



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**“ESTUDIO DE LA RESISTENCIA,  
GENOTIPIFICACIÓN Y RELACIÓN CLONAL DE  
CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* CAUSANTES  
DE INFECCIONES NOSOCOMIALES”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

**Q.F.B. CLAUDIA ANGÉLICA JUÁREZ ZELOCUALTÉCATL**

ASESORA DE TESIS:

**D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN**

CO-ASESORA:

**D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA**



**BUAP**

Puebla, Pue. a 8 de diciembre 2015.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
P R E S E N T E.**

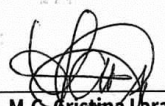
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Claudia Angélica Juárez Zelocualtecatl**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

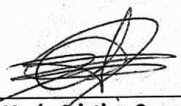
**"Estudio de la resistencia, genotipificación y relación clonal de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales"**

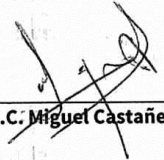
A nuestro juicio, la alumna Juárez Zelocualtecatl puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

  
M.C. Cristina Lara Ochoa

  
D.C. María Cristina González Vázquez

  
D.C. Miguel Castañeda Lucio

  
D.C. Gerardo Santos López

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

## RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la **D.C. Patricia Lozano Zarain** y la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**.

La alumna fue apoyada con una beca por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) con el **número de becario 297906**.

La alumna también fue apoyada por el Programa Becas-Tesis del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (**Concytep 2015**).

El trabajo fue financiado con recursos del Programa Institucional de Fomento al Desarrollo de la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos, otorgado por la VIEP con el proyecto **No. LOZP-NAT14-G**

Este trabajo recibió fondos del proyecto “Ciencia Básica CONACYT” **CB-2012-01/No.178942** bajo la responsabilidad de la **Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia**.

A la **D.C. Carmen Torres Manrique** del grupo de investigación de Ecología Molecular de la Resistencia a Antimicrobianos y Seguridad Alimentaria, del Departamento de Agricultura y Alimentación; Área: Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de la Rioja, Logroño, España, por su valiosa colaboración para la obtención de la secuencia tipo de los aislados

A la **D.C. Yolanda Sáenz Domínguez**, investigadora del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España, por su valiosa aportación para el estudio y análisis de los integrones.

Al **Doctor José Fernando Huerta Romano** del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE de la Ciudad de México, por la donación de aislados clínicos.

A la **Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores** del Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla, por la donación de aislados clínicos.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A los miembros de la **Comisión Revisora**:

**Dr. Miguel Castañeda Lucio**

**Dr. Gerardo Santos López**

**M.C. Cristina Lara Ochoa**

**Dra. María Cristina González Vázquez**

Por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y por la confianza depositada en mí, por su apoyo, motivación, consejos y paciencia para la elaboración de esta tesis.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por el apoyo y consejos brindados para la culminación de esta tesis.

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, **M.C. Cristina Lara Ochoa** y al **D.C. Gerardo Santos López** por sus consejos y su paciencia en cada Tutorial.

A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas** por sus comentarios, sugerencias y por darme siempre ánimos y palabras de aliento.

A la **D.C. Yolanda Sáenz** por su apoyo para el estudio de los integrones.

A la **M.C. María Eleno Bello López** por su amistad, por su colaboración para la caracterización de los integrones y la obtención de las secuencias tipo, por sus consejos y enseñanzas para guiarme en el misterioso mundo de las *Pseudomonas*.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

### A mis padres:

**María Isabel**, mi ejemplo de amor incondicional, gracias por haberme dado la vida, por acompañarme en cada paso siempre con el mismo entusiasmo, por enseñarme que siempre hay algo nuevo que aprender, y que cada piedra en el camino, no es más que un escalón en la escalera del éxito.

**Francisco**, mi luchador incanzable, gracias por enseñarme que el carácter, la determinación, la constancia y el amor por lo que haces es fundamental para alcanzar tus sueños y que aquello que parece el fin, puede representar un nuevo comienzo.

### A mi hermana:

**Sandra Gabriela**, mi eterna niña, gracias por robarme siempre una sonrisa, por los momentos de diversión, por los regaños, por abrazarme cuando más me hace falta, por secar mis lágrimas y sobre todo por darme el mejor regalo del mundo, "**K**".

### A mi abuelito:

**Francisco**, porque sé que desde donde esté, continúa iluminando mi camino.

***Gracias por alentarme aún en las pruebas más difíciles, porque sin ustedes ningún esfuerzo valdría la pena.***

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Aime, Emilio, Angie, Isa, Tatiana, Gerardo, Olinca, Enrique, Jessy y Caro**, por compartir estrés, regaños pero sobre todo risas y buenos momentos. A **Alma, Olinca y Elena** por su amistad y por el excelente equipo que formamos, siempre dándonos consejos y ánimos para continuar a pesar de tantos contratiempos.

*Un largo camino por vivir...  
grandes amores que conocer...  
momentos difíciles por afrontar...  
y una sola vida tan corta...*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES GENERALES</b>	<b>4</b>
2.1 Multiresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	4
2.1.1 Mecanismos de resistencia	4
2.1.2 Impermeabilidad de membrana y pérdida de porinas	6
2.1.3 Bombas de expulsión	8
2.1.4 Inactivación y modificación de antibióticos	10
2.1.4.1 Beta-lactamasas	10
2.1.4.2 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	12
2.1.5 Cambio en sitios blanco	13
2.2 Papel de los integrones en la diseminación de la resistencia	13
2.3 Genotipificación	15
2.3.1 Multilocus Sequence Typing (MLST)	16
2.3.2 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	17
2.3.2.1 Estudios de genotipificación por PFGE a nivel internacional y nacional	19
<b>3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b>	<b>23</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos particulares	26
<b>6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO</b>	<b>27</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
7.1 Condiciones éticas	28
7.2 Microorganismos en estudio	28
7.3 Cepas control	29
7.4 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	30
7.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar	32
7.6 Amplificación de genes de resistencia por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
7.6.1 Extracción de DNA	34
7.6.2 Amplificación de genes codificantes para beta-lactamasas, reguladores de bombas de expulsión y porina OprD	34
7.6.3 Caracterización de integrones de clase 1 mediante la estrategia de "primer walking" y amplificación de regiones variables	39
7.6.4 Visualización de los productos de PCR	41
7.6.5 Secuenciación de los productos de PCR	41
7.6.6 Análisis de las secuencias	41
7.7 Determinación de la secuencia tipo (MLST) de algunos aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>45</b>

8.1 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	<b>45</b>
8.1.1 Aislados de <i>P. aeruginosa</i> del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE de la Ciudad de México	<b>45</b>
8.1.2 Aislados de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla	<b>47</b>
8.2 Amplificación de beta-lactamasas tipo IMP, GES y PSE	<b>50</b>
8.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	<b>51</b>
8.4 Identificación de genes de resistencia de los 7 aislados seleccionados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla	<b>52</b>
8.5 Amplificación de los genes reguladores de las bombas de expulsión MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM.	<b>53</b>
8.6 Amplificación y análisis del gen codificante de la porina OprD	<b>57</b>
8.7 Determinación de la estructura de integrones de clase 1	<b>59</b>
8.7.1 Amplificación de los genes conservados de integrones clase 1 ( <i>intl1</i> , <i>qacEΔ1</i> y <i>sul1</i> ) en <i>P. aeruginosa</i>	<b>59</b>
8.7.2 Amplificación de la región variable de integrones clase 1	<b>59</b>
8.8 Genotipificación por MLST de algunos aislados en estudio	<b>65</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>106</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Funciones y posiciones en el genoma de los 7 genes usados en el esquema de tipificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	17
2	Cepas utilizadas como controles	29
3	Antibióticos evaluados en la determinación de CMI	33
4	Puntos de corte de CMI para <i>P. aeruginosa</i>	33
5	Componentes para PCR con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase	35
6	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los diferentes genes de resistencia	35
7	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los Reguladores de Bombas de Expulsión	38
8	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar la porina OprD	39
9	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para el estudio de integrones	40
10	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos para el estudio de integrones por “ <i>primer walking</i> ”	40
11	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los genes “ <i>housekeeping</i> ” para MLST	42
12	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos empleados para secuenciar los genes “ <i>housekeeping</i> ” para MLST	43
13	Fenotipo y genotipo de resistencia, y CMI de 7 aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	53
14	Fenotipo de resistencia, CMI, genotipo y cambios en reguladores de bombas de expulsión de 7 aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	56
15	Fenotipo de resistencia, y cambios aminoacídicos en los <i>loops</i> de la proteína oprD de 7 aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	58
16	Perfil alélico y secuencia tipo de los aislados PE06 y PE52	66
17	Resumen de las características de los aislados en estudio y sus mecanismos de resistencia	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Representación esquemática de la estructura terciaria de la porina OprD de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	7
2	Organización genética de <i>mexR-mexAB-oprM</i> , <i>mexTmexEF-oprN</i> , <i>nfxB-mexCD-oprJ</i> y <i>mexZ-mexXY</i> de <i>P. aeruginosa</i>	9
3	Representación esquemática de un integrón de clase 1 y un modelo para la adquisición del gen cassette	15
4	Perfil de PFGE de aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México	45
5	Dendograma de similitud de 21 aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México	46
6	Perfil de PFGE de aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla	48
7	Dendograma de similitud de 25 aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla.	49
8	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificadas del gen <i>bla<sub>IMP</sub></i> para diversos aislados de <i>P. aeruginosa</i> en estudio del H.R. ISSSTE de la Cd. de Puebla.	50
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificadas del gen <i>bla<sub>GES</sub></i> para diversos aislados de <i>P. aeruginosa</i> en estudio del H.R. ISSSTE de la Cd. de Puebla.	50
10	Porcentaje de amplificación para los genes <i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>PSE</sub></i> y <i>bla<sub>GES</sub></i> en los aislados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla.	51
11	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificadas de genes reguladores de bombas de expulsión	54
12	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificadas de los genes de las regiones conservadas en integrones de clase 1	59
13	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de la región variable en los aislados seleccionados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla	60
14	Esquema parcial de los integrones encontrados en los aislados PE06 y PE52 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	61
15	Análisis de electroferograma para confirmar alelo del gen <i>imp-18</i> en el aislado PE52	62
16	Esquema de los integrones de clase 1, encontrados en el aislado PE52 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	63
17	Esquema de los integrones parcialmente secuenciados encontrados en el aislado PE21 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	64
18	Esquema de los integrones parcialmente secuenciados encontrados en el aislado PE21 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla	65

## ABREVIATURAS

AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BLEE	Beta-Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CB	Carbenicilina
CF	Cefalotina
CIP	Ciprofloxacino
CL	Colistina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMN	Centro Médico Nacional
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxiribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FEP	Cefepime
GM	Gentamicina
HR	Hospital Regional
IPM	Imipenem
MDR	Multidrug resistant
MEM	Meropenem
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
ml	Mililitro
MLST	Multilocus sequence typing
NET	Netilmicina
NOR	Norfloxacina
OFX	Ofloxacina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> )
PIP	Piperacilina
PT	Pulsotipo
pM	Picomol o Picomolar
Rpm	Revoluciones por minuto
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TIC	Ticarcilina
TIM	Ticarcilina/Ácido clavulánico
TZP	Piperacilina/Tazobactam
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
µg	Microgramo
µl	Microlitro

## RESUMEN

La versatilidad de *Pseudomonas aeruginosa* para sobrevivir bajo ambientes nutricionales mínimos, su capacidad de adaptación y los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos con los que cuenta, la hacen uno de los patógenos nosocomiales más importantes. El objetivo del presente trabajo fue determinar la relación genética por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) de 21 aislados de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes (MDR) del año 2009 del Centro Médico Nacional (CMN) "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México y 25 aislados MDR recolectados durante 2013-2014 en el Hospital Regional (HR) ISSSTE de la Cd. de Puebla. Se seleccionaron algunos aislados de este último hospital para estudiar la presencia de mecanismos de resistencia.

La electroforesis en el de campos pulsados de los aislados del CMN "20 de Noviembre", mostraron 21 pulsotipos (PT) y 4 grupos genéticamente relacionados: grupo A (Ps87 y Ps89), grupo B (Ps33 y Ps35), grupo C (Ps62 y Ps48) y grupo D (Ps49, Ps65 y Ps39). Los aislados del HR ISSSTE, mostraron 25 PT y 2 grupos genéticamente relacionados: grupo A (PE25, PE45 y PE48) y grupo B (PE09 y PE16), los aislados PE20 y PE26; PE09, PE16, PE15, PE10 y PE19 se clasificaron como posiblemente relacionados. De los 25 aislados de este hospital, el 40% portó el gen *bla<sub>IMP</sub>* y el 24% el gen *bla<sub>GES</sub>*. Para el estudio completo de los mecanismos involucrados en su multiresistencia se seleccionaron 7 aislados pertenecientes a 4 pacientes, con resistotipo diferente y sin relación genética por PFGE. PE02 (18/04/13, lavado bronquial) y PE20 (19/08/13, expectoración) aislados de un mismo paciente; PE06 (10/05/13) y PE52 (14/01/14) de urocultivo del mismo paciente; PE26 (expectoración) y PE30 (urocultivo), aisladas el 17/09/13 de un mismo paciente; y PE21 aislada de expectoración el 20/08/13. El 100% (7) de los aislados portó *bla<sub>OXA-50</sub>*; 85.7% portó *bla<sub>OXA-2</sub>*; el 42.8% portó *bla<sub>IMP-18</sub>*, 14.2% portó *bla<sub>IMP-15</sub>*; y 42.8% amplificaron para *bla<sub>GES</sub>*, de los cuales 2 aislados portaron *bla<sub>GES-2</sub>* y uno presenta una variante aún no determinada; 71.4% amplificaron para *aac-6'-Ib*. Todos los aislados presentaron resistencia a todos los antibióticos probados por concentración mínima inhibitoria (CMI), excepto para colistina, y en el caso de PE02 para ceftazidima y amikacina. Se presentaron mutaciones en los reguladores de bombas de expulsión MexR (PE06 y PE52), MexT (PE20, PE06, PE52, PE30 y PE21) y MexZ (PE06, PE52 y PE21), ninguna reportada como relacionada con la resistencia a los antibióticos. Los aislados PE06, PE52 y PE21 presentaron el *loop* 7 corto (L7-short) en la porina OprD, relacionado con aumento en la sensibilidad a meropenem, además presentan codones de paro tempranos en el *loop* 8. El aislado PE20 presenta una secuencia de inserción IS1394 truncando la proteína OprD. PE06, PE52 y PE21 presentaron integrones de clase 1; PE21, dos integrones parcialmente secuenciados con estructura: *intl1*, *aadA6*, ¿?, *qacEΔ1*, *sul1* y *intl1*, *aacA7*, *imp-15*, ¿?, *orfD*, *qacEΔ1*, *sul1*. PE06 (ST308), dos integrones

parcialmente secuenciados: *int1*, *aac6'-lb*, *¿?*, *oxa-2*, *aadA1*, *qacEΔ1*, *sul1* y *int1*, *imp-18*, *¿?*, *qacEΔ1*, *sul1*. PE52 (ST385), dos integrones: *int1*, *imp-18*, *aadA1*, *oxa-2*, *qacEΔ1*, *sul1* (In1215) y *int1*, *imp-18* like, *aadA1*, *oxa-2*, *qacEΔ1*, *sul1* (In1218). En este trabajo se observó que aislados de un mismo paciente con características fenotípicas y genotípicas de resistencia muy similares pueden no tener relación genética o no pertenecer a la misma clona. Por ello es importante realizar el estudio global de la relación genética, fenotipo de resistencia y los mecanismos de resistencia presentes en aislados de *P. aeruginosa* provenientes de un mismo hospital para conocer la diversidad de cepas circulantes y la posterior toma de decisiones

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), reguladores de bombas de expulsión, porina OprD, integrones.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una infección nosocomial puede definirse como una infección contraída en el hospital por un paciente internado por una razón distinta a esa infección; es decir, una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internamiento. También, comprende a las infecciones contraídas en el hospital, pero que se manifiestan después del alta hospitalaria, así mismo involucra a las infecciones ocupacionales del personal de salud (Ducel *et al.*, 2003)

La aparición y propagación de la resistencia a antimicrobianos y la escasez de agentes antimicrobianos en investigación contra patógenos MDR (*multidrug resistant*) han aumentado la preocupación de que estas infecciones puedan llegar a ser inmanejables debido a la falta de terapia antibacteriana eficaz (Rice, 2010). La resistencia a antimicrobianos incrementa la estancia hospitalaria, mortalidad, morbilidad, y los costos económicos asociados (Lister *et al.*, 2009; Sandiumenge, 2011).

La mayoría de los problemas de resistencia a antibióticos en los hospitales están concentrados en un número limitado de géneros y especies bacterianas, que en el 2008 Rice, agrupó con el acrónimo “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Enterobacter*) (Boucher *et al.*, 2009) debido a su capacidad para “escapar” de los efectos de los antimicrobianos y los cuales están involucrados en más del 40% de las infecciones en pacientes en unidades de cuidados intensivos, representando nuevos paradigmas en patogénesis y resistencia (Boucher *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2012; Rice, 2010; Sandiumenge, 2011) . Sin embargo en 2009, se propuso que el término ESKAPE sea cambiado a ESCAPE, para abarcar más ampliamente a todos los patógenos problemáticos actuales que desafían la eficacia de los tratamientos de

enfermedades infecciosas; en este acrónimo, se incluye a *Clostridium difficile* como la nueva "C" y a las enterobacterias como la nueva "E" final. Ésta terminología ESCAPE, abarca no sólo a *K. pneumoniae* (la antigua K), y especies de *Enterobacter* (la antigua "E" final), sino también a otros patógenos importantes que pueden expresar niveles crecientes de resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (*E. coli* y especies de *Proteus*) (Peterson, 2009).

La emergencia del panel ESCAPE, y la tendencia creciente de resistencia a los antimicrobianos hacen que la vigilancia mundial y regional de estos microorganismos sea fundamental para el control de las infecciones que ocasionan (Llaca-Díaz *et al.*, 2012).

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo, Gram negativo, no fermentador de glucosa, clasificado como aerobio facultativo, sobrevive en condiciones microaeróbicas como las de la mucosa de pacientes pulmonares con fibrosis quística (Curran *et al.*, 2004; Gomila *et al.*, 2013), esta bacteria es encontrada con poca frecuencia como parte de la microbiota de individuos inmunocompetentes (axilas, periné, tracto respiratorio, faringe 0-6,6% y en las heces 2,6-24%) (Corona-Nakamura *et al.*, 2001; Yetkin *et al.* 2006).

La versatilidad nutricional de *Pseudomonas* le permite sobrevivir en ambientes extremos, tales como soluciones antimicrobianas en los hospitales. Estas bacterias permanecen durante largos períodos en líquidos y superficies (jabones, esponjas, bañeras, fregaderos, termómetros orales, equipos de inhalación, líquidos de diálisis, grifos de agua, nutrición parenteral y ropa), y se ha aislado de equipos de soluciones de irrigación, catéteres, por lo que estas fuentes sirven de reservorios y pueden servir como foco de diseminación de *P. aeruginosa* (Curran *et al.*, 2004; Yetkin *et al.*, 2006).

La resistencia intrínseca que presenta *P. aeruginosa* contra muchos antibióticos, explican su papel como un importante patógeno nosocomial (Gomila *et al.*, 2013), principalmente causando neumonías asociadas a ventilador, infección en sitio quirúrgico, infecciones del tracto urinario y sepsis en pacientes en unidad de cuidados intensivos (Corona-Nakamura *et al.*, 2001; Fariñas & Martínez, 2013; Yetkin *et al.*, 2006), así mismo está asociada con altos rangos de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Curran *et al.*, 2004).

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1 LA MULTIRESISTENCIA EN *P. aeruginosa*

La multiresistencia a los antibióticos es un fenómeno microbiológico natural, a través del curso de miles de millones de años las bacterias han desarrollado mecanismos para prevenir la entrada, expulsar o destruir, compuestos estructuralmente similares a los antibióticos clínicamente usados en la actualidad. Desde los albores de la "era de los antibióticos", dos factores principales han exacerbado el aumento de la resistencia global: el mal uso de los antibióticos y la propagación de microorganismos resistentes. Estas acciones no sólo han provocado la emergencia de microorganismos resistentes, sino que también proveen medios ambientes óptimos para la propagación y selección de determinantes de resistencia.

