}. The
41 simultaneous production of multiple broad spectrum transferable β -lactamases in *P.*
42 *aeruginosa*, including different variants from the same family, determine a mayor detection
43 challenge for the clinical microbiology laboratory, and a remarkable epidemiological risk
44 of nosocomial spread of multidrug resistance determinants.

45

46

47 **INTRODUCTION**

48 *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most serious nosocomial problems, not only
49 because the severity of the infections that it can develop in hospitalized patients, but also
50 because of the difficulties that its treatment implies, since it is intrinsically resistant to a
51 wide range of antibiotics. In addition to chromosomal mutations (such as those leading to
52 AmpC overexpression, porins loss and/or efflux pumps overexpression), horizontal
53 acquisition of resistance genes in plasmids and transposons can increase its resistance to
54 essentially all reliable antipseudomonal antibiotics (20). Broad spectrum cephalosporins,
55 such as ceftazidime, and carbapenems are most widely used today to treat clinical
56 infections caused by *P. aeruginosa*. However, clinical isolates often show resistance to
57 them, not only because of the accumulation of the cited chromosomal mutations, but also
58 because they can horizontally acquire β -lactamases. Examples of them are the extended-
59 spectrum β -lactamases (ESBLs) (17) and the class B carbapenemases (also called metallo-
60 β -lactamases [MBLs]), that in combination, could virtually hydrolyze all β -lactams (38). Of
61 special interest are the GES β -lactamases, given that with few aminoacid changes, they
62 extend their spectrum from oxyimino cephalosporins (ESBLs hydrolyzing pattern), to also
63 carbapenems, as occurs with the -4, -5, and -6 subtypes (1), showing then carbapenemase
64 profile like the MBLs.

65 MBLs and ESBLs genes can be located on different genetic elements, such as
66 plasmids, transposons and/or integrons, which often also carry additional resistance genes.
67 So, the spread of β -lactamases is amplified by mobilization of resistance genes from the
68 chromosome to a plasmid and by the location of these genes in integrons, transposons,
69 prophages and genomic islands (29). Integrons are the main responsible for the

70 accumulation and spread of resistance gene cassettes involved in the resistance of bacteria
71 to antibiotics (11).

72 The emergence and spread of β -lactamases producing strains are an important risk
73 represented by the conferred resistance to antibiotics of choice. Thus, strains of *P.*
74 *aeruginosa* producing acquired β -lactamases such as GES-5 have caused outbreaks in
75 several hospitals in different regions of the world, as in China (39), South Africa (18),
76 Brazil (23) and Spain (37), although to date there is no formal description of its
77 identification in North America. In contrast, the VIM type MBLs were first described in
78 Europe in 1999 (19) and, since then, specific reports such as VIM-11 (22), VIM-13 (15) as
79 well as other VIM subtypes have been made around the world (2), reaching currently a
80 VIM group with 27 subtypes (nomenclature is in accordance with that provided by G.
81 Jacoby on the Lahey website [<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>]). The
82 simultaneous presence of genes encoding MBLs and/or ESBLs have been described in
83 *Escherichia coli*, which encodes two different MBLs, specifically the genes *bla*_{VIM} – *bla*_{SIM}
84 or *bla*_{IMP} – *bla*_{SIM} (8); as well as coding for the MBLs *bla*_{VIM-2} and the ESBLs *bla*_{GES-7} (9).
85 In *P. aeruginosa* there are reports of the coexistence in a single integron of the genes
86 *bla*_{OXA-10} - *bla*_{VIM-2}, *bla*_{OXA-10} - *bla*_{IMP-1} or *bla*_{OXA-10} - *bla*_{PER-1} (34), and *bla*_{GES-1}- *bla*_{GES-5},
87 *bla*_{OXA-2} (37). Recently, in Mexico, *bla*_{VIM-2} was found alone in clinical *E. coli* isolates in
88 2007 (21) and simultaneously with *bla*_{IMP-15} in *P. aeruginosa* clinical isolates in 2010 (27),
89 additionally *bla*_{VIM-23} subtype was identified in an *Enterobacter cloacae* isolate (GenBank
90 accession number GQ242167).

91 The aim of this study was to determine the diversity of β -lactamases in a group of
92 multidrug resistant (MDR) strains of *P. aeruginosa* involved in nosocomial infections in

93 Mexico in 2004, demonstrating for the first time the presence of *bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-11}, as well
94 as previously reported *bla*_{VIM-2} and *bla*_{OXA-2}; interestingly, this is the first report of the
95 presence of these genes simultaneously, including two types of *bla*_{VIM} in some of *P.*
96 *aeruginosa* clones studied.

97

98 MATERIAL AND METHODS.

99 **Biological material.** Fourteen imipenem and ceftazidime resistant *P. aeruginosa*
100 isolates were studied (3). These isolates were obtained from cases of nosocomial infections
101 in the Intensive Care Service, Hospital of Infectious Diseases, “La Raza” National Medical
102 Center, Mexican Institute of Social Security (IMSS, for its initials in Spanish), from August
103 to November 2004. Bacteriological identification was performed with the BBL Crystal ®
104 system (Becton, Dickinson and Company, USA) and three strains were selected at random
105 to confirm identification at the molecular level, analyzing their 16S rDNA gene partial
106 sequence (results not shown).

107 **Molecular typing and susceptibility to antibiotics.** The clonal relationship of
108 isolates was studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) as described by Spencker *et*
109 *al.* (33). Genomic DNA was subjected to digestion with SpeI. Macro restriction patterns of
110 DNA were interpreted under the criteria established by Tenover *et al.* (35).

111 Susceptibility to 21 antibiotics (amikacin, azlocillin, aztreonam, carbenicillin,
112 cefepime, cefoperazone, ceftazidime, ceftizoxime, ceftriaxone, ciprofloxacin, imipenem,
113 levofloxacin, meropenem, mezlocillin, netilmicin, norfloxacin, ofloxacin, piperacillin,
114 ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid, and tobramycin) was assessed by the disk diffusion

115 method using filter paper discs and following the recommendations of the Clinical and
116 Laboratory Standard Institute (4).

117 MBLs phenotype was detected with the Etest metallo- β -lactamase strips (Etest
118 MBLs; AB Biodisk, Solna, Sweden) used according to the manufacturer's instructions.
119 ESBLs detection was performed with the double-disk synergy test (DDST) with
120 ceftazidime and amoxicillin/clavulanate with a 20 mm separation (13).

121 **Detection, characterization and cloning of acquired β -lactamases.** In order to
122 have a biochemical approximation to the potential acquired β -lactamases, crude protein
123 extracts were prepared by sonication for the determination of isoelectric focusing (IEF)
124 using Phast gels (pH gradient of 3 to 9) in a Phast System apparatus (Pharmacia AB,
125 Uppsala, Sweden). The extracts from four control strains of the collection of the Son Dureta
126 Hospital (Spain) were subjected in parallel to electrophoresis: IES (pI 7.6), 12D (pI 6.0 and
127 8.6), 2D2 (pI 5.4 and 8.0), and g5 (pI 8.2). For genetic characterization, PCR reactions were
128 performed using as template genomic DNA obtained with the DNeasy Tissue kit
129 (QIAGEN, Hilden, Germany), as well as specific primer sequences previously reported to
130 identify genes of β -lactamases GIM, IMP, SIM, SPM and VIM (12, 25) , GES (37) and
131 OXA (31). Amplicons obtained by PCR and cloned DNA fragments were sequenced in the
132 ABI PRISM 3100 automated equipment [®] (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).
133 Resulting sequences were then compared with those available at GenBank
134 (www.ncbi.nih.gov/BLAST).

135 When the IEF assay showed bands with a pI corresponding to β -lactamases reported
136 in the literature but whose presence was not detected by PCR, cloning of the involved gene
137 was attempted. The cloning was done in *E. coli* XL1-Blue or *E. coli* DH5- α using the

138 CaCl₂ method (30) with ligation reactions of pUCP24 and total DNAs digested with EcoRI
139 and BamHI. The transformants were selected on LB agar plates containing 5 µg/ml
140 gentamicin and 30 µg/ml ampicillin. Since the potential presence of multiple integrons
141 simultaneously in the same strain may interfere with PCR and sequencing experiments,
142 cloning was performed to isolate the different integrons and/or genetic regions containing
143 the different resistance genes. On the obtained transformants, the activity of ESBLs and
144 MBLs was analyzed as described before (DDST and Etest MBLs). The minimal inhibitory
145 concentration (MIC) to the antibiotics piperacillin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime,
146 cefepime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, and
147 colistin was performed with Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden).

148 **Characterization of the involved integrons.** The search for integrons of classes 1,
149 2, and 3 potentially containing the β-lactamase genes and/or other resistance determinants,
150 was carried out by PCR, using as target the conserved regions of genes coding for different
151 integrases (5, 12, 24). Subsequently, to identify the cassettes present in integrons, PCR
152 amplification was performed for the integron variable region located between the genes
153 *intI1* and *qacEΔ* (12). The integrons amplified directly from the genomic DNA of *P.*
154 *aeruginosa* strains, and those identified from the recombinant pUC24 clones were finally
155 sequenced.

156 **Characterization of genetic elements carrying the transferable β-lactamases.**

157 Strains B203(B), 204(B1) and 208(D) were the only clones that proved to have
158 native plasmids. Electroporation of plasmids DNA in *P. aeruginosa* PAO1 was carried out
159 (32). The transformants were selected on LB agar plates added with ceftazidime at a
160 concentration of 16µg/ml. The analysis of resistance transfer in the transformed clones was

161 tested by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) for piperacillin, piperacillin/tazobactam,
162 ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin and
163 ciprofloxacin, interpreting the results according to CLSI. β -lactamase phenotypic tests were
164 performed as previously described.

165 A series of hybridization analyses were performed to determine the location of the
166 genes encoding β -lactamases in the bacterial genome. Southern hybridization analyses were
167 carried out according to manufacturer's instructions (GE Healthcare, Little Chalfont, UK),
168 using as hybridization probes internal fragments of *bla_{GES}*, or *bla_{VIM}* and genomic or
169 plasmid DNA obtained through Genopure Plasmid Maxi kit (Roche Diagnostics, USA)
170 from clinical strains and recombinant clones.

171 **RESULTS**

172 **Molecular typing and susceptibility to antibiotics.** PFGE analysis allowed
173 grouping the 14 multiresistant clinical isolates of *P. aeruginosa* in four clusters designated
174 A to D, containing from one to six isolates (Table 1). Eleven strains showed resistance to
175 nearly all ($\geq 20/21$) antibiotics tested, and were distributed among the four PFGE clusters.
176 The three strains resistant to five and six antibiotics were grouped into A and C. Two
177 isolates (from cluster B and D) showed ESBLs phenotype by double-disk synergy test,
178 whereas MBL E-test yielded a positive result in seven strains (Table 1).

179 **Characterization of acquired β -lactamases.** Clones 212(A), 204(B), 206(C), and
180 208(D) were selected as representatives of each PFGE clonal type to detect the production
181 of β -lactamases by the IEF technique. Two bands with a pI of 5.8 and 8.2 were found,
182 which compared with those generated by control strains corresponded to GES-5 and OXA-
183 2 β -lactamases, respectively. The clone type 212 (A2) showed both bands, the 204 (B1)

184 showed only 5.8, the 208 (D) depicted the 8.2, and 206 (C) produced no band. Because no
185 pI corresponding to MBLs could be observed, probably due to poor nitrocefin hydrolysis by
186 these enzymes in the regular IEF conditions, and the fact of positive results for MBLs
187 synergy test, specific MBLs genes amplification was performed. The search was positive
188 for MBLs gene *bla*_{VIM} for seven clones and each *bla*_{VIM} fragment was sequenced directly or
189 from recombinant *E.coli* clones. The aminoacid sequence analysis result when compared to
190 VIM-2 revealed the presence of two VIM subtypes already reported: VIM-2 and VIM-11.
191 Interestingly, two *P. aeruginosa* strains showed simultaneously the presence of both VIM
192 subtypes. Moreover, *bla*_{GES-5} was detected by PCR and sequencing in 11 clones, as well as
193 *bla*_{OXA-2} that was present in four clones. The β -lactamases genes were located in all clonal
194 types (Table 1).

195 **Characterization of the involved integrons.** Only class 1 integrons carrying
196 different resistance genes were identified in six clones of *P. aeruginosa*; however *bla*_{VIM}
197 was not detected in them. Most genes were associated with resistance to
198 aminoglycosides. The *bla*_{GES-5} and *bla*_{OXA-2} genes detected in diverse integrons presented a
199 different arrangement (Figure 1).

200 Since the potential presence of multiple integrons simultaneously in the same strain
201 may interfere with PCR and sequencing experiments, cloning was attempted to isolate the
202 different integrons and/or genetic regions containing the different resistance genomic DNA
203 of clones type 173(A1), 212(A2), B203(B), 204(B1), 206(C), 210(C), and 208(D). Only
204 two recombinant clones were obtained, pUCB203B and pUC204B, which showed a
205 phenotype positive for ESBLs and negative for MBLs (Table 2). Recombinant plasmids
206 were used as templates for class 1 integron PCR search. After amplification and sequencing

207 of pUC204B a class 1 integron was identified carrying genes *intI1*, *bla_{GES-5}*, *aadA1*, and
208 *qac Δ E1* (Figure 1).

209 ***bla_{GES}* and *bla_{VIM}* distribution in multidrug resistant strains of *P. aeruginosa*.**

210 The recombinants derived from clones B203(B), 204(B1) and 208(D) showed positive for
211 ESBLs phenotype and negative for MBLs, in addition to confer resistance to ceftazidime,
212 susceptibility to imipenem and transfer of another resistance markers (Table 2).

213 To localize *bla_{GES}* in the chromosome and/or plasmids transfer to *P. aeruginosa*
214 PAO1, a Southern hybridization assay was performed. Eleven clinical strains previously
215 positive by PCR to *bla_{GES-5}* demonstrated a chromosomal location; in addition, strains
216 B203(B), 204 and 208 with the native plasmids showed a plasmidic location. On the other
217 hand, *bla_{VIM}* was found to have chromosomal location in all the strains (results not shown).

218 **DISCUSSION**

219 In this study, we analyzed 14 strains of *P. aeruginosa* that were chosen for their
220 resistance to imipenem and ceftazidime. The susceptibility test of 21 antibiotics of the β -
221 lactam, aminoglycosides, quinolones, and tetracycline groups revealed that 11 strains were
222 resistant to all or almost all antibiotics, indicating that the hospital suffers from a selective
223 pressure on antibiotic use that leads to the increasing trend of resistance, as has been
224 indicated for other hospitals (28).

225 Typing of *P. aeruginosa* by PFGE lead to the identification of four different clones
226 circulating in the intensive care unit for a period of three months, showing the coexistence
227 of different strains in a short period, which is similar to reports of outbreaks by MDR *P.*
228 *aeruginosa* in other countries (6, 7).

229 A plasmid containing a class 1 integron with a cassette containing the *bla*_{GES-5}
230 sequence was isolated from the 204PA transformant clone type. Additionally, in the same
231 clinical clone type source, 204(B1), a copy of this gene was found in the chromosome,
232 suggesting that *bla*_{GES-5} could be found at first associated with a plasmid and then
233 integrated into the bacterial chromosome. To date, there are no reports on the presence of
234 *bla*_{GES-5} in countries of Central and North America. It has been reported in Europe (37),
235 Asia (14), Africa (18) and South America (23), indicating expansion of the presence of this
236 gene to North America.

237 The VIM-2 MBLs was first described in *P. aeruginosa* in Europe by Poirel *et al.* in
238 2000 (25), and since then there have been reports in all regions of the world (16). In
239 Mexico, detection of the *bla*_{VIM-2} gene in strains of *P. aeruginosa* was not documented until
240 2010 (27). On the other hand, the VIM-11 MBLs has undergone a very different
241 distribution, since it was first described in Argentina by Pasteran *et al.* in 2005 (22), and to
242 date there is only one additional report of this type of MBLs in strains of *P. aeruginosa*
243 collected in India (2). Interestingly, in two out of seven strains, more than one *bla*_{VIM}
244 subtype or variant were observed, that included a *bla*_{VIM-2} and *bla*_{VIM-11}. To date, *P.*
245 *aeruginosa* strains co-producing two or more types of VIM β -lactamase have not been
246 reported. However, Glupczynski *et al.* (10) showed that BEL or PER ESBLs co-existed
247 with VIM carbapenemases in strains from Belgian hospitals.

248 The β -lactamase genes are mostly associated to class 1 integron that are plasmid or
249 chromosome located (26). This study did not detect *bla*_{VIM} genes linked to integrons and
250 plasmids; however, to rule out the presence of *bla*_{VIM} genes in these elements it would be
251 necessary to determine the regions flanking these genes in the *P. aeruginosa* strains studied.

252 Nevertheless, exceptionally, resistant cassettes could be found in absence of a transmissible
253 element as has been showed by Toleman *et al.* (36), who demonstrated the absence of a
254 transmissible element in the upstream or downstream regions of the *bla*_{SPM-1} gene.

255 The presence of bacteria carrying β -lactamases that cause outbreaks in hospitals in
256 Mexico seems to be an emerging problem. However, there are no previous studies in this
257 country showing the simultaneous presence of genes *bla*_{OXA-2}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, and *bla*_{VIM-}
258 ₁₁. The isolates of this study were recovered in 2004, which is close to 2005 when Pasteran
259 *et al.* (22) recovered strains with gene *bla*_{VIM-11} in Argentina. The results indicate that the
260 bacteria carrying β -lactamases have been circulating in Mexico for several years and their
261 association with nosocomial infections makes it essential to control better the use of
262 antibiotics. Active surveillance is necessary to prevent the spread of clones carrying
263 integrons and resistance genes associated with plasmids. The proper use of antibiotics in
264 infection control will help in the fight against organisms producing carbapenemases.

265 This is the first study that reports the presence of *bla*_{GES-5} in *P. aeruginosa* strains
266 from North America, in addition to the particular finding that several *P. aeruginosa* clinical
267 strains simultaneously produced *bla*_{VIM-2}, and/or *bla*_{VIM-11}. The coexistence of several and
268 variable beta-lactamases in a single clone is reported for the first time, adding further
269 complexity to the epidemiology of transferable resistance in *P. aeruginosa*. In addition, the
270 detection of two VIM variants through the approach followed, suggests the possibility that
271 this circumstance might be more common than thought, since the detection of a VIM
272 variant, may mask the presence of other additional β -lactamases. It is important to highlight
273 the epidemiological risk posed by these strains, due to the potential spread of resistance
274 genes, especially when these strains have so many and diverse.

275 **ACKNOWLEDGMENTS**

276 JCV received a graduate studies fellowship and support to carry out a research stay
277 at Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain, from CONACyT and
278 I.P.N., Mexico. RMR-A and GA-O are recipients of COFAA-IPN and EDD-IPN
279 fellowships. This work was supported by SIP-IPN-Mexico grant numbers 20091358 and
280 20101151. CJ and AO are supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain
281 and Instituto de Salud Carlos III, through the Spanish Network for the Research in
282 Infectious Diseases (REIPI C03/14 and RD06/0008).

283 **REFERENCES**

- 284 1. **Bae, I. K., Y. N. Lee, S. H. Jeong, S. G. Hong, J. H. Lee, S. H. Lee, H. J. Kim,**
285 **and H. Youn.** 2007. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-
286 spectrum class A β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*
287 **58**:465-468.
- 288 2. **Castanheira, M., J. M. Bell, J. D. Turnidge, D. Mathai, and R. N. Jones.**
289 2009. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence
290 for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -
291 11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1225-1227.
- 292 3. **Castillo-Vera J., R.M. Ribas-Aparicio, L. Osorio-Carranza, and G.**
293 **Aparicio.** 2006. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes
294 a 21 antibióticos. *Bioquimia.* **31**:41-48
- 295 4. **CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Performance
296 standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Vol. 29, No. 1, M02-A10. 10th Edition.
297 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. USA.
- 298 5. **Collis C. M., M.J. Kim, S.R. Partridge, H.W. Stokes, and R.M. Hall.** 2002.
299 Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it
300 determines. *J. Bacteriol.* **184**: 3017-3026.
- 301 6. **Corvec, S., L. Poirel, E. Espaze, C. Giraudeau, H. Drugeon, and P.**
302 **Nordmann.** 2008. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas*
303 *aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J. Hosp. Infect.* **68**:73-82.
- 304 7. **Crespo, M. P., N. Woodford, A. Sinclair, M. E. Kaufmann, J. Turton, J.**
305 **Glover, J. D. Velez, C. R. Castañeda, M. Recalde, and D. M. Livermore.** 2004.

306 Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel
307 metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. J. Clin. Microbiol.
308 **42**:5094-5101.

309 **8. Dwivedi, M., A. Mishra, A. Azim, R.K. Singh, A.K. Baronia, K.N. Prasad,**
310 **T.N. Dhole, and U.N. Dwivedi.** 2009. Ventilator-associated pneumonia caused by
311 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* carrying multiple metallo-beta-lactamase genes.
312 Indian J. Pathol. Microbiol. **52**:339-342.

313 **9. Galani, I., M. Souli, E. Koratzanis, Z. Chryssouli, and H. Giamarellou.** 2006.
314 Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both
315 metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7:
316 identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. J. Antimicrob. Chemother.
317 **58**:432-433.

318 **10. Glupczynski, Y., P. Bogaerts, A. Deplano, C. Berhin, T.D. Huang, J. Van**
319 **Eldere, and H. Rodriguez-Villalobos.** 2010. Detection and characterization of class A
320 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian
321 hospitals. J. Antimicrob. Chemother. **65**: 866-871

322 **11. Gómez-Lus R.** 1998. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the
323 last three decades. Int. Microbiol. **1**:279-284.