La resistencia surge endógenamente a través de mutaciones puntuales aleatorias en el cromosoma, debidas a concentraciones subterapéuticas de antibióticos que incrementan la variabilidad genética y selección de cepas resistentes, o de forma exógena mediante la transferencia horizontal de genes a través de elementos genéticos móviles o la recombinación de DNA externo con el cromosoma (Pendleton *et al.*, 2013). Ante opciones terapéuticas limitadas para infecciones por *P. aeruginosa* MDR en pacientes críticos, es una prioridad realizar un seguimiento estricto y periódico de los patrones de resistencia que se presentan en cepas de origen hospitalario que puedan contribuir a su vigilancia epidemiológica (Fariñas & Martínez, 2013; Gomila *et al.*, 2013; Lister *et al.*, 2009; Obritsch *et al.* 2005)

#### 2.1.1 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* pueden clasificarse en:

## 1. Resistencia intrínseca

Comprende los mecanismos de resistencia que existen naturalmente en los miembros de una especie bacteriana determinada, los cuales se expresan aún sin la exposición a los antibióticos (Guevara *et al.*, 2012). En *P. aeruginosa* los mecanismos de resistencia intrínseca son los siguientes:

- a) Debida a la baja permeabilidad de su pared celular (Henrichfreise *et al.*, 2007; Lambert, 2002; Pendleton *et al.*, 2013; Strateva & Yordanov, 2009).
- b) Tiene la capacidad genética para expresar un amplio repertorio de mecanismos de resistencia como las bombas de expulsión (Henrichfreise *et al.*, 2007; Lambert, 2002; Strateva & Yordanov, 2009).
- c) Producción de enzimas degradadoras o modificadoras de antibióticos (Guevara *et al.*, 2012).

## 2. Resistencia adquirida

Implica la adquisición de información genética nueva, bien sea a través de mutaciones en genes (Guevara *et al.*, 2012; Henrichfreise *et al.*, 2007; Lambert, 2002; Lister *et al.*, 2009) o por la adquisición de elementos genéticos móviles que contienen genes que codifican diversos mecanismos de resistencia (Guevara *et al.*, 2012; Lambert, 2002; Lister *et al.*, 2009):

- a) Desrepresión de beta-lactamasas AmpC
- b) Pérdida de porinas
- c) Sobre-expresión de bombas de expulsión
- d) Modificación de las proteínas de unión a las penicilinas (PBP)
- e) Producción de enzimas degradadoras o modificadoras de antibióticos.
- f) Modificación del sitio de acción antimicrobiano.

Hay tres mecanismos básicos mediante los cuales los microorganismos resisten a la acción de agentes antimicrobianos: impermeabilidad de la membrana externa y

pérdida de porinas, bombas de expulsión, inactivación y modificación de antibióticos, los cuales son descritos a continuación.

### 2.1.2 Impermeabilidad de membrana y pérdida de porinas

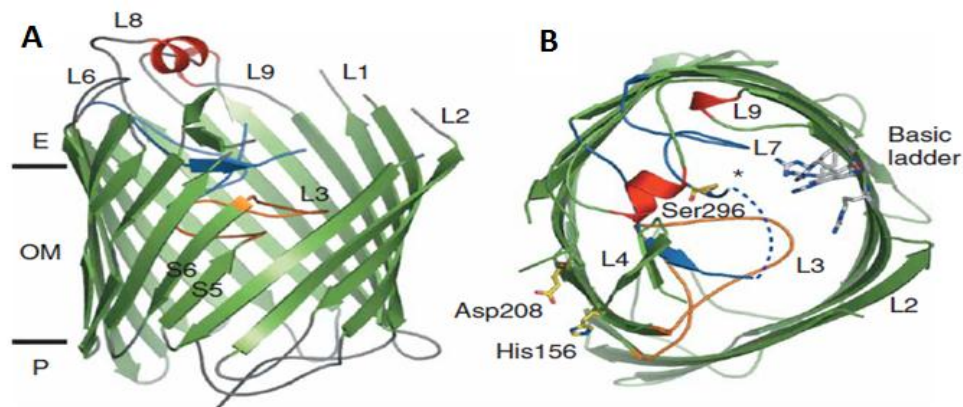
La membrana externa de *P. aeruginosa* presenta una barrera significativa a la penetración de antibióticos, restringiendo la tasa de penetración de moléculas hidrofílicas y excluyendo a las moléculas grandes.

Los antibióticos hidrofílicos pequeños como los  $\beta$ -lactámicos y las quinolonas sólo pueden cruzar la membrana externa pasando a través de canales acuosos provistos por porinas. Las porinas son moléculas proteicas en forma de barril que abarcan la membrana externa, usualmente asociadas como trímeros. *P. aeruginosa* contiene en su membrana 64 porinas que forman canales y de las cuales las más estudiadas son: OprB, OprC, OprD, OprE, OprF, OprJ, OprM, OprN (Guevara *et al.*, 2012).

La porina OprF está presente en todas las cepas de *P. aeruginosa* y es la principal responsable de conferirle a la membrana características de impermeabilidad (Guevara *et al.*, 2012), su pérdida ocasiona una ligera elevación de la concentración mínima inhibitoria de los beta-lactámicos y las fluoroquinolonas (Lambert, 2002). Las porinas OprJ, OprM y OprN son de tipo inducible y generalmente están unidas a proteínas transportadoras formando bombas de expulsión, mientras que las porinas OprC y OprE constituyen canales inespecíficos utilizados por algunos antibióticos (Guevara *et al.*, 2012).

La porina OprD de *P. aeruginosa* facilita la difusión de aminoácidos básicos, péptidos pequeños y carbapenémicos al interior de la célula (Biswas *et al.*, 2007; Rojo-Bezares *et al.*, 2014), por tanto la pérdida o modificación de esta porina disminuye significativamente la susceptibilidad a los carbapenémicos (Fariñas & Martínez, 2013; Rojo-Bezares *et al.*, 2014) y por ello es clínicamente importante. La porina OprD es una proteína de 443 aminoácidos (Rojo-Bezares *et al.*, 2014)

compuesta por 16 láminas  $\beta$ -antiparalelas que forman un barril, conectadas por 7 *loops* cortos en el lado periplásmico (Li *et al.*, 2012; Ochs *et al.*, 2000) y 8 *loops* de tamaño variable (pero más largos que los periplásmicos) en la superficie de la célula (Huang *et al.*, 1995) (Figura 1). Los *loops* externos 2 y 3 están involucrados en el paso de imipenem, por lo tanto cualquier sustitución o deleción aminoacídica dentro de éstos produce cambios en la conformación, lo que puede ocasionar resistencia a este antibiótico. Además la deleción de los *loops* 5, 7 y 8 resulta en un incremento en la susceptibilidad a beta-lactámicos, quinolonas, cloranfenicol y tetraciclina, indicando que estos *loops* podrían reducir la acumulación intracelular de algunos antibióticos (Huang & Hancock, 1996; Li *et al.*, 2012). Por otro lado se ha descrito que la deleción de 2 aminoácidos en la región 372 a 383 del *loop* 7 (MSDNNVGYKKNYG), nombrado L7-corto (VDSSSSYAGL) (Rojo-Bezares *et al.*, 2014) está involucrado en la susceptibilidad a meropenem en cepas clínicas (Epp *et al.*, 2001).



**Figura 1. Representación esquemática de la estructura terciaria de la porina OprD de *Pseudomonas aeruginosa*.** Vista lateral (A) y vista desde el medio extracelular (B). Verde, láminas  $\beta$  antiparalelas; gris, *loops* y curvas; rojo:  $\alpha$ -hélices; naranja y azul: constricción del poro, *loops* 3 y 7, respectivamente. Los *loops* han sido suavizados para mayor claridad. La línea punteada en la vista extracelular representa el segmento del *loop* 7 no visible en la estructura. Las láminas  $\beta$  cortas S5 y S6 están indicadas. E, espacio extracelular; OM: membrana externa; P: espacio periplásmico. Tomado de Biswas *et al.*, 2007.

### 2.1.3 Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma de la bacteria, sustancias que pueden ser tóxicas o nocivas para la integridad celular, incluyendo productos metabólicos e incluso antibióticos (Díaz *et al.*, 2009; Guevara *et al.*, 2012; Lambert, 2002).

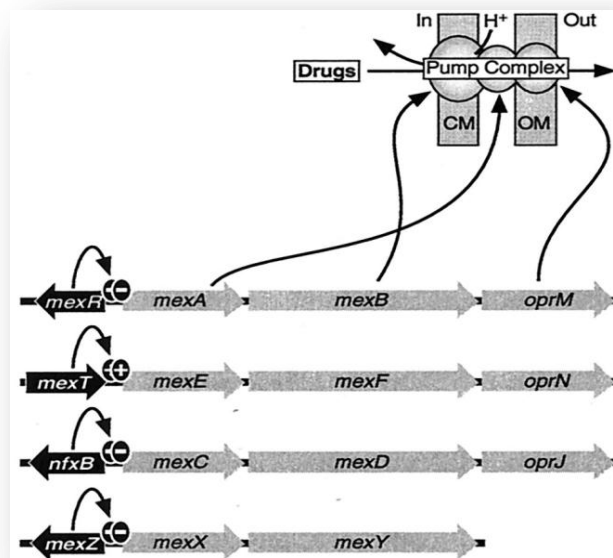
Los sistemas de bombas de expulsión son complejos proteicos que utilizan iones (protones) y ATP como energía para su funcionamiento. Las bombas de expulsión conocidas hasta ahora pertenecen a seis familias: MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Modulation Cell Division), MATE (*Multidrug And Toxic Compounds Extrusion*), ABC (*ATP Binding Cassette*) y DMT (*Drug/Metabolite Transporter*) (Díaz *et al.*, 2009; Guevara *et al.*, 2012).

Las bombas de expulsión de la familia RND están conformadas por tres elementos: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna o citoplasmática (MexB, MexD, Mex F, MexY, MexK, MexI o MexW), una porina ubicada en la membrana externa (OprM, OprJ, OprN, OprD) y una proteína periplásmica accesoria (MexA, MexC, MexE, MexX, MexJ, MexH o MexV), la cual acopla los dos componentes de membrana. Algunas bombas pueden estar conformadas por proteínas de la membrana externa en lugar de porinas, tales como OpmD, OpmE, OpmG, OpmH, Opml (Guevara *et al.*, 2012; Lambert, 2002; Tenover, 2006).

Se han identificado en esta bacteria once sistemas de expulsión pertenecientes a la familia RND: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW-OprM, MexMN, MexPQ-OpmE, TriABC y Mux ABC-OmpB (Guevara *et al.*, 2012; Schweizer, 2003). Sin embargo, sólo cuatro diferentes sistemas de bombas de esta familia han sido descritas en *P. aeruginosa* las cuales contribuyen significativamente a su resistencia antimicrobiana: MexAB-

OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN (Henrichfreise *et al.*, 2007; Lambert, 2002).

Mutaciones en los genes reguladores de estas bombas de expulsión (Figura 2), pueden causar su sobre-expresión, desencadenando resistencia a ciertos antibióticos. Todas las clases de antibióticos excepto las polimixinas son susceptibles a la eliminación por uno o más de los sistemas de bombas de expulsión. MexAB-*oprM* es responsable de la eliminación de beta-lactámicos, quinolonas, un amplio rango de desinfectantes, colorantes y detergentes (Lambert, 2002), y puede también asociarse con la resistencia a sulfonamidas, cefalosporinas, macrólidos, novobiocina, cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprim, y en cierta medida, meropenem (aunque no imipenem) (Fariñas & Martínez, 2013; Pendleton *et al.*, 2013). Otras bombas, como MexCD-OprJ y MexEF-OprN también confieren resistencia a las fluoroquinolonas y algunos beta-lactámicos, mientras que MexXY-OprM está asociada con la resistencia a aminoglucósidos (Pendleton *et al.*, 2013).



**Figura 2. Organización genética de *mexR-mexAB-oprM*, *mexT-mexEF-oprN*, *nfxB-mexCD-oprJ* y *mexZ-mexXY* de *P. aeruginosa*.** Cada operón contiene genes (flechas grises) que codifican un complejo de expulsión de fármaco y está regulada por el producto de un gen río arriba (flechas negras) que reprime (-) o activa (+) la expresión del operón. Tomado de Grkovic *et al.*, 2002.

## 2.1.4 Inactivación y modificación de antibióticos

*P. aeruginosa* tiene la capacidad de producir una gran cantidad de enzimas codificadas por genes que se encuentran en el cromosoma de la bacteria o en elementos extra-cromosómicos.

En *P. aeruginosa* existen dos grupos de enzimas capaces de inactivar o modificar antibióticos, la mayoría se clasifican en el grupo de las beta-lactamasas, donde se incluyen las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), oxacilinasas, carbapenemasas y la beta-lactamasa cromosómica AmpC, las cuales en general hidrolizan antibióticos beta-lactámicos. El otro grupo lo conforman las enzimas modificadoras de aminoglucósidos AME (*aminoglycoside modification enzyme*), donde se encuentran las enzimas aminoglucósido nucleotidiltransferasa (ANT), aminoglucósido acetiltransferasa (AAC) y aminoglucósido fosforiltransferasa (APH) (Díaz *et al.*, 2009).

### 2.1.4.1 Beta-lactamasas

La principal causa de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos es la presencia de beta-lactamasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo beta-lactámico produciendo moléculas carentes de actividad antibacteriana (Díaz *et al.*, 2009; Garau *et al.*, 2005).

Las beta-lactamasas son ubicuas de las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican a estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones (Tafur & Villegas, 2008).

Las beta-lactamasas comúnmente son clasificadas de acuerdo a dos esquemas generales: la clasificación Ambler y el sistema de clasificación funcional Bush-Jacoby-Medeiros. El esquema Ambler se basa en la homología de la

secuencia aminoacídica y no en características fenotípicas, y divide a las beta-lactamasas en cuatro clases principales (A a D). En esta clasificación, las beta-lactamasas clase A, C y D son serin-beta-lactamasas, las cuales actúan a través de un mecanismo dependiente de serina para catalizar la hidrólisis, mientras que las enzimas clase B son metalo-beta-lactamasas (MBL), que requieren un ión divalente ( $Zn^{2+}$ ) en el sitio activo para ejercer su acción (Bush & Jacoby, 2010; Díaz *et al.*, 2009; Garau *et al.*, 2005; Livermore, 1995; Paterson & Bonomo, 2005). La clasificación Bush-Jacoby-Medeiros agrupa a las beta-lactamasas de acuerdo a similitudes funcionales, como la afinidad al sustrato y perfiles de inhibición. En este sistema hay cuatro grupos principales y múltiples subgrupos, y fue propuesto inicialmente por Bush en 1989 y ampliado en 1995 (Bush & Jacoby, 2010; Paterson & Bonomo, 2005).

#### **a) Metalo-beta-lactamasas**

*P. aeruginosa* productora de metalo-beta-lactamasas (MBL) fue reportada por primera vez en Japón en 1991 y ha sido descrita en varias partes del mundo, incluyendo Asia, Europa, Australia, Sur y Norte América. Cuatro principales familias han sido identificadas en *P. aeruginosa* (IMP, VIM, GIM y SPM) y tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de agentes beta-lactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, exceptuando aztreonam (Lister *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2008; Pitout *et al.*, 2005). Además, como se mencionó anteriormente, estas enzimas requieren Zinc para ejercer su actividad catalítica y son inhibidas por agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los genes responsables de la producción de MBL típicamente forman parte de un integrón y son transportados en plásmidos (Pitout *et al.*, 2005).

#### **b) Serin-beta-lactamasas**

Las beta-lactamasas más comunes encontradas en aislados de *P. aeruginosa* son las penicilinasas, pertenecientes al grupo molecular A de las serin-beta-lactamasas (familias PSE, CARB y TEM). Dentro de este grupo, las enzimas pertenecientes a

la familia PSE (PSE-1 y PSE-4) son las más frecuentemente encontradas en *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009; Livermore, 2002). El impacto terapéutico de estas enzimas es relativamente limitado ya que no afecta la eficacia clínica de cefalosporinas de espectro extendido, monobactams o carbapenems (Lister *et al.*, 2009).

Aunque menos frecuente, la clase A de beta-lactamasas de espectro extendido ha sido detectada en cepas de *P. aeruginosa* e incluyen a las enzimas de las familias TEM, SHV, CTX-M, PER, BEL, VEB, GES e IBC; siendo TEM, SHV y CTX-M las más prevalentes. Usualmente, las BLEE tipo TEM y SHV hidrolizan a ceftazidime con mayor eficiencia que a ceftriaxona o cefotaxima, mientras que las enzimas CTX-M, usualmente, hidrolizan cefotaxima y ceftriaxona más rápidamente que ceftazidima. CTX-M también hidroliza cefepime con gran eficiencia y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) son mayores que las observadas en otros productores de BLEE (Lister *et al.*, 2009; Tafur & Villegas, 2008).

Beta-lactamasas de espectro extendido de clase D (enzimas tipo OXA) han sido también encontradas en *P. aeruginosa*. La primera identificación de una carbapenemasa importada tipo OXA en *P. aeruginosa* fue reportada en 2008, y mostró ser la misma carbapenemasa OXA-40 descrita previamente en *A. baumannii* (Lister *et al.*, 2009). Además, carbapenemasas clase A de la familia KPC han sido identificadas, la primera *P. aeruginosa* productora de KPC fue reportada en Colombia en el año 2007 (Lister *et al.*, 2009).

#### **2.1.4.2 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos**

La inactivación de aminoglucósidos ocurre a través de la producción de enzimas modificadoras, las cuales transfieren grupos acetilo, fosfato o adenilo a sustituyentes amino e hidroxilo en los antibióticos. Antes del reconocimiento de que los aminoglucósidos podían ser eliminados por las bombas de expulsión, la inactivación era considerada como el principal mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos. Las enzimas modificadoras usan cofactores citoplasmáticos

como la acetil co-enzima A o ATP, para suministrar los sustituyentes añadidos a los aminoglucósidos, por lo que el proceso de modificación ocurre en el citoplasma. Las enzimas modificadoras están mediadas por plásmidos, por lo que mutaciones espontáneas en las células durante el tratamiento antibiótico no conduce a la sobre-expresión de las enzimas (Lambert, 2002).

### **2.1.5 Cambio en sitios blanco**

*P. aeruginosa* presenta frecuentemente resistencia a fluoroquinolonas a través de la mutación en el gen que codifica la enzima diana, DNA girasa y/o topoisomerasa IV, enzimas bacterianas involucradas en la regulación de la topología del DNA durante la replicación y transcripción (Díaz *et al.*, 2009; Fariñas & Martínez, 2013; Lambert, 2002; Pendleton *et al.*, 2013). Las modificaciones en estas enzimas se producen por mutaciones puntuales en los genes cromosomales *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, los cuales codifican para las subunidades de la DNA girasa y topoisomerasa IV, respectivamente (Díaz *et al.*, 2009).

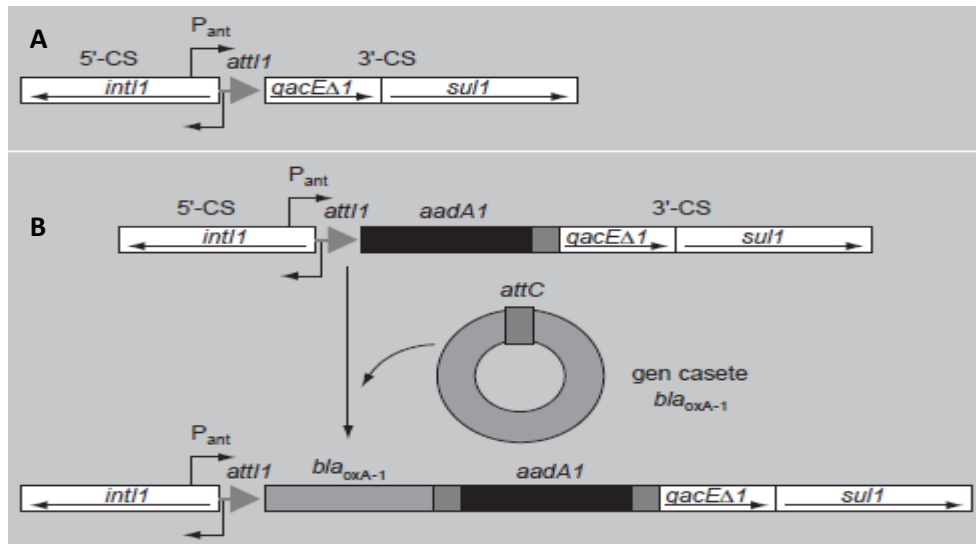
## **2.2 PAPEL DE LOS INTEGRONES EN LA DISEMINACIÓN DE LA RESISTENCIA**

En décadas recientes han sido identificados varios mecanismos genéticos involucrados en la diseminación de genes de resistencia entre bacterias. Uno de estos mecanismos son los integrones, que son elementos genéticos que tienen la capacidad de adquirir, intercambiar y expresar genes insertados en cassetes (Stalder *et al.*, 2012). Estos fueron descritos por primera vez a finales de los años 80, inicialmente en aislados clínicos de humanos; sin embargo han sido identificados también en ambientes no clínicos, como agua y suelo (Domingues *et al.*, 2012). Los integrones están ampliamente distribuidos, principalmente en bacterias Gram negativas y son transportados por elementos genéticos móviles, plásmidos y transposones, los cuales promueven su propagación dentro de comunidades bacterianas (Stalder *et al.*, 2012).