324 **12. Gutierrez, O., C. Juan, E. Cercenado, F. Navarro, E. Bouza, P. Coll, J.L.**
325 **Pérez, and A. Oliver.** 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem
326 resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. Antimicrob. Agents
327 Chemother. **51**:4329-4335.

- 328 13. **Jarlier, V., M.H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon.** 1998. Extended
329 broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam
330 agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect.*
331 *Dis.* **10**:867-878.
- 332 14. **Jeong, S.H., I.K. Bae, D. Kim, S.G. Hong, J.S. Song, J.H. Lee, and S.H. Lee.**
333 2005. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-
334 12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4809-
335 4810.
- 336 15. **Juan, C., A. Beceiro, O. Gutiérrez, S. Albertí, M. Garau, J. L. Pérez, G. Bou,**
337 **and A. Oliver.** 2008. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its
338 integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *J.*
339 *Antimicrob. Chemother.* **52**:3589-3596.
- 340 16. **Juan, C., L. Zamorano, A. Mena, S. Albertí, J. L. Pérez, and A. Oliver.** 2010.
341 Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug
342 resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J*
343 *Antimicrob Chemother.* **65**:474-478.
- 344 17. **Kotsakis, S.D., C.C. Papagiannitsis, E. Tzelepi, N.J. Legakis, V. Miriagou,**
345 **and L.S. Tzouvelekis.** 2010. GES-13, a β -Lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-
346 170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **54**: 1331-1333.
- 347 18. **Labuschagne, C. de J., G.F. Weldhagen, M.M. Ehlers, and M.G. Dove.**
348 2008. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum
349 beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int. J.*
350 *Antimicrob. Agents.* **31**:527-530.

- 351 19. **Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante,**
352 **R.Fontana, and G.M. Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new
353 integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical
354 isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1584-1590.
- 355 20. **Livermore, D.M.** 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in
356 *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34**:634-640.
- 357 21. **Morfin-Otero, R., E. Rodriguez-Noriega, L.M. Deshpande, H.S. Sader, M.**
358 **Castanheira.** 2009. Dissemination of a *bla*(VIM-2)-carrying integron among
359 *Enterobacteriaceae* species in Mexico: Report from the SENTRY antimicrobial
360 surveillance program. *Microb. Drug Resist.* **15**:33-35
- 361 22. **Pasteran, F., D. Faccone, A. Petroni, M. Rapoport, M. Galas, M. Vazquez,**
362 **and A. Procopio.** 2005. Novel variant *bla*_{VIM-11} of the metallo-β-lactamase *bla*_{VIM} family in
363 a GES-1 extended-spectrum-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical
364 isolate in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:474-475.
- 365 23. **Picão, R.C., L. Poirel, A.C. Gales, and P. Nordmann.** 2009. Diversity of
366 beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates
367 causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3908-3913.
- 368 24. **Ploy, M.C., F.O. Denis, P. Courvalin, and T. Lambert.** 2000. Molecular
369 characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: Description of a hybrid class 2
370 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2684-2688.
- 371 25. **Poirel, L., T. Naas, D. Nicolas, L. Collet, S. Bellais, J.D. Cavallo, and P.**
372 **Nordmann.** 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-

373 lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa*
374 clinical isolate in France. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:891-897.

375 26. **Poirel, L., J.D. Pitout, and P. Nordmann.** 2007. Carbapenemases: molecular
376 diversity and clinical consequences. Future Microbiol. **2**:501-512.

377 27. **Quinones-Falconi, F., M. Galicia-Velasco, P. Marchiaro, M.A. Mussi, V.**
378 **Ballerini, A.J. Vila, A.M. Viale, K. Bermejo-Morales, and A. S. Limansky.** 2010.
379 Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the
380 IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. Clin. Microbiol Infect. **16**:126-131.

381 28. **Rice, LB.** 2009. The clinical consequences of antimicrobial resistance. Curr.
382 Opin. Microbiol. **12**:476-481.

383 29. **Roy, P.H., S.G. Tetu, A. Larouche, L. Elbourne, S. Tremblay, Q. Ren, R.**
384 **Dodson, D. Harkins, R. Shay, K. Watkins, Y. Mahamoud, I.T. Paulsen.** 2010.
385 Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas*
386 *aeruginosa* PA7. PLoS One. **5**:e8842.

387 30. **Sambrook, J., and D.W. Russell.** 2001. Preparation and transformation of
388 competent *Escherichia coli* using calcium chloride, p. 1.116-1.118. In Molecular cloning. A
389 laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

390 31. **Senda, K., Y. Arakawa, K. Nakashima, H. Ito, S. Ichiyama, K. Shimokata,**
391 **N. Kato, and M. Ohta.** 1996. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase producing
392 *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems.
393 Antimicrob. Agents Chemother. **40**:349-353.

394 32. **Smith, A.W., and B. H. Iglewski.** 1989. Transformation of *Pseudomonas*
395 *aeruginosa* by electroporation. Nucleic Acids Res. **17**: 10509.

- 396 33. **Spencker, F.B., S. Haupt, M.C. Claros, S. Walter, T. Lietz, R. Schille, and**
397 **A.C. Rodloff.** 2000. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in
398 patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**:600-607.
- 399 34. **Suk, S.E., J.S. Yoo, J.K. Lee, K.M. Lee, G.T. Chung, E.S. Shin, S.Y. Han,**
400 **S.H. Lee, J. Kim, Y.S. Lee.** 2007. Investigation of beta-lactamase-producing multidrug-
401 resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from non-tertiary care hospitals in Korea. *J.*
402 *Microbiol. Biotechnol.* **17**:1733-1737.
- 403 35. **Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray,**
404 **D.H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction
405 patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J.*
406 *Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.
- 407 36. **Toleman, M.A., A.M. Simm, T.A. Murphy, A.C. Gales, D.J. Biedenbach,**
408 **R.N. Jones, and T.R. Walsh.** 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-
409 beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial
410 surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:673-679.
- 411 37. **Viedma, E., C. Juan, J. Acosta, L. Zamorano, J. R. Otero, F. Sanz, F.**
412 **Chaves, and A. Oliver.** 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive (COS) ST235
413 *Pseudomonas aeruginosa* producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-
414 5 in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4930-4933.
- 415 38. **Walsh, T.R., M.A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2005. Metallo-
416 beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:306-325.

417 39. Wang, C., P. Cai, D. Chang, and Z. Mi. 2006. A *Pseudomonas aeruginosa*
418 isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother.
419 **57**:1261-1262.

420 TABLE 1. Phenotypic and genotypic characterization of multiresistant *P. aeruginosa* clinical isolates

Strain (PFGE pattern)	Clinical isolates antibiotic resistance	Antibiotics		ESBLs phenotype	ESBLs genotype	MBLs phenotype	MBLs genotype
		resistant / total					
201(A)				-	GES-5	-	N.D.
201a(A)				-	GES-5	+	VIM-11
211(A)	AMK, AZL, AZT, CAR,			-	GES-5	+	VIM-2 VIM-11
207(A2)	CAZ, CEF, CIP, CTX,			-	GES-5 OXA-2	-	N.D.
212(A2)	CTZ, FEP, IMP, LEV,	21/21		-	GES-5 OXA-2	+	VIM-2
203(B)	MER, MEZ, NET, NOR,			-	GES-5	+	VIM-11
B203(B)	OFX, PIP, TIC,			+	GES-5	+	VIM-11
215(B)	TIC/CLAV y TOB			-	GES-5	+	VIM-11
210(C)				-	GES-5	-	N.D.
204(B1)	AMK, AZL, CAR, CAZ, CEF, CIP, CTX, CTZ,			+	GES-5 OXA-2	-	N.D.
208(D)	FEP, IMP, LEV, MER, MEZ, NET, NOR, OFX, PIP, TIC, TIC/CLAV y TOB	20/21		+	GES-5 OXA-2	+	VIM-2 VIM-11
214(C1)	AMK, CTX, CTZ, IMP, NET, OFX	6/21		-	N.D.	-	N.D.
173(A1)	CEF, CTX, IMP, NET, TOB	5/21		-	N.D.	-	N.D.
206(C)	CEF, CTX, IMP, NET, TOB	5/21		-	N.D.	-	N.D.

421
422 AMK, amikacin; AZL, azlocillin; AZT, aztreonam; CAR, carbenicillin; CAZ, ceftazidime; CEF, cefoperazone, IPF,
423 ciprofloxacin, CTX, ceftizoxime, CTZ, cefriaxone, FEP, cefepime; IMP, imipenem; LEV, levofloxacin; MER, meropenem;
424 MEZ, mezlocillin; NET, netilmicin; NOR, norfloxacin, OFX, Ofloxacin, PIP, piperacillin; TIC, ticarcillin, TIC/CLAV, ticarcillin-
425 clavulanate, TOB, tobramycin. The highlighted text indicates strains representing each of the four clonal groups. N.D.= not
426 detected

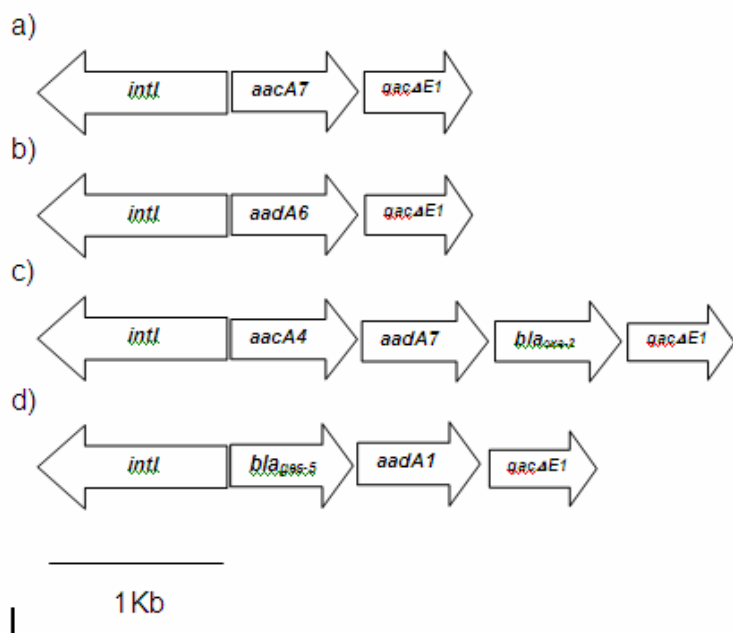
427
428
429

TABLE 2. Results of resistance to antibiotics and beta lactamase phenotype in the recombinant plasmids pUC204B and pUCB203B; and native plasmids of strains B203(B), 204(B1) and 208(D).

Receiver	Plasmid	MIC (µg/ml) ^a												
		CAZ	FEP	PIP	PIP-TZ	IMP	MER	CIP	COL	GEN	TOB	AMK	MBLs	ESBLs
<i>E. coli</i> XL1-Blue	No	0.5	0.25	1	1	0.125	0.016	0.064	0.064	0.25	0.38	0.75	-	-
	pUC204B	12	0.5	4	1	0.125	0.012	0.047	0.064	12	0.5	1	-	+
	pUCB203B	>256	2	8	2	0.25	0.094	0.032	0.064	8	3	4	-	+
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	No	2	1.5	3	2	1	0.25	0.094	1.5	2	0.75	3	-	-
	204PA	>256	48	48	24	1.5	0.38	0.125	2	4	32	64	-	+
	208PA	96	12	>256	128	1	0.5	0.094	2	1.5	1	3	-	+
	B203PA	>256	24	256	256	1.5	0.38	0.125	2	2	1	4	-	+

430
431
432
433
434

^aMIC: CAZ, ceftazidime, FEP, cefepime; PIP, piperacillin, PIP-TZ, piperacillin-tazobactam; IMP, imipenem, MER, meropenem; CIP, ciprofloxacin; COL, colicistine; GEN, gentamicin, TOB, tobramycin; AMK, amikacin were determined by Etest.
Note: cutoff values (µg / ml) for antibiotics: CAZ^R ≥ 32; FEP^R ≥ 32; PIP^R ≥ 128; PIP-TZ^R ≥ 128; IMP^R ≥ 16; MEM^R ≥ 16; CIP^R ≥ 4; COL^R ≥ 8; TOB^R ≥ 8; AMK^R ≥ 64. GEN was the selection marker.



436

437 FIGURE 1. Schematic representation of the class 1 integrons identified in strains of *P.*
 438 *aeruginosa*. a) Organization of integrons in 173(A1), 212(A2), 206(C), and 210(C) showed
 439 identity to: *intI1* [integrase], *aacA7* (GenBank accession number: AM988778) [resistant to
 440 aminoglycosides], and *qacΔE1* [codifying resistance to quaternary ammonium salts]; b)
 441 Array of one integron in 204(B1) presented identity to genes: *intI1*, *aadA6* (GenBank
 442 accession number: FJ752628), and *qacΔE1*; c) Organization of the integron in 208(D)
 443 presented gene sequences corresponding to: *intI1*, *aacA4* (GenBank accession number:
 444 GQ202693), *aadA7* (GenBank accession number: DQ899757), *bla_{OXA-2}* [resistant to
 445 oxacillin], and *qacΔE1*; d); Second integron in 204(B1) located in the recombinant plasmid
 446 pUC204B presented gene sequences corresponding to: *intI1*, *bla_{GES-5}*, *aadA*, and *qacΔE1*.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**Estudio de la diversidad de β -lactamasas e integrones
en cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*
de origen hospitalario**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR

P R E S E N T A

M. EN C. JANE CASTILLO VERA

**Directores de Tesis:
Dra. Rosa María Ribas Jaimes
Dr. Gerardo Aparicio Ozores**



México, D.F., diciembre 2010

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Producción y Control de Biológicos del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Ribas Jaimes y del Dr. Gerardo Aparicio Ozores.

Parte de los resultados de esta tesis se obtuvieron en colaboración con el Dr. Antonio Oliver Palomo y del Dr. Carlos Juan Nicolau, del Laboratorio de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta en Palma de Mallorca, España, donde la sustentante realizó una estancia de investigación, a través del apoyo otorgado por el Programa de Biomedicina y Biotecnología Molecular de la ENCB, con el financiamiento del Programa de Becas Mixtas en el Extranjero (205191) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y por el Programa de Vinculación Académica del Instituto Politécnico Nacional.

Este trabajo se desarrolló con el apoyo de los proyectos SIP-IPN-México 20091190, 20091358 y 20101151, dirigidos por el Dr. Gerardo Aparicio y Rosa María Ribas, a partir de los cuales la alumna recibió el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN. La sustentante fue becaria del Programa de Becas Nacionales del CONACyT.

Índice general

	Página
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
1.0. INTRODUCCIÓN	
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Importancia clínica	2
1.1.3. Patogénesis	2
1.2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	3
1.3. β-lactamasas	3
1.3.1. ESBLs	4
1.3.2. Metallo- β -Lactamasas.	5
1.3.3. Epidemiología de las metalo- β -lactamasas	6
1.4. Elementos genéticos involucrados en la diseminación de genes de resistencia	7
1.4.1 Plásmidos	
1.4.2 Transposones	8
1.4.3 Integrones	9
1.4.3.1. CASETES GÉNICOS	11
1.4.3.2 SITIO <i>ATT</i>	12
1.4.3.3 Integrasa	14
1.4.3.4. Clasificación de los integrones	14
2.0. ANTECEDENTES	18
3.0. JUSTIFICACIÓN	19
4.0. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2 Objetivos particulares	20

5.0. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1. Material	21
5.1.1. Material Biológico	22
5.1.2. Cepas de referencia	22
5.2. Identificación bacteriológica	23
5.3. Caracterización molecular por electroforesis en campos pulsados (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> [PFGE])	23
5.3.1. Extracción de DNA	23
5.3.2. Digestión enzimática y electroforesis en gel	24
5.4. Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de difusión en agar utilizando discos de papel filtro (CLSI, 2005)	24
5.4.1. Control de Calidad	25
5.5. Detección y caracterización fenotípica de β-Lactamasas	25
5.5.1. Prueba de sinergismo de metalo- β -lactamasas (MBLs).	25
5.5.2. Prueba de sinergismo de β -Lactamasas de espectro extendido (BLEEs)	26
5.6. Detección, caracterización y clonación de β-Lactamasas adquiridas	27
5.6.1. Isoelectroenfoque (IEF)	27
5.7. Detección genotípica y clonación de β-Lactamasas adquiridas	28
5.8. Detección y clonación de integrones	32
5.8.1. Caracterización de integrones e identificación de transposones	33
5.9. Secuenciación de los fragmentos amplificados	34
5.10. Electroporación y análisis de transformantes	34
5.10.1. Electroporación de plásmidos nativos	34
5.10.2. Análisis de transformantes resistentes	35

5.11. Localización cromosomal o plasmídica de β-Lactamasas por hibridación tipo Southern	36
5.11.1. Digestión enzimática	36
5.11.2. Electroforesis y Transferencia	37
5.11.3. Marcaje de la sonda	38
5.11.4. Hibridación y condiciones de estrictez	38
5.11.5 Generación de la señal y detección	39
5.12. Análisis bioinformático de las secuencias	40
6.0 RESULTADOS	39
6.1. Identificación bacteriológica de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	41
6.2. Caracterización molecular por electroforesis en campos pulsados (PFGE) y su relación con la resistencia a los antibióticos	41
6.3. Detección, caracterización y clonación de β-Lactamasas adquiridas	44
6.4. Caracterización de integrones e identificación de transposones	47
6.5. Localización cromosomal o plasmídica de genes que codifican β-Lactamasas por hibridación tipo Southern	51
7.0. DISCUSIÓN	55
8.0 CONCLUSIONES	62
9.0. PERSPECTIVAS	63
10.0. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

Un mecanismo común de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* es la producción de β -Lactamasas, las cuáles muestran una afinidad diferente a sustratos, especialmente las, β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) "ESBL" y las metalo- β -lactamasas (MBLs).

La finalidad de este trabajo fue estudiar la presencia potencial de BLEEs y MBLs en 14 aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes al imipenem y ceftazidima, que fueron aislados en un Hospital de tercer nivel en México. Más del 70% de los aislados clínicos mostró un fenotipo de resistencia a casi todos los 21 antibióticos estudiados, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas.

El análisis de macrorestricción por electroforesis en campos pulsados, mostraron la presencia de cuatro patrones clonales. La clonación y los análisis por PCR y secuenciación revelaron la presencia de los genes: *bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11} y *bla*_{OXA-2}, así como las variantes: *bla*_{VIM-11b}, *bla*_{VIM11c} y *bla*_{VIM13b}. Interesantemente estos genes se encontraron solos o simultáneamente en cinco formas distintas: *<bla*_{GES-5}*>*, *< bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-11}*>*, *< bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{OXA-2}*>* y *< bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}, *bla*_{OXA-2}*>*. Además en seis aislados se detectaron integrones clase 1, dos de ellos portando los casetes: *bla*_{GES-5} o *bla*_{OXA-2}, pero en ninguno de ellos se asoció a *bla*_{VIM}. Los genes *bla*_{VIM} se localizaron solamente en el cromosoma bacteriano, mientras que *bla*_{GES-5} mostró una localización tanto cromosómica así como en plásmidos nativos.

Este trabajo describe por primera vez, cepas de *P. aeruginosa*, portadoras de *bla*_{GES-5} y/o de *bla*_{VIM-11}, en Centro y Norteamérica, además de la presencia simultánea de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{OXA-2}. Estos resultados destacan la amenaza creciente de la multirresistencia transferible en *P. aeruginosa*, la producción simultánea de múltiples β -Lactamasas de espectro extendido transferibles, incluyendo variantes diferentes de la misma familia, lo que representa un desafío en la detección oportuna en el laboratorio de microbiología clínica, además del riesgo epidemiológico notable de diseminación de determinantes de multirresistencia en los nosocomios.

ABSTRACT

A common mechanism of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactam antibiotics is the production of β -lactamases that show different substrate affinity, especially extended spectrum β -lactamases (ESBL) and metallo β -lactamase (MBL). The aim of this work was to study the potential presence of ESBL and MBL in 14 *P. aeruginosa* strains resistant to imipenem and ceftazidime, which were isolated in a hospital level third in Mexico. Over 70% of the isolates showed resistance to nearly all 21 antibiotics tested, including β -lactams, aminoglycosides, quinolones and tetracycline. A macrorestriction analysis by pulse field gel electrophoresis revealed the presence of four clonal types. Seven strains from different clonal types tested positive with the Etest MB. Cloning and analysis by PCR and sequencing, revealed the presence of *bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}, *bla*_{VIM-11b}, *bla*_{VIM-11c} and *bla*_{VIM-13b} and *bla*_{OXA-2}. Interestingly, all these genes were found alone or simultaneously in the *P. aeruginosa* strains in five different ways: *<bla*_{GES-5}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-11}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{OXA-2}*>* and *<bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}, *bla*_{OXA-2}*>*. In addition, in six strains class 1 integrons were detected, two of them harboring *bla*_{GES-5} or *bla*_{OXA-2} cassettes, but none of them contained *bla*_{VIM}. The *bla*_{VIM} genes occurred only in the chromosome, while *bla*_{GES-5} were located on the chromosome and native plasmids. This is the first report of clinical isolates of *P. aeruginosa* in North America carrying *bla*_{GES-5} and/or *bla*_{VIM-11}, in addition to the simultaneous presence of *bla*_{VIM-2} and the *bla*_{OXA-2}. These results highlight the growing threat of transferable multidrug resistance in *P. aeruginosa*. The simultaneous production of multiple broad spectrum transferable β -lactamases, including different variants from the same family, determine a mayor detection challenge for the clinical microbiology laboratory, and a remarkable epidemiological risk of nosocomial spread of multidrug resistance determinants.