Los integrones están formados por un segmento conservado 5' (5'CS), compuesto por tres elementos: el gen que codifica para una tirosín recombinasa (integrasa, codificada por el gen *intI*), necesaria para la recombinación sitio específica dentro de un integrón; el sitio adyacente de recombinación (*attI*), que es reconocido por la integrasa; y el promotor ( $P_c$ ), localizado corriente arriba del sitio de integración, necesario para la transcripción y expresión eficientes de los cassettes génicos presentes en el integrón (Di Conza & Gutkind, 2010; Domingues *et al.*, 2012; Stalder *et al.*, 2012).

La clasificación de los integrones se basa en la secuencia de la integrasa. Actualmente, se conocen nueve clases. Los miembros de la clase 1, 2 y 3, contienen genes de resistencia a los antibióticos; los de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen genes que no codifican la resistencia a antibióticos, el integrón de clase 9 contiene un sólo gen de resistencia a antibióticos y otros genes de función desconocida, mientras que el integrón de clase 8 no presenta ningún gen (Sabaté & Prats, 2002).

Los integrones de clase 1 son los más prevalentes en aislamientos clínicos, y están asociados con multiresistencia, se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias Gram negativas, y están asociados con multiresistencia. Actualmente han cobrado una gran importancia, no sólo por el amplio espectro de bacterias en las que han sido encontrados, sino también por su frecuente nexa con cassettes que codifican distintas metalo-beta-lactamasas. Estos integrones contienen dos segmentos conservados que flanquean una región central (región variable), donde se insertan los cassettes que codifican la resistencia a antibióticos. El segmento 5'CS común para todas las clases de integrones, pero con el gen de la integrasa *intI1*; y el segmento 3' conservado (3'CS) en los integrones clase 1, que en general incluye un gen que codifica resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacE $\Delta$ 1*), un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*), y un marco de lectura abierto (*orf5*) de función desconocida (Figura 3) (Carattoli, 2001; Di Conza & Gutkind, 2010; Stalder *et al.*, 2012).



**Figura 3. Representación esquemática de un integrón de clase 1 y un modelo para la adquisición del gen cassette.** A) Integrón de la clase 1 con la estructura común a todos los integrones en posición 5' (5'-CS) y la secuencia conservada 3'-CS característica de esta clase de integrones que incluye los genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*gacEΔ1*) y a sulfamidas (*sul1*). B) Integrón de la clase 1 con un gen cassette que codifica una aminoglucósido-adenililtransferasa (*aadA1*). Se muestra la integración en él de un nuevo cassette codificante de una betalactamasa (*bla<sub>OXA-1</sub>*), observándose como la integración de éste desplaza el anterior gen cassette (*aadA1*) hacia 3' (Tomado de Sabaté & Prats, 2002).

## 2.3 GENOTIPIFICACIÓN

Los métodos de genotipificación, permiten establecer la relación genética entre aislados de una misma fuente, pero que manifiestan diferencias a nivel fenotípico o, por el contrario, aislados provenientes de una fuente diferente pero que muestran características fenotípicas similares. La confirmación de la relación genética entre estos microorganismos permitiría determinar la fuente de la infección, el número de clones circulantes, el vehículo, la ruta y el patrón de distribución de las cepas. Además, el conocimiento que brindan las técnicas de genotipificación permite la implementación de nuevos programas que contribuyan al control y prevención de los brotes infecciosos (Vílchez & Alonso, 2009).

Las investigaciones sobre la epidemiología hospitalaria de *P. aeruginosa* siempre se han visto obstaculizadas por la inadecuada capacidad discriminadora de los marcadores fenotípicos comúnmente aplicados, tales como los utilizados en

la serotipificación (Grundmann *et al.*, 1995), es por ello que durante la última década, los métodos tradicionales de fenotipificación han sido reemplazados por métodos de genotipificación (Corona-Nakamura *et al.*, 2001; Spencker *et al.*, 2000). En *P. aeruginosa* han sido utilizados varios esquemas para la tipificación molecular, como Multilocus Sequence Typing (MLST), o la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), que es considerado como el “estándar de oro” para la genotipificación de varios microorganismos (Corona-Nakamura *et al.*, 2001; Curran *et al.*, 2004; Yetkin *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Multilocus Sequence Typing (MLST)

La genotipificación por *multilocus sequence typing*, fue propuesta en 1988, para proveer datos útiles y precisos para la investigación epidemiológica de patógenos bacterianos (Gomila *et al.*, 2013; Urwin & Maiden, 2003). Esta técnica está basada en diferencias alélicas entre genes *housekeeping*, los cuales son genes codificantes de proteínas que pueden estar conservados y expresarse de manera constitutiva, debido a que están involucrados en el mantenimiento de la célula, cumpliendo funciones metabólicas básicas involucradas en el buen funcionamiento celular, por lo tanto se espera que sus niveles de expresión se mantengan constantes en todas las células y frente a todas las condiciones a las que esté expuesta (Eisenberg & Levanon, 2013). Los genes *housekeeping* evolucionan de manera relativamente lenta y pueden indicar las relaciones genéticas entre aislados bacterianos más fiablemente que los genes que se encuentran bajo selección positiva, tales como genes que confieren resistencia a antibióticos (Gomila *et al.*, 2013; Urwin & Maiden, 2003).

Los esquemas de tipificación por MLST que han sido desarrollados para la determinación de la relación de numerosos microorganismos incluyen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica*, *Enterococcus faecalis* y *Vibrio cholera* (Johnson *et al.*, 2007). En 2004, Curran y colaboradores, desarrollaron un esquema de MLST que permite diferenciar cepas de *P. aeruginosa* de origen clonal diferente mediante comparación en las secuencias de los genes (Tabla 1): *acsA*, *aroE*, *guaA*,

*mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE* (Curran *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007), lo cual provee una base de datos que permite cotejar resultados obtenidos en distintos laboratorios <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. MLST ha sido aplicado en muchos estudios de *P. aeruginosa* para el mejor entendimiento de la epidemiología de las infecciones que causa y para estudiar clonas multiresistentes (Gomila *et al.*, 2013).

**Tabla 1. Funciones y posiciones en el genoma de los 7 genes usados en el esquema de tipificación de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Locus	Función hipotética del gen (CEPA)	Posición en el genoma en la PAO1 (Pares de bases)
<i>acsA</i>	Acetyl coenzyme A synthetase (PA0887)	969670
<i>aroE</i>	Shikimate dehydrogenase (PA0025)	26711
<i>guaA</i>	GMP synthase (PA3769)	4227237
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein (PA4946)	5551681
<i>nuoD</i>	NADH dehydrogenase I chain C, D (PA2639)	2983963
<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvate synthase (PA1770)	1914037
<i>trpE</i>	Anthralite synthetase component I (PA0609)	670980

Tomado de Curran *et al.*, 2004

### 2.3.2 Electroforesis en gel de campos pulsados (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* PFGE)

El análisis del polimorfismo genético a través de PFGE es la técnica que tiene el más alto poder discriminatorio, la mejor reproducibilidad y la mayor versatilidad, permitiendo tipificar una enorme variedad de especies bacterianas, estas ventajas

la han convertido en la técnica estándar de referencia para la tipificación de bacterias, hongos y parásitos de importancia clínica (Vílchez & Alonso, 2009).

Cuando se digiere una molécula de DNA con un enzima de restricción se obtienen un número de fragmentos equivalentes a las veces que se encuentra repetido el lugar de restricción a lo largo de la molécula. El tamaño de los distintos fragmentos de restricción indica la separación entre dos lugares de restricción contiguos. Un cambio por mutación, delección, inserción o recombinación en uno de estos lugares de restricción lo hace irreconocible para la enzima y se traduce en una variación del perfil de fragmentos de restricción que es el responsable del polimorfismo existente entre distintas cepas. Este perfil también variará si existen delecciones o inserciones de DNA entre dos lugares de restricción. La comparación de cepas para detectar el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) se consigue separando los fragmentos obtenidos mediante electroforesis. Cada banda corresponde a la suma de todos los fragmentos generados del tamaño correspondiente a aquella movilidad electroforética.

Para una especie bacteriana concreta, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del DNA cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del DNA de la bacteria y la división del DNA en pocos fragmentos de más de 40 kb que no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional (Coll *et al.*, 2005).

Para resolver esta problemática, en 1984 Schwartz y Cantor desarrollaron la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), la cual es una variación de la electroforesis convencional, en la cual la orientación del campo eléctrico no es unidireccional sino alternante. Este cambio periódico en la dirección de migración de las moléculas de DNA, previamente digerido con endonucleasas de baja frecuencia de corte, permite separar fragmentos de DNA de alto peso molecular, produciéndose patrones de 5 a 20 fragmentos de un tamaño de 10 a

800 Kb (Coll *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 1995). El patrón de bandas generado, que es característico de cada aislado, puede ser analizado con la ayuda de programas adecuados y se pueden crear bases de datos de referencia de patrones de PFGE, en las que cualquier nueva cepa puede ser comparada para definir su relación con otras cepas (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2006).

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del DNA y separación de los fragmentos por PFGE, se emplean actualmente para *P. aeruginosa* en estudios epidemiológicos (Coll *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 1995).

Tenover y colaboradores, propusieron un criterio que permite interpretar el patrón de bandeo entre diversas cepas de manera tal que, se puedan establecer las relaciones genéticas y epidemiológicas entre dichos microorganismos. Según este sistema se puede clasificar a los aislados bacterianos en cuatro categorías: cepas indistinguibles, cepas estrechamente relacionadas, cepas posiblemente relacionadas y cepas no relacionadas (Tenover *et al.*, 1995; Vílchez & Alonso, 2009).

### **2.3.2.1 Estudios de genotipificación por PFGE a nivel internacional y nacional**

Las poblaciones de *P. aeruginosa* a nivel hospitalario han sido estudiadas en diversos países del mundo, pues el monitoreo de la emergencia y transmisión de cepas de *P. aeruginosa* principalmente de cepas resistentes a carbanémicos es importante a nivel de control epidemiológico.

A continuación se muestran algunos estudios en diversos países con un alto impacto en el ámbito epidemiológico:

- a) En Venezuela se analizaron 17 cepas resistentes a carpabenémicos aislados en 4 hospitales del Este y Sur del país recolectados entre 2007 y 2010, en todas las cepas se confirmó la presencia de la MBL *bla<sub>VIM-2</sub>*, se

realizó PFGE y se encontró que en los 4 hospitales circulan cepas de *P. aeruginosa* productoras de *bla*<sub>VIM-2</sub> con un origen clonal común (Guevara *et al.*, 2012a).

- b) En otro estudio realizado en Brasil, se determinó la presencia de carbapenemasas y la clonalidad de 127 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aislados de un hospital durante un periodo de 12 años. Se determinó que 50 aislados portaron carbapenemasas, siendo la más frecuente fue *bla*<sub>SPM-1</sub>. En este caso mediante PFGE se mostró que 25% de los aislados pertenecían a la misma clona predominante, 29.7% estaban estrechamente relacionados y 14.8% se clasificaron como posiblemente relacionados (Rizek *et al.*, 2014).
- c) En Alemania se estudiaron 469 aislados que fueron obtenidos de 30 pacientes durante abril de 1994 a abril de 1996 principalmente de esputo. Se tipificaron con PFGE donde se observó que 22 pacientes estuvieron colonizados persistentemente por una clona específica y única para cada paciente, y 4 fueron co-colonizados por una segunda clona diferente para cada paciente, concluyendo que PFGE es adecuado para las investigaciones detalladas de la colonización con *P. aeruginosa* (Spencer *et al.*, 2000).
- d) En un estudio en Bélgica, se realizó la caracterización de *P. aeruginosa* multiresistente causante de un brote en la UCI de un hospital universitario de tercer nivel, donde 18 pacientes estuvieron colonizados o infectados con esta bacteria y el 100% de los aislados fue resistente a carbapenémicos, 16 aislados (80%) pertenecieron al mismo serotipo y al mismo tipo en PFGE. Esta clona estaba limitada a la UCI y no se encontró en otro lugar en el hospital. La contaminación del medio ambiente en la UCI y las manos de una enfermera de esta área con el mismo clon sugiere la posible transmisión por las manos (Deplano *et al.*, 2005).
- e) Así mismo, en Taiwán, se estudiaron 72 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, recolectados en varios centros médicos y hospitales regionales, a través de *Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance* (TSAR) en los años 2000 y 2002, detectándose el gen *bla*<sub>VIM-3</sub> en

varios aislados en integrones de clase 1. La tipificación por PFGE reveló una cepa predominante en 14 aislados resistentes a carbapenémicos y con MBL y que estaban geográficamente dispersos en Taiwán en 2 años diferentes. Estos resultados sugieren que la propagación de la cepa predominante, así como la transmisión horizontal de *bla*<sub>VIM-3</sub> se llevó a cabo a través de un integrón de clase 1 entre diferentes aislados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (Huang *et al.*, 2007).

En nuestro país, se tienen los siguientes reportes:

- a) En el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México se estudiaron 60 aislados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes hospitalizados por más de 48 horas en UCI de abril a mayo de 1998, además se obtuvieron simultáneamente cultivos ambientales y cultivos de manos del personal, presentándose una resistencia de 40% a imipenem y meropenem. Mediante PFGE se mostró que 23 aislados pertenecieron al mismo clon común, identificado en 5 pacientes, 2 enfermeras y 10 muestras ambientales. La utilización de PFGE demostró la existencia de una clona común en un área de cuidado crítica (Corona-Nakamura *et al.*, 2001).
- b) En el Centro Médico Nacional La Raza en la Ciudad de México fue descrito un aislado resistente a carbapenémicos con un nuevo arreglo de integrón de clase 1 conteniendo el gen *bla*<sub>IMP-18</sub> (ln169), el cual fue comparado por PFGE con otros 3 productores de *bla*<sub>IMP</sub>, 2 aislados representativos del Hospital Civil de Guadalajara y 1 aislado del Hospital Infantil de Morelia, demostrando que el aislado del CMN La Raza estuvo genéticamente relacionado con el aislado del Hospital Infantil de Morelia. Siendo el primer reporte que describe el gen *bla*<sub>IMP-18</sub> en dos aislados genéticamente relacionados provenientes de dos instituciones diferentes (Sánchez-Martínez *et al.*, 2010).
- c) Se realizó un estudio multicéntrico que incluyó 124 aislados resistentes a carbapenémicos recolectados de agosto de 2004 a diciembre de 2011 de 5 hospitales: Hospital Civil de Guadalajara (HCG), Instituto Nacional de

Cancerología (INCan), Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI), Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza (HICMNR) y la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 71 IMSS, Torreón, Coahuila(UMAE-71), donde se describió la prevalencia de carbapenemasas cromosómicas del tipo IMP, VIM y GES en 36.2% de los aislados. Se realizó PFGE y se determinó que existía una diseminación clonal entre hospitales cercanos y distantes (clona A encontrada en CMNSXXI y HICMNR; y clona B presente en INCan y UMAE-71) (Garza-Ramos *et al.*, 2014)

Los reportes anteriormente mencionados, nos permiten recalcar la importancia que tiene la genotipificación de aislados de *P. aeruginosa*, en México, aislados clínicos multiresistentes a carbapenémicos han sido muy poco estudiados, lo que dificulta la identificación de brotes y el reforzamiento de medidas oportunas para el control de infecciones; es necesario el establecimiento de mejores sistemas de vigilancia, desinfección, esterilización de superficies y equipo médico, así como el diseño de estrategias que disminuyan el uso de antimicrobianos de amplio espectro, para evitar la transmisión vertical y horizontal de elementos genéticos responsables de la diseminación de genes de resistencia.

### 3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En estudios realizados por Martínez, 2011; Valerio, 2012 y Ayala, 2013 en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP, se estudiaron 65 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales, provenientes del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. De México, recolectadas en el periodo 2007-2009 y se seleccionaron 21 aislados MDR recolectadas en el año 2009 para conocer su relación genética, la mayor parte de estos aislados fueron obtenidos de secreciones bronquiales (52%) y urocultivo (15%), y 54% recolectados de pacientes de UCI. La resistencia de estos 21 aislados fue de 91.4% para beta-lactámicos (incluyendo 86% resistentes a imipenem y 95% a meropenem), 93.6% resistentes a aminoglucósidos, 90.3% a fluoroquinolonas, 95% a cloranfenicol, y 100% a trimetoprim-sulfametoxazol. Se determinó por PCR la presencia de diversos genes de resistencia de los cuales únicamente se encontraron presentes *oxa-2* en 90% de los aislados, 100% fueron positivas para *bla<sub>OXA-50</sub>*, 67% para *bla<sub>GES-1</sub>*, 9% para el *tandem bla<sub>GES-19/bla<sub>GES-20</sub></sub>*, 52% amplificó para *aac-3'-IIa* y 57% para *aac-6'-Ib*. Por otro lado 100% amplificaron para *Int1* y 85.7% amplificaron para las regiones conservadas 5'-CS y 3'-CS del integrón de clase 1 (Anexo 1).

Por otro lado, se tienen en el laboratorio 25 aislados identificados previamente como *P. aeruginosa* mediante el equipo semiautomatizado Vitek2, provenientes del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla, recolectadas durante el periodo de abril de 2013 a febrero de 2014, obtenidas en mayores porcentajes de muestras respiratorias (56% incluyendo muestras de lavado bronquial, aspirado bronquial y expectoración) y de urocultivo (32%), y recolectadas de pacientes de UCI (12%) y Medicina Interna (40%), de las cuales se realizó su caracterización mediante pruebas bioquímicas y se obtuvo su perfil de resistencia, presentando el 74.4% resistencia a beta-lactámicos (incluyendo 96% resistentes a meropenem y 92% a imipenem), 82.6% fueron resistentes a aminoglucósidos,

86.6% a fluoroquinolonas, 100% a cloranfenicol, 96% a trimetoprim-sulfametoxazol y 28% a colistina. A partir de los perfiles de resistencia, se seleccionaron 25 aislados MDR y se realizó la amplificación del gen *bla<sub>VIM</sub>* siendo negativo para el 100% de los aislados (Ramos, 2014) (Anexo 2).

#### 4. JUSTIFICACION

Cientos de clonas bacterianas han sido distribuidas en el mundo y en la mayoría de los casos, asociadas con patrones de multiresistencia. Debido a que el número de antibióticos activos contra *P. aeruginosa* es limitado, es una prioridad realizar un seguimiento estricto y periódico de los patrones de resistencia y conocer la relación entre las cepas involucradas en los procesos infecciosos, así como conocer los mecanismos moleculares implicados en la resistencia que sirvan de base para establecer un uso adecuado de antimicrobianos y un mejor control epidemiológico dentro de cada unidad hospitalaria.

## 5. OBJETIVOS

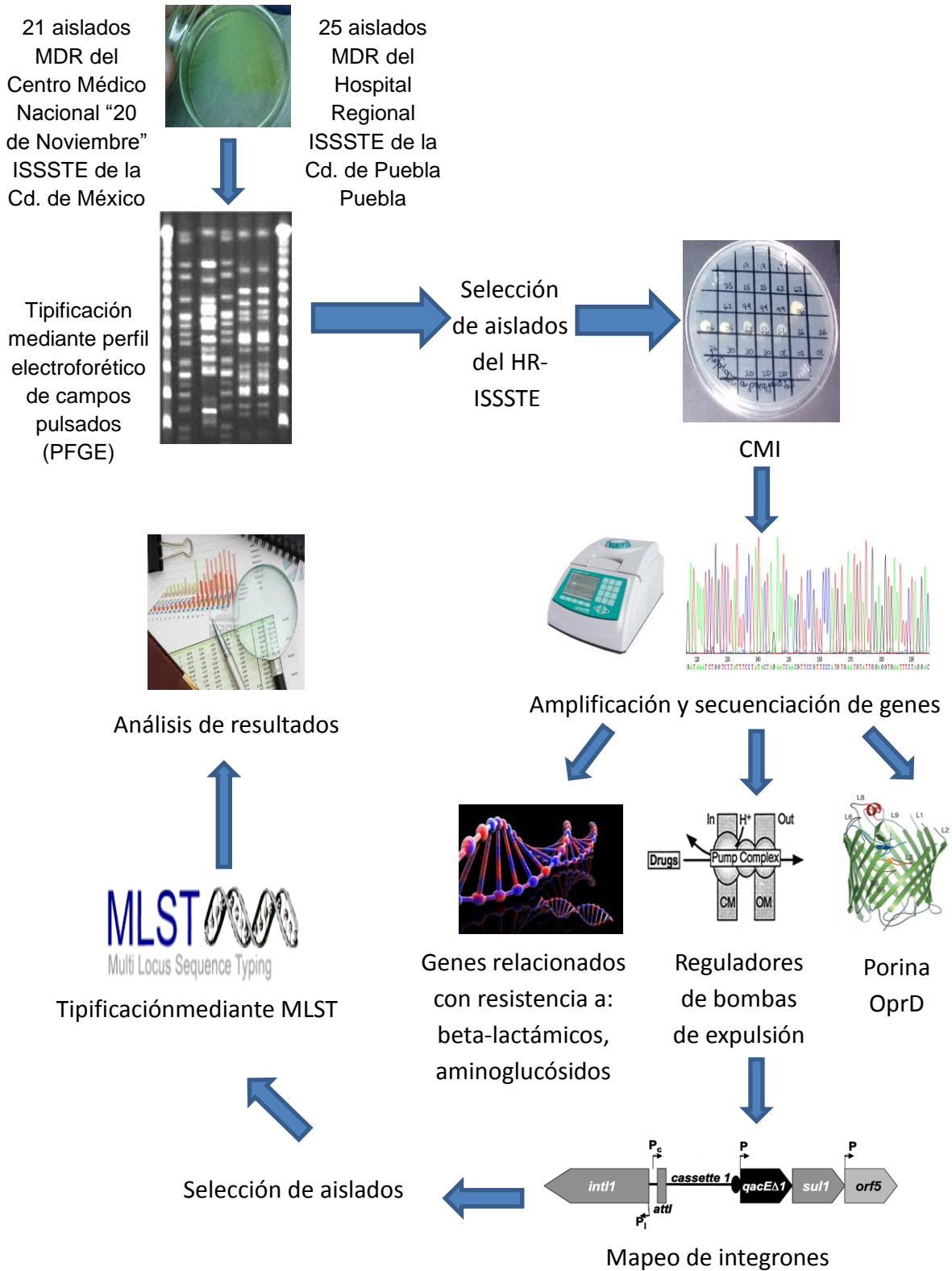
### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación genética entre los aislados de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes causantes de infecciones nosocomiales provenientes de dos Unidades Hospitalarias, así como estudiar la presencia de algunos mecanismos de resistencia.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Genotipificar aislados MDR de *P. aeruginosa* del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México y del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla causantes de infecciones nosocomiales.
- b) Determinar la presencia de algunos genes que codifican para serin-beta-lactamasas, beta-lactamasas del tipo oxa, metalo-beta-lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos de algunos aislados de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.
- c) Buscar mutaciones en genes reguladores de bombas de expulsión y en la porina OprD de algunos aislados de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.
- d) Amplificar los genes característicos de integrones de clase 1 (*int1*, *qacEΔ1* y *sul1*) y determinar la estructura de los integrones de algunos aislados *P. aeruginosa* de interés del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.

## 6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 CONDICIONES ÉTICAS

Los aislados del Centro Médico Nacional fueron donados por el Dr. José Fernando Huerta Romano; los aislados del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla fueron donados por la QFB. Guadalupe Jiménez Flores.

Todos los aislados fueron obtenidos de manera rutinaria, los datos de los pacientes fueron eliminados por lo que no fue necesario el consentimiento informado.

Los microorganismos son desechados de acuerdo a los lineamientos de CRETIB y RPBI.

### 7.2 MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

Se trabajaron un total de 46 aislados de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes causantes de infecciones nosocomiales, procedentes de diferentes áreas hospitalarias y de distintos sitios anatómicos de pacientes provenientes de las dos Unidades hospitalarias siguientes:

- a) 21 aislados MDR recolectados del 4 de febrero al 2 de abril de 2009, provenientes del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE de la Ciudad de México, el cual cuenta con servicios de alta especialidad y atiende a pacientes referidos del 2do. y 3er. nivel del ámbito nacional. Estos aislados ya contaban con el perfil de resistencia por Kirby-Baüer y amplificado de algunos genes (Anexo 1).
- b) 25 aislados MDR recolectados del 2 de abril de 2013 al 14 de enero de 2014, provenientes del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla, la cual es una Unidad Médico Administrativa desconcentrada de Tercer Nivel, que otorga servicios médicos en la Región VII conformada por los estados

de Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Oaxaca. Estos aislados ya contaban con el perfil de resistencia por Kirby-Baüer y la amplificación del gen *bla<sub>VIM</sub>* para el que fueron negativas (Anexo 2).

Los aislados se preservaron en crioviales con caldo BHI/Glicerol al 10% a -70°C y están identificados con número secuencial en el cepario interno del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Estos se descongelaron, se sembraron por estría cruzada en placas de agar TSA (BD Bioxon®) y se incubaron 24 horas a 37°C para el procedimiento correspondiente.

### 7.3 CEPAS CONTROL

Se usaron distintas cepas como control positivo para la amplificación de los diferentes genes de resistencia, los genes presentes en estas cepas ya están secuenciados (Tabla 2).

**Tabla 2. Cepas utilizadas como controles.**

Cepa	Microorganismo	Genes secuenciados	Donada por
IMP-15	<i>P. aeruginosa</i>	<i>imp</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
Ps36	<i>P. aeruginosa</i>	<i>intl1, sul1, qacED1, ges-1, aac-(6')-Ib, oxa-2, oxa-50</i>	M.C. Elizabeth Valerio Calleja/ M.C. Cristal Ayala Arias
PSE-1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>pse-1</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
Ps16	<i>P. aeruginosa</i>	<i>oxa-1</i>	M.C. Elizabeth Valerio Calleja/ M.C. Cristal Ayala Arias
19.0	<i>E.coli</i>	<i>tem-1</i>	Biol. Gabriela Moreno Ramírez
560	<i>E.coli</i>	<i>shv-1</i>	M.C. Gerardo Cortés Cortés
57.N	<i>E. coli</i>	<i>qnrA</i>	M.C. Gerardo Cortés Cortés
SA42	<i>K. pneumoniae</i>	<i>ctxm</i>	M.C. Gabriel Abraham González
SA96	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB</i>	M.C. Gabriel Abraham González
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>mexT, mexZ, nfxB, mexR, oprD</i>	Dra. Gloria Soberón / Dr. Miguel Castañeda

## 7.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

Esta técnica se realizó de acuerdo a protocolos propuestos anteriormente (modificado de Kaufmann, 1998; Rojo-Bezares *et al.*, 2011).

### Preparación de los insertos

A partir de un cultivo puro de 16 h de *P. aeruginosa* en placa de BHI agar, se tomaron las colonias suficientes para suspenderlas en 1 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA pH=8,0) ajustando al patrón No. 4 de Mac Farland ( $1.2 \times 10^9$  UFC/ml). Se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón TE y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos, se repitió la operación una vez más para completar 3 lavados. Se eliminó el último sobrenadante y se volvió a resuspender en 1 ml de TE. Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en tampón TE y se mantuvo a 54°C. Se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa de bajo punto de fusión y se distribuyó en los moldes, preparando 10 insertos por aislado y se dejaron solidificar 10 minutos en refrigeración.

### Lisis bacteriana

Se añadió 1 ml de tampón de lisis 1 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA pH=8,0, 1% sarcosil, 2 mg/ml proteinasa K) en cada tubo con 2 insertos del aislado correspondiente y se dejó incubar en baño maría a 54°C con agitación durante 6 horas. Posteriormente, se eliminó el tampón de lisis 1 y se añadió 1 ml del tampón de lisis 2 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA pH=8,0, 1% sarcosil, 0,1 mg/ml proteinasa K) y se incubaron durante 12 horas en baño de maría a 54°C con agitación.

### **Lavado de los insertos**

Después de llevarse a cabo la lisis, se eliminó el tampón y se realizaron los siguientes lavados:

- a) 10 ml de agua destilada estéril durante 10 minutos en baño maría a 54°C con agitación.
- b) 10 ml de tampón TE durante 30 minutos en baño maría a 54°C con agitación, se repitió 3 veces.
- c) 10 ml de tampón TE durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los insertos se guardaron a 4°C en 1 ml de tampón TE (se pueden conservar hasta por 12 meses).

### **Digestión enzimática**

Para realizar la digestión enzimática se utilizó una cuarta parte de inserto por cada cepa de estudio. El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo compuesto por: 1 µl de enzima *SpeI* Thermo Scientific (10 U), 10 µl de tampón 10 X de la enzima y 89 µl de agua inyectable estéril. Se incubó durante 6 horas a 37°C en baño maría con agitación.

### **Preparación del gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X, se vertió sobre el molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se rellenaron con los insertos digeridos, dejando el segundo y el último de los mismos para el marcador de peso molecular (CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder, Bio-RadLabs), y se sellaron con agarosa de la misma concentración atemperada a 50°C.

## **Electroforesis**

Se realizó en una cubeta de electroforesis CHEF-DR II (BioRad) con 2.870 litros de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75  $\mu$ M. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron: 1) una rampa lineal pulsada de 5 a 15 s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 10h; seguida de 2) una rampa lineal pulsada de 15 a 45 s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 10 h.

## **Tinción del gel y visualización**

Se tiñó el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio (10  $\mu$ l/ 200 ml) durante 1 min, posteriormente se destiñó en agua destilada por 10 minutos. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta MiniBIS Pro DNR Bio-Imaging Systems. El gel se destiñó en agua destilada, fotografiándose cada 30 minutos hasta la perfecta visualización de las bandas.

## **Análisis de los patrones de PFGE**

Las imágenes capturadas fueron analizadas con el programa GelQuant Express Analysis Software. Los patrones de bandeo fueron comparados usando el coeficiente de Dice/UPGMA mediante el programa NTSYS pc 2.21q software para obtener el dendograma y determinar la similitud de las cepas de acuerdo a los criterios establecidos por Tenover (Tenover *et al.*, 1995)

## **7.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR**

Se partió de un cultivo puro de las cepas a evaluar, se resuspendió en un tubo con 5 ml de solución salina isotónica (SSI) 0.85% m/v, para ajustar la turbidez con un estándar de 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Posteriormente se hizo una dilución 1:10 con SSI, depositando por triplicado 2  $\mu$ L de esta suspensión en placas con agar Mueller Hinton suplementadas con los antibióticos a evaluar

(Tabla 3). Una vez inoculadas las placas se esperó a que se seque el inóculo y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Finalmente se observó el crecimiento de las placas y se buscó la concentración a la cual ya no hubiera crecimiento.

Los puntos de corte se determinaron con base en el CLSI, 2015 y se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 3. Antibióticos evaluados en la determinación de CMI**

Antibiótico	Concentración (µg/ml)											
<b>Ceftazidima (CAZ)</b>	512	256	128	64	32	16	8	4	2			
<b>Cefepime (FEP)</b>	512	256	232	128	64	32	16	8	4	2		
<b>Meropenem (MEM)</b>	512	256	128	64	32	16	12	8	6	4	2	
<b>Imipenem (IMP)</b>	512	256	128	64	32	16	12	8	6	4	2	
<b>Ciprofloxacino (CIP)</b>	512	256	128	64	32	16	8	4	2			
<b>Gentamicina (GM)</b>	512	256	128	64	32	16	8	4				
<b>Amikacina (AN)</b>	512	256	128	64	32	16	8					
<b>Colistina (CL)</b>	2	4	8	9								

**Tabla 4. Puntos de corte de CMI para *P. aeruginosa* (CLSI, 2015)**

Antibiótico	Punto de corte CMI (µg/ml)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
<b>CAZ</b>	≥ 32	16	≤ 8
<b>FEP</b>	≥ 32	16	≤ 8
<b>MEM</b>	≥ 8	4	≤ 2
<b>IMP</b>	≥ 8	4	≤ 2
<b>CIP</b>	≥ 4	2	≤ 1
<b>GN</b>	≥ 16	8	≤ 4
<b>AN</b>	≥ 64	32	≤ 16
<b>CL</b>	≥ 8	4	≤ 2

CAZ: ceftazidima; FEP: Cefepime; MEM: meropenem; IMP: imipenem; CIP: ciprofloxacino; GM: gentamicina; AN: amikacina; C: colistina. Puntos de corte CLSI, 2015.

## **7.6 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **7.6.1 Extracción de DNA**

Se realizó un lisado bacteriano a partir de colonias aisladas de *P. aeruginosa* en TSA e incubados 18-24 horas a 37°C, posteriormente se depositaron 2 asadas en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml, con 800 µl de solución salina isotónica y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 800 µl de solución salina isotónica (se realizaron 3 lavados con 800 µl de solución salina isotónica), la última pastilla se re-suspendió con 800 µl de solución inyectable estéril, posteriormente se colocó en baño maría por 10 minutos, se retiró, se homogeneizó y centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos, se guardó el sobrenadante a -20 °C hasta su uso.

A todos los lisados se les realizó la cuantificación de DNA en el equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) y se ajustó la concentración a 250 µg/µl utilizando el mismo equipo.

### **7.6.2 Amplificación de genes codificantes para beta-lactamasas, reguladores de bombas de expulsión y porina OprD.**

Se realizó la amplificación de distintos genes por PCR, la cual fue llevada a cabo en un termociclador TProfessional TRIO® a un volumen final de reacción de 10 µl y cuyos componentes se muestran en la tabla 5. Se utilizó un juego de oligonucleótidos por cada gen en reacciones individuales y a diferentes condiciones según protocolos estandarizados en el Laboratorio de Microbiología Médica y de la Comunidad (Tablas 6, 7 y 8), amplificándose algunos genes de resistencia a betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos; así mismo se amplificaron genes reguladores de bombas de expulsión (*mexR*, *mexT*, *mexZ*, *nfxB*) y el gen de la porina *oprD* para la búsqueda de mutaciones que pudieran conferir resistencia a los antibióticos.

**Tabla 5. Componentes para PCR con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase**

Componentes	Concentración inicial	Volumen añadido por tubo	Concentración final de la reacción
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase® (Thermo Scientific)	5U/μL	0.08	0.4U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1	2.5mM
dNTPs	10mM	0.2	0.2mM
Oligonucleótido Forward	25μM	0.5	1.25μM
Oligonucleótido Reverse	25μM	0.5	1.25μM
DNA	---	1	---
Agua libre de nucleasas	---	Hasta 10μL	---
Volumen final	---	10μL	---

**Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los diferentes genes de resistencia.**

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>bel</i> (variantes)	852	BEL-1F	ATGAAACTGCTGCTCTACCCG	817	94°C/5 min 94°C/1 min 50°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bello, 2014
		BEL-1R	CAGAAGCAATTAATAACGCC			
<i>per-1</i>	927	PER-1F	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	925	94°C/5 min 94°C/1 min 42°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Danel <i>et al.</i> , 1995
		PER-1R	ATGAATGTCATTATAAAAGC			
<i>per</i> (variantes)	927	PERd-F	GCCACTGTAGGYGTWGCMT	714	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bello, 2014
		PERd-R	GCGCRATRATRGCTTCATTGGT			

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<b>ctx-m</b>	910	KpCTX-F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	909	95°C/3 min 95°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1996
		KpCTX-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC			
<b>tem</b>	861	TEM1F	AGAGTATGAGTATTCAACATT	837	95°C/3 min 95°C/1 min 45°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Hansen <i>et al.</i> , 2004
		TEM2R	ATCTCAGCGATCTGTCTAT			
<b>shv</b>	871	SHV1F	GGGTTATTCTATTTGTGCT	883	96°C/15 seg 96°C/15 seg 52°C/15 seg 24 ciclos 72°C/2 min 72°C/3 min 10°C/∞	Mercier y Levesque, 1990
		SHV2R	TAGCGTTGCCAGTGCTCG			
<b>kpc-2</b>	882	Kpc1F	ATGTCAGTCTATCGCCGTCT	882	94°C/3 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Patrick <i>et al.</i> , 2009
		Kpc2R	TTACTGCCCGTTGACGCCCA			
<b>ges-1</b>	864	GES1F	ATGCGCTTCATTACGCAC	864	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Dubois <i>et al.</i> , 2002
		GES1R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG			
<b>pse-1</b>	867	PSE1	TTATTGGCATTTCGCTTTTA	804	94°C/5 min 94°C/1 min 50°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Pai <i>et al.</i> , 2001
		PSE2	CGCATCATTTGCTCTG			
<b>veb-1</b>	900	VEB1F	CGACTTCCATTCCCGATGC	643	95°C/5 min 95°C/1 min 57°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/5 min 10°C/∞	Naas <i>et al.</i> , 1999
		VEB1R	GGACTCTGCAACAAATACGC			
<b>oxa-1</b>	831	OXA1F	ACACAATACATATCAACTTCGC	814	96°C/5 min 96°C/1 min 61°C/1 min 35 ciclos 72°C/2 min 72°C/10 min 10°C/∞	Steward, 2001
		OXA1R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC			

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<b>oxa-2</b>	828	OXA2F	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG	703	96°C/5 min 96°C/1 min 61°C/1 min 35 ciclos 72°C/2 min 72°C/10 min 10°C/∞	Steward, 2001
		OXA2R	TCCGAGTTGACTGCCGGTTG			
<b>oxa-10</b>	801	OXA10F	CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG	652	96°C/5 min 96°C/1 min 61°C/1 min 35 ciclos 72°C/2 min 72°C/10 min 10°C/∞	Steward, 2001
		OXA10R	CATGATTTTGGTGGGAATGG			
<b>oxa-11</b>	801	OXA11F	TCTTTCGAGTACTGCATTAGC	759	94°C/5 min 94°C/1 min 51°C/1 min 40 ciclos 72°C/1 min 72°C/90 s 10°C/∞	Budak, 2012
		OXA11R	CCAATGATGCCCTCACTTCC			
<b>oxa-13</b>	801	OXA13F	CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG	652	96°C/5 min 96°C/1 min 61°C/1 min 35 ciclos 72°C/2 min 72°C/10 min 10°C/∞	Steward, 2001
		OXA13R	CATGATTTTGGTGGGAATGG			
<b>oxa-40</b>	828	OXA40-F	GGTTAGTTGGCCCCCTAAA	249	94°C/5 min 94°C/25 s 52°C/40 s 30 ciclos 72°C/50 s 72°C/6 min 10°C/∞	Fernandez <i>et al.</i> , 2009
		OXA40-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
<b>oxa-50</b>	789	OXA50-F	GAAAGGCACCTTCGTCTCTA	453	94°C/4 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Craciunas <i>et al.</i> , 2010
		OXA50-R	CAGAAAGTGGGTCTGTTCCATC			
<b>imp</b> (variantes)	741	IMPd-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	515	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bello, 2014
		IMPd-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC			
<b>ndm-1</b>	825	NDM-1F	CGGGCCGTATGAGTGATTGC	781	94°C/5 min 94°C/1 min 53°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bello, 2014
		NDM-1R	CCAATATTATGCACCCGGTC			

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<b>ndm</b> (variantes)	813	NDMv-F	AATATTATGCACCCGGTCGCG	732	94°C/5 min 94°C/1 min 54°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bello, 2014
		NDMv-R	CATCACGATCATGCTGGCCTT			
<b>gim-1</b>	773	GIM-F	AGAACCTTGACCGAACGCAG	748	95°C/5 min 95°C/1 min 57°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/5 min 10°C/∞	Castanheira <i>et al.</i> , 2004
		GIM-R	ACTCATGACTCCTCACGAGG			
<b>spm</b>	2004	SPMF1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	800	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 30 ciclos 68°C/1 min 68°C/5 min 10°C/∞	Mendes <i>et al.</i> , 2008
		SPMR2	CCTTTTCCGCGACCTTGATC			
<b>aac3</b>	861	aac(3)-II-F	ACTGTGATGGGATACGCGTC	237	94°C/5 min 94°C/30 s 60°C/45 s 32 ciclos 72°C/2 min 72°C/8 min 10°C/∞	Chun-Hsien <i>et al.</i> , 2012
		aac(3)-II-R	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA			
<b>aac6</b>	612	aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	481	94°C/5 min 94°C/1 min 60°C/45 s 20 ciclos 72°C/45 s 72°C/5 min 10°C/∞	Park <i>et al.</i> , 2006
		aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			

**Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los reguladores de bombas de expulsión**

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<b>mexR</b>	444	mexR-1	CGCCATGGCCCATATTGAG	637	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexR-2	GGCATTGCGCAGTAAGCGG			
<b>nfxB</b>	563	nfxB-1	CGATCCTTCTATTGCACG	939	94°C/5 min 94°C/1 min 52°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		nfxB-2	GCCAAGTGCCAGTATCG			

<i>mexT</i>	1043	mexT-1	CGGTTGCAGCCTCTAGCC	1005	94°C/5 min 94°C/1 min 58°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexT-2	CGATTTTCCCGTTGCGACG			
<i>mexZ</i>	534	mexZ-1	AGCGGCGCGACAGTAGCATA	781	94°C/5 min 94°C/1 min 59°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexZ-2	CCGAGGACCAGCGCAGGC			

**Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar la porina OprD**

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>oprD</i>	1332	oprD-F	TGCTGCTCCGCAACTACTATTTTC	751	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 68°C/8 min 72°C/8 min 10°C/∞	Naenna <i>et al.</i> , 2010
		oprD-R	GTAGGCCAAGGTGAAAGTGTG			
<i>oprD</i>	1332	oprDlong-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	1412	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
		oprDlong-R	GTCGATTACAGGATCGACAG			
<i>oprD</i>	1332	oprDlong2-F	CTACGCAGATGCGACATGC	1586	94°C/5 min 94°C/1 min 64°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Wolter <i>et al.</i> , 2004
		oprDlong2-R	CCTTTATAGGCGCGTTGCC			

### 7.6.3 Caracterización de integrones de clase 1 mediante la estrategia de "primer walking" y amplificación de regiones variables

Para la búsqueda de la presencia del integrón, se realizaron reacciones de PCR con 1 juego de oligonucleótidos para cada gen, para ver si portaban los extremos 5' (*intlΔ1*) y 3' (*qacEΔ1-sul1*) conservados en la mayoría de los integrones de clase 1 (Lévesque *et al.*, 1995). Posteriormente se realizó la identificación de la región variable del integrón con un juego de oligonucleótidos específicos; así mismo se llevó a cabo la estrategia de "primer walking" que consiste en diseñar oligonucleótidos específicos para que los fragmentos obtenidos de los genes

cassette se solapen y así se obtenga la secuencia completa. Los oligonucleótidos usados se describen en las tablas 9 y 10.