Índice de figuras

Figura 1: Representación esquemática de la estructura común de un integrón clase I.	11
Figura 2: Secuencia del sitio <i>attI</i> de integrones clase 1.	13
Figura 3: Representación esquemática del sitio <i>attC</i> .	14
Figura 4: Esquema general de trabajo.	21
Figura 5: Análisis de las cepas resistentes al imipenem de <i>P. aeruginosa</i> por PFGE.	41
Figura 6: Alineamiento de una región de 168 aminoácidos de cuatro MBLs tipo VIM con siete cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	46
Figura 7: Representación esquemática de los integrones clase 1 identificados en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	48
Figura 8: Localización de genes <i>bla</i> _{VIM} y <i>bla</i> _{GES} en DNA total y DNA plasmídico de cepas de <i>P. aeruginosa</i> en estudio.	52
Figura 9: Presencia de copias de los genes y <i>bla</i> _{VIM} en el genoma de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> en estudio.	54

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR así como en la secuenciación.	29
Tabla 2. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas resistentes al imipenem.	43
Tabla 3. Resultados de la MIC en las clonas recombinantes: <i>E. coli</i> XL1-Blue portadora del plásmido recombinante pUCP204B y pUCPB203 y <i>P. aeruginosa</i> PA01 portadora de los plásmidos naturales de las clonas: 204PA, B203PA y 208PA, además de las cepas de referencia.	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1.1. Generalidades.

Pseudomonas aeruginosa, es la especie del género *Pseudomonas* más importante con respecto al número y tipo de infecciones causadas y a su asociación con la morbilidad y mortalidad (Kiska y Gilligan, 2003).

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza debido a su capacidad para sobrevivir y formar biocapas en ambientes acuosos y superficies húmedas. Los requerimientos nutricionales mínimos que presenta, así como la tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas contribuyen a la diversidad ecológica y a su papel como patógeno oportunista. Además, representa un problema en los hospitales al poderse encontrar en pomadas, jabones, fluidos biológicos, gotas para ojos, en tinas de hidroterapia y equipo de terapia respiratoria (Kiska y Gilligan, 2003). Aparte, el hecho de que *P. aeruginosa* presenta resistencia intrínseca y adquirida a diversos agentes químicos empleados en la formulación de medicamentos, antisépticos y desinfectantes refiere un panorama complicado en el control permitiendo la diseminación de este microorganismo entre los individuos, lo que lleva con frecuencia a la presencia de brotes epidémicos en los hospitales (Pollack y col., 2000; Aparicio, 2005).

Aproximadamente el 0.3% del genoma de *Pseudomonas* codifica para proteínas involucradas en la resistencia a antibióticos. El 10% del genoma se encuentra organizado en islas de patogenicidad, en las cuales se encuentran genes que codifican factores de virulencia e integrones (Stover y col., 2000).

1.1.2. Importancia clínica.

La infección por *Pseudomonas* en los tejidos sanos, no es frecuente; sino cuando las defensas del huésped están comprometidas esta bacteria puede infectar cualquier sitio anatómico, lo que explicaría el porque la mayoría de las infecciones son del tipo intrahospitalario (Obritsch y col., 2005).

P. aeruginosa se adapta bien al ambiente del tracto respiratorio de pacientes inmunosuprimidos con enfermedad broncopulmonar obstructiva crónica, neumonía nosocomial con ventilación asistida y fibrosis quística (Sadikot y col., 2005). La endocarditis es frecuente en enfermos con complicaciones tras cirugía abierta de corazón. El organismo se establece en el endocardio por la invasión directa a partir de la corriente sanguínea. También es causa de infecciones oculares altamente destructivas, originadas a partir de soluciones oftálmicas contaminadas o tras quemaduras faciales, causando una infección rápidamente destructiva, infecciones en el tracto urinario (Mesaros y col., 2007).

P. aeruginosa es la causa principal de infecciones nosocomiales en pacientes que se encuentran en la unidad de terapia intensiva, ya que permanecen en hospitalización por tiempos prolongados y reciben tratamientos con antibióticos de amplio espectro (Bertrand y col., 2001).

1.1.3. Patogénesis.

La forma en la cual *P. aeruginosa* causa daño es el resultado de la presentación y la expresión de moléculas que interaccionan de manera combinada en un hospedero susceptible. Los atributos de virulencia se asocian con la organización estructural, el metabolismo excretor de enzimas y toxinas que permiten la presentación de cuadros clínicos locales y sistémicos (Pollack y col., 2000; Kiska y Gilligan, 2003; Aparicio, 2005).

Un fenómeno adicional que se relaciona con la patogenicidad de *P. aeruginosa* es la resistencia adquirida que presenta frente a diversos antibióticos; y la cual se da como resultado de la adquisición de genes que confieren una resistencia variada a los antibióticos de elección utilizados contra esta bacteria. La forma en que desarrolla resistencia a diferentes agentes antimicrobianos es el resultado de cambios cromosomales o por el intercambio de material genético vía plásmidos, transposones e integrones (Gillings y col., 2008).

1.2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Los antibióticos más utilizados en la práctica médica para el tratamiento de infecciones ocasionadas por esta bacteria son β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Walsh, 2003).

P. aeruginosa presenta resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos debido a la baja permeabilidad de su membrana externa, la expresión constitutiva de varios sistemas de eflujo y a la producción de enzimas que inactivan antibióticos. Además de la capacidad de desarrollar o adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos (Mesaros y col., 2007).

Un cambio específico en el sitio blanco, cambios en la permeabilidad de la membrana por la acción de componentes estructurales, la activación de un sistema de expulsión o bomba de eflujo y la inactivación de un antibiótico por modificación a través de enzimas son considerados como los principales mecanismos por los cuales *P. aeruginosa* resiste la acción de agentes antimicrobianos (Lambert, 2002).

1.3. β -Lactamasas.

Las β -Lactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos β -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Este gran número de enzimas ha llevado a establecer diferentes clasificaciones atendiendo a diversas consideraciones. En la actualidad se sigue la clasificación establecida por Bush y colaboradores (1995).

La clasificación actual se basa en características funcionales de estas enzimas, hasta el momento se reconocen cerca de 200 variantes, las cuales conforman 4 grupos. Las β -Lactamasas de espectro extendido ([ESBLs] por sus siglas en inglés *Extended Spectrum β -Lactamases*) y que en español son: BLEEs del grupo 1 incluyen a todas las β -Lactamasas que hidrolizan cefalosporinas, no son inhibidas por el ácido clavulánico y están presentes en microorganismos Gram negativos, incluyendo a *P. aeruginosa*. El grupo 2 es el más numeroso y acoge a las β -Lactamasas inhibidas por el ácido clavulánico y que presentan un residuo de serina en su sitio activo, llamadas serín- β -Lactamasas. El grupo 3 está conformado por enzimas que requieren Zn^{2+} para su acción, por lo que se les refiere como metalo- β -Lactamasas, y no son inhibidas por el ácido clavulánico e hidrolizan carbapenemes. El grupo 4 reúne aquellas enzimas que no encajan en los grupos anteriores (Bush y col., 1995).

1.3.1. BLEEs (“ESBLs”).

La definición clásica de las ESBLs incluye solo las β -Lactamasas del grupo funcional 2be y la clase molecular A de Ambler, en las cuáles se encuentran las variantes derivadas de TEM-1, TEM-2, SHV-1 y K1 (KOXY) de *Klebsiella oxytoca*. La segunda definición es más amplia e incluye tanto a las β -Lactamasas clásicas como a los tipos: CTX, GES, VEB, AmpC, OXA (pero no carbapenemasas). Finalmente, la tercera

definición incluye a las ESBLs clase A; las misceláneas las cuáles han sido subdivididas en clase C que son mediadas por plásmidos; las de clase D y las CARB que son β -Lactamasas con actividad hidrolítica contra carbapenemes. Sin embargo, estas tres definiciones despiertan el debate sobre la pregunta de "¿Cuál de las enzimas del tipo AmpC-ESBLs, OXA-ESBLs, y/o carbapenemasas podrían ser incluidas en la categoría de ESBLs?" Por lo que la falta de una definición consenso para las ESBLs podría tener tres causas: dificultades en la detección de las ESBLs; fracaso en la terapia contra infecciones causadas por patógenos productores de ESBLs y favorecer la selección de cepas resistentes a los antibióticos utilizados contra las bacterias portadoras de ESBLs. Por lo tanto, es necesario el acuerdo general en la definición exacta de ESBLs (Lee y col., 2010).

Las carbapenemasas tipo GES se han localizado en diferentes especies bacterianas incluyendo *P. aeruginosa*, distribuidas a nivel mundial. GES-5 es responsable de la resistencia a β -lactámicos y se ha encontrado en integrones clase I (Wang y col., 2006).

1.3.2. Metallo- β -Lactamasas.

Las metallo- β -Lactamasas presentan un alto grado de hidrólisis hacia los carbapenemes y una actividad nula contra monobactames (aztreonam). A la fecha, en *P. aeruginosa*, se han demostrado ocho tipos diferentes: IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, SIM, KHM y DIM (Lee y col., 2005; Walsh y col., 2005; Gupta, 2008; Picão y col., 2008; Sekiguchi y col., 2008; Poirel y col., 2010).

Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran con frecuencia en el cromosoma bacteriano; sin embargo, se ha descrito la diseminación de genes que codifican metallo- β -Lactamasas a través de elementos genéticos como transposones, bacteriófagos, plásmidos e integrones (Ito y col., 1995; Iyobe y col., 1996; Toleman y col., 2004;

Poirel y col., 2006; Bing y col., 2007; Sacha y col., 2007; Sacha y col., 2008).

1.3.3. Epidemiología de las metalo- β -Lactamasas.

Las metalo- β -Lactamasas se han encontrado en enterobacterias, *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. principalmente (Livermore y col., 2001; Walsh y col., 2005).

En *K. pneumoniae* se han identificado los genes *bla*_{M β L}, en plásmidos conjugativos, lo que representa una fuente potencial de diseminación de la resistencia hacia carbapenemes en enterobacterias (Osano y col., 1994; Luzarro y col., 2004).

El primer hallazgo de genes que codificaban para metalo- β -Lactamasas fue descrito en *Aeromonas hydrophila* en Japón en la década de 1980, estas enzimas generaron resistencia a carbapenemes y los genes que las codifican se localizaron en el cromosoma bacteriano (Massidda y Rossolini 1991). En 1991 se detectó a IMP-1, la cual se encontró codificada en plásmidos de *P. aeruginosa* (Watanabe y col., 1991). Ya se han reportado cepas productoras de metalo- β -Lactamasas en otras partes del mundo como, Hong Kong (Chu y col., 2001), Taiwan (Yan y col., 2001) Europa (Toleman y col., 2003), América Latina incluyendo México (Costa y col., 2002; Garza y col., 2008) y Estados Unidos (Toleman y col., 2004).

La familia VIM fue reportada inicialmente en países de Europa, (Lauretti y col., 1999; Poirel y col., 2000) posteriormente se reportó en Asia (Yan y col., 2001), así como, en Estados Unidos (Lee y col., 2002; Iyobe y col., 1996). En América Latina se encontró *bla*_{VIM} en cepas de *P. aeruginosa* (Pasteran y col., 2005), recientemente se detectó en cepas de *A. hydrophila* en Hungría (Balázs y col., 2008).

La familia SPM fue identificada en *P. aeruginosa* aislada de un paciente pediátrico en el Instituto de Oncología en Brasil (Toleman y col., 2002).

Posteriormente se describió la diseminación de este tipo de enzimas en cuatro hospitales de zonas diferentes en ese país (Gales y col., 2003).

La familia de metalo- β -Lactamasas tipo GIM, fue detectada en Alemania (Castanheira y col., 2004).

La familia de metalo- β -Lactamasas SIM fue detectada en Brasil (Picão y col., 2008). Recientemente se reportó a AIM en Australia (Gupta, 2008) y a KHM en Japón (Sekiguchi y col., 2008), la DIM en la India (Poirel y col., 2010).

1.4. Elementos genéticos involucrados en la diseminación de genes de resistencia.

1.4.1 Plásmidos.

Son moléculas extracromosómicas de DNA circular de doble cadena, de 1 a 200 Kb, se replican independientemente del cromosoma bacteriano, pero dependen de las proteínas de su hospedero, tienen un origen de replicación (*ori*) (Craig y col., 2002).

Existen plásmidos conjugativos, que pueden ser transferidos por si mismos, presentan los genes *tra* que codifican para proteínas necesarias en el proceso de conjugación. Por otro lado, existen los plásmidos móviles que dependen de plásmidos conjugativos; requieren de plásmidos que si lo pueden hacer. Son de menor tamaño que los plásmidos transferibles, esto se debe a que solo necesitan de uno o dos genes *mob*, que codifican para proteínas de transferencia, es decir; toman ventaja de la maquinaria de transferencia dada por los otros plásmidos (Craig y col., 2002; Nosova y col., 2005; Sacha y col., 2007).

Los plásmidos movilizados por conjugación, pueden ser portadores de una amplia variedad de determinantes genéticos, como resistencia, energía, metabolismo, virulencia y diseminación, favoreciendo la sobrevivencia de la célula hospedadora en un ambiente adverso, proporcionándole una ventaja competitiva frente a otros microorganismos (Frost & Koraimann, 2009).

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

1.4.2 Transposones.

Los transposones son segmentos de DNA que pueden moverse en diferentes sitios del DNA dentro de la misma célula o incluso a otra célula, pudiendo llevar genes de resistencia a los antibióticos, y cuando se combinan con eventos de conjugación representan los principales vehículos diseminadores de dichos genes. Poseen al menos un gen que codifica para una transposasa, enzima que cataliza la reacción de transposición, flanqueados por secuencias de inserción, compuestas de 15 a 25 pb conocidas como repetidos invertidos (IR) (Lewin, 2008). El movimiento no es totalmente al azar, existen sitios preferentes en una molécula de DNA en la cual se insertará el elemento genético transponible. Su existencia fue propuesta por Mc Clintock (1951 a 1957) en el maíz, sin embargo, su existencia no se demostró hasta mucho más tarde en bacterias. Los transposones no se pueden auto-replicar, por lo que no existen de manera autónoma (a excepción algunos genes transponibles en los fagos) y por tanto, para ser replicados deben ser parte de algún otro replicón. El mecanismo de transposición es mediado por recombinación sitio-específica es decir; la transposición requiere poca o ninguna homología entre la localización actual y el nuevo sitio. En muchas instancias la transposición del elemento genético transponible resulta en la remoción del elemento de su sitio original y su inserción en un nuevo sitio. Sin embargo, en algunos casos el evento de

transposición se acompañan de una duplicación del elemento genético transponible. Una copia permanece en el sitio original y la otra se transpone en el nuevo sitio (Lewin, 2008).

Los transposones conjugativos son segmentos de DNA que se encuentran localizados normalmente en el cromosoma bacteriano, pero pueden abandonarlo y transferirse por ellos mismos de la célula donadora al cromosoma de la célula receptora, además ya se han descrito estos elementos genéticos en plásmidos (Salyers y col., 1995; Mullany y col., 2002).

Los pasos que involucran la transposición así como la transferencia son: la escisión y formación de un intermediario circular covalentemente cerrado, el cual puede integrarse en cualquier lugar dentro de la misma célula o transferirse e integrarse por sí mismo por conjugación a otra célula (Scott, 1992). El mecanismo de transposición de estos elementos genéticos es similar a los transposones no conjugativos en el sentido que ellos se cortan y luego se integran de un lugar del DNA a otro, dentro de los transposones más estudiados están Tn5 y Tn10 (Ahmed, 2009; Scott, 1992).

1.4.3 Integrones.

La fluidez del genoma así como los rearrreglos genéticos, permiten a las bacterias responder rápidamente a nuevas condiciones ambientales. La naturaleza dinámica de su genoma, puede ser atribuida a la capacidad de las bacterias de intercambiar información por sistemas de transferencia genética vía horizontal, como conjugación, transducción, transformación y a procesos de recombinación, que integran, eliminan o translocan genes. Un ejemplo del impacto de esos procesos es la diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Rosewarne y col., 2010).

Debido al avance tecnológico y a la aplicación de la biología molecular, se ha demostrado que algunos genes de resistencia a los antibióticos, en bacterias patógenas Gram negativas, se localizan en sitios genéticos los cuales presentan secuencias flanqueantes similares o idénticas, sugiriendo un mecanismo específico que puede favorecer la diseminación genética (Recchia y Sherratt, 2002).

Los integrones son unidades genéticas que se descubrieron en la década de 1980, cuando el estudio molecular de algunos genes de resistencia reveló la existencia de una secuencia común en la región 5' que contenía un promotor y un gen codificante de una integrasa, similar a la descrita en bacteriófagos, constatándose que estas secuencias formaban parte de una zona conservada (5') de una estructura genética, a la cual se le llamó integrón (In) (Stokes y col., 1989; Sabaté y Guillem 2002).

Los integrones son definidos como una unidad genética capaz de capturar genes, presentes en elementos llamados casetes, mediante un mecanismo de recombinación sitio específica (Hall y Collis 1995).

Un integrón está conformado por un gen *intI*, que codifica para una integrasa (Int) sitio específica de la familia de las tirosina recombinasas, un sitio adyacente de recombinación *attI*, en el cual los casetes son integrados, un promotor P_{int} , para la expresión de *int* y un promotor P_c , para la expresión de los genes que se encuentran en los casetes, ya que por lo general estos genes no tienen promotor (Recchia y Sherratt, 2002; Recchia y Hall., 1995) (Figura 1).

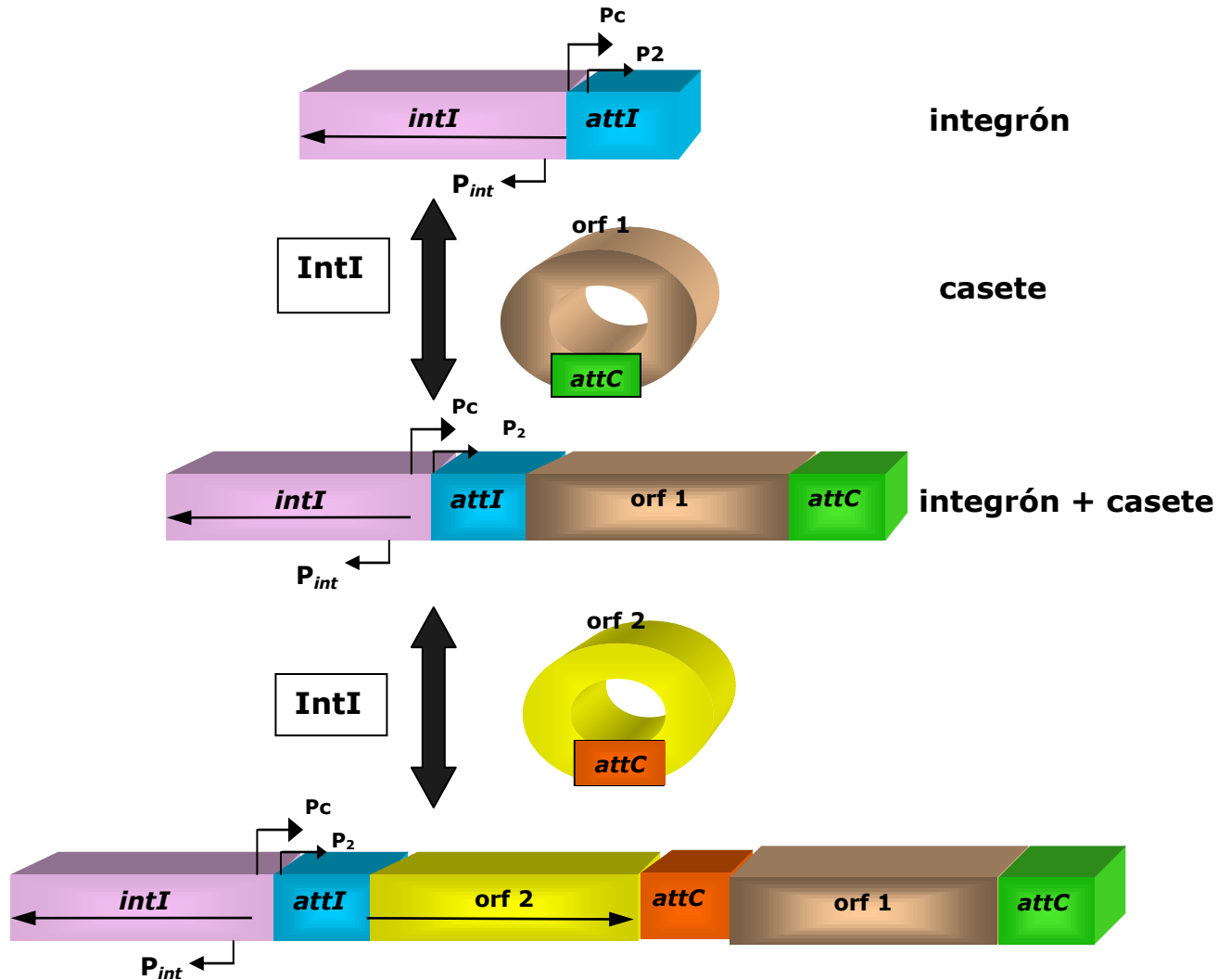


Figura 1: Representación esquemática de la estructura común de un integrón clase I. Está presente el gen *intI*, que codifica para la integrasa Int, la cual se transcribe a partir del promotor P_{int} . La recombinación sitio específica de los casetes se lleva a cabo entre los sitios *attC* y *attI*. Los genes en los casetes son transcritos a partir del promotor P_c . P_2 es un promotor más fuerte. (Adaptada de Davis y Waldor, 2002).