**Tabla 9. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para el estudio de integrones**

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>int1</i>	1017	Int1-F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	564	94°C/5 min 94°C/30 seg 52 °C/30 seg 72°C/2 min 72°C/7 min 10°C/∞	30 ciclos Jianyu <i>et al.</i> , 2005
		Int1-R	GAAAGGTCTGGTCATACATG			
<i>sul1</i>	840	Sul1-F	TGGTGACGGTGTTCCGGCATTG	790	94°C/5 min 94°C/30 seg 63°C/30 seg 72°C/1 min 72°C/8 min 10°C/∞	30 ciclos Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Sul1-R	CACCTTCTCGGAAACCCTCGC			
<i>qacEΔ1</i>	348	Qac-F	GGCTGGCTTTTTCTTGTATCG	247	94°C/5 min 94°C/30 seg 60 °C/30 seg 72°C/1 min 72°C/8 min 10°C/∞	30 ciclos Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Qac-R	TGAGCCCCATACCTACAAAGC			
Región Variable 1	v	rv.Int1-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	v	94°C/5 min 94°C/1 min 55 °C/1 min 65°C/8 min 72°C/8 min 10°C/∞	35 ciclos Levesque y Roy, 1993
		rv.Int1-R	AAGCAGACTTGACCTGA			

\*v: el tamaño del amplicon es variable

**Tabla 10. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos para el estudio de integrones por "primer walking"**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Referencia
<i>intFRC</i>	ACCGAAACCTTGCGCTCGT	60.1	Ayala, 2013
<i>sulFRC</i>	GAATGCCGAACACCGTCACCA	60.3	Ayala, 2013
<i>qacFRC</i>	CGATAACAAGAAAAAGCCAGCC	60.1	Bello, 2014
<i>aac6FRC</i>	GCCACTCATAGAGCATCGCAA	57.5	Bello, 2014
<i>aac6RRC</i>	AAACACGCCAGGCATTCGAG	58.5	Ayala, 2013
<i>aadA1FRC</i>	TCGATACTTCGGCGATCACC	56.7	Bello, 2014
<i>aadA1RRC</i>	AGGCGAGATCACCAAGGTAG	56.3	Bello, 2014
<i>oxa2-FRC</i>	CTAGCGTGCCCTTCTTGCCAT	70.7	Bello, 2014
<i>oxa2-RRC</i>	AATCGTGCGGGCAATCCTTC	70.5	Bello, 2014

#### **7.6.4 Visualización de los productos de PCR**

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% a un corrimiento de 90V por 45 min. Se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 g/l durante un minuto y lavados por 5 minutos en agua destilada; para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro - DNR Bio-Imaging Systems.

#### **7.6.5 Secuenciación de los productos de PCR**

Los productos amplificados se purificaron a partir del gel de agarosa con ayuda de *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit™*, siguiendo instrucciones de fabricante, y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca Morelos, México (secuenciación por electroforesis capilar, basado en el método de Sanger).

#### **7.6.6 Análisis de las secuencias**

Las secuencias se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza. Para eliminar espacios en las secuencias se utilizó el programa a través de Nucleic Acid Sequence Massager.

([www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm](http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm))

El análisis comparativo de las secuencias se realizó con el programa BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information site.

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/))

Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal Omega.

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

La conversión de la secuencia nucleotídica a aminoacídica se realizó en ExPASy-Translate tool.

(<http://expasy.org/tools/dna.html>)

Para la predicción del modelo de la porina OprD se utilizaron los programas:

(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)

(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)

## 7.7 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA TIPO (MLST) DE ALGUNOS AISLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

La genotipificación de las cepas consistió en amplificar mediante PCR siete genes “*housekeeping*” utilizando dos juegos de oligonucleótidos, uno para amplificar y otro para secuenciar, la secuencia de los oligonucleótidos se obtuvo directamente de la página MLST *Pseudomonas aeruginosa* dirección: <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. Para la obtención del DNA molde se realizó la extracción de DNA mediante el mismo procedimiento utilizado para la amplificación de genes de resistencia. Las secuencias de los oligonucleótidos para cada gen se muestran en la tabla 11 y 12.

**Tabla 11. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los genes “*housekeeping*” para MLST**

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción/*Enzima empleada
<i>acsA</i>	F:	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT		
<i>aroE</i>	F:	TGGGGCTATGACTGGAAACC	825	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *KapaTaq
	R:	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA		
<i>guaA</i>	F:	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	940	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA		
<i>mutL</i>	F:	CCAGATCGCCCGGTGAGGTG	940	94°C/5 min 94°C/1 min 58°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *KappaTaq
	R:	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC		

<i>nuoD</i>	F:	ACCGCCACCCGTA CTG	1042	94°C/5 min 94°C/1 min 53°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos     *BioTaq
	R:	TCTCGCCCATCTTGACCA			
<i>ppsA</i>	F:	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos     *BioTaq
	R:	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG			
<i>trpE</i>	F:	GCGGCCAGGGTCGTGAG	811	94°C/5 min 94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos     *BioTaq
	R:	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT			

**Tabla 12. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos empleados para secuenciar los genes “housekeeping” para MLST**

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)
<i>acsA</i>	Seq-F:	GCCACACCTACATCGTCTAT	390pb
	Seq-R:	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC	
<i>aroE</i>	Seq-F:	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	495pb
	Seq-R:	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	
<i>guaA</i>	Seq-F:	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC	372pb
	Seq-R:	GACGTTGTGGTGCGACTTGA	
<i>mutL</i>	Seq-F:	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	441pb
	Seq-R:	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	
<i>nuoD</i>	Seq-F:	ACGGCGAGAACGAGGACTAC	366pb
	Seq-R:	TGGCGGTCCGGTGAAGGTGAA	
<i>ppsA</i>	Seq-F:	GGTGACGACGGCAAGCTGTA	369pb
	Seq-R:	GTATCGCCTTCGGCACAGGA	
<i>trpE</i>	Seq-F:	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	441pb
	Seq-R:	GGTGTCCATGTTGCCGTTCC	

La secuenciación de estos genes se llevó a cabo por la empresa COGENICS © Beckman Coulter Genomics, U.K. El análisis de las secuencias se realizó con los programas informáticos antes mencionados y el número de alelo y la secuencia tipo (ST) se obtuvo al introducir las secuencias en la página: <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

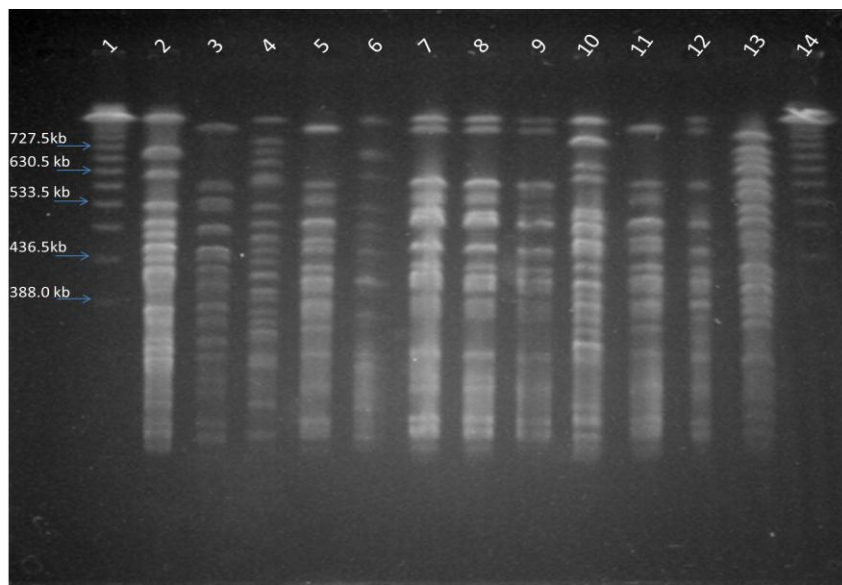
## 8. RESULTADOS

Es de gran importancia conocer la relación genética y la presencia de mecanismos de resistencia a nivel regional y nacional, por lo que en este trabajo se llevó a cabo a través del estudio de aislados de *P. aeruginosa* provenientes de 2 unidades hospitalarias.

### 8.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

#### 8.1.1 Aislados de *P. aeruginosa* del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE de la Ciudad de México.

Los 21 aislados (100%) fueron tipificables, la macrorestricción del DNA genómico por medio de la enzima *SpeI* en estos aislados, generó de 14 a 23 bandas claramente visibles. El análisis de la macrorestricción y de los fragmentos generados resultó en 21 diferentes patrones de bandeo. En la Figura 4 se muestra un ejemplo del bandeo presentado.



**Figura 4. Perfil de PFGE de aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE de la Cd. de México.** Un ejemplo de los patrones de bandeo de DNA genómico digerido con la enzima de restricción *SpeI* de algunos aislados clínicos de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* PAO1 fue utilizada como cepa de referencia. Para los aislados Ps84 y Ps22 se repitió la macrorestricción y el corrimiento electroforético. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (MPM), **carril 2:** Ps52, **carril 3:** Ps74, **carril 4:** Ps78, **carril 5:** Ps81, **carril 6:** Ps84, **carril 7:** Ps87, **carril 8:** Ps89, **carril 9:** Ps91, **carril 10:** Ps94, **carril 11:** Ps95, **carril 12:** Ps22, **carril 13:** PAO1, **carril 14:** MPM.

A partir de las imágenes de los corrimientos electroforéticos se elaboraron matrices de similitud y posteriormente se elaboró un dendrograma (Figura 5) con el programa NTSYSpc 2.21q (Dice/UPGMA).

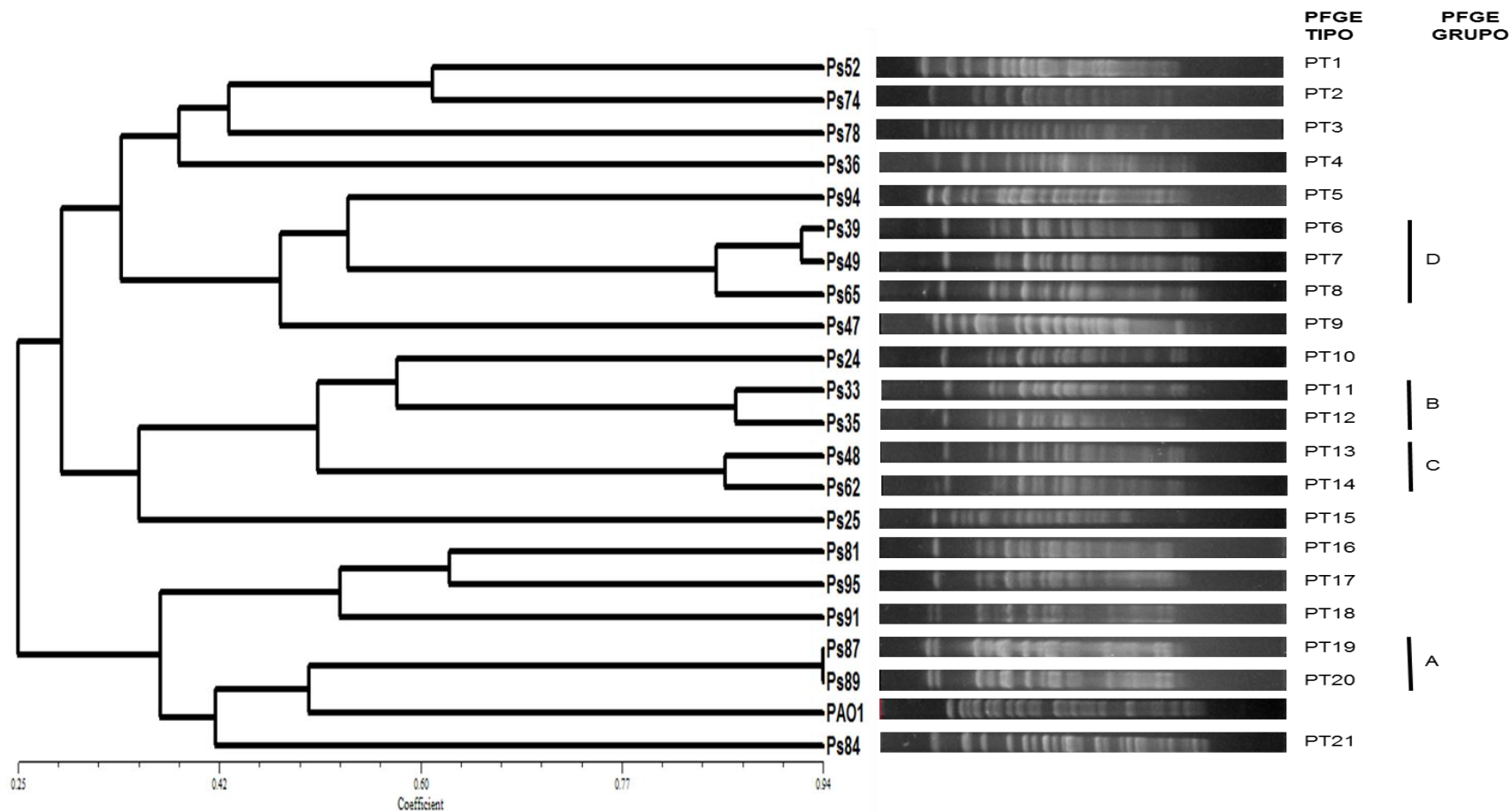


Figura 5. Dendrograma de similitud de 21 aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México. La escala inferior representa el coeficiente de similitud de Dice. PT: pulsotipos

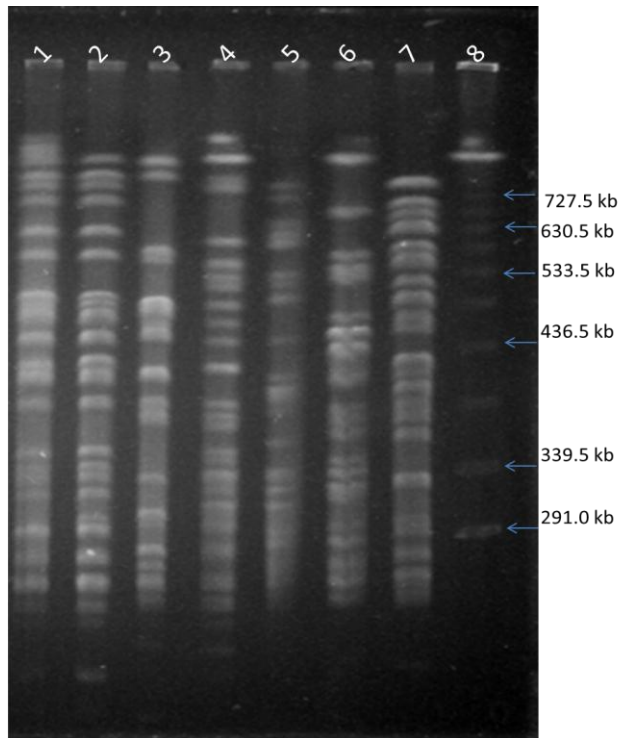
Con la finalidad de establecer posibles relaciones genéticas entre los aislados clínicos de *P. aeruginosa* de esta Unidad Hospitalaria, se utilizó el coeficiente de similitud de Dice. Las cepas que presentaron un coeficiente de similitud de 1 en los patrones de bandeo, se incluyeron en el mismo pulsotipo (PT) y se enumeraron de manera secuencial. Además, los aislados que presentaron un coeficiente de similitud  $\geq 0.80$  fueron incluidos en el mismo grupo, y fueron designados por letras del abecedario.

Bajo estos criterios se identificaron 21 PT los cuales se nombraron como PT1 a PT21, así como 4 grupos con dos a tres aislados cada uno, asignados con las letras de la A a la D; los aislados de cada grupo están relacionados genéticamente, según los criterios de Tenover *et al.* 1995 ( $\leq 6$  diferencias en los fragmentos de restricción). Los aislados restantes que se encuentran en el dendograma, con coeficientes de Dice menores a 0.65 fueron definidos como no relacionados genéticamente según los mismos criterios.

De acuerdo con la información previamente reportada (Ayala, 2013; Martínez, 2011; Valerio, 2012) , se observó que los aislados pertenecientes al mismo grupo de PFGE, presentaron un fenotipo y genotipo de resistencia similar (Anexo 3). En el grupo A se encontraron los aislados Ps87 y Ps89; en el grupo B los aislados Ps33 y Ps35; el grupo C estuvo conformado por Ps62 y Ps48; y en el grupo D, Ps49, Ps65 y Ps39. Los 12 aislados restantes no se encontraron genéticamente relacionados.

### **8.1.2 Aislados de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla**

Los 25 aislados (100%) fueron tipificables, la macrorestricción del DNA genómico por medio de la enzima *SpeI* en estos aislados, generó de 18 a 29 bandas claramente visibles. El análisis de la macrorestricción y de los fragmentos generados resultó en 25 diferentes patrones de bandeo. En la Figura 6 se muestra un ejemplo del bandeo presentado.



**Figura 6. Perfil de PFGE de aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla.** Patrones de bandeo de DNA genómico digerido con la enzima de restricción *SpeI* de algunos aislados clínicos de *P. aeruginosa*. La *P. aeruginosa* PAO1 fue utilizada como cepa de referencia. MPM: Marcador de peso molecular. **Carril 1:** PE06, **carril 2:** PE52, **carril 3:** PE24, **carril 4:** PE27, **carril 5:** PE28, **carril 6:** PE29, **carril 7:** PAO1, **carril 8:** MPM.