1.4.3.1. Casetes génicos.

Los casetes por lo general incluyen un solo gen y en la posición 3' presentan un sitio de recombinación específica, conocido como *attC*, o también denominada elemento de 59 bases, a través del cual se lleva a cabo el reconocimiento y movilización (Figura 1); en un integrón pueden

recombinarse varios casetes (Recchia y Sherratt, 2002; Fluit y Schmitz 2004).

Los casetes por lo general no presentan promotores y los genes presentes se transcriben utilizando el promotor del integrón, dando lugar a un RNA mensajero policistrónico, por lo que habrá una disminución de la transcripción en los genes más distantes al sitio promotor (Collis y Hall 1995). Pueden ser ensamblados en serie y estar sujetos a reacomodo o rearrreglo en un integrón o en un plásmido conjugativo, para posteriormente ser diseminados a través de las poblaciones bacterianas (Recchia y Sherratt, 2002).

Se han identificado más de 60 genes de resistencia asociados a casetes, dentro de los cuales destacan genes que codifican para la resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos, cloranfenicol, trimetoprim, eritromicina, una gran variedad de desinfectantes, antisépticos, etc., (Recchia y Sherratt, 2002; Bing y col., 2007; Pitout y col., 2007).

1.4.3.2 Sitio *att*.

El sitio de recombinación *attI1* del integrón clase 1, consiste de dos secuencias repetidas en donde se une la integrasa (Int) y dos sitios de unión adicionales llamados sitio fuerte y débil, DR1 y DR2 respectivamente. El sitio *attI1* está conformado por 65 pares de bases (figura 2), las cuales incluyen dos regiones correspondientes a los lugares de unión fuerte y débil de la integrasa, así como un lugar de recombinación, en el cual los genes capturados son integrados (Partridge y col., 2000; Mazel 2006).

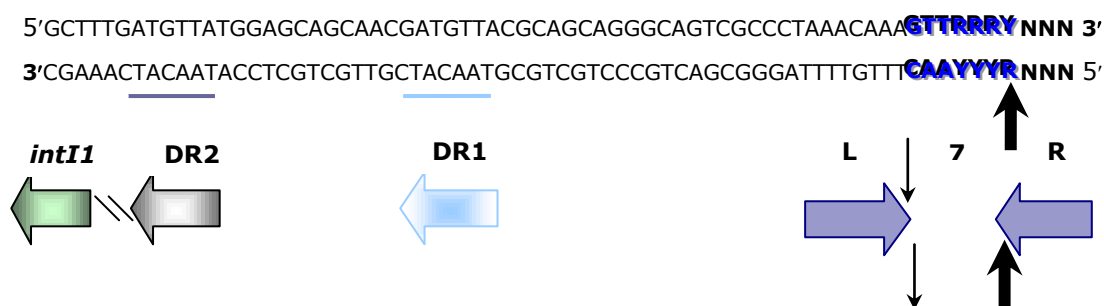


Figura 2: Secuencia del sitio *attI* de integrones clase 1. Se muestra en letras azules la secuencia conservada de 7pb, presentes en el sitio *core*. Las flechas negras intensas indican el sitio principal de recombinación, las flechas negras delgadas indican el segundo posible lugar de recombinación y de unión de la recombinasa. DR1 y DR2 son las regiones accesorias repetidas de los sitios de unión a recombinasas que contienen las secuencias consenso de unión a DNA. L y R representan los sitios de unión de la recombinasa en el sitio *core* de recombinación. Tomada de: may y col., 1995.

La región *attC*, es el sitio de recombinación que contienen los casetes encontrados en integrones de multirresistencia de clase 1, 2 y 3 (Hall y col., 1994). Se le ha referido históricamente como el elemento de 59 pares de bases, aunque exista una variación en longitud desde 57 a 141 pb (Figura 3). Esta región se encuentra formada por cuatro sitios principales llamados R', R'', L' y L''. Los sitios R' y R'' son parte de la secuencia consenso RH. Los sitios L' y L'' forman parte de la secuencia consenso LH (Hall y col., 1999).

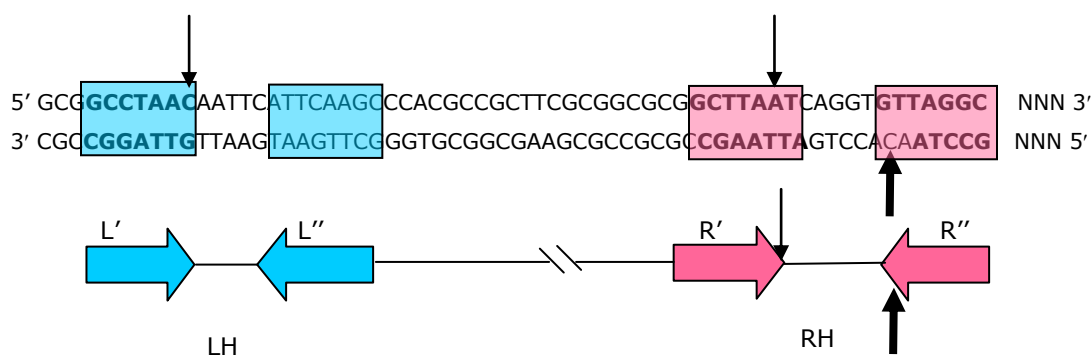


Figura 3. Representación esquemática del sitio *attC*. Las flechas negras gruesas indican la principal posición de recombinación. Las flechas negras delgadas indican la posición de recombinación alternativa. Los recuadros en azul y rosa representan las secuencias conservadas de 7pb de repetidos invertidos. Tomada de: may y col., 1995.

1.4.3.3 Integrasa.

La recombinación entre los sitios *attC* y *attI* es llevada a cabo por una integrasa (Int), la cual pertenece a la familia de las recombinasas, ya que presenta los dos motivos consenso RHRV encontrados en la integrasa del fago λ y en otras recombinasas (Nunes y col., 1998). Las integrasas de los integrones clase 1, 2 y 3 se denotan IntI 1-3. Mientras que la integrasa 4 se denota VchIntIA, puesto que se encontró en *Vibrio cholerae* (Rowe-Magnus y col., 2001).

1.4.3.4. Clasificación de los integrones.

Los integrones pueden ser divididos en dos grupos principales: los integrones de resistencia (IR) y superintegrones (SI). Los IR se encuentran habitualmente formando parte de transposones, plásmidos y/o en el cromosoma bacteriano; además de presentar una mayor proporción de genes de resistencia a antibióticos, mientras que los SI se localizan en el cromosoma de ciertas bacterias y contienen genes asociados a múltiples funciones adaptativas (Rowe-Magnus y Mazael 2002; Fluit y Schmitz 2004; Mazel 2006).

Se han descrito más de 30 SI, en los cromosomas de bacterias como *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*; al parecer son el origen de los IR (Rowe-Magnus y Mazael 2002).

La clasificación de los integrones (IR), se basa en la secuencia de la integrasa, las cuales presentan de un 48 a un 50% de identidad (Partridge y col., 2000). Se conocen nueve clases. Los integrones de las clases 1, 2 y 3 presentan casetes de resistencia a antibióticos (Diconza & Gutkind, 2010), los de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen casetes que no codifican para la resistencia a los antibióticos (Clark y col., 1995), el integrón de la clase 8 no presenta ningún casete (Nield y col., 2001); el de la clase 9 contiene un sólo casete de resistencia a antibióticos (Hochhut y col., 2001).

Los integrones de la clase 1 son los que se encuentran con mayor frecuencia en las cepas aisladas de casos clínicos. Se caracterizan por tener una secuencia conservada que tiene el gen codificante de la integrasa en el extremo 5' (5'-CS) y la gran mayoría presentan una secuencia conservada en el extremo 3' (3'-CS), además de presentar el gen que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio (*qacEΔ1*) y un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*). La longitud de la secuencia conservada (3'-CS) es variable, lo que se puede constatar en los integrones In1, In2, In3, In4, In5 e In0 (Hall y col., 1994; Toleman y col., 2007). Una gran variedad de integrones de la clase 1 se han localizado en elementos transponibles (Toleman y col., 2003).

Los integrones de la clase 2 presentan en el segmento conservado (5'-CS) una estructura similar a los integrones de la clase 1 y se encuentran en el transposon Tn7 (Radstrom y col., 1994) y en derivados de éste, tales como Tn1825, Tn1826 y Tn4132 (Tietze y col., 1987; Young y col., 1994).

Se han descrito integrones de la clase 3 en *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *P. putida* y *K. pneumoniae*, en Japón. La estructura de estos integrones es similar a la estructura de los integrones de la clase 2 (Arakawa y col., 1995; Senda y col., 1996).

Los integrones se han diseminado ampliamente entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (White y col., 2001), *V. cholerae* (Rowe-Magnus y col., 2001) y *P. aeruginosa* (Roser y col., 1999).

Los integrones identificados en diversos serotipos, son compatibles con la presencia de elementos genéticos diseminados mundialmente y además se asocian a fenotipos particulares de resistencia a antibióticos (Fluit, 2005).

La presencia de IR en plásmidos conjugativos y/o transposones diseminados mundialmente y descritos con anterioridad a la era antibiótica, podría explicar su rápida dispersión en las últimas décadas. De hecho, la baja diversidad y gran estabilidad temporal de la estructura de los integrones de clase 1 y 2 en aislados clínicos resistentes a antibióticos de las últimas dos décadas, apoyaría la hipótesis de episodios de selección de un pequeño número de unidades de captura génica ocurrida en el medio hospitalario como consecuencia del uso de antibióticos (Machado y col., 2005). Aunque no se pueda excluir que la adquisición de ciertos integrones proporcione ventajas adaptativas no relacionadas con la resistencia. No debemos perder de vista que también existe una gran heterogeneidad genética y genómica en los integrones, tanto en casetes correspondientes a un mismo gen (*bla*_{OXA-1-32}, *bla*_{IMP-1-13}, *aadA*₁₋₁₇ o *dfrA*₁₋₁₇) como en la organización de integrones que albergan casetes idénticos habiéndose descrito incluso la presencia de un mismo casete, *dfrA1*, en integrones de diferentes clases (Fluit y Schmitz 2004; Rowe-Magnus y Mazaël 2002; Toleman y col., 2003).

Además se han aislado integrones no asociados a la resistencia a antibióticos en zonas no sometidas a presión selectiva aparente (Michael y col., 2004; Nield y col., 2001).

Rowe-Magnus y colaboradores (2002), demostraron la presencia de integrones en microorganismos ancestrales de diferentes géneros, corroborando así que estos elementos móviles son estructuras antiguas que han ido evolucionando conjuntamente con el genoma bacteriano.

2.0. ANTECEDENTES

P. aeruginosa es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias cuyo tratamiento no resulta fácil por la creciente resistencia a los antibióticos de última opción terapéutica, como los carbapenemes. En el trabajo de tesis de maestría que realicé, se demostró el fenómeno de panresistencia así como la multiresistencia de un grupo de cepas de *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario, a antibióticos de diferentes familias, como β -lactámicos, incluyendo el imipenem, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas (Castillo y col., 2006). Además se reveló por métodos fenotípicos la expresión de MBLs y por PCR y secuenciación se obtuvo una región del gen *bla_{VIM}* en una de las cepas. La identificación cada vez más frecuente de genes de resistencia asociados con MBL, como causa de brotes de infecciones intrahospitalarias ocasionados por bacterias de origen clínico, se ha atribuido a la transferencia horizontal de información genética que codifica para la resistencia a antimicrobianos, entre los elementos genéticos involucrados en este proceso destacan los integrones.

3.0. JUSTIFICACIÓN

La diseminación de genes de resistencia a los antibióticos entre las bacterias, incluida *P. aeruginosa*, es un problema de salud pública muy serio. Los genes de resistencia están localizados en el cromosoma bacteriano o en elementos móviles como son los fagos, plásmidos y transposones, los cuales están involucrados en la transferencia horizontal de material genético entre diferentes especies bacterianas. En décadas recientes se ha descrito un sistema de captura de información genética que integra casetes de resistencia, llamado integrón. Esta unidad genética no es móvil por si misma y puede estar localizada en el cromosoma bacteriano, en plásmidos o en transposones por lo que su movilidad está asociada a plásmidos conjugativos que presentan un intervalo amplio de hospederos y a transposones que pueden transferirse entre las bacterias. La caracterización de los integrones en bacterias de origen hospitalario es una herramienta epidemiológica valiosa que permite entender la evolución y repercusión de los elementos genéticos asociados a la multirresistencia, así como la distribución de los casetes génicos de resistencia; así mismo la identificación de β -Lactamasas del los tipos: MBL y BLEEs que representan uno de los principales mecanismos de resistencia a antibióticos de última opción terapéutica en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa*, permitirá contribuir a establecer programas de control y manejo de antibióticos en los hospitales.

4.0. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Caracterizar β -Lactamasas e integrones en cepas de *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario que son resistentes al imipenem.

4.2. Objetivos particulares.

- Determinar la relación clonal de las cepas en estudio.
- Detectar por los métodos fenotípicos de sinergismo y punto isoeléctrico a las β -Lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y a las metalo β -Lactamasas (MBLs).
- Detectar y caracterizar por PCR, secuenciación y análisis bioinformático BLEEs, MBLs e integrones.
- Determinar la localización cromosomal o en plásmidos de BLEEs, MBLs e integrones.

5.0. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron procedimientos fenotípicos y genotípicos para caracterizar el mecanismo de resistencia mediado por β -Lactamasas en cepas de *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario. El esquema general de trabajo se presenta en la figura 4.

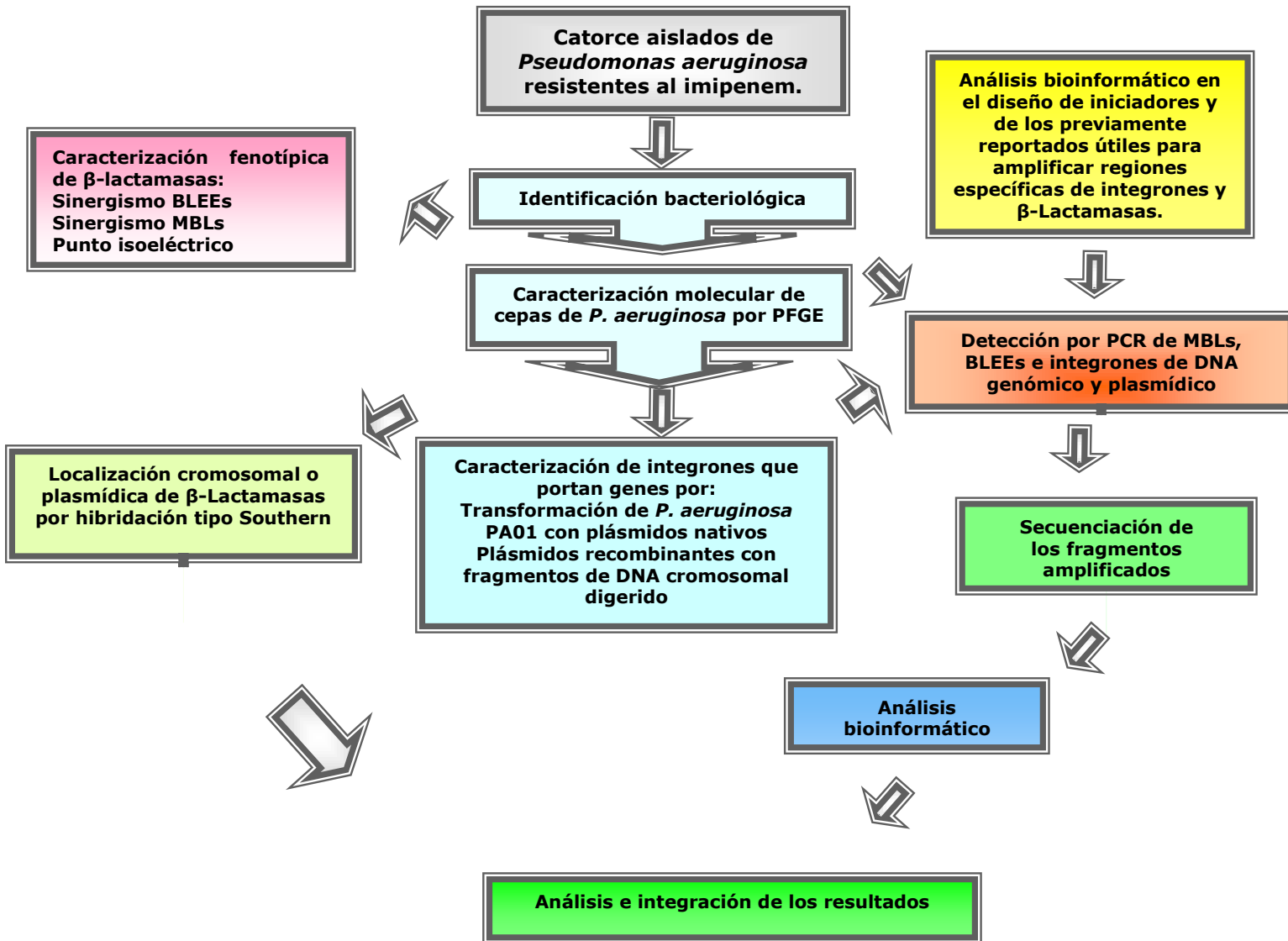


Figura 4. Esquema general de trabajo.

5.1. Material Biológico.

5.1.1. Aislados clínicos de *P. aeruginosa*.

Los 14 aislados clínicos de *P. aeruginosa* que se usaron en este estudio se seleccionaron con base en el fenotipo de resistencia al imipenem. Estos aislados provienen de una colección de 24 cepas, las cuales, fueron proporcionadas por la QBP Lourdes Osorio Carranza del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional la Raza del IMSS. Estos aislados clínicos se obtuvieron en el 2004 a partir de procesos diversos como causa de infección intrahospitalaria, y en un estudio previo de Castillo-Vera y colaboradores en el 2006, se demostraron perfiles variados de resistencia a 21 antibióticos (amikacina, azlocilina, aztreonam, carbenicilina, cefepime, cefoperazona, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriazone, ciprofloxacina, imipenem, levofloxacina, meropenem, mezlocilina, netilmicina, norfloxacina, ofloxacina, piperacilina, ticarcilina, ticarcilina/ácido-clavulánico y tobramicina), que representan diferentes familias de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

5.1.2. Cepas de referencia.

E. coli DH5 α , cuyas características genéticas son las siguientes: F⁻, ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK⁻, mK⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Md.) se utilizó en los experimentos de clonación

E. coli XL1Blue, con las siguientes características genéticas: *endA1* *gyrA96*(nal^R) *thi-1* *recA1* *relA1* *lac* *glnV44* F'[::Tn10 *proAB*⁺ *lacI*^q Δ (*lacZ*)M15] *hsdR17*(rK⁻ mK⁺) y resistente al ácido nalidíxico y tetraciclina, se utilizó en los experimentos de transformación y se extrajo de la colección de cepas del Laboratorio de Investigación del

Hospital Universitario Son Dureta, el cual está bajo la dirección del Dr. Antonio Oliver Palomo.

P. aeruginosa PAO1, presenta: 5,669 genes, su genoma tiene una longitud de 6,264,404 pb y un contenido GC de 66%, el cual codifica 5,566 proteínas y presenta 5 pseudogenes, no presenta elementos genéticos móviles, así como integrones. Esta cepa se utilizó en los experimentos de transformación y se extrajo de la colección de cepas del Laboratorio de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta, el cual está bajo la dirección del Dr. Antonio Oliver Palomo.

5.2. Identificación bacteriológica.

Los aislados clínicos fueron identificados por el sistema BBL Crystal[®] system (Becton, Dickinson and Company, USA), además se seleccionaron tres cepas al azar para confirmar la identificación a nivel molecular a partir de la secuenciación de la región 16S del rDNA (Castillo-Vera, 2006).

5.3. Caracterización molecular por electroforesis en campos pulsados (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* [PFGE]).

5.3.1. Extracción de DNA.

Se utilizó la técnica de PFGE descrita por Spencker y colaboradores en el 2000, para analizar la relación clonal de un grupo de cepas de *P. aeruginosa* resistentes al imipenem. Las bacterias se cultivaron en caldo Luria (LB) a 37°C toda la noche con agitación constante, posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 min, la pastilla se resuspendió en 500µl de solución PIV (Tris-HCL 1M, pH 8.0; NaCl 5M), luego se incubó durante 5 min a 13,000 rpm, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200µl de solución PIV, se tomaron 100µl de esta mezcla y se le añadieron 100µl de agarosa fundida al 1.5%, (previamente enfriada hasta 42°C aproximadamente),

luego se distribuyeron 20 μ l de esta última mezcla en contenedores de pozos, se dejó solidificar la agarosa durante 10 min aproximadamente. Con la finalidad de llevar a cabo la lisis celular, se introdujeron los bloques de agarosa en un tubo conteniendo 1 ml de solución de lisis ST (Tris-HCL 1M, pH 8.0; NaCl 5M; EDTA 0.5M, pH 8.0; Desoxicolato sódico 10%; Sarkosyl 10%; lisozima 50mg/ μ l) y se incubaron a 37°C durante 5h. Posteriormente se decantó la solución ST y se sustituyó por una solución ES (EDTA 0.5M, pH 8.0; Sarkosyl 10%; proteinasa-K 1mg/ml [recién preparada]). Se incubó durante 18h a 50°C. Se decantó la solución K y se añadieron 500 μ l de solución TE (Tris-HCL 1M, pH 7.5; EDTA 0.5M, pH 8.0).

5.3.2. Digestión enzimática y electroforesis en gel.

La digestión se realizó con la enzima de restricción SpeI, que es una enzima de baja frecuencia de corte. A los tubos conteniendo los posillos se les adicionó 40 μ l de la solución SR (2.5U de SpeI; amortiguador 1X; 0.4 μ l BSA). Se preparó un gel de agarosa al 1%, luego se colocaron los posillos en los carriles del gel, así como los controles de tamaño molecular correspondientes. Se realizó la separación del DNA en el equipo Chef-DRIII (Bio-Rad, la Jolla, CA), bajo condiciones de: 6v/ cm² por 26h y 5 pulsos de 40s. Los patrones de macrorrestricción del DNA se interpretaron bajo los criterios establecidos por Tenover y colaboradores (1995).

5.4. Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de difusión en agar utilizando discos de papel filtro (CLSI, 2005).

Este procedimiento se realizó previamente (Castillo-Vera, 2006), tanto para la cepa de referencia (control de calidad del procedimiento), como para las cepas intrahospitalarias, de acuerdo a las recomendaciones del

Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]).(CLSI, 2005b).

5.4.1. Control de Calidad.

El control de calidad de la prueba se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2005b), utilizando como microorganismo de referencia la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, la cual se empleó en cada experimento y siempre bajo las mismas condiciones de prueba. El procedimiento se consideró válido si la cepa de referencia proveía diámetros en los valores de susceptibilidad que estaban comprendidos dentro de los intervalos de referencia.

5.5. Detección y caracterización fenotípica de β -Lactamasas.

5.5.1. Prueba de sinergismo de metalo- β -lactamasas (MBLs).

Para cada aislamiento clínico cuya MIC para el imipenem fuera mayor a 8 μ g/ml, se inoculó una colonia aislada en un tubo con caldo Müeller-Hinton, se incubaron 3h a 37°C con agitación constante, hasta que apareció una leve turbiedad con el propósito de ajustar el inóculo de prueba, tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala del Nefelómetro de McFarland, igualando la turbidez de los tubos problema y del Nefelómetro sobre un fondo blanco bien iluminado que presentaba una línea negra gruesa. La siembra del inóculo se hizo en cajas con 20 mL de gelosa Müeller-Hinton con 4 mm de espesor conservadas a 4°C en bolsas de plástico y selladas para evitar la deshidratación, usando un hisopo que se sumergió en la suspensión bacteriana ajustada, quitando el exceso de inóculo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo por arriba del nivel del caldo. Cada caja se sembró en tres direcciones y a 60° para obtener una distribución uniforme sobre toda la superficie del agar. Las cajas inoculadas se dejaron reposar por

cinco minutos a temperatura ambiente para que se absorbiera el inóculo.

Se distribuyeron en cada placa tiras de Etest MBLs (AB Biodisk, Solna, Sweden), conteniendo imipenem/imipenem-EDTA (IP/IP). La presencia de MBL se consideró una prueba positiva con MIC para imipenem-EDTA, de al menos 3 concentraciones por debajo de la MIC para el imipenem.

5.5.2. Prueba de sinergismo de β -Lactamasas de espectro extendido (BLEEs).

Se realizaron ensayos de sinergia de doble disco con amoxicilina-clavulánico, para detectar la posible presencia de BLEEs (Jarlier y col., 1988), para lo cual se ajustó el inóculo de prueba tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala del Nefelómetro de McFarland, posteriormente se sembró en placas conteniendo gelosa Müeller-Hinton, usando un hisopo y eliminando el exceso de inóculo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo por arriba del nivel del caldo. Cada caja se sembró en tres direcciones y a 60° para obtener una distribución uniforme sobre toda la superficie del agar. Las cajas inoculadas se dejaron reposar por cinco minutos a temperatura ambiente para que se absorbiera el inóculo. Posteriormente se colocaron discos de amoxicilina-clavulánico y de una cefalosporina de tercera generación a una distancia de 10 y 20 mm centro a centro (Jarlier y col., 1988), la prueba se consideró positiva cuando se observó una reducción en los halos de inhibición entre los dos discos, comparada con los halos observados en los discos por separado.

5.6. Detección, caracterización y clonación de β -Lactamasas adquiridas.

5.6.1. Isoelectroenfoque (IEF).

Como parte de la caracterización de β -Lactamasas, se determinó el punto isoeléctrico por isoelectroenfoque (IEF) para una representante de cada grupo clonal encontrado por PFGE (tabla 2). Para ello se utilizó el método descrito por Matthew y colaboradores (1979), el cual consistió en cultivar las cepas en 5 ml de caldo LB con 10 μ g/ml de imipenem, durante 16 a 18 h a 37°C, posteriormente se centrifugó a 13,000 x *g* durante 2 min, luego se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de regulador de fosfatos (PBS) 1X pH 7.4. Posteriormente se sonicó en hielo dando dos ciclos de 15 pulsos cada uno hasta que el sobrenadante se aclaró y luego se centrifugó a 13,000 x *g* durante 30 min a 4°C. Una alícuota del sobrenadante y un marcador preteñido con pI de 4.45-9.6 (IEF Standards BIO-RAD) se corrieron en geles de poliacrilamida (PhastGel™ IEF 3-9 de Amersham Pharmacia Biotech AB) impregnados con anfólinas con rangos de pH 3-9, se corrieron en un aparato de (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden). Para determinar la actividad de β -Lactamasa de las proteínas se utilizó nitrocefina (500 μ g/ml) el cual al ser hidrolizado por β -Lactamasas dio una señal colorimétrica por lo que se adicionó sobre el gel de isoelectroenfoque (IEF). Se corrieron en paralelo extractos de las cepas control de la colección de cepas del Hospital Universitario Son Dureta (España) cuyos corrimientos correspondieron a: IES (pI 7.6), 12D (pI 6.0 y 8.6), 2D2 (pI 5.4 y 8.0), y g5 (pI 8.2).

5.7. Detección genotípica y clonación de β -Lactamasas adquiridas.

Se utilizaron iniciadores para detectar MBLs tipos: GIM, IMP, SIM, SPM y VIM; así como para detectar BLEEs tipo OXA y GES (tabla 1).

La PCR para todos los genes se llevó a cabo a partir de una mezcla de reacción de 25 μ l, en general:

Reactivo	volumen
DNA molde (100 ng)	1.0 μ l
Amortiguador para PCR 10X	2.5 μ l
MgCl₂ (50mM)	0.75 μ l
dNTPs (2.0mM)	2.5 μ l
Oligonucleótidos (30pmoles/μl)	0.5 μ l
Agua estéril tipo I	17 μ l
Taq polimerasa (5 Unidades/μl)	0.25 μ l
Volumen total	25 μ l

Las condiciones de reacción fueron una fase de desnaturalización de 7 min a 94°C durante un ciclo, 30 s a 94°C para desnaturalización, 58°C para alineamiento, 10 min a 72°C para extensión durante 30 ciclos de reacción y finalmente un ciclo a 72°C durante 7 min.

Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 voltios durante 1 h y se utilizó como marcador de tamaño molecular la escalera de 100 pb (Invitrogen).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR así como en la secuenciación.

Iniciador	Gen	Secuencia	Referencia
INT5/CSBH	<i>intI1</i> <i>tnpA</i>	AGCTAGATCCTTCTAGAAAACCGAGGA TGC	Yatsuyanagi y col., 2003
INT3/CSJY2ER	<i>qacEΔ1</i>	AGCTAAAATTGCGATGCCATAACCGATTATGAC	Yatsuyanagi y col., 2003
Int1R	<i>intI1</i>		Este estudio
IntF-F	<i>aacA4</i>	GTACTTGCCAAGCGTTTTA	Este estudio
IntR-F	<i>aacA41/</i> <i>bla_{OXA}</i>	CCTTTGCAAATAGCTCATAC	Este estudio
IntI2-L	<i>intI2</i>	GTACTTGCCAAGCGTTTTA	Ploy y col., 2000
IntI2R		CACGGATATGCGACAAAAGGT	
HS207	<i>IntI3</i>	GGAATTCCTGCATGAACAGGTATAACGG	Collis y col., 2002
HS208		CGGGACCCGCAGCCGGGCGACAAGGCA	
VIMB	<i>bla_{VIM}</i>	ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC	Poirel y col., 2002
VIMF		TGGGCCATTGAGCCAGATC	
VIM2-F	<i>bla_{VIM-2}</i>	ATGTTCAAACTTTTGAGTAAG	Gutiérrez y col., 2007
VIM2-R		CTACTCAACGACTGAGCG	
GES5inicF	<i>bla_{GES-5}</i>	CACTCTGCATATGCCTCGGA	Viedma y col., 2009
GESintR	<i>bla_{GES-5}</i>	GCCGTTGTATACACCGCTAC	
GIM	<i>bla_{GIM}</i>	AGAACCTTGACCGAACGCAG	Castanheria y col., 2004
		ACTCATGACTCCTCACGAGG	
IMP	<i>bla_{IMP}</i>	CTACGGCAGCAGAGTCTTTG	Senda y col., 1996
		AACCAGTTTTGCCTTACCAT	
SIM	<i>bla_{SIM}</i>	TACAAGGGATTCGGCATCG	Lee y col., 2005
		TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
SPM	<i>bla_{SPM}</i>	CCTACAATCTAACGGCGACC	Castanheria y col., 2004
		TCCGCCGTGTCCAGGTATAAC	

Los productos de PCR correspondientes a los genes *bla* se purificaron mediante el estuche de reactivos "Ultra Clean Gel Spin DNA Purification Kit®" de (Marligen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, al producto de PCR se le adicionaron 400 μ l de solución de unión H1, esta mezcla se colocó en el filtro y se centrifugó 10 s a 13,000 x *g*. El DNA se lavó con 300 μ l de "Gel wash amortiguador", en el filtro y se centrifugó 10 s a 13,000 x *g*, el filtro se transfirió a un tubo limpio y el DNA se recuperó con 50 μ l de H₂O a una temperatura de entre 65°C a 70°C para eluir el DNA pegado a la columna durante 1 min a 13,000 x *g*. El DNA obtenido se utilizó para la reacción de ligación, previa verificación por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Posteriormente, se utilizó el plásmido pGEM-T easy® de (Promega), como vector de clonación para insertar dichos fragmentos. Dentro de las características principales, se encuentra un sitio múltiple de clonación flanqueado por los promotores T7 y SP6 RNA polimerasa en una región donde se encuentra *lacZ*, contiene el gen de resistencia a ampicilina el cual es útil como marcador de selección.

Cada reacción de ligación se realizó de acuerdo a las instrucciones especificadas por el fabricante. Brevemente, se mezclaron suavemente los componentes de la reacción de ligación, contenidos en un volumen total de 10 μ l:

Reactivo	Volumen
Producto de PCR (100 ng/μl)	1 μ l
Amortiguador de ligación 2X	5 μ l
Enzima T4 ligasa (5u/μl)	1 μ l
Agua estéril tipo I	2 μ l
Vector (50 ng/μl)	1 μ l
Volumen final	10 μ l

Después de mezclar se incubó a temperatura ambiente toda la noche, posteriormente se llevó a cabo la transformación, la cual se realizó con células competentes de *E. coli* DH5 α más el producto de la ligación. Se colocaron 50 μ l de células competentes en un microtubo estéril y se adicionó el producto de la ligación, se agitó suavemente y se dejó reposar en hielo durante 30 min. Las células se colocaron en un baño a 42°C durante 90 s, sin agitación e inmediatamente después se transfirieron a un baño de hielo durante 1 min. Se le adicionó al tubo 500 μ l caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 45 min con agitación de 100 rpm. Se inocularon 50 μ l de la suspensión bacteriana en placas de agar LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml, IPTG 100 mM y X-Gal 40mg/ml, para poner de manifiesto las colonias transformadas que llevan el fragmento clonado de las que no lo llevan, se incubaron las placas 37°C durante 24 h. Las colonias blancas obtenidas se pasaron con un palillo estéril a un tubo con 3 ml de medio LB que contenía ampicilina 100 μ g/ml, y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación de 100 rpm.

Se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico de las clonas obtenidas, utilizando el kit *Wizard*[®] plus SV Minipreps DNA Purification System, para lo cual a partir de un cultivo de toda la noche de una colonia aislada de *E. coli* DH5 α recombinante, se centrifugó durante 5 min a 13,000 x *g*, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 250 μ l de solución de resuspensión (glucosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM pH 8.0). Posteriormente, se adicionaron 250 μ l de solución de lisis (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se invirtieron las muestras cuatro veces y luego se adicionó 10 μ l de proteinasa alcalina, se invirtieron las muestras cuatro veces y se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente. La precipitación del DNA plasmídico y

proteínas se efectuó adicionando 350 μ l de solución de neutralización, se invirtieron cuatro veces las muestras y el precipitado se centrifugó a 13,000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, se insertó la columna en el tubo, se tomaron 700 μ l del lisado y se depositaron en una columna, luego se centrifugó a 13,000 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante, se adicionó al mismo tubo 750 μ l de solución de lavado y se centrifugó durante 15 s a 13,000 x g , se adicionaron 250 μ l de solución de lavado y se centrifugó 30 s a 13,000 x g , posteriormente se transfirió la columna a un tubo y se adicionaron 50 μ l de agua libre de nucleasas, se centrifugó a 13,000 x g durante 1 min. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 90 Voltios durante 1 h, se utilizó como marcador de tamaño molecular las escaleras de 100 y 1 Kpb de Invitrogen.

5.8. Detección y clonación de integrones.

Se llevaron a cabo ensayos de clonación utilizando la cepa *E. coli* XL1-Blue mediante el método de CaCl_2 (Sambrook, 2001), para lo cual se incluyó al azar una clona representante de cada grupo encontrados por PFGE, debido a que en el ensayo de IEF no se observaron bandas con un pI correspondiente con el pI de las β -Lactamasas reportadas en la literatura pero cuya presencia se había detectado previamente en nuestras cepas por PCR, se procedió a su clonación. Para lo cual se clonó en *E. coli* XL1-Blue el producto de la ligación de pUCP24 (EcoRI, BamHI) con el DNA total de las clonas, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Dentro de las características principales de pUCP24, se encuentra un sitio múltiple de clonación flanqueado por los promotores T7 y SP6 RNA polimerasa en una región donde se encuentra *lacZ*, contiene el gen de resistencia a ampicilina el cual fue útil como marcador de selección, tiene un tamaño de 4,036 pb. Los transformantes fueron seleccionados

en placas de agar LB con una concentración de: gentamicina 5µg/ml y ampicilina 30µg/ml. Como comprobación de los transformantes se llevó a cabo un test de sinergia de doble disco, Etest MBLs, ESBLs y la batería de Etest (AB Biodisk) para: piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacina y colistina. Los fragmentos clonados fueron secuenciados directamente a partir del DNA plasmídico [Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep and Microcentrifuge kit (Quiagen)].

5.8.1 Caracterización de integrones e identificación de transposones.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar los genes *intI1*, *intI2*, *intI3*, casetes génicos y *tnpA*, mediante PCR, se pueden apreciar en la tabla 1. Los iniciadores que se diseñaron en este estudio se hicieron, con base en un análisis de las secuencias reportadas en el GenBank, las secuencias de los oligonucleótidos se analizaron y se diseñaron con los programas Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi); CLUSTALX versión 1.8 y blast (www.ncbi.nih.gov/blast) previamente al análisis. Las condiciones de reacción se establecieron específicamente para la amplificación de cada región génica.

Las condiciones de reacción fueron: una fase de desnaturalización de 5 min a 94°C, 30 ciclos de reacción con 30 s a 94°C para desnaturalización, 1 min a las diferentes temperaturas 45, 45.2, 45.9, 46, 48.2, 49.4, 50.6, 51.8, 53, 54, 54.7 y 55°C para alineamiento 1 min a 72°C para extensión y finalmente un ciclo a 72°C durante 6 min.

A partir de los fragmentos de DNA obtenidos y secuenciados, se diseñaron otros oligonucleótidos para realizar una secuenciación en avanzada y de esta forma obtener el arreglo de integrones.

5.9. Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Para la secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos mediante la PCR y/o los plásmidos recombinantes se utilizó el servicio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, a cargo de la Dra. Laura Ongay, así como el servicio de secuenciación del Hospital Universitario Son Dureta con un equipo automatizado ABIPRISM 3100® de Applied Biosystems ® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

5.10. Electroporación y análisis de transformantes.

5.10.1 Electroporación de plásmidos nativos.

Para determinar la presencia de integrones en plásmidos nativos y analizar el patrón de resistencia transferido, se llevó a cabo la transformación del DNA plasmídico de las cepas en estudio de *P. aeruginosa*, las cuáles presentaban plásmidos nativos, en *P. aeruginosa* PA01; mediante la técnica de electroporación (Smith y Iglewski, 1989). Primero se llevó a cabo la extracción de los plásmidos nativos mediante el kit [Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche Diagnostics)], de la siguiente manera: una colonia aislada de cada una de las cepas intrahospitalarias de *P. aeruginosa*, crecidas previamente en agar LB, se transfirieron a caldo LB, luego se incubaron en agitación constante a 37 °C toda la noche. Al siguiente día se añadieron 24 ml de amortiguador de suspensión y se mezcló, posteriormente se centrifugaron 3.000 x *g* durante 10 min; pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y se añadieron 24 ml de amortiguador de lisis y se invirtieron de 5 a 6 veces, luego se incubaron 3 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 24 ml de amortiguador de neutralización frío y se invirtió 4 veces, luego se incubaron 5 min en hielo. Pasado este tiempo se centrífugo 1,500 x *g* durante 30s. Se adicionó el sobrenadante a la columna al mismo tiempo que se adicionaron 6ml de amortiguador de equilibrio. Una vez que se filtro toda el sobrenadante, se adicionaron 12

ml de amortiguador de lavado. Posteriormente se transfirió la columna a un tubo nuevo y se adicionaron 7 ml de amortiguador de elusión. Posteriormente se adicionaron otros 7 ml de amortiguador de elusión. Luego se adicionaron 10 ml de isopropanol y se centrifugó 1,500 x g durante 10 min. Finalmente a la pastilla se le adicionaron 500 µl de H₂O.

La electroporación se llevó a cabo de la siguiente manera: a partir de un inóculo crecido a 37°C durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 en medio fresco y se incubó el cultivo hasta una densidad óptica de 0.8. Posteriormente las células se centrifugaron 3,000 x g, 10 min, pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de agua destilada estéril. Posteriormente, se transfirieron 100 µl a un microtubo nuevo y se añadieron 1.5 µl de pUC24 y 5 µl de los plásmidos nativos de cada una de las cepas intrahospitalarias de *P. aeruginosa*. Luego se incubaron las células 5 min en hielo. La mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 1 mm de separación entre los electrodos y se mantuvo durante unos minutos en hielo.

La electroporación se llevó a cabo en un equipo Bio-Rad: Cubetas Gene Pulser® Cuvette, Gene Pulsr Xcel™ electroporation System). Una vez realizada la descarga, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC (LB; Glucosa 1M), se pasaron a un tubo de 10 ml y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, con una agitación de 200 rpm.

5.10.2. Análisis de transformantes resistentes.

Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar LB con una concentración de ceftazidima 16µg/ml. El análisis de la resistencia transferida en las clonas transformantes se realizó por el método de Etest (AB Biodisk) para piperaciclina, piperaciclina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina y ciprofloxacina, considerando los valores de

corte, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, así como el Etest MBLs y un test de sinergia de doble disco para detectar la presencia de BLEEs.

5.11. Localización cromosomal o plasmídica de β -Lactamasas por hibridación tipo Southern.

Para realizar la hibridación tipo Southern se utilizó el kit comercial "Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems" (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.11.1. Digestión enzimática.

Primero se hizo una digestión enzimática del DNA total de las cepas de *P. aeruginosa* con EcoRI y SalI. A continuación se muestra las mezclas de reacción que se llevaron a cabo.

Reactivo	Volumen
Regulador 10X ("React" 3)	10.0 μ l
EcoRI (5 U)	5.0 μ l
BSA (0.1 mg/ml)	10.0 μ l
DNA (5 μg)	50 μ l
Agua estéril tipo I	25.0 μ l
Volumen final	100.0 μ l

Reactivo	Volumen
Regulador 10X ("React" 10)	10.0 μ l
SalI (5 U)	5.0 μ l
BSA (0.1 mg/ml)	10.0 μ l
DNA (5 μg)	50 μ l
Agua estéril tipo I	25.0 μ l
Volumen final	100.0 μ l

Después de mezclar se incubó durante 12 h a 37°C.

5.11.2. Electroforesis y Transferencia.

Se sometieron las digestiones a una electroforesis en geles de agarosa al 1% a 80 voltios durante 6 h; utilizando el marcador de tamaño molecular del fago λ digerido con PstI (2-23.3 kpb), el cual se colocó en los extremos del gel.

Una vez terminada la electroforesis en gel, se tomó una fotografía en el documentador de geles "Gel Documenttion System" BioSens SC 645 (Shanghai Bio-Tech Co., Ltd.), se recortó para quitar el exceso de agarosa y se marcó la esquina superior izquierda indicando el primer carril. Se colocó el gel en recipiente con una solución (HCL 250mM) durante 10 min con agitación intermitente. Luego se enjuagó con agua desionizada, se cubrió con regulador alcalino (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M) y se agitó por 25 min, posteriormente se enjuagó con agua desionizada, finalmente se cubrió con regulador neutro (NaCl 1.5M, Tris-HCl 0.5M a pH 7.5) y se agitó durante 30 min. Posteriormente se desechó la solución y se reemplazó con regulador neutro nuevo, se continuó con la agitación por 15 min más.