Del análisis de los corrimientos electroforéticos, se elaboró el dendograma de similitud (Figura 7) y utilizando los criterios señalados anteriormente, se identificaron 25 PT los cuales se nombraron como PT1 a PT25, así como 2 grupos con dos a tres aislados cada uno, asignados con las letras A y B; los aislados de cada grupo están relacionados genéticamente, según los criterios de Tenover *et al.* 1995 ( $\leq 6$  diferencias en los fragmentos de restricción). Los aislados restantes que se encuentran en el dendograma, con coeficientes de Dice  $< 0.80$  pero  $> 0.65$  fueron definidos como posiblemente relacionados genéticamente y los aislados con coeficientes  $\leq 0.65$  se clasificaron como no relacionados, según los mismos criterios.

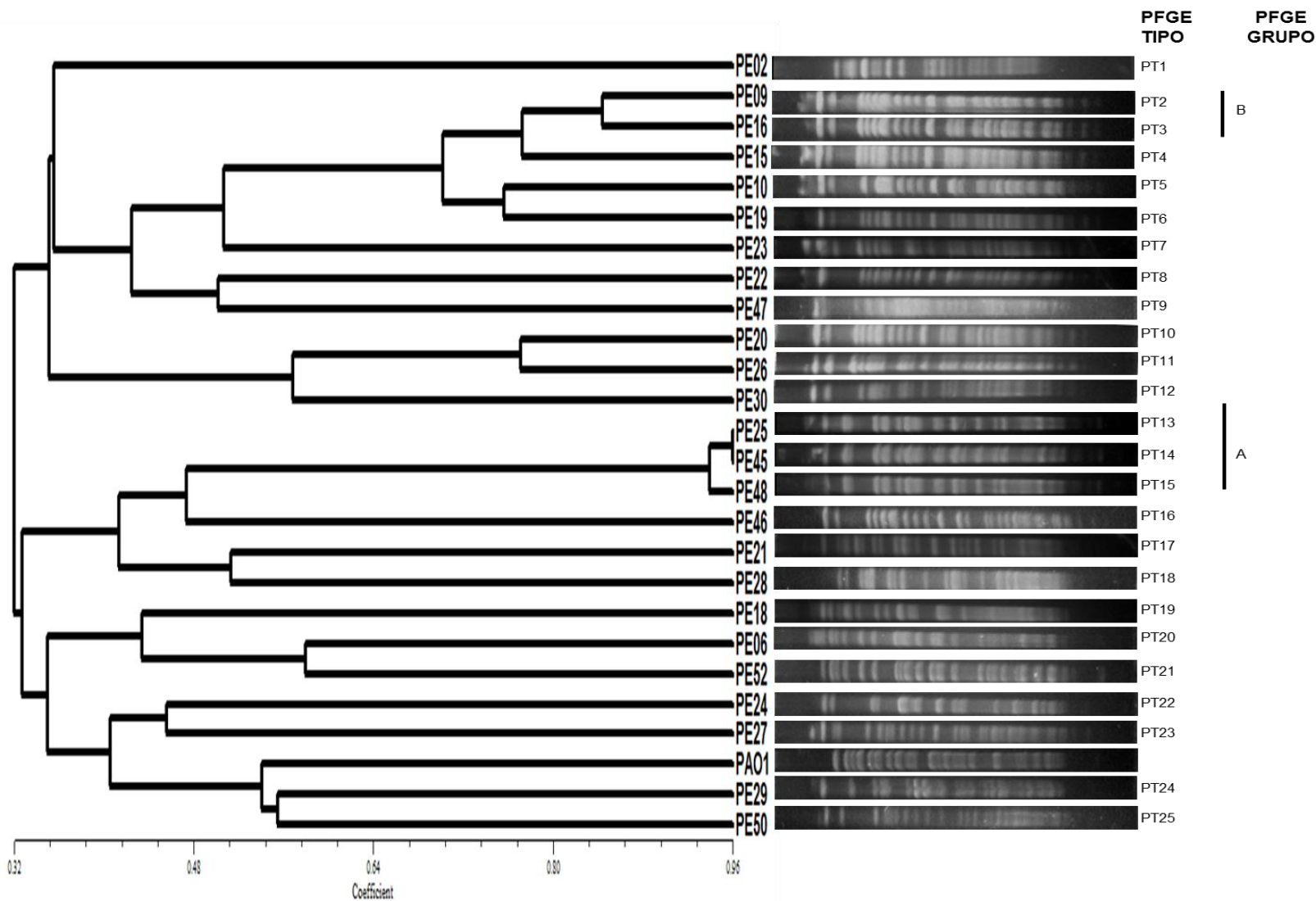


Figura 7. Dendrograma de similitud de 25 aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla. La escala inferior representa el coeficiente de similitud de Dice.

De acuerdo con la información que se tenía del perfil fenotípico de resistencia de estos aislados (Ramos, 2014) se observó que los que tenían relación genética presentaron un fenotipo similar (Anexo 4). En el grupo A se encuentran los aislados PE25, PE45 y PE48; los aislados PE09 y PE16 se clasificaron en el grupo B. Por otro lado PE20 y PE26; PE09, PE16, PE15, PE10 y PE19 fueron definidos como posiblemente relacionados. Los 15 aislados restantes resultaron no relacionados genéticamente.

## 8.2 AMPLIFICACIÓN DE BETA-LACTAMASAS TIPO IMP, GES y PSE

Se amplificaron genes para serin-beta-lactamasas ( $bla_{PSE}$ ,  $bla_{GES}$ ) y metalo-beta-lactamasas ( $bla_{IMP}$ ) a los 25 aislados del HR ISSSTE de la Ciudad de Puebla. Las figuras 8 y 9 muestran los amplificados para los genes  $bla_{IMP}$  y  $bla_{GES}$ . De los 25 aislados, 10 (40%) amplificaron para  $bla_{IMP}$ , 6 para  $bla_{GES}$  (24%) y ninguno amplificó para  $bla_{PSE}$ . (Figura 10).

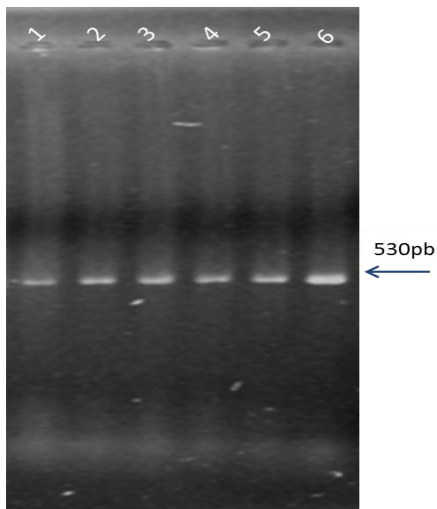


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificados del gen  $bla_{IMP}$  para diversos aislados de *P. aeruginosa* en estudio del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla. Carril 1: PE09, carril 2: PE15, carril 3: PE20, carril 4: PE46, carril 5: PE52, carril 6: control (IMP-15).

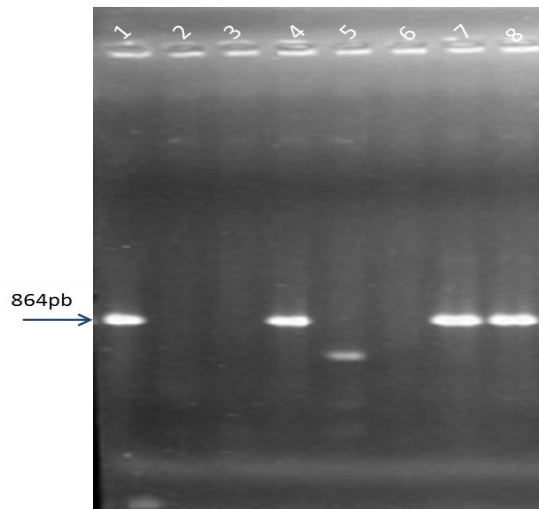
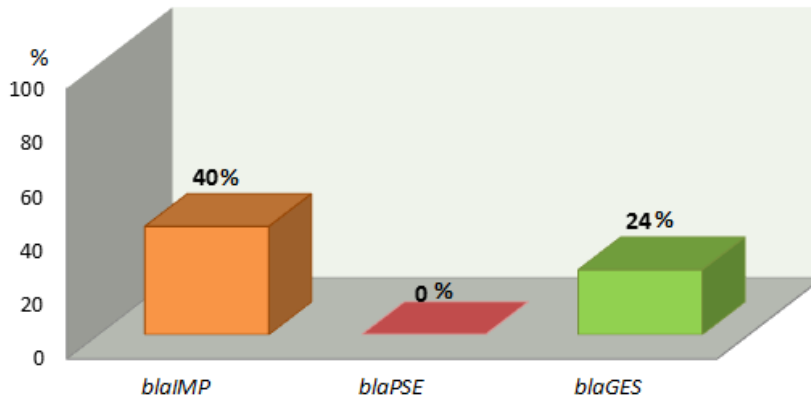


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificados del gen  $bla_{GES}$  para diversos aislados de *P. aeruginosa* en estudio del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla. Carril 1: control (Ps36) carril 2: PE24, carril 3: PE25, carril 4: PE26, carril 5: PE27, carril 6: PE28, carril 7: PE29, carril 8: PE30.



**Figura 10. Porcentaje de amplificación para los genes *blaIMP*, *blaPSE* y *blaGES* en los aislados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla.**

Un dato importante acerca de los aislados de este Hospital, es que había 6 de ellos que pertenecían a los mismos pacientes y cuya muestra había sido recolectada en fechas diferentes o provenían de diferente sitio anatómico, que tenían un fenotipo de resistencia diferente y no estaban genéticamente relacionados de acuerdo a PFGE; además PE21 amplificó para los genes *blaIMP* y *blaGES*, por ello estos 7 aislados fueron seleccionados para la determinación de concentración mínima inhibitoria y el estudio completo de los mecanismos involucrados en su multiresistencia.

### **8.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)**

Se realizó la determinación de la CMI de los 7 aislados, provenientes de mismos pacientes, los cuales presentaban diferencias en los resistotipos y eran multidrogoresistentes como se mencionó anteriormente, esto se corroboró con la determinación de la CMI; además se observó que en la prueba de Kirby Baüer varios aislados mostraron sensibilidad para algunos antibióticos, y al realizar la determinación de CMI fueron resistentes (Tabla 13). Por otro lado, para la mayoría de los aislados se observaron altas CMIs para los antibióticos probados, razón por

la cual se procedió a estudiar los mecanismos que pueden estar involucrados de manera simultánea en la resistencia y que puedan explicar estos resultados.

#### **8.4 IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA DE LOS 7 AISLADOS SELECCIONADOS.**

A los siete aislados se les realizó la identificación de algunos genes que codifican para enzimas relacionadas con la resistencia a beta-lactámicos y para aminoglucósidos, obteniendo que para beta-lactámicos: 100% de los aislados portaron *bla*<sub>OXA-50</sub>, 85.7% *bla*<sub>OXA-2</sub>, 42.8% *bla*<sub>IMP-18</sub>, 14.2% *bla*<sub>IMP-15</sub> y 42.8% amplificaron para *bla*<sub>GES</sub>, de los cuales 2 aislados portaron *bla*<sub>GES-2</sub> y uno presentó una variante aún no determinada. Para aminoglucósidos, el 71.4% porto *aac-6'-Ib*. Para el resto de los genes buscados, el 100% fue negativo para las metalo beta-lactamasas: *bla*<sub>GIM-1</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub>; serin beta-lactamasas: *bla*<sub>VEB-1</sub>, *bla*<sub>PSE-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>PER</sub> y *bla*<sub>BEL</sub>; beta-lactamasas del tipo oxa: *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-11</sub>, *bla*<sub>OXA-13</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub>. Para aminoglucósidos ningún aislado portó *aac-3'-IIa* (Tabla 13). Los alineamientos de cada gen se muestran en el anexo 5.

En el caso de PE21, la secuencia obtenida del gen *bla*<sub>GES</sub>, tuvo porcentajes de identidad del 96% con *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>GES-2</sub>, *bla*<sub>GES-3</sub>, *bla*<sub>GES-4</sub>, *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>GES-6</sub>, *bla*<sub>GES-7</sub>, *bla*<sub>GES-11</sub>, *bla*<sub>GES-13</sub>, *bla*<sub>GES-16</sub> y *bla*<sub>GES-26</sub>, sin embargo al no tener una identidad del 100% con ninguna variante del gen, se piensa que este aislado presenta un nuevo alelo, el cual debe determinarse en estudios posteriores realizando nuevamente su amplificación y secuenciación para obtener el gen completo y corroborar los cambios nucleotídicos encontrados en este trabajo.

**Tabla 13. Fenotipo y genotipo de resistencia, y CMI de 7 aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.**

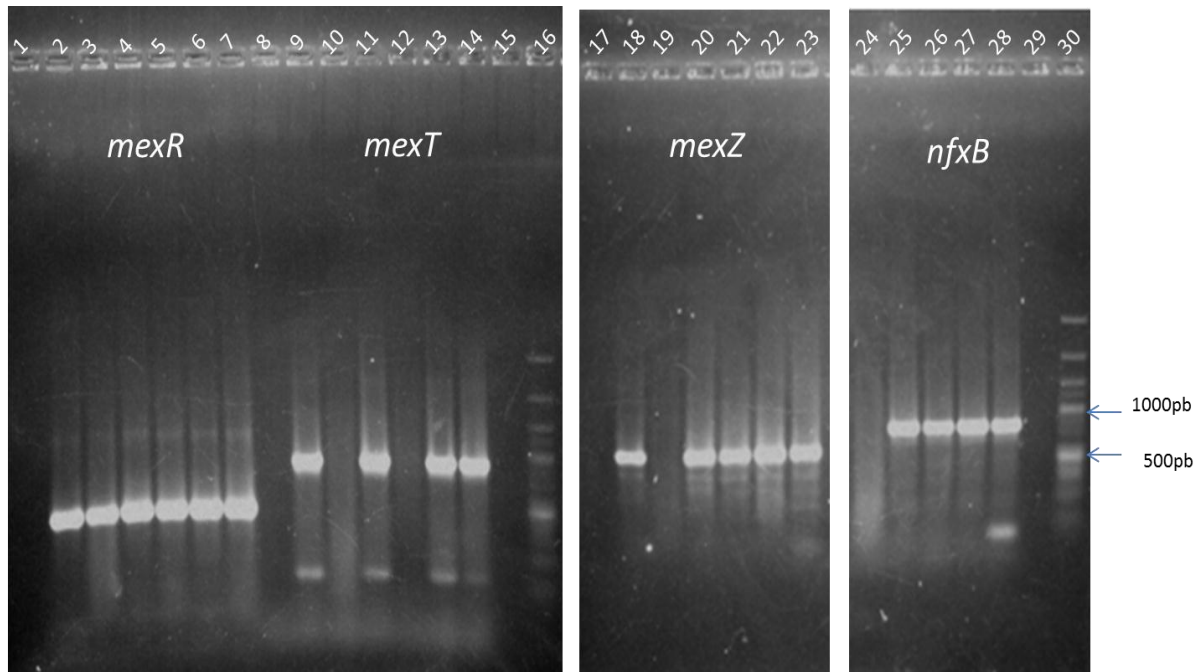
AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI(µg/ml)								GENOTIPO
					CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GM	CL	
PsE02	UCI-5	Lavado bronquial	18-abr-13	CF, CTX, FEP, MEM, OFX, C, SXT	16	64	128	128	4	<8	4	<2	oxa-50
PsE20	C-529-MIH	Expectoración	19-ago-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	>512	>512	>512	>512	128	>512	>512	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50, aac-6'-Ib
PsE06	Urología	Urocultivo	10-may-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50, aac-6'-Ib
PsE52	C.E. MI	Urocultivo	14-ene-14	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, *NET CIP, OFX, NOR, C, SXT	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50
PsE26	C-425-CIR	Expectoración	17-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	128	64	>512	64	64	128	>512	<2	ges-2, oxa-2, oxa-50, aac-6'-Ib
PsE30	C-425-CIR	Urocultivo	17-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	64	32	>512	64	128	256	>512	<2	ges-2, oxa-2, oxa-50, aac-6'-Ib
PsE21	C-512-MIH	Expectoración	20-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	>512	>512	>512	128	128	>512	>512	<2	imp-15, ges¿?, oxa-2, oxa-50, aac-6'-Ib

Las filas marcadas con un mismo color pertenecen a aislados de un mismo paciente. Las diferencias entre aislados de un mismo paciente se resaltan en color rojo. El signo ¿? Indica que se desconoce la variante del gen. **PIP**: Piperacilina, **TIC**: Ticarcilina, **CB**: Carbenicilina, **TZP**: Piperacilina/Tazobactam, **TIM**: Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF**: Cefalotina, **CAZ**: Ceftazidima, **CTX**: Cefotaxima, **CRO**: Ceftriaxona **FEP**: Cefepime, **IMP**: Imipenem, **MEM**: Meropenem, **ATM**: Aztreonam, **GM**: Gentamicina, **AN**: Amikacina, **NET**: Netilmicina, **CIP**: Ciprofloxacina, **OFX**: Ofloxacina, **NOR**: Norfloxacina, **C**: Cloranfenicol, **STX**: Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL**: Colistina. \*Intermedio.

### 8.5 AMPLIFICACIÓN DE GENES REGULADORES DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM.

Se realizaron ensayos de PCR con el fin de buscar mutaciones en los genes que regulan la expresión de las bombas de expulsión que pudieran estar implicadas en la multiresistencia de los 7 aislados en estudio. Estos genes reguladores son: *mexR* que regula a la bomba MexAB-OprM; *nfxB* que regula a MexCD-OprJ; *mexZ* que regula a MexXY-OprM y *mexT* que regula a la bomba MexEF-OprN.

Los aislados PE20, PE06, PE52, PE30 y PE21 amplificaron para los 4 genes reguladores de bombas de expulsión, mientras que PE02 solo amplificó para *mexR*, y PE21 amplificó solo para *mexR*, *mexZ* y *nfxB* (Figura 11).



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificadores de genes reguladores de bombas de expulsión.** Se amplificaron en 7 aislados de *P. aeruginosa* en estudio del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla. ***mexR*** carril 1: Blanco, carril 2: control (PAO1), carril 3: PE02, carril 4: PE20, carril 5: PE26, carril 6: PE30, carril 7: PE21; ***mexT*** carril 8: blanco, carril 9: control (PAO1), carril 10: PE02, carril 11: PE20, carril 12: PE26, carril 13: PE30, carril 14: PE21, carril 15: vacío, carril 16: MPM; ***mexZ*** carril 17: blanco, carril 18: control (PAO1), carril 19: PE02, carril 20: PE20, carril 21: PE26, carril 22: PE30, carril 23: PE21; ***nfxB*** carril 24: PE02, carril 25: PE20, carril 26: PE26, carril 27: PE30, carril 28: PE21, carril 29: vacío, carril 30: MPM.

Los reguladores de bombas de expulsión amplificadas para los aislados se mandaron a secuenciar, se hicieron las comparaciones de las secuencias obtenidas utilizando el programa BLAST con las secuencias del Gen Bank y posteriormente se hizo el alineamiento nucleotídico y aminoacídico en Clustal Omega (Anexo 6) obteniendo lo siguiente (Tabla 14):

- Para el regulador MexR, PE02, PE20, PE26, PE30 y PE21 no presentaron cambios. Los aislados PE06 y PE52 presentaron la mutación Val126Glu.
- Para MexT, los aislados PE20, PE06, PE52, PE30 y PE21 presentaron una deleción de 8 pb (235-242 pb) que ocasionó un cambio en el marco de lectura de la proteína. PE02 y PE26 no amplificaron para este regulador.

- En el caso de MexZ, los aislados PE20, PE26 y PE30 no presentaron cambios; PE06 y PE52 tuvieron la mutación Glu81Asp y PE21 la mutación Gly162Glu.
- Para el regulador NfxB, no amplificó en PE02, para el resto de los aislados no presentó cambios.