Posteriormente se cortaron tres hojas de papel Whatman 3MM y una hoja de nailon Hybond ECL, de las mismas dimensiones del gel. Las cuales se saturó con regulador 20X SSC ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 0.3M, NaCl 3M a pH de 7.0), durante 10 min. Se transfirió el DNA localizado en el gel a la membrana con una solución de transferencia, para lo cual se colocaron en el siguiente orden: sobre el soporte se colocó el gel con la marca que previamente se hizo del lado izquierdo hacia arriba, encima se colocó la membrana, cuidando de eliminar todas las burbujas que se pudieran formar; posteriormente se colocaron las tres hojas de papel

Whatman 3MM, luego una torre de 7 cm de toallas de papel absorbente, finalmente se colocó un peso de aproximadamente 750 g. Se saturó el sistema con regulador 20X SSC ($\text{Na}_3\text{citrato}$ 0.3M, NaCl 3M a pH de 7.0) por toda la noche.

Al siguiente día se desmontó el sistema y se marcó la membrana con un lápiz, de manera que se pueda identificar la cara de la membrana en la que está el DNA, posteriormente se fijó la membrana por la cara donde estaba el DNA con luz UV durante 1 min.

5.11.3. Marcaje de la sonda.

Brevemente, se utilizó como sonda un producto de amplificación obtenido por PCR de uno de los aislados clínicos en estudio (203) y se secuenció, comprobándose su identidad como *bla*_{VIM-11}.

Se hizo una dilución del DNA a ser marcado a una concentración de 10ng/ μl , usando agua, luego se desnaturalizaron 100ng del DNA (10 μl), calentándolo durante 5 min en un baño de agua hirviendo, inmediatamente se transfirió el DNA a hielo por 5 min. Posteriormente se le dio un pulso breve en una centrífuga para colectar el botón del tubo. Luego se adicionó un volumen equivalente del reactivo de marcaje (10 μl) al DNA en hielo. Se mezcló y se homogeneizó suavemente. Posteriormente se adicionó la solución de glutaraldehído, usando un volumen equivalente al volumen del reactivo de marcaje (10 μl). Se homogeneizó. Luego se centrifugó brevemente para colectar el contenido en el fondo del tubo.

5.11.4. Hibridación y condiciones de estrictez.

Se preparó el regulador como sigue: a temperatura ambiente se tomaron 0.125 ml/cm² del amortiguador de hibridación por cm² de membrana de nitrocelulosa. Se adicionó NaCl 0.5M grado analítico y agente de bloqueo a una concentración final de 5% (w/v).

Inmediatamente se homogeneizó para obtener al agente de bloqueo en una suspensión libre.

Se continuó mezclando a temperatura ambiente en un agitador magnético durante 1 h, luego se calentó a 42°C durante 1 h mezclando en un agitador magnético.

Posteriormente se calentó un volumen suficiente de regulador de hibridación a 42°C, luego se colocó la membrana de nitrocelulosa en botellas de hibridación, posteriormente se adicionó el regulador de hibridación teniendo cuidado de mantener una circulación adecuada y evitando la formación de burbujas de aire entre la membrana y la botella. Se pre hibridó por 1h a 42°C en el horno de hibridación.

Al final del periodo de incubación se adicionó la sonda marcada al amortiguador de hibridación y se continuó la incubación con agitación suave toda la noche a 42°C.

Al siguiente día se preparó el regulador primario de lavado (urea 6 M, SDS 0.4% 20X SSC 0.5mM) y se calentó a 42°C. Este se usó en un volumen de aproximadamente 2 a 5 ml/cm² de membrana. Se transfirió cuidadosamente la membrana a un recipiente y se adicionó el amortiguador primario se lavó por 20 min con agitación suave, asegurando que la temperatura no excediera los 42°C. Posteriormente, se descartó el regulador y se reemplazó con regulador nuevo y se lavó por 20 min a 42°C. Transcurrido este tiempo se adicionó un exceso de regulador secundario y se incubó con agitación suave durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó este regulador y se reemplazó por uno nuevo, se continuó con una agitación suave durante 5 min a temperatura ambiente.

5.11.5 Generación de la señal y detección.

Se mezcló un volumen igual del reactivo de detección 1 con un volumen igual del reactivo de detección 2 para lograr un volumen de 0.125ml/cm² de membrana. Luego se drenó el exceso de regulador secundario de la membrana y colocó en un contenedor limpio, se adicionó el reactivo de detección directamente a la membrana en la parte donde se ubica el DNA, evitando que se secase la membrana y se dejó por 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se drenó el exceso del reactivo de detección y se cubrió con papel SaraWrap® y se eliminaron todas las burbujas de aire.

En un cuarto oscuro, usando una luz roja. Se colocó una hoja de la película autoradiográfica (Hyperfilm ECL) sobre la membrana en la cual está expuesto el DNA. Se cerró el casete y se expuso por 1 min. Finalmente se removió la película y se reveló para lo cual se colocó la película autoradiográfica en un recipiente con 500ml de solución reveladora, el tiempo necesario hasta que se logro observar un bandeo, inmediatamente se sumergió en otro recipiente con 500ml de solución fijadora, luego se le hizo un lavado con agua destilada y finalmente se puso a secar.

5.12. Análisis bioinformático de las secuencias.

Cada una de las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GeneBank y mediante el programa bioinformático Blast ("*Basic Local Alignment and Search Tool*"), disponible en la página principal del NCBI ("*Nacional Center for Biotechnology Information*" de EE.UU) para corroborar la identidad de las mismas. Posteriormente se compararon con el programa BioEdit Séquense Aligment Editor ©.

6.0 RESULTADOS.

6.1. Identificación bacteriológica de los aislados clínicos de *P. aeruginosa*.

La identificación bioquímica y molecular a nivel de especie, mostró que los 14 aislados clínicos correspondieron a *P. aeruginosa* por lo que se incluyeron en las pruebas de resistencia a los antibióticos y se consideró idóneo para establecer la relación de epidemiología molecular entre ellas.

6.2. Caracterización molecular por electroforesis en campos pulsados (PFGE) y su relación con la resistencia a los antibióticos.

Los ensayos de PFGE permitieron agrupar a los 14 aislados clínicos multirresistentes en cuatro patrones clonales. En el patrón A, se incluyeron seis cepas, tres de las cuales fueron agrupadas en el patrón A (201, 201a y 211), una en un subtipo del patrón A, denominado como A1 (173) y dos en el subtipo A2 (207 y 212); el patrón B lo integraron los aislamientos 203, B203 y 215; así como el subtipo B1 con el aislamiento 204. El patrón C por 206 y 210; mientras que el subtipo C1 por 214. El patrón D fue único, ubicándose el aislamiento 208. (Figura 5).

Los 14 aislados clínicos presentaron perfiles de resistencia que variaron de 5 a 21 antibióticos probados. Los aislados clínicos que presentaron el mismo perfil de resistencia a los 21 antibióticos se distribuyeron en los patrones clonales A, B y C, mientras que los dos aislados resistentes a 20 antibióticos correspondieron a los tipos B y D. Los tres aislados resistentes a cinco y seis antibióticos se agruparon en A y C. Las pruebas de detección fenotípica de β -Lactamasas mostraron actividad BLEE, por la prueba de sinergia de doble disco, sólo en las cepas

B203(B), 204(B1) y 208(D); mientras que la actividad de MBL, por el método de Etest, se observó en las 14 cepas (Tabla 2).



Figura 5. Análisis de las cepas resistentes al imipenem de *P. aeruginosa* por PFGE. Se observan los diferentes patrones clonales y las cepas en estudio correspondientes. Líneas 1: (A1)173; 2: (A)201; 3: (A)201^a; 4: (B)203; 5: (B)B203; 6: (C)206; 7: (A2)207; 8: (C)210; 9: (A)211; 10: (A2)212; 11: (C1)214; 12: (B)215; 13: (B1)204; 14: (D)208; 15: cepa de *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla 2. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas resistentes al imipenem

CEPA (PFGE PATRÓN)	PERFIL DE RESISTENCIA	TOTAL DE ANTIBIÓTI COS RESISTENTES	BLEE FENOTIPO	BLEE GENOTIPO	MBL FENOTIPO	PI*	MBL GENOTIPO
201(A)			-	GES-5	+	N.A.	N.D.
201 ^a (A)	AMK, AZL, AZT,		-	GES-5	+	N.A.	VIM-11
211(A)	CAR, CAZ, CEF,	21/21	-	GES-5	+	N.A.	VIM-2 VIM-11
207(A2)	CIP, CTX, CTZ,		-	GES-5 OXA-2	+	N.A.	N.D.
212(A2)	FEP, IMP, LEV,		-	GES-5 OXA-2	+	5.8 y 8.2	VIM-2 VIM-11b
203(B)	MER, MEZ, NET,		-	GES-5	+	N.A.	VIM-11
B203(B)	NOR, OFX, PIP,		+	GES-5	+	N.A.	VIM-11 VIM-11c VIM-13b
215(B)	TIC, TIC/CLAV		-	GES-5	+	N.A.	VIM-11
210(C)	Y TOB		-	GES-5	+	N.A.	N.D.
204(B1)	AMK, AZL, CAR,		+	GES-5 OXA-2	+	5.8	N.D.
208(D)	CAZ, CEF, CIP, CTX, CTZ, FEP, IMP, LEV, MER, MEZ, NET, NOR, OFX, PIP, TIC, TIC/CLAV Y TOB	20/21	+	GES-5 OXA-2	+	8.2	VIM-2 VIM-11 VIM-11b
214(C1)	AMK, CTX, CTZ, IMP, NET, OFX	6/21	-	N.D.	+	N.A.	N.D.
173(A1)	CEF, CTX, IMP, NET, TOB	5/21	-	N.D.	+	N.A.	N.D.
206(C)	CEF, CTX, IMP, NET, TOB	5/21	-	N.D.	+	-	N.D.

AMK, AMIKACINA; AZL, AZLOCILINA; AZT, AZTREONAM; CAR, CARBENICILINA; CAZ, CEFTAZIDIMA; CEF, CEFOPERAZONE; CIP, CIPROFLOXACINA; CTX, CEFTIZOXIMA; CTZ, CEFRIAXONA; FEP, CEFEPIME; IMP, IMIPENEM; LEV, LEVOFLOXACINA; MER, MEROPENEM; MEZ, MEZLOCILINA; NET, NETILMICINA; NOR, NORFLOXACINO; OFX, OFLOXACINA; PIP, PIPERACILINA; TIC, TICARCILINA; TIC, TICARCILINA-CLAVULÁNICO; TOB, TOBRAMICINA. Se resaltan las cepas representantes de cada uno de los cuatro grupos clonales. *De acuerdo a los controles, PI 5.8 corresponde a GES-5; PI 8.2 A OXA-2; Ninguno de los clones presentaron la banda correspondiente a MBL_S. N.A. no analizada.

6.3. Detección, caracterización y clonación de β -Lactamasas adquiridas.

Debido a que la literatura establece que la resistencia a los β -Lactámicos en el caso de *P. aeruginosa* puede estar dado por tres mecanismos, siendo la producción de β -Lactamasas el mecanismo de mayor frecuencia, se realizaron experimentos para detectar y caracterizar estas enzimas (Livermore, 2001).

Para realizar la caracterización de β -Lactamasas, se seleccionaron las clonas 212(A), 204(B), 206(C) y 208(D) que correspondieron a cada uno de los tipos clonales diferentes encontrados por PFGE. Mediante la técnica de IEF se encontraron dos bandas con un pI de 5.8 y de 8.2, que por comparación con las cepas control correspondieron con β -Lactamasas de los tipos GES-5 y OXA-2 respectivamente. La cepa 212(A2) presentó ambas bandas, mientras que 204(B1) y 208(D) mostraron una con un pI de 5.8 y de 8.2 respectivamente (tabla 2).

Al no observar un pI correspondiente a MBLs, debido a la mala hidrólisis de estas enzimas a la nitrocefina y tener una prueba fenotípica positiva para MBL, se decidió llevar a cabo la amplificación de genes MBL por PCR (Tabla 1), resultando sólo positivo para MBL tipo VIM en las clonas: 212 (A2) y 208 (D) de las cuatro cepas seleccionadas. Posteriormente y con el propósito de identificar dicho gen se incluyeron las diez aislados clínicos restantes. Los resultados de PCR mostraron el amplificado de \sim 500 bp en las clonas: 201a(A), 211(A), 212(A2), 203(B), B203(B), 215(B) y 208(D).

Todos los amplificados obtenidos fueron estudiados por secuenciación, observando que las secuencias generadas, para algunas cepas resultaron limpias, mientras que para otros casos se observaron translapadas. Por lo anterior, se decidió clonar estos productos para su posterior resecuenciación, seleccionando al menos dos clonas

recombinantes por cepa. Cada fragmento amplificado se secuenció directamente, así como de las clonas recombinantes de *E. coli*. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GeneBank y mediante el programa bioinformático Blast ("*Basic Local Alignment and Search Tool*"), disponible en la página principal del NCBI ("*Nacional Center for Biotechnology Information*" de EE.UU), se demostró la presencia de un fragmento de los genes de las MBL *bla*_{VIM-2} y *bla*_{VIM-11}. En las cepas en las que se había observado el traslape, se analizaron varias secuencias de las clonas recombinantes (Tabla 2).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se tradujeron a un lenguaje de aminoácidos con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor ©. Cuando se compararon las secuencias con respecto a la MBL tipo VIM-2, revelaron la presencia de los subtipos VIM-2 y VIM-11 previamente reportados. Tomando como referencia la secuencia de VIM-2, se encontraron cambios adicionales a las secuencias de las VIM depositadas en GenBank y en la base de datos de Lahey, los cambios observados fueron los siguientes: a) N148S la cual designamos como VIM-11b; b) N148S más S161G, designada como VIM-11c; c) En la cepa B203 el análisis de una clona recombinante mostró una secuencia muy relacionada con VIM-13, la cual mostró todos los cambios reportados cuando ésta es comparada con VIM-2, excepto I200V que en nuestra secuencia resultó I200A, la cual denominamos VIM-13b (Figura 6). Estos cambios sugieren la presencia de otras variantes de VIM en nuestras cepas en estudio; sin embargo, para tener la certeza de que se trata de nuevas VIM se requiere la obtención de las secuencias completas de los genes. Sin embargo, con base en estos resultados y de ser ciertos, podríamos sugerir que algunas cepas mostraron uno, dos y hasta tres subtipos VIM simultáneamente (Tabla 2).

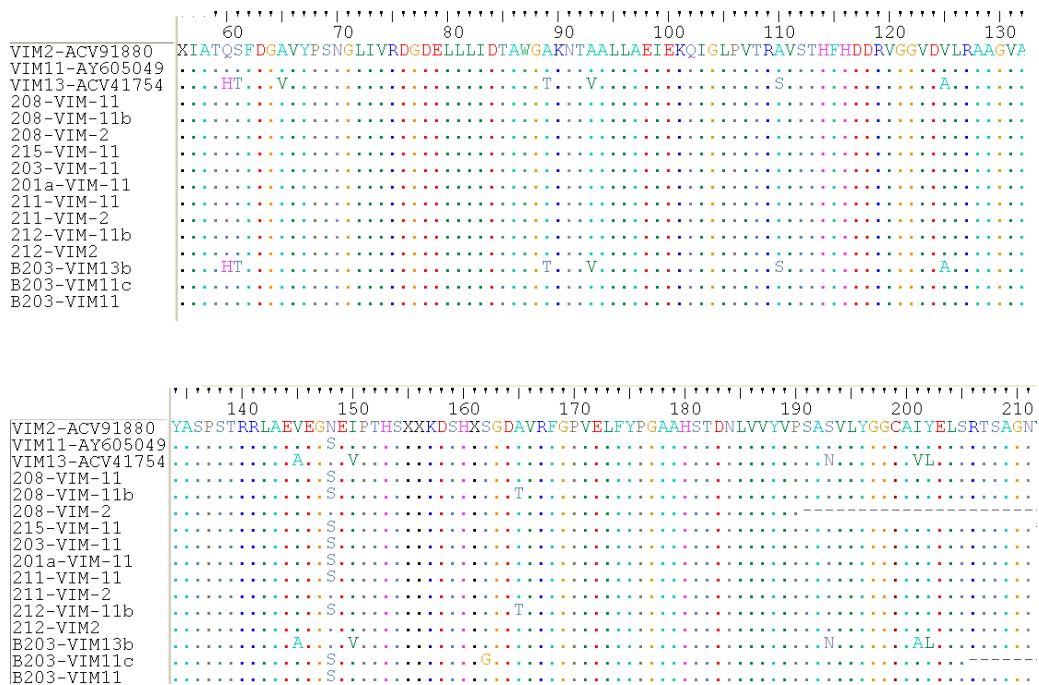


Figura 6. Alineamiento de una región de 168 aminoácidos de cuatro MBLs tipo VIM con siete cepas de *P. aeruginosa*. Las secuencias de referencia comparadas fueron: VIM-2 (ACV91880), VIM-11 (ABL61511 y VIM-13 (ACV41754). Las secuencias fueron comparadas con VIM-2, de lado izquierdo se observan los números de referencia, así como el número asignado a las cepas en estudio. Se puede apreciar los cambios de aminoácidos en las secuencias de las cepas de *P. aeruginosa*, que resultan en VIM-2, VIM-11, dos VIM-11 designadas como VIM-11b y VIM-11c (N148S; N148S más S161G respectivamente), también como VIM-13 la variante designada como VIM-13b, la cual presenta una sustitución (V200A) con respecto a VIM13.

Las secuencias obtenidas a partir de los amplificados generados por PCR utilizando los iniciadores que detectan genes *bla_{GES}* y *bla_{OXA}* se compararon con la base de datos del GeneBank y mediante el programa bioinformático Blast (*“Basic Local Alignment and Search Tool”*), disponible en la página principal del NCBI (*“National Center for Biotechnology Information”*), se corroboró la presencia de *bla_{GES-5}* en los cuatro patrones clonales A, B C y D; mientras que *bla_{OXA-2}* se presentó solo en los tipos clonales A, B y D (Tabla 2).

6.4. Caracterización de integrones e identificación de transposones.

Se utilizaron iniciadores para detectar integrones de las clases 1, 2 y 3 tal como se describe en material y métodos, ya que se tiene referencia que son los encontrados con mayor frecuencia en cepas intrahospitalarias que portan genes de resistencia; sin embargo, en este estudio no se detectaron los integrones de las clases 2 y 3.

En las cepas en estudio únicamente se identificaron integrones de la clase 1 y debido a que los genes que codifican β -Lactamasas se han relacionados con éstos, se amplificaron por PCR utilizando iniciadores dirigidos a las regiones conservadas de estos elementos genéticos. Posteriormente se realizó la caracterización por medio de secuenciación. Se identificaron integrones de la clase 1 en los cuatro patrones clonales detectados por PFGE, portando diferentes genes de resistencia, sin embargo no se detectaron los genes *bla_{VIM}* en los mismos.

En las clonas 173(A1), 212(A2), 206(C) y 210(C), se amplificaron y secuenciaron los genes *intI1* [integradora], *aacA7* (número de acceso del GenBank: AM988778.1) [resistencia a aminoglucósidos] y *qac Δ E1* [resistencia a sales cuaternarias de amonio]. En la clona 204(B1) se amplificaron y secuenciaron los genes *intI1*, *aadA6* (número de acceso del GenBank: FJ752628.1) y *qac Δ E1*. En la clona 208(D) las secuencias identificadas mostraron la presencia de *intI1*, los casetes génicos: *aacA4* (número de acceso del GenBank: GQ202693.1), *aadA7* (número de acceso del GenBank: DQ899757.1), *bla_{OXA-2}* [resistencia a oxacilinas] y *qac Δ E1* (Figura 7).

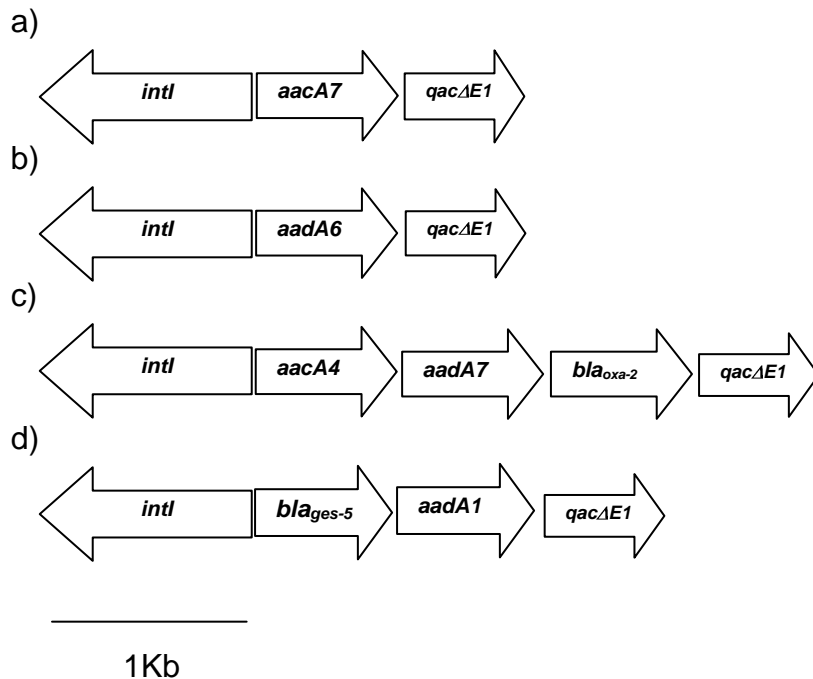


Figura 7. Representación esquemática de los integrones clase 1 identificados en las cepas de *P. aeruginosa*. Organización de los integrones en a) 173(A1), 212(A2), 206(C) y 210(C). b) 204(B1). c) 208(D). d) Representación esquemática de un segundo integrón en 204(B1) presente en la clona recombinante pUC204B y de la clona B203(B).

Debido a que se puede tener la presencia potencial y simultánea de múltiples integrones en la misma cepa, se llevaron a cabo ensayos de clonación, con la finalidad de detectar los integrones y/o regiones relacionadas con determinantes de resistencia en las clonas: 173(A1), 212(A2), B203(B), 204(B1), 206(C), 210(C), y 208(D). El DNA cromosómico de estas clonas se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, luego se ligaron en pUCP24, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas y posteriormente clonado en *E. coli* XL1-Blue. Estos experimentos se realizaron por triplicado y solamente se obtuvieron dos recombinantes, que fueron designadas como: pUCB203B y pUC204B. Estas clonas mostraron un fenotipo BLEE positivo y MBL negativo (Tabla 3). Por PCR y secuenciación se demostró en ambas clonas la presencia de un integrón clase 1 que contenía los genes *intI1*,

*bla*_{GES-5}, *aadA1* y *qac* Δ *E1*. En la cepa 204 se identificaron dos integrones clase 1, uno fue detectado a partir de la clona 204(B1) y el otro detectado en la clona recombinante pUC204B (Figura 7, incisos b y d).

Se realizó el aislamiento de plásmidos nativos los cuales fueron identificados únicamente a partir de las clonas 173(A1), B203(B), 204(B1) y 208(D). Para entender su participación en la resistencia se llevó a cabo una transformación por electroporación en *P. aeruginosa* PA01 y se hizo un análisis de las transformantes resultantes. Se obtuvo la transferencia de la resistencia sólo con los plásmidos de las clonas: B203(B), 204(B1) y 208(D) a las cuáles se les designó como B203PA, 204PA y 208PA respectivamente. La clona B203PA mostró un fenotipo de resistencia a ceftazidima, cefepime, piperacilina, piperacilina-tazobactam y amikacina, además mostró un fenotipo BLEE tipo GES positivo. La clona 204PA mostró un fenotipo de resistencia a ceftazidima cefepime piperacilina, piperacilina-tazobactam, tobramicina y amikacina, así mismo mostró un fenotipo BLEE tipo GES positivo. La transformante 208PA mostró un fenotipo de resistencia a ceftazidima, cefepime, piperacillin y piperacillin-tazobactam y un fenotipo BLEEs positivo para GES (Tabla 3). En estas recombinantes no se realizó el análisis para asociar la resistencia con integrones.

Tabla 3. Resultados de la MIC en las clonas recombinantes: *E. coli* XL1-Blue portadora del plásmido recombinante pUCP204B y pUCPB203 y *P. aeruginosa* PA01 portadora de los plásmidos naturales de las clonas: 204PA, B203PA y 208PA, además de las cepas de referencia.

Receptora	Plásmido	MIC (µg/ml) de ^a												
		CAZ	FEP	PIP	PIP-TZ	IMP	MER	CIP	COL	GEN	TOB	AMK	MBLs	ESBLs
<i>E. coli</i> XL1-Blue	No	0.5	0.5	1	1	0.15	0.06	0.064	0.04	0.25	0.38	0.75	-	-
	pUCP204B	12	0.5	4	1	0.15	0.02	0.047	0.04	12	0.5	1	-	+
	pUCPB203B	>256	2	8	2	0.25	0.04	0.032	0.04	8	3	4	-	+
<i>P. aeruginosa</i> PA01	No	2	1.5	3	2	1	0.25	0.094	1.5	2	0.75	3	-	-
	204PA	>256	48	48	24	1.5	0.38	0.125	2	4	32	64	-	+
	208PA	96	12	>256	128	1	0.5	0.094	2	1.5	1	3	-	+
	B203PA	>256	24	256	256	1.5	0.38	0.125	2	2	1	4	-	+

^aMIC: CAZ, ceftazidima, FEP, cefepime; PIP, piperacilina, PIP-TZ, piperacilina-tazobactam; IMP, imipenem, MER, meropenem; CIP, ciprofloxacina; COL, colicistina; GEN, gentamicina, TOB, tobramycina; AMK, amikacina fueron determinadas por Etest. Nota: los valores de corte MIC (µg/ml) para los antibióticos: CAZ^R ≥ 32; FEP^R ≥ 32; PIP^R ≥ 128; PIP-TZ^R ≥ 128; IMP^R ≥ 16; MEM^R ≥ 16; CIP^R ≥ 4; COL^R ≥ 8; TOB^R ≥ 8; AMK^R ≥ 64. GEN es el marcador de selección.

Durante los procedimientos de detección de integrones se amplificaron fragmentos inespecíficos que una vez llevada a cabo su secuenciación y el análisis correspondiente, se encontró solamente que en seis de las cepas el siguiente resultado: el gen *cysD*, el cual codifica para una adeniltransferasa; que es una subunidad de la ATP sulfurilasa, enzima que cataliza la activación de iones sulfato por el ATP para formar adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y pirofosfato (Pinto y col., 2004).

En la clona 212(A2) se detectó el gen *tnpA*, presente en transposones.

6.5. Localización cromosomal o plasmídica de genes que codifican β -Lactamasas por hibridación tipo Southern.

Para conocer la localización de *bla*_{GES} en el cromosoma y/o en plásmidos se llevaron a cabo ensayos de hibridación tipo Southern. Para este ensayo se utilizó el DNA total de las 14 cepas y los cuatro plásmidos nativos purificados. Se determinó una localización cromosomal de *bla*_{GES-5} en 11 cepas (Tabla 2) y una localización plasmídica en tres de las cuatro clonas analizadas: B203PA, 204PA y 208PA. En la Figura 8 inciso b se puede observar el resultado positivo de la hibridación tipo Southern para la cepa 204.

El ensayo de hibridación del gen *bla*_{VIM} presentó una distribución a nivel cromosomal para todas las cepas. En la Figura 8 inciso a se ejemplifica una prueba positiva para el DNA total de cuatro cepas.

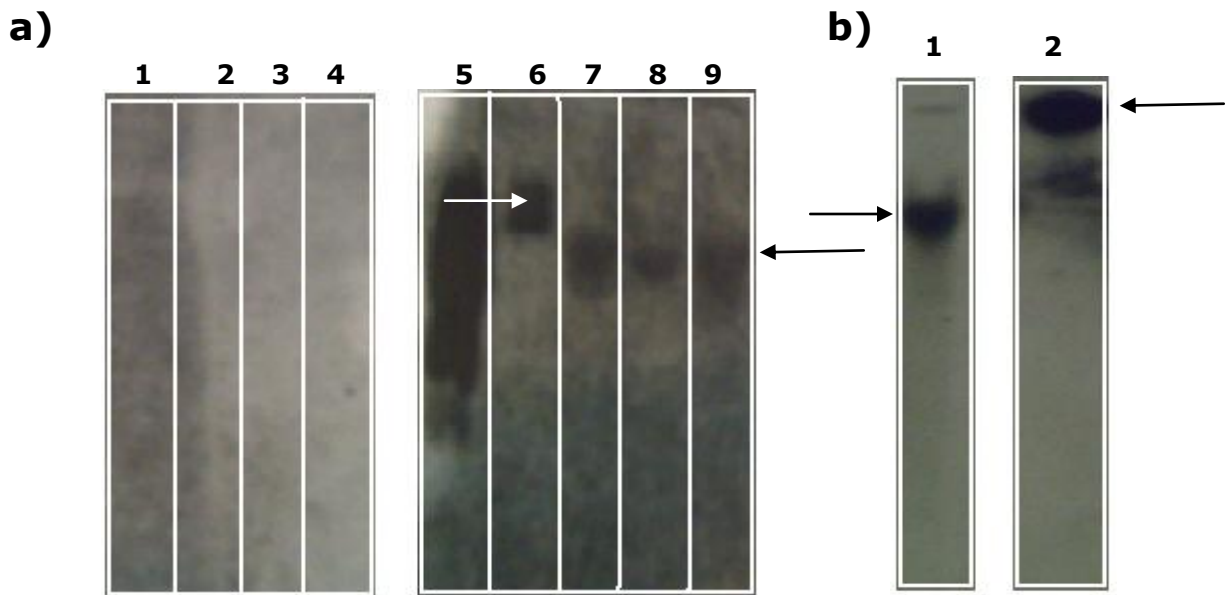


Figura 8. Localización de genes bla_{VIM} y bla_{GES} en DNA total y DNA plasmídico de cepas de *P. aeruginosa* en estudio. a) Hibridación de bla_{VIM} en DNA plasmídico sin digerir de los aislados: B203, 204, 208 y 211 de *P. aeruginosa* (carriles 1-4) y DNA total sin digerir (carriles 6-9). Línea 5: ladder 1Kbp (Invitrogen). La flecha indica la señal positiva para bla_{VIM} en las cuatro cepas a partir del DNA total b) Hibridación de bla_{GES} en el aislado 204 a partir del DNA total y DNA plasmídico. Línea 1: DNA total de 204 y línea 2: DNA plasmídico de 204. La flecha indica la señal positiva para bla_{GES} en DNA total y DNA plasmídico.

Dado que se observó que los resultados de las secuencias correspondientes a bla_{VIM} sugirieron la presencia de múltiples copias en una misma cepa, se llevaron a cabo ensayos de hibridación con las siete cepas en las que se detectaron genes bla_{VIM} (Tabla 2).

El DNA genómico de cada cepa se digirió de forma independiente con las enzimas de restricción: EcoRI, la cual no reconoce ningún sitio en la mayoría de las secuencias de los genes bla_{VIM} descritos hasta el momento y SalI, la cual reconoce un sólo sitio de corte en la mayoría de las secuencias bla_{VIM} depositadas en el GenBank. Los resultados de

hibridación mostraron que en la clona B203(B) están presentes al menos tres copias de *bla_{VIM}*, ya que después de llevar a cabo la digestión con EcoRI se obtuvieron por lo menos tres bandas de tamaño diferente. Mientras que cuando se llevaba a cabo la digestión con SalI se generaban al menos 4 bandas. Con relación a los resultados de la hibridación en la clona 208(D), se observó que el DNA no se digirió con EcoRI, sin embargo resulta evidente la presencia de múltiples copias de *bla_{VIM}*, ya que la digestión con SalI generó al menos cuatro bandas. Las clonas 211(A) y 212(A2), generaron cuatro y seis fragmentos respectivamente, cuando se digirió su DNA con EcoRI; mientras que cuando se utilizó SalI, se observaron cinco y seis fragmentos respectivamente, en la Figura 9 se puede observar el análisis de la hibridación tipo Southern utilizando la sonda *bla_{VIM}*.

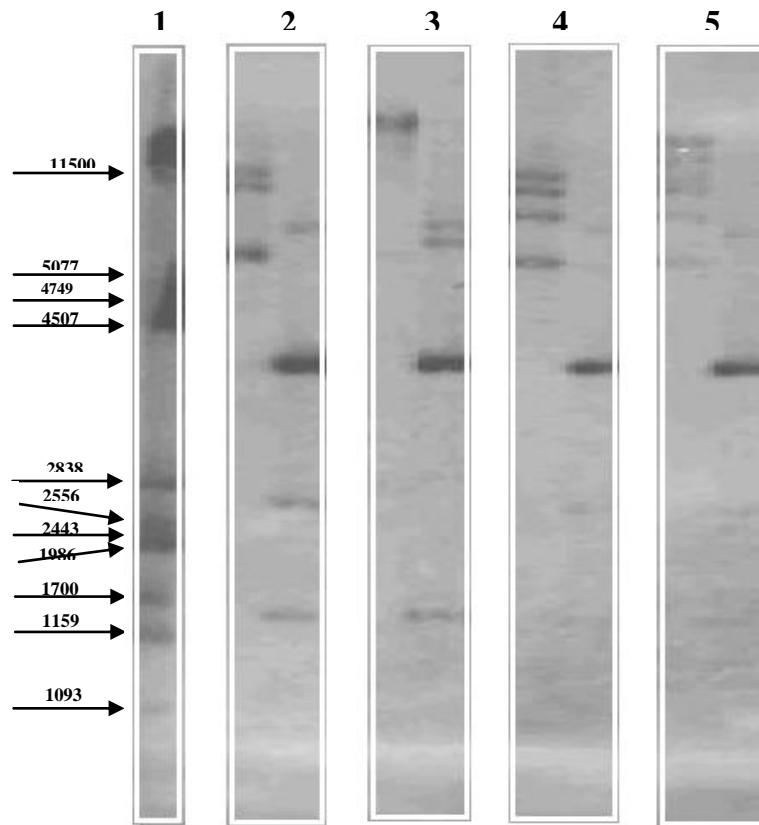


Figura 9. Presencia de copias de los genes y *bla*_{VIM} en el genoma de las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. Línea 1, DNA del fago lambda digerido con PstI; líneas: 2 a 5: DNA genómico de los aislados clínicos: B203, 208, 211 y 212 digeridos con EcoRI y SalI. El análisis muestra al menos dos copias de *bla*_{VIM} en todos los casos.

7.0. DISCUSIÓN.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria oportunista que frecuentemente causa brotes en los hospitales, además de provocar infecciones que amenazan la vida de pacientes comprometidos. De ahí la importancia de una detección rápida, así como el adecuado y oportuno tratamiento en el control de las infecciones nosocomiales (Obritsch y col., 2005; Pollack y col., 2002).

Los antibióticos más utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* son los β -Lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, sin embargo el uso indiscriminado de antibióticos junto con el inadecuado control sanitario en los hospitales ha propiciado la selección de cepas con diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos, lo que da como resultado la reducción en las opciones terapéuticas y por ende aumenta los costos de estancia hospitalaria y lo que es peor, pone en riesgo la vida del paciente (Strateva y col., 2009).

Esta bacteria presenta diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos, debido a que presenta una baja permeabilidad de su membrana externa, mutaciones en el sitio blanco en donde los antibióticos ejercen su acción, también de la expresión constitutiva de varios sistemas de eflujo, la producción de enzimas que inactivan antibióticos como las carbapenemasas, afectando a un importante abanico de antibióticos y que en conjunto hidrolizan a prácticamente todos los β -lactámicos (Juan y Oliver, 2010). Además de la capacidad de desarrollar o adquirir nuevos y diversos mecanismos de resistencia a antibióticos (Mesaros y col., 2007). Así mismo la capacidad cada vez mayor de transferencia horizontal de genes de resistencia que se ha presentado en las últimas décadas. Esta diseminación es ocasionada

frecuentemente por integrones localizados en plásmidos y transposones (Rosewarne y col., 2010; Frost & Koraimann, 2009; Ahmed, 2009).

Los genes que codifican para las MBLs son otro ejemplo de determinantes transferibles de resistencia que tienen un impacto importante sobre la terapia antimicrobiana. Las MBL adquiridas horizontalmente fueron descritas primero a principios de los años 1990 y actualmente incluyen ocho grupos de enzimas (IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, DIM, AIM y KHM) (Lee y col., 2005; Walsh y col., 2005; Gupta, 2008; [Picão](#) y col., 2008; Poirel y col., 2010). Las MBL producidas por *P. aeruginosa* han sido responsable de brotes hospitalarios en varios países por todo el mundo (Poirel y col., 2010; Sekiguchi y col., 2008; Queenan y col., 2007).

En el presente estudio se analizaron 14 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, que fueron seleccionados por su resistencia al imipenem y ceftazidima. Se determinó la susceptibilidad a 21 antibióticos incluyendo β -Lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas; un grupo de 11 aislados clínicos mostró un fenotipo de panresistencia a todos los antibióticos utilizados, lo que indica que en el Hospital existe una presión selectiva sobre el uso de los antibióticos lo que conduce a una tendencia creciente de resistencia, como ha sido reportada en otro hospital (Rice, 2009).

La tipificación de *P. aeruginosa* por PFGE permitió la identificación de cuatro patrones clonales diferentes. Al mismo tiempo se encontró que nueve de los catorce aislados, resistentes al imipenem fueron incluidas en tres de los cuatro clones identificados por PFGE, el patrón clonal predominante fue el A, las cepas incluidas en este patrón mostraron un fenotipo de panresistencia a los 21 antibióticos utilizados, tales como β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes), aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas, lo cual muestra la presión

selectiva en el uso de antibióticos en este ambiente hospitalario, además del riesgo implícito por el carácter de panresistencia a todos los antibióticos utilizados. La diseminación de 4 clones diferentes A, B, C y D; circulantes en la unidad de cuidados intensivos en un periodo de 3 meses refleja la coexistencia de distintas cepas circulantes en un periodo corto de tiempo, si se compara con brotes reportados en otros países (Corvec y col., 2008; Crespo y col., 2004).

En la clona 212(A2) se detectó el gen *tnpA*, presente en transposones, el cual codifica para una proteína de unión a DNA de doble cadena y que también puede unirse a DNA de una cadena (Bacic, 2005).

Los transposones, son un factor más de diseminación de genes de resistencia entre microorganismos en el ambiente hospitalario, ya que estos elementos genéticos móviles se encuentran localizados por lo general en el cromosoma bacteriano, pero pueden transferirse de manera relativamente rápida de una célula o otra llevando genes de resistencia a los antibióticos lo que aumenta la diseminación de genes de resistencia a otras bacterias (Salyers y col., 1995; Mullany y col., 2002).

Adicionalmente se detectó el gen *cysD*, el cual codifica para una adenil-transferasa; que es una subunidad de la ATP sulfurilasa, enzima que cataliza la activación de iones sulfato por el ATP para formar adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y pirofosfato (Pinto y col., 2004).

La actividad de ATP sulfurilasa está relacionada con un gran número de procesos biosintéticos en *M. tuberculosis*, defensa anti-oxidante y resistencia a antibióticos (Buchmeier y col., 2003; Rawat y col., 2002), por lo que se observa un factor más de resistencia en estas cepas.

Los integrones de la clase 1 son los que se encuentran con mayor frecuencia en las cepas aisladas de casos clínicos (Toleman y col.,

2007). Los integrones son estructuras que funcionan como sistemas de captación de genes tienen la capacidad de reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, así como una capacidad prácticamente ilimitada de intercambio y reserva de casetes (Sabaté y col., 2002). La baja diversidad y gran estabilidad temporal de la estructura de los integrones de clase 1 en aislados clínicos resistentes a antibióticos de las últimas dos décadas, apoyaría la hipótesis de episodios de selección de un pequeño número de unidades de captura génica ocurrida en el medio hospitalario como consecuencia del uso de antibióticos (Machado y col., 2005). La disposición de los casetes génicos en estas cepas es diferente a lo reportado hasta el momento en la literatura; esto podría sugerir el constante intercambio de genes de resistencia entre diferentes microorganismos causantes de infecciones en el ambiente hospitalario (Rosewarne y col., 2010; Bing y col., 2007).

Por otro lado se identificó *bla*_{GES-5} en un integrón de clase 1, localizado en un plásmido en la clonas transformantes B203PA y 204PA, además se detectó una copia de dicho gen en el cromosoma de dichos aislamientos clínicos, lo que sugiere que este gen se pudo encontrar en un principio asociado a un plásmido y luego ser integrado al cromosoma bacteriano. Así mismo se detectó *bla*_{GES-5} por PCR en los cuatro patrones clonales detectados por PFGE, lo que genera un panorama preocupante, ya que este gen confiere resistencia a antibióticos que son utilizados de forma continua en el ambiente hospitalario como son los β -Lactámicos, además sugiere una diseminación continua entre los aislados en la unidad de cuidados intensivos, ya que se detectó en todos los patrones clonales.

Hasta la fecha no se tenían reportes de la presencia de *bla*_{GES-5} en países del Centro y Norteamérica; solamente se había reportado en Europa, Asia, África y en Sudamérica (Viedma y col., 2009; Jeong y col., 2005;

Labuschagne y col., 2008; Picão y col., 2009), lo que podría indicar la diseminación de este gen, incluso entre países en un periodo relativamente corto de tiempo, o ser el resultado de la presión selectiva en el uso de carbapenemes, además del hecho de ser detectado en *P. aeruginosa*, un microorganismo portador de múltiples mecanismos de resistencia, representando un desafío en el tratamiento de pacientes en el ambiente hospitalario.

En *P. aeruginosa*, se identificó por primera vez la MBL del tipo VIM-2 en Italia en el 2000 (Poirel y col., 2000). A la fecha se han detectado más de 23 variantes alrededor del mundo, en México sólo se ha reportado la variante VIM-2 (Quiñónez y col., 2010). Mientras que la MBL variante VIM-11 ha tenido una distribución más localizada, fue reportada por primera vez en Argentina por Pasteran y colaboradores en el 2005 (Pasteran y col., 2005) y en la India (Castanheira y col., 2009).

El análisis de las secuencias de aminoácidos reveló la presencia de diferentes subtipos de VIM en cuatro de las siete cepas positivas para *bla*_{VIM} (Tabla 2). La cepa 211 presentó las variantes: *bla*_{VIM-2} y *bla*_{VIM-11}; la cepa 212, *bla*_{VIM-2} y *bla*_{VIM-11b}; la cepa B203, *bla*_{VIM-11}, *bla*_{VIM-11c}, y *bla*_{VIM-13b}; la 208, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}, y *bla*_{VIM-11b}. Los resultados se corroboraron con los ensayos de hibridación a partir del DNA total digerido con EcoRI y/o SalI, usando como sonda un fragmento de aproximadamente 500 bp del gen *bla*_{VIM}, en donde se identificaron múltiples copias de dicho gen. Sin embargo las variantes identificadas en este trabajo difieren de las reportadas en el banco de información biológica ("GenBank"), tan solo en uno o dos aminoácidos en la región conservada de las MBLs.