**Tabla 14. Fenotipo de resistencia, CMI, genotipo y cambios en reguladores de bombas de expulsión de 7 aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.**

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI(µg/ml)								GENOTIPO	REGULADORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN
					CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GM	CL		
PsE02	UCI-5	Lavado bronquial	18-abr-13	CF, CTX, FEP, MEM, OFX, C, SXT	16	64	128	128	4	<8	4	<2	oxa-50	mexR: Silvestre
PsE20	C-529-MH	Expectoración	19-ago-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	>512	>512	>512	>512	128	>512	>512	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50, aac-6'-lb	mexR: Silvestre; mexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; mexZ: Silvestre; nfxB: Silvestre
PsE06	Urología	Urocultivo	10-may-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50, aac-6'-lb	mexR: Val126Glu; mexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; mexZ: Glu81Asp; nfxB: Silvestre
PsE52	C.E. MI	Urocultivo	14-ene-14	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, *NET CIP, OFX, NOR, C, SXT	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50	mexR: Val126Glu; mexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; mexZ: Glu81Asp; nfxB: Silvestre
PsE26	C-425-CIR	Expectoración	17-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	128	64	>512	64	64	128	>512	<2	ges-2, oxa-2, oxa-50, aac-6'-lb	mexR: Silvestre; mexZ: Silvestre; nfxB: Silvestre
PsE30	C-425-CIR	Urocultivo	17-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	64	32	>512	64	128	256	>512	<2	ges-2, oxa-2, oxa-50, aac-6'-lb	mexR: Silvestre; mexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; mexZ: Silvestre; nfxB: Silvestre
PsE21	C-512-MH	Expectoración	20-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	>512	>512	>512	128	128	>512	>512	<2	imp-15, ges¿?, oxa-2, oxa-50, aac-6'-lb	mexR: Silvestre; mexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; mexZ: Gly162Glu; nfxB: Silvestre

Las filas marcadas con un mismo color pertenecen a aislados de un mismo paciente. Las diferencias entre aislados de un mismo paciente se resaltan en color rojo. El signo ¿? Indica que se desconoce la variante del gen. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina. \*Intermedio.

## 8.6 AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN CODIFICANTE DE LA PORINA OprD

Un mecanismo importante involucrado en la resistencia a carbapenémicos son las mutaciones o la presencia de secuencias de inserción en el gen de la porina oprD, por ello se realizó el análisis del gen que codifica esta proteína.

El aislado PE02 fue el único que no amplificó para este gen, para el resto de los aislados se llevó a cabo su secuenciación y análisis encontrándose los siguientes cambios (Tabla 15 y anexo 7).

Ningún aislado presentó mutaciones en los *loops* 2 y 3, los cuales se han relacionado con aumento en la resistencia a imipenem. En cuanto al *loop* 7, los aislados PE06, PE52 y PE21 presentaron 2 deleciones ( $\Delta$ 378,  $\Delta$ 379), generando una secuencia de 10 aminoácidos (VDSSSSYAGL) llamada *loop* 7 corto (L7-short), que está relacionada con aumento en la susceptibilidad a meropenem. Por otro lado, se presentaron mutaciones también en los *loops* 1 y 4 (PE20, PE06, PE52, PE26, PE30 y PE21), *loop* 5 (PE06, PE52, PE26, PE30 y PE21); los aislados PE06, PE52 y PE21, presentaron mutaciones en los *loops* 6 y 7, sin embargo no se ha reportado que mutaciones en estos *loops* interfieran con la resistencia a carbapenémicos; en estos mismos aislados se presentaron codones de paro tempranos en el *loop* 8, lo que pudiera interferir con la expresión de la porina. Además en el aislado PE20, la proteína se encontró trunca en la posición 246 debido a la presencia de la secuencia de inserción IS1394.

Por último, para los aislados PE26 y PE30 solamente se pudieron amplificar y secuenciar 828 pb de 1332 pb en dirección 5' a 3', traduciendo 276 de 443 aminoácidos de la porina OprD y no encontrando codones de paro tempranos en esta parte. Para amplificar la parte final del gen se usaron diversos oligonucleótidos, sin embargo no se obtuvo amplificado en ninguno de los casos.

**Tabla 15. Fenotipo de resistencia, y cambios aminoacídicos en los *loops* de la porina OprD de 7 aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla**

AISLADO	SERVICIO	CMI(µg/ml)								porina OprD							
		CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GM	CL	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
PsE02	UCI-5	16	64	128	128	4	<8	4	<2	No amplificó							
PsE20	C-529-MIH	>512	>512	>512	>512	128	>512	>512	<2	S57E S59R	WT	WT	E230K I232M Y233A	Truncada por IS1394			
PsE06	Urología	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	S57E S59R	WT	WT	E230K	N262T A267S	R310G	V359L, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L	Codón de paro en el a.a. 424
PsE52	C.E. MI	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	S57E S59R	WT	WT	E230K	N262T A267S	R310G	V359L, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L	Codón de paro en el a.a. 424
PsE26	C-425-CIR	128	64	>512	64	64	128	>512	<2	S57E S59R	WT	WT	E230K	N262T A267S	No amplificó		
PsE30	C-425-CIR	64	32	>512	64	128	256	>512	<2	S57E S59R	WT	WT	E230K	N262T A267S	No amplificó		
PsE21	C-512-MIH	>512	>512	>512	128	128	>512	>512	<2	S57E S59R	WT	WT	E230K	N262T A267S	R310G	V359L, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L	Codón de paro en el a.a. 415

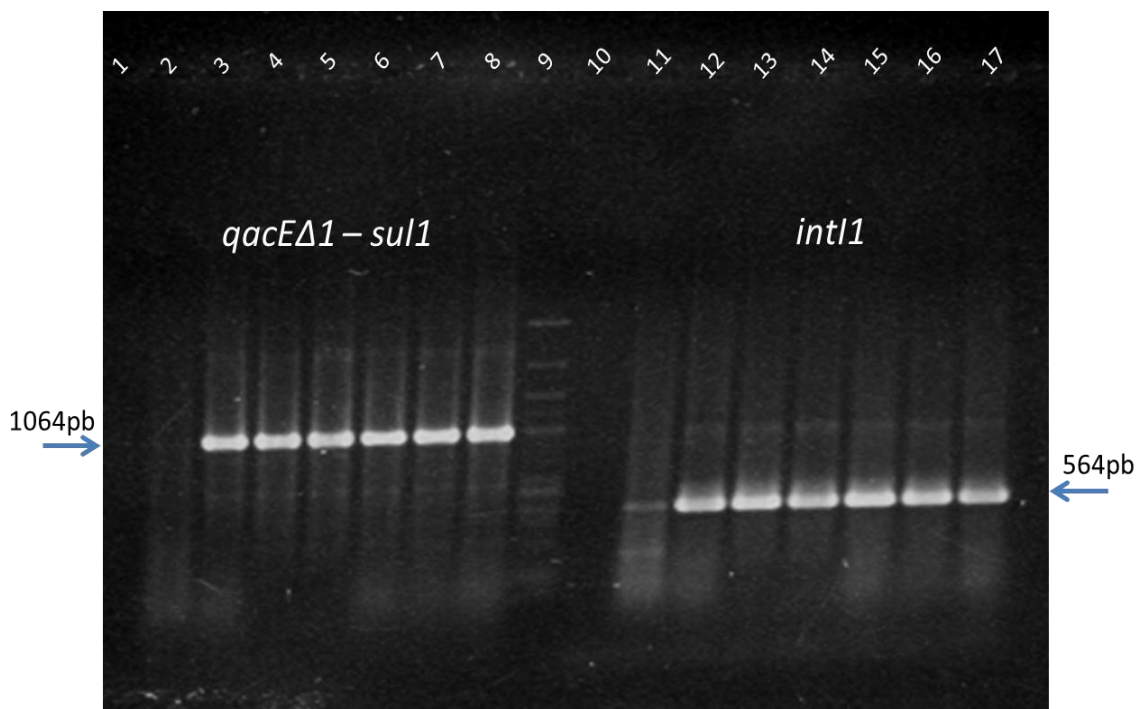
Las filas marcadas con un mismo color pertenecen a aislados de un mismo paciente. Las diferencias entre aislados de un mismo paciente se resaltan en color rojo. **PIP:** Piperacilina, **TIC:**Ticarclina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:**Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina. \*Intermedio.

## 8.7 DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE INTEGRONES CLASE 1

### 8.7.1 Amplificación de los genes conservados de integrones clase 1 (*intl1*, *qacEΔ1* y *sul1*) en *P. aeruginosa*

Para conocer si los 7 aislados tenían la presencia de integrones de clase 1 que pudieran estar albergando genes de resistencia, se realizó la amplificación de las regiones conservadas de estas estructuras.

El aislado PE02 sólo amplificó el gen de *intl1*, el resto de los aislados amplificaron para la región conservada 5' *intl1* y 3' *qacEΔ1-sul1* (Figura 12).



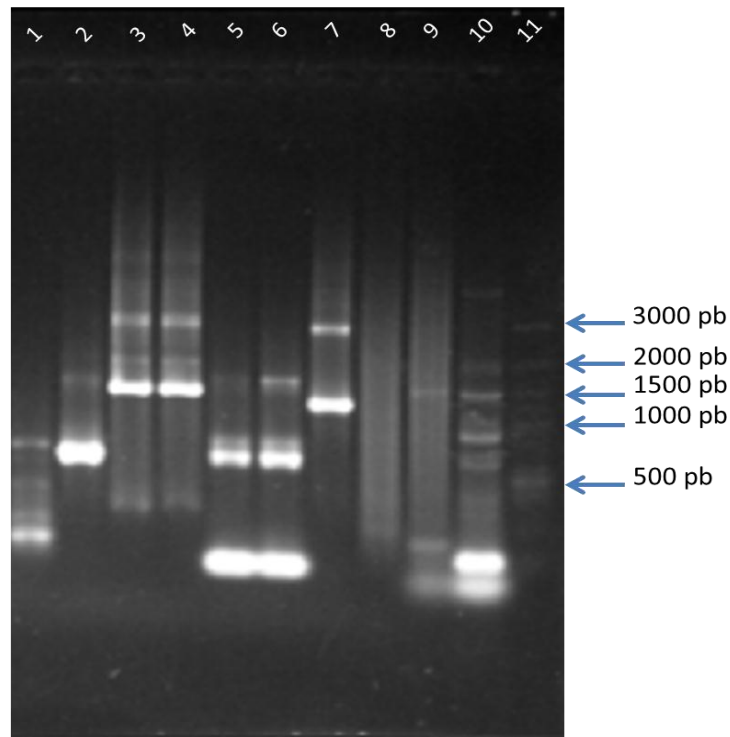
**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificados de los genes de las regiones conservadas en integrones de clase 1.** Se amplificaron en los 7 aislados de *P. aeruginosa* en estudio del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla. *qacEΔ1-sul1* carril 1: Blanco, carril 2: PE02, carril 3: PE20, carril 4: PE06, carril 5: PE52, carril 6: PE26, carril 7: PE30, carril 8: PE21, carril 9: MPM; *intl1* carril 10: vacío, carril 11: PE02, carril 12: PE20, carril 13: PE06, carril 14: PE52, carril 15: PE26, carril 16: PE30, carril 17: PE21.

### 8.7.2 Amplificación de la región variable de integrones clase 1

A partir de estos resultados y con la información que se contaba acerca de su fenotipo de multiresistencia y los genes para los cuales habían amplificado estos

aislados, se decidió conocer si dichos genes estaban formando parte de la estructura de un integrón de clase 1.

Para ello se comenzó realizando la amplificación de la región variable de los 7 aislados para saber cuántos integrones podrían estar portando y el tamaño aproximado de estos (Figura 13).



**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de la región variable (RV) en los aislados seleccionados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla, para la caracterización de integrones. Carril 1: PE02, carril 2: PE20, carril 3: PE06, carril 4: PE52, carril 5: PE26, carril 6: PE30, carril 7: PE21, carril 11: MPM. Los carriles 8, 9 y 10 son pruebas para amplificar genes no relacionados con la RV.**

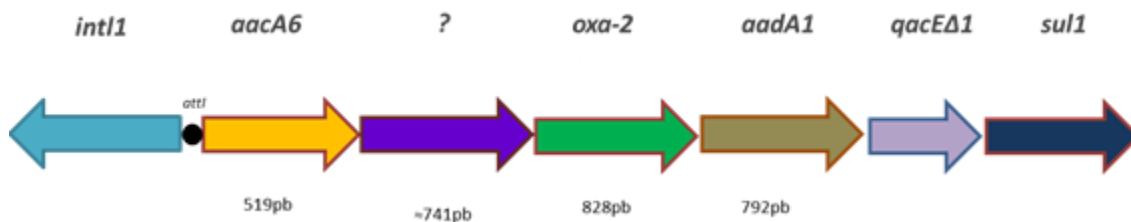
Para continuar con este estudio se eligieron los aislados PE06, PE52 y PE21, para la caracterización de sus integrones.

Los aislados PE06 y PE52 fueron aislados de urocultivo del mismo paciente pero recolectados en fechas diferentes, de acuerdo a resultados anteriores, la CMI, los cambios en reguladores de bombas de expulsión y las mutaciones en los

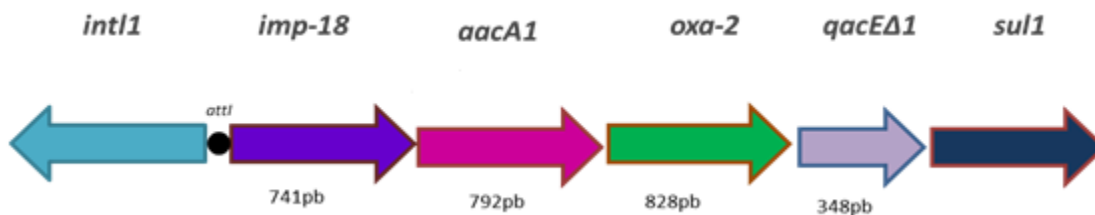
loops de la proteína OprD son idénticos, en lo que respecta al genotipo ambos portan los genes *imp-18*, *oxa-2* y *oxa-50* y PE06 además porta el gen *aac-6'-lb* (Tablas 14 y 15); por otro lado en el dendograma de similitud aparecen como no relacionados con un coeficiente de Dice <0.65. En la figura 11 se puede observar que ambos aislados amplifican las mismas bandas para la región variable del integrón de clase 1.

Estos aislados ya habían sido parcialmente estudiados por Bello, 2014 en donde se encontraron 2 integrones con las estructuras descritas en la figura 14.

### PE06



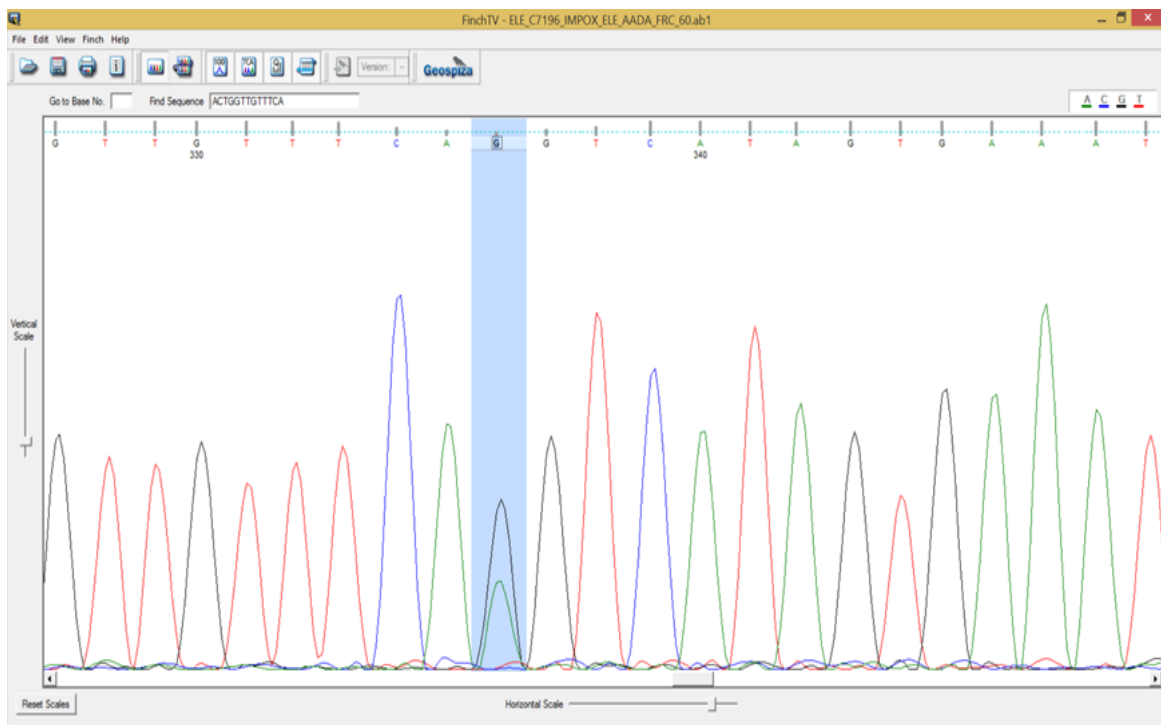
### PE52



**Figura 14. Esquema parcial de los integrones encontrados en los aislados PE06 y PE52 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.** El integrón del aislado PE06 se encuentra parcialmente secuenciado, el signo (?) probablemente corresponda al gen *imp-18* con un peso alrededor de 741 pb. Para el aislado PE52 faltan determinar las uniones de la región variable con las conservadas (Tomado de Bello, 2014).

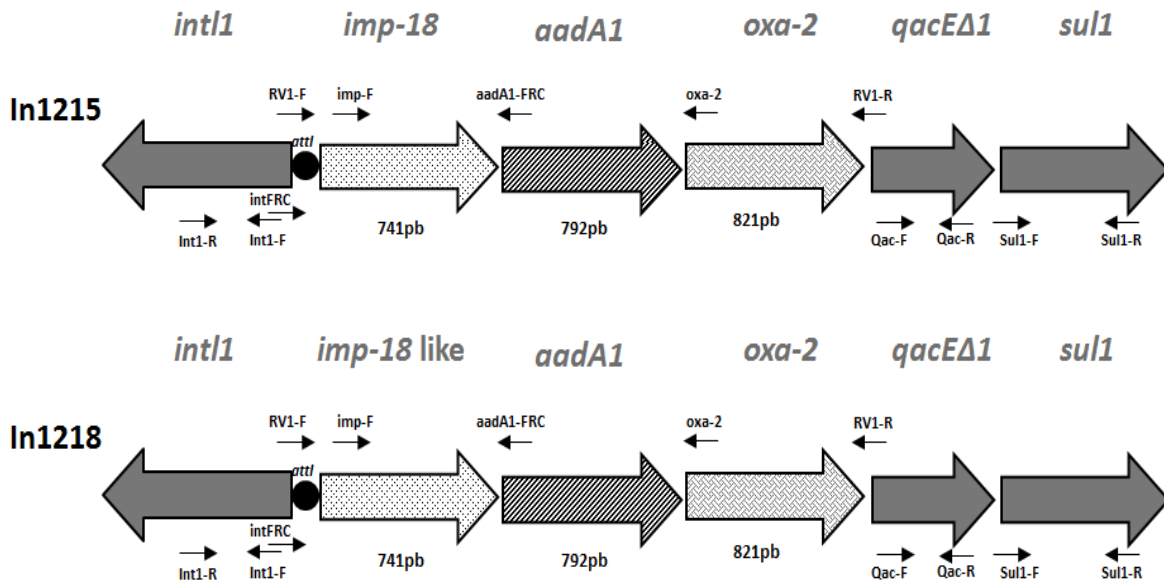
En el caso del integrón de PE52, ya se tenía caracterizada la región variable completa de 2,772pb (Bello, 2014), en este trabajo, se amplificaron y secuenciaron los genes de la región 5'-CS (*int11*) y 3'-CS (*qacEΔ1-sul1*), y las uniones de estas regiones con los genes cassette (Anexo 8); además al revisar el análisis de las

secuencias obtenidas por Bello, 2014 se encontró que el gen *aacA1* en realidad era una adenilasa *aadA1* (Figura 14), y que en el electroferograma de la secuenciación de *imp-18*, en el nucleótido 640 se observan 2 picos superpuestos (Figura 15, Anexo 8) y fue comprobado en 3 reacciones distintas, este cambio único en la secuencia del gen (nuevo alelo *imp-18* like), sugiere la existencia de 2 integrones con la estructura descrita en la Figura 16.



**Figura 15. Análisis de electroferograma para confirmar alelo del gen *imp-18* en el aislado PE52. El doble pico se marcó con el sombreado azul.**

Es importante resaltar que ambas estructuras no se encontraban descritas anteriormente en integrones de clase 1, por lo que les fue asignado el número In1215 y In1218 respectivamente en Integrall (The Integron Database <http://integrall.bio.ua.pt/>) y su secuencia está por subirse al GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

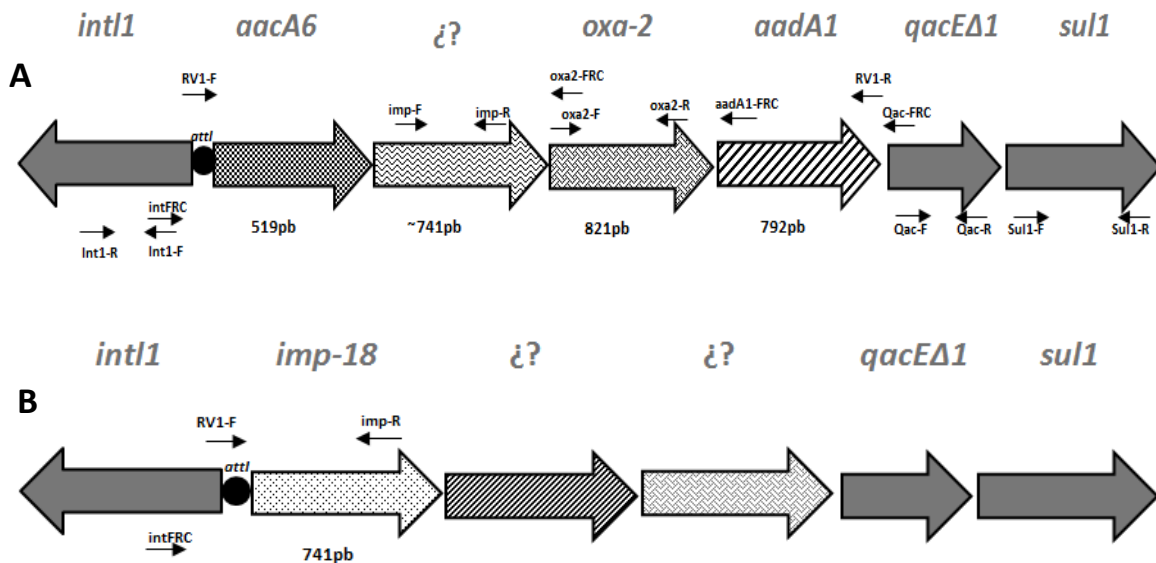


**Figura 16.** Esquema de los integrones de clase 1, encontrados en el aislado PE52 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla. Las flechas indican los oligonucleótidos utilizados para secuenciar la estructura del integrón. La secuencia completa se puede ver en el anexo 8.

En el caso del integrón del aislado PE06 de región variable de ~3000 pb se tenía caracterizado parcialmente, faltando un gen por secuenciar el cual se pensaba que correspondía a *imp-18* con un peso alrededor de 741 pb (Bello, 2014). En este trabajo se realizó la amplificación y secuenciación de los genes de la región 5'-CS (*int1*) y 3'-CS (*qacEΔ1-sul1*), así como amplificaciones con diferentes juegos de oligonucleótidos (Figura 17a), para conocer la secuencia del gen faltante y tener las uniones de las regiones conservadas con los genes cassette, sin embargo las secuencias recibidas en todos los casos no nos permitieron realizar dichas uniones.

Además, de la secuenciación de la reacción realizada con los oligonucleótidos intFRC-impR, se obtuvo la estructura indicada en la figura 17b, sugiriendo que PE06 podría albergar otro integrón, con estructura similar a In1215 y In1218 del aislado PE52 (Anexo 9), lo que es coincidente con lo encontrado en la amplificación de la región variable donde observamos las mismas bandas en los

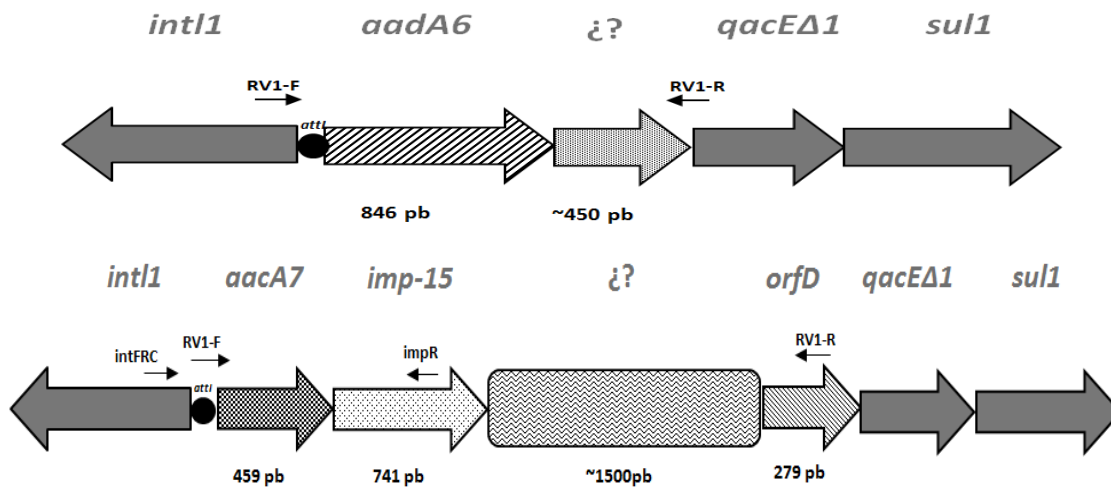
dos aislados. Los dos integrones de ambos aislados continúan en estudio para su caracterización completa.



**Figura 17. Esquema de los integrones de clase 1 encontrados en el aislado PE06 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.** A. Integrón caracterizado parcialmente. No se obtuvo el gen faltante, ni las uniones de las regiones conservadas con los genes cassette. B. Nuevo integrón caracterizado parcialmente encontrado en este trabajo con estructura relacionada con In1215 y In1218 de PE52, *bla<sub>IMP-18</sub>* está secuenciado parcialmente (Anexo 9). Las flechas indican los oligonucleótidos utilizados para secuenciar la estructura de los integrones. El signo (¿?) indica que se desconoce que gen o genes están formando la región variable de estos integrones.

En cuanto a PE21, este fue aislado de expectoración y presentó los genes *bla<sub>IMP-15</sub>* y *bla<sub>GES</sub>*, este último aún no se ha determinado a que variante corresponde. En la amplificación de la región variable de este aislado se observan 2 bandas de diferente peso (Figura 13), de estas se purificó y secuenció parcialmente la banda de ~1300 pb (Anexo 10), encontrándose un integrón de clase 1 con la estructura descrita en la Figura 18a, aun cuando falta determinar a que corresponden los 450 pb y secuenciar completamente el gen *aadA6*; así mismo, se secuenció una parte de la región variable (RV) del otro integrón de ~3000 pb con los genes *aacA7* y *bla<sub>IMP-15</sub>* (secuenciados parcialmente) en la región 5', y *orfD* (secuenciado

parcialmente) adyacente a la región 3'-CS (Anexo 10 y Figura 18b). Los 2 integrones de este aislado continuarán siendo estudiados.



**Figura 18. Esquema de la probable estructura de los integrones parcialmente secuenciados encontrados en el aislado PE21 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.** A: integrón de RV ~1300 pb, *aadA6* parcialmente secuenciado. B: integrón de RV ~3000 pb, *aacA7*, *bla<sub>IMP-15</sub>* y *orfD* parcialmente secuenciados. Las flechas indican los oligonucleótidos utilizados para secuenciar la estructura del integrón. La secuencia parcial se puede ver en el anexo 10. El signo (¿?) indica que se desconoce que gen o genes están formando la región variable de estos integrones. Para ambas estructuras falta secuenciar las regiones conservadas 5' y 3'.

## 8.8 GENOTIPIFICACIÓN POR MLST DE ALGUNOS AISLADOS EN ESTUDIO

Para conocer la relación clonal de los aislados PE06 y PE52 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla, portadoras de *bla<sub>IMP-18</sub>* y las cuales portan integrones diferentes, se les determinó el número de Secuencia Tipo con ayuda de Elena Bello en el laboratorio de la Dra. Carmen Torres en la Universidad de la Rioja España. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Estos resultados nos permiten corroborar el resultado obtenido mediante la genotipificación por PFGE, acerca de que estos aislados no pertenecen a la

misma clona, a pesar de haber sido recolectados del mismo paciente, en fecha distinta, y de tener mecanismos de resistencia e integrones muy parecidos.

**Tabla 16. Perfil alélico y secuencia tipo de los aislados PE06 y PE52.**

Aislado	Perfil alélico							ST
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
PE06	13	4	5	21	12	7	15	308
PE52	15	5	5	21	50	4	14	385

***acsA*** (Acetil coenzima A sintasa), ***aroE*** (Shikimato deshidrogenasa), ***guaA*** (GMP sintasa), ***mutL***(Proteína de reparación de DNA), ***nuoD*** (NADH deshidrogenasa I cadena C, D), ***ppsA*** (Fosfoenol piruvato sintasa), ***trpE*** (Componente I de antranilato sintasa). El número de secuencia tipo (**ST**) se obtiene introduciendo el número de alelo en la página <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

En la tabla 17 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el estudio de los mecanismos involucrados en la resistencia de los 7 aislados seleccionados.

**Tabla 17. Resumen de las características de los 7 aislados en estudio del HR ISSSTE de la Cd de Puebla y sus mecanismos de resistencia.**

AISLADO	ORIGEN	SERVICIO	FECHA	RESISTOTIPO	PT	CMI(µg/ml)							GENOTIPO	CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN	ST	REGULADORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN	PORINA OprD	
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GM						CL
PsE02	Lavado bronquial	UCI-5	18-abr-13	CF, CTX, FEP, MEM, OFX, C, SXT	PT1	16	64	128	128	4	<8	4	<2	oxa-50	ND	ND	MexR: Silvestre	NA
PsE20	Expectoración	C-529-MIH	19-ago-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	PT10	>512	>512	>512	>512	128	>512	>512	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50, aac6	ND	ND	MexR: Silvestre; MexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; MexZ: Silvestre; NfxB: Silvestre	Loop 1: S57E, S59R; Loop 2: SC; Loop 3: SC; Loop 4: E230K, I232M, Y233A; oprD está truncada por IS1394 en el a.a. 246.
PsE06	Urocultivo	Urología	10-may-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	PT20	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50, aac6	Integrón 1 int1, aac6, probable imp-18, oxa-2, aadA1, qacED1, sul1 Integrón 2 int1, imp-18 ¿?	308	MexR: Val126Glu; MexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; MexZ: Glu81Asp; NfxB: Silvestre	Loop 1: S57E, S59R; Loop 2: SC; Loop 3: SC; Loop 4: E230K; Loop 5: N262T, A267S; Loop 6: R310G; Loop 7: V359L, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L (L7-short); Loop 8: codón de paro temprano en la posición 424.
PsE52	Urocultivo	C.E. MI	14-ene-14	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, *NET CIP, OFX, NOR, C, SXT	PT21	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32	<2	imp-18, oxa-2, oxa-50	Integrón 1 int1, imp-18, aadA1, oxa-2, qacED1, sul1 Integrón 2 int1, imp-18 like, aadA1, oxa-2, qacED1, sul1	385	MexR: Val126Glu; MexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; MexZ: Glu81Asp; NfxB: Silvestre	Loop 1: S57E, S59R; Loop 2: SC; Loop 3: SC; Loop 4: E230K; Loop 5: N262T, A267S; Loop 6: R310G; Loop 7: V359L, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L (L7-short); Loop 8: codón de paro temprano en la posición 424.

Las filas marcadas con un mismo color pertenecen a aislados de un mismo paciente. Las diferencias entre aislados de un mismo paciente se resaltan en color rojo. **ND:** No determinado. **NA:** No amplificó. **SC:** Sin cambios; **PT:** Pulsotipo. **ST:** Secuencia Tipo. El signo ¿? Indica que se desconoce la variante del gen o los genes faltantes en el integrón. \*Intermedio. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina.

Tabla 17 continuación....

ASLADO	ORIGEN	SERVICIO	FECHA	RESISTOTIPO	PT	CMI(µg/ml)								GENOTIPO	CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN	ST	REGULADORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN	PORINA OprD
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GM	CL					
PsE26	Expectoración	C-425-CIR	17-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	PT11	128	64	>512	64	64	128	>512	<2	ges-2, oxa-2, oxa-50, aac6	ND	ND	MexR: Silvestre; MexZ: Silvestre; NfxB: Silvestre	Loop 1: S57E, S59R; Loop 2: SC; Loop 3: SC; Loop 4: E230K; Loop 5: N262T, A267S. Loop6, Loop7 y Loop8: NA
PsE30	Urocultivo	C-425-CIR	17-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	PT12	64	32	>512	64	128	256	>512	<2	ges-2, oxa-2, oxa-50, aac6	ND	ND	MexR: Silvestre; MexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; MexZ: Silvestre; NfxB: Silvestre	Loop 1: S57E, S59R; Loop 2: SC; Loop 3: SC; Loop 4: E230K; Loop 5: N262T, A267S. Loop6, Loop7 y Loop8: NA
PsE21	Expectoración	C-512-MIH	20-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	PT17	>512	>512	>512	128	128	>512	>512	<2	imp-15, ges¿?, oxa-2, oxa-50, aac6	Integrón 1 intl1, aadA6, ¿?, qacEΔ1, sul1 Integrón 2 intl1, aacA7, imp-15, ¿?, oriD, qacEΔ1, sul1	ND	MexR: Silvestre; MexT: cambio del marco de lectura a partir del aa 80; MexZ: Gly162Glu; NfxB: Silvestre	Loop 1: S57E, S59R; Loop 2: SC; Loop 3: SC; Loop 4: E230K; Loop 5: N262T, A267S; Loop 6: R310G; Loop7: V359L, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L (L7-short); codón de paro temprano en la posición 415

Las filas marcadas con un mismo color pertenecen a aislados de un mismo paciente. Las diferencias entre aislados de un mismo paciente se resaltan en color rojo. **ND:** No determinado. **NA:** No amplificó. **SC:** Sin cambios; **PT:** Pulsotipo. **ST:** Secuencia Tipo. El signo ¿? Indica que se desconoce la variante del gen o los genes faltantes en el integrón. \*Intermedio. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina.

## 9. DISCUSIÓN

*P. aeruginosa* es una bacteria ubicua en el ambiente que puede ser encontrada en una amplia variedad de hábitats naturales (Häußler, 2004), además es una de las principales causas de las infecciones nosocomiales (Rossolini & Mantengoli, 2005). Otro aspecto sobresaliente radica en su resistencia natural a diversos antibióticos y su capacidad de adquirir, de manera horizontal, genes de resistencia (Poole, 2011), lo que la hace uno de los microorganismos más difíciles de tratar (Henrichfreise *et al.*, 2007) y a su vez dificulta su erradicación en ambientes hospitalarios (Ochoa *et al.*, 2013). Estas características, aunadas al uso indiscriminado de antibióticos, le han permitido dispersarse rápidamente de manera global causando infecciones intrahospitalarias. Por lo que es importante la realización de estudios de genotipificación y el estudio molecular de los mecanismos de resistencia que permitan conocer la relación genética entre aislados y puedan orientar acerca del origen o diseminación de clonas resistentes a fármacos y los mecanismos involucrados en esta resistencia.

En este trabajo partimos de 2 colecciones de aislados de *P. aeruginosa* previamente estudiados, recolectados del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México y del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla. Todos los aislados en los dos hospitales provenían en mayor porcentaje de los servicios de Medicina Interna y Unidad de Cuidados Intensivos, y recolectados de muestras de vías respiratorias (lavado y aspirado bronquial, expectoración) y de urocultivo, lo cual coincide con lo reportado a nivel mundial donde se menciona que las infecciones nosocomiales causadas por *P. aeruginosa* involucran con mayor frecuencia el tracto respiratorio, el tracto urinario y heridas (Rossolini & Mantengoli, 2005), y principalmente causa infecciones en pacientes hospitalizados por largos periodos de tiempo, que son sometidos a intervenciones médicas (como broncoscopia o endoscopia) y que tienen enfermedades subyacentes; además los pacientes tratados en las Unidades de Cuidados

Intensivos se encuentran en mayor riesgo debido a que frecuentemente cuentan con dispositivos invasivos (Yetkin *et al.*, 2006).

Por otro lado la multiresistencia en cepas circulantes en hospitales representa un problema grave, es por ello que varios estudios a nivel mundial se han enfocado en la genotipificación de *P. aeruginosa* MDR y resistentes a carbapenémicos mediante la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), (Corona-Nakamura *et al.*, 2001; Grundmann *et al.*, 1995; Spencker *et al.*, 2000; Yetkin *et al.*, 2006), para obtener datos que permitan establecer relaciones genéticas entre aislados en los diferentes hospitales (Maâtallah *et al.*, 2013) y así proveer las bases para un control más efectivo para prevenir la diseminación de cepas resistentes entre pacientes (Yetkin *et al.*, 2006), a través del personal de la salud o mediante fomites.

En el caso de los aislados estudiados, varios de ellos mostraron perfiles de resistencia similares (Anexos 1 y 2), lo que pudiera sugerir que provienen de una misma cepa, cuando se trata de un mismo hospital y de una misma unidad médica; sin embargo, esto no siempre ocurre, por lo cual para conocer si estaban o no relacionados genéticamente, se llevó a cabo su genotipificación mediante el análisis de la macrorestricción enzimática realizada por la enzima *SpeI* y la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

A través de PFGE, en los aislados obtenidos del Hospital CMN "20 de Noviembre" ISSSTE se obtuvieron 21 PT's y 4 grupos de aislados genéticamente relacionados; para los aislados del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla, se obtuvieron 21 PT's y 2 grupos genéticamente. De acuerdo a estos resultados, existe una amplia diversidad genética entre los aislados de cada Hospital, los cuales provenían de distintas áreas hospitalarias y fueron recolectadas dentro de un periodo de tiempo corto, lo que nos indica que no existió la presencia de un brote, pues no hubo pulsotipos que prevalecieran en los dendogramas obtenidos.

Con los resultados obtenidos y las comparaciones realizadas dentro de cada uno de los grupos de PFGE en ambas colecciones de aislados, podemos observar que contrario a lo que se podría pensar, aislados con fenotipos o genotipos similares pueden no tener relación genética, mientras que los que difieren en estas características pueden estar relacionados genéticamente (Maatallah *et al.*, 2011), además aislados provenientes del mismo paciente pueden no tener relación genética (Gilpin *et al.*, 2012; Spencker *et al.*, 2000)

En el caso de los aislados Ps36 y Ps52 del CMN "20 de Noviembre" de la Cd. de México, los cuales presentaron mismo fenotipo de resistencia, CMLs y genotipos similares, portando el mismo integrón de clase 1 y con mismo ST309 según estudios anteriores, en este trabajo no estuvieron relacionados por PFGE. Por otro lado para los aislados PE06 y PE52 del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla, pertenecientes a un mismo paciente con CMLs idénticas, genotipo de resistencia similar, con los mismos cambios en reguladores de bombas de expulsión y al parecer los mismos integrones de acuerdo a la región variable amplificada para los dos aislados, no estuvieron genéticamente relacionados por PFGE y tuvieron diferente secuencia tipo, PE06 fue ST308 y PE52 ST385.

Las diferencias en los patrones de bandeo, reflejadas en el coeficiente de Dice  $<0.65$  para ambos pares de aislados, indican que hubo eventos genéticos que pudieron alterar el tamaño de los fragmentos de restricción o el número de sitios reconocidos por la enzima; sin embargo en el caso de Ps36 y Ps52, que tengan la misma secuencia tipo demuestra que a pesar de estas diferencias, están relacionados a partir de un ancestro común, pues presentaron los mismos alelos en los genes *housekeeping*. Por lo tanto podemos ver que eventos evolutivos menores pueden causar cambios sustanciales en los perfiles de restricción de PFGE (Kidd *et al.*, 2011), así que los datos obtenidos mediante esta técnica nos ayudan a predecir el nivel de relación clonal, por lo que es útil para investigaciones de brotes, pero no para el estudio de la historia evolutiva a largo plazo de una población de aislamientos (Maâtallah *et al.*, 2013), para lo cual es utilizada la

tipificación por MLST. Existen estudios que demuestran la concordancia entre ambos métodos de genotipificación, y que de acuerdo a sus resultados, demuestran que su uso combinado es complementario (Kidd *et al.*, 2011), mientras que PFGE tiene un alto poder discriminatorio para determinar diferencias genéticas en *P. aeruginosa*, MLST permite