No han sido reportadas cepas de *P. aeruginosa* co-productoras de dos o más β -Lactamasas tipo VIM. Lo más cercano se refiere al reporte de Glupczynski y colaboradores en el 2010 que reportaron la coexistencia

de las BLEEs tipo BEL y PER con una MBL tipo VIM en cepas aisladas en un hospital en Bélgica.

El gen *bla*_{VIM} por lo general se ha encontrado asociado a integrones clase 1, aunque también se ha detectado en transposones y plásmidos (Tato y col., 2010). En este estudio no se asoció *bla*_{VIM} con integrones, transposones y plásmidos, aunque Toleman y colaboradores en el 2000, observaron un resultado similar. Cabe destacar que si bien se detectó actividad MBLs por métodos fenotípicos en 14 aislados clínicos, sólo se obtuvieron las secuencias correspondientes a MBLs en 4 aislados, lo que podría sugerir la presencia de diferentes tipos de MBLs. Esto hace necesario el tener las secuencias completas para poder descartar si se tiene una variante de una MBL o si es una distinta a la ya reportadas.

También se detectó la β -Lactamasas tipo OXA-2, en cuatro cepas, *bla*_{OXA-2} es el subtipo dentro de la familia de las enzimas que confieren resistencia a oxacilinas, más comúnmente identificado (Bhattacharjee y col., 2007; Lee y col., 2005), lo que demostraría una movilización más activa de dicho gen, entre los aislamientos.

La presencia cada vez más frecuente de bacterias portadores de β -Lactamasas que son causa de brotes en los hospitales, es un problema emergente. La vigilancia activa es necesaria para prevenir la diseminación de clonas portadoras de integrones y genes de resistencia asociados a plásmidos. El buen uso de los antibióticos en el control de las infecciones, ayudará en la lucha contra los organismos productores de carbapenemasas.

Este es el primer estudio en el cual se reporta la presencia de *bla*_{GES-5} en *P. aeruginosa* desde Centroamérica hasta Norteamérica. Además de la presencia simultánea de las variantes de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{VIM-11} en una

misma cepa, así mismo la presencia simultánea de β -Lactamasas: BLEEs y MBLs en una misma cepa a nivel mundial.

Finalmente, la detección de diversas variantes nuevas de VIM, sugiere la posibilidad que este hecho podría ser más común de lo que se tiene hasta el momento, la detección de una variante VIM, podría enmascarar la presencia β -Lactamasas adicionales. Es importante destacar el riesgo epidemiológico implícito de estas cepas, tanto por la potencial diseminación de genes de resistencia, especialmente cuando las cepas son muchas y tan variadas.

8.0 CONCLUSIONES.

-Once de las 14 cepas de *P. aeruginosa* en estudio, mostraron un fenotipo de multirresistentes a 21 antibióticos de diversas familias.

-Se demostró que las 14 cepas de *P. aeruginosa* forman parte de cuatro patrones clonales.

-En seis de las cepas, se identificaron integrones clase 1 portadores de genes de resistencia para aminoglucósidos, de genes de β -lactamasas de los tipos GES y OXA, pero no de MBLs del tipo VIM.

-Se detectaron plásmidos naturales portadores de genes de resistencia a β -lactámicos en tres cepas.

-Se demostró la presencia de los genes *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}*bla*_{GES-5} y *bla*_{OXA-2}, solos o en cinco diferentes combinaciones: *<bla*_{GES-5}*>*, *< bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-11}*>*, *< bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}*>*, *<bla*_{GES-5}, *bla*_{OXA-2}*>* y *< bla*_{GES-5}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-11}, *bla*_{OXA-2}*>*

-Este es el primer estudio que demuestra la presencia de *bla*_{GES-5} y *bla*_{VIM-11} en *P. aeruginosa* desde Centroamérica hasta Norteamérica, además de la presencia de posibles variantes de *bla*_{VIM-11} y de *bla*_{VIM-13}

9.0. PERSPECTIVAS.

-Determinar las secuencias completas de los genes *bla*_{VIM}, a partir de las secuencias parciales que se tienen de las variantes *bla*_{VIM11-b}, *bla*_{VIM-c}, *bla*_{VIM13b}, para descartar la posibilidad de variantes de MBLs tipo VIM o descartar la posibilidad de MBLs no reportadas.

-Determinar la localización del gen *bla*_{VIM}, en el genoma bacteriano y detectar si existe alguna asociación con integrones, plásmidos y/o transposones, además de detectar la organización de los mismos.

-Como parte de la caracterización de MBLs identificadas, determinar el pI de las mismas.

10.0. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, H.** 2010. Alternative Mechanisms for Tn5 Transposition Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Mexico: Special Focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*. **4**:275-279.
- Aparicio O. G.** 2005. Géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Stenotrophomonas*, En: Lugo de la Fuente G (ed.), *Bacteriología Médica*. 3ª ed. México D.F. Ediciones Cuellar. pp. 63-72.
- Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N., & M. Ohta.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- β -Lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob Agents Chemother*.**39**:1612-1615.
- Bacic M.K & C.J. Smith.** 2005. Analysis of chromosomal insertion sites for Bactrioides Tn 4555 and the role of TnpA. *Gene*. **20**: 80-88.
- Balázs L., Christian G.G., Bogáta K., Tama's G.T., & M. Füzi.** 2008. Identification of the First VIM Metallo- β -Lactamases Producing Multiresistant *Aeromonas hydrophila* Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. **46**:1878-1880.
- Bertrand, X; Thouverez, M; Patry, C; Balvay, P; & D. Talon.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. **7**:706-8.
- Bing G., Mingqing T., Wenjun Z., Genyan L., Mingzhe N., Shiyang P., & Z. Wangsheng.** 2007. Prevalence and Characterization of Class I Integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients in Nanjing, China. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 241-243.

- Bush K., Jacoby G.A., & A.A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**:1211-33.
- Buchmeier N.A., Newton G.L., Koledin T & R.C., Fahey.** 2003. Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Mol Microbiol.* **47**: 1723-1732.
- Castanheira, M., J. M. Bell, J. D. Turnidge, D. Mathai, and R. N. Jones.** 2009. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1225-1227.
- Castanheira M., Toleman M.A., Jones R.N., Schmidt F.J., & T.R. Walsh.** 2004. Molecular characterization of a β -Lactamase gen, *bla*_{GIM-1}. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 4654-4661.
- Castillo-Vera J.** 2006. Estudio sobre la multirresistencia a los antibióticos y detección molecular de Metalo- β -lactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen intrahospitalario. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.
- Castillo-Vera J., Ribas-Aparicio R.M., Osorio-Carranza L., y G. Aparicio.** 2006. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes a 21 antibióticos. *Bioquimia.* **31**:41-48.
- Chu Y. W., Afzal-Shah M., Houang E. T. S., Palepou M.F., Lyon D. J, Woodford N., & Livermore D.V.** 2001. IMP-4, a Novel Metallo- β -Lactamase from Nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 710-714.

-
- Clark C.A., Purins L., Kaewrakon P., Focareta T., & P.A. Manning.** 1995. The *V. cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology*. **146**:2605-2612.
- CLSI/NCCLS.** 2005. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, Approved standard. 8th edition. M02-A8. *CLSI*, Wayne, Philadelphia, U.S.A.
- Costa F., Teixeira L., Siquiera G., Nouer A., Pinto de Oliveira M., & H.J.L. Mello.** 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* **40**. 2420-2424.
- Craig L.N., Craigie R., Geller M., & A.M. Lambowitz.** Mobile DNA II. Asm Press. Washington, D.C. 2002. pp 168- 261.
- Corvec, S., L. Poirel, E. Espaze, C. Giraudeau, H. Drugeon, and P. Nordmann.** 2008. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J. Hosp. Infect.* **68**:73-82.
- Crespo M.P., Woodford N., Sinclair A., Kaufmann M.E., Turton J., Glover J., Velez J.D., Castañeda C.R., Recalde M., & Livermore D.M.** 2004. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo-Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* pp.5094–5101.
- Di Conza, J., A; & G., O. Gutkind.** 2010. Integrones: los coleccionistas de genes *Rev argent microbiol.* **42**: 63-78.
- Gales A.C., Menezes L.C., Silbert S., & S.H. Sader.** 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenemes-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-metallo- β -Lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **52**:699-702.

-
- Garza-Ramos U., Morfin-Otero R., Sader H.S., Jones R.N., Hernández E., Rodríguez-Noriega E., Sánchez A., Carrillo B., Esparza-Ahumada S., & J. Silva.** 2008. Metallo- β -Lactamase Gene, *blaIMP-15*, in a Class 1 Integron (In95) from *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital in México. *Antimicrob Agents Chemother.* In press.
- Gillings, M; Bouche,r Y; Labbate, M; Holmes, A; Krishnan, S; Holley M, & Stokes H.,W.** 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol.* 14:5095-100.
- Gupta V.** 2008. Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species.* *Expert Opin Investig Drugs.* **17**:131-143.
- Glupczynski, Y., P. Bogaerts, A. Deplano, C. Berhin, T.D. Huang, J. Van Eldere, and H. Rodriguez-Villalobos.** 2010. Detection and characterization of class A extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**: 866-871.
- Fluit A.C.** 2005. Towards more virulent and atibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol.* **43**:1-11.
- Fluit A.C., & F.J. Schmitz.** 2004. Resistance integrons and superintegrones. *Clin Microb Infect.* **10**:272-288.
- Frost, L., & G., Koraimann.** 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* **5**: 1057–1071.
- Hall R.M., Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Recchia G.D. & H.W. Stokes.** 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci.* **870**:68-80.
- Hall R.M., & C.M. Collis.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* **15**.593-600.

-
- Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G.M. Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1584-1590.
- Labuschagne, C. de J., G.F. Weldhagen, M.M. Ehlers, and M.G. Dove.** 2008. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**:527-530.
- Lambert P.A.** 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J of the Royal Society of Medicine.* **95**: 22-26
- Lee, J., H; Bae, K; & S., H., Lee.** 2010. New Definitions of Extended-Spectrum β -Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. *Medicinal Research Reviews.* DOI 10.1002/med.
- Lee K., Yum J.H., Yong D., Lee H.M., Kim H.D., Docquier J.D., Rossolini G.M., & Y. Chong.** 2005. Novel Acquired Metallo- β -Lactamase Gene, *blaSIM-1*, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother.* **9**:4485-4491.
- Lee K., Lim J.B., Yum J.H., Young D., Chong Y., & J.M. Kim.** 2002. *blaVIM-2* cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamases-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in Korea hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1053-1058.
- Lewin, B.** GENES IX. 2008. 9^a ed. Ed. Jones And Bartlet Publishers. Canada. 21:521-536.

-
- Livermore D.M.** 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenemes. *J Antimicrob Chemother.* **47**: 247-250.
- Luzzaro F., Docquier J.D., Colinon C., Endimiani A., Lombardi G., Amicosante G., Rossolini G.M., & A. Toniolo.** 2004. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates of the VIM-4 Metallo- β -Lactamase Encoded by a Conjugative Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:648-650.
- Machado E., Canton R., Baquero F., Galan J.C., Rollan A., Peixe L., & T.M. Coque.** 2005. Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1823-1829.
- Massida O.G., Rossolini M., & G. Satta.** 1991. The *Aeromonas hydrophila* *cpb A* gene molecular heterogeneity among metallo- β -Lactamases. *J Bacteriol.* **173**: 4611-4617.
- Matthew M., Hedges R.W. & J.T. Smith.** 1979. Types of β -lactamase Determined by plasmids in Gram-negative Bacteria. *J Bacteriol.* **138**:657-662.
- Mazel D.** 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature.* **4**: 608-623.
- Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., Van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P. M., & F. Van Bambeke.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* **13**: 560-578.
- Michael C.A., Gillings M.R., Holmes A. J., Hughes L., Anrew N.R., Holley M.P., & H.W. Stokes.** 2004. Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. *The American Naturalist.* **1**:1-12.

-
- Mullany P.** 2002. Introduction to the multi-author review on conjugative transposons. *Cell Mol Life Sci.* **59**:2015–2016.
- Narváez, P; Pedroza, R; & V., Rodríguez-Lemoine.** 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* **25**:29-34.
- Nield B.S., Holmes A.J., Gillings M.R., Recchia G.D., Mabbut B.C., & K.M.H. Nevalainen.** 2001. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett.* **195**:59-65.
- Nosova L.U., Morozov G.I., Zhilenkov E. L., & I.V. Domaradskii.** 2005. Uncommon Properties of pLD105 Conjugative Plasmid. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Immunol and Microbiol.* **139**: 443-445.
- Nunes-Duby S.E., Kwon H.J., Tirumalai R.S., Ellenberger T., & A. Landy.** 1998. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **26**: 391–406.
- Obritsch M., D; Fisch, D.,N; MacLaren, R & R. Jung.** 2005. Nosocomial Infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy.* **25**: 1353-1364.
- Osano E.Y., Arakawa R., Wacharotayankun M., Ohta T., Horii H., Ito F., Yoshimura & N. Kato.** 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**:71-78.
- Pasteran F., Faccone D., Petroni A., Rapoport M., Galas M., Vázquez M., & A. Procopio.** 2005. Novel variant (bla(VIM-11) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -

lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**: 474-475.

-Partridge S.R., Recchia G.D., Scaramuzzi C., Collis C.M., Stokes H.W., & R.M. Hall. 2000. Definition of the attI site of class 1 integrons. *Microbiology.* **146**:2855-28.

-Picão, R.C., L. Poirel, A.C. Gales, and P. Nordmann. 2009. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3908-3913.

-Picão R.C., Andrade S.S., Nicoletti A.G., Campana E.H., Moraes G.C., Mendes R.E., & A.C. Gales. 2008. Metallo- β -Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP, GIM, SIM, SPM or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol.* *En prensa.*

-Pinto R., Tang Q.X., Britton W.J., Leyh T.S., & J. A. Triccas. 2004. The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex. *Microbiology.* **150**: 1681-1686.

-Pitout J. D. D., Chow L.B., Gregson D.B., Laupland K.V., Sameer E., & D.L. Church. 2007. Molecular Epidemiology of Metallo- β -Lactamases Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Emergence of VIM-2-Producing Isolates. *J of Clinic Microbiol.* **45**: 294-298.

-Poirel, L; Rodríguez-Martínez, J.,M; Al Naiemi, N; Debets-Ossenkopp, Y.J., & P. Nordmann. 2010. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **54**:2420-4.

- Poirel L., Cabanne L., Collet L., & P. Nordmann.** 2006. Class II Transposon-Borne Structure Harboring Metallo- β -Lactamase Gene *blaVIM-2* in *Pseudomonas putida*. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*. **50**:2889-2891.
- Poirel L., Naas T., Nicolas D., Collet L., Bellais S., Cavallo J.D., & P. Nordmann.** 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. **4**:891-897.
- Pollack M.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R.M.D., (eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. New York, N.Y. U.S.A: Churchill Livingstone, Inc. pp.1980-2003.
- Queenan, A.,M; & K., Bush.** 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. **20**: 440–58.
- Quinones-Falconi, F., M. Galicia-Velasco, P. Marchiaro, M.A. Mussi, V. Ballerini, A.J. Vila, A.M. Viale, K. Bermejo-Morales, and A. S. Limansky.** 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clin. Microbiol Infect*. **16**:126-131.
- Radstrom P., Skold O., Swedberg G., Flensburg J., Roy P.H., & L. Sundstrom.** 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol*. **176**:3257-3268.
- Rawat M; Newton G. L; Ko M; Martinez G.J; Fahey R.C; & Yossef Av-Gay.** 2002. Mycothiol-Deficient *Mycobacterium smegmatis* Mutants Are Hypersensitive to Alkylating Agents, Free Radicals, and Antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. **46**:3348-55.

- Recchia G.D., & D.J. Sherratt.** 2002. Gene Acquisition in Bacteria by Integron-Mediated Site-Specific Recombination, In: Craig N., Caigie R., Gellert M., Lambowitz A.M. th. Ed. Mobile DNA II . Washington, D.C. American Society for Microbiology. pp:162-176.
- Recchia G.D., & R.M. Hall.** 1995. Gene cassettes: A new class of mobile element. *Microbiology*. **141**:3015-3027.
- Rice, LB.** 2009. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:476-481.
- Roser S.J., & H.K. Young.** 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother.* **44**:11-18.
- Rosewarne, C.P; Pettigrove, V; Stokes, H.,W; & Y. M., Parsons.** 2010. Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *Microbiol Ecol.* **72**:35-46.
- Rossolini, G.,M., & E., Mantengol.** 2005. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol infect.* **11**:17-32.
- Rowe-Magnus D.A., & D. Mazel.** 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol.* **292**:115-125.
- Rowe-Magnus D.A., Guerout A.M., Ploncard P., Dychinco B., Davies J. & D. Mazel.** 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:652-657.
- Sabaté M., & P. Guillem.** 2002. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.***7**:341-345.

- Sacha P., Wieczorek P., Hauschild T., Zórawski M., Olszańska D., & E. Tryniszewska.** 2008. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* **46**: 137-142.
- Sacha P., Zórawski M, Hauschild T., Wieczorek P., Jaworowska J., Jakoniuk P., & E. Tryniszewska.** 2007. The presence of *bla*_{IMP} genes on plasmids DNA isolated from multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains at University Hospital in Bialystok (Poland) first report. *Folia Histochemica et Cytobiol.* **45**:405-408.
- Sadikot, R., T; Blackwell, T., S; Chritman, J., W. & A. S. Prince.** 2005. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J respir Crit Care Med.* **171**:1209-1223.
- Salyers A.A., Shoemaker N.B., Stevens A.M., & L.Y. Li.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev.* **59**:579-90.
- Sambrook J., & D., W. Rusell.** 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 3rd, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y. **1**:6.33-6.46.
- Scott, J. R.** 1992. Sex and the single circle: conjugative transposition. *J.Bacteriol.* **174**:6005-6010.
- Sekiguchi, J., Morita, K., Kitao, T., Watanabe, N., Okazaki, M., Miyoshi-Akiyama, T., Kanamori, M. and T., Kirikae.** 2008. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:4194-7.
- Senda K., Arakawa Y., & S. Ichiyama.** 1996. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol.* **34**:2909-2913.

- Smith, A.W., and B. H. Iglewski.** 1989. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**: 10509.
- Spencer, F.B., S. Haupt, M.C. Claros, S. Walter, T. Lietz, R. Schille, and A.C. Rodloff.** 2000. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Infegct.* **6**:600-607.
- Stokes H. W., & R.M., Hall.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* **3**:1669-1683.
- Stover, C., K; Pham, X., Q; Erwin, A., L; Mizoguchi, S., D; Warrenner, P., Hickey, M., J; Brinkman, F., S., L; Hufnagle, W., O; Kowalik, D., J; Lagrou, M; Garber, R., L; Goltry, L; Tolentino, E; Westbrook-Wadman, S; Yuan, Y; Brody, L., L; Coulter, S., N; Folger, K., R; Kas, A; Larbid, K; Lim, R; Smith, K; Spencer, D; Wong, G., K, S; Wu, Z; Paulsen, I., T; Reizer, J; Saier, M.,H; Hancock, R., E., W; Lory, S & M., V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**: 959-964.
- Strateva, T., & D., Yordanov.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* **58**: 1133–48.
- Tato, M; Coque, T; Baquero, M & R. Canto´n.** 2010. Dispersal of Carbapenemase *bla*VIM-1 Gene Associated with Different Tn402 Variants, Mercury Transposons, and Conjugative Plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 320–327.
- Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting

chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.

-Toleman M. A., Vinodh H., Sekar U., Kamat V., & T.R. Walsh. 2007. *bla*_{VIM-2}- Harboring Integrons Isolated in India, Russia, and the United States Arise from an Ancestral Class 1 Integron Predating the Formation of the 3' Conserved Sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2636-2638.

-Toleman, M.A., Rolston K., Jones R.N., & T.R. Walsh. 2004. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo-β-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:329-332.

-Toleman M.A., Biedenbach D., Bennett D., Jones R. N., & T.R., Walsh. 2003. Genetic characterization of a novel metallo-β-lactamase gene *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn 5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* **52**:583-590.

-Toleman M.A., Simm A.M. Murphy T.A, Gales A.C., Biedenbach D.J., Jones R.N., & T.R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* **50**:673-679.

-Tietze E., Brevet J., & H., Tschape. 1987. Relationship among the streptothricin resistance transposon Tn7. *Plasmid.* **18**:246-249.

-.Viedma, E., C. Juan, J. Acosta, L. Zamorano, J. R. Otero, F. Sanz, F. Chaves, and A. Oliver. 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive (COS) ST235 *Pseudomonas aeruginosa* producing the

extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:4930-4933.

-Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., & P. Nordmann. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* **18**:306-25.

-Walsh C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.* **1**: 65-70.

-Wang C, Cai P, Chang D, & Z. Mi. 2006. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **57**:1261-1262.

-Watanabe T.R., Toleman M.A., Hyryniewics W., Bennett P.M., & R.N. Jones. 1991. Transferible imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **35**: 147-151.

-White P.A., Mclver C.J., & W.D. Rawlinson. 2001. Integrrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 2658-2661.

-Yan J-J., Hsueh P-R., Ko W-C., Luh S-H., Tsai H-M., W., & Wu J-J. 2001. Metallo- β -Lactamases in clinical *Pseudomonas isolates* in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:2224-2228.

-Young H.K., Qunsieh M.J., & M.L. McIntosh. 1994. Nucleotid sequence and genetic analysis of the type Ib trimetroprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. *J Antimicrob Chemother.* **34**:715-725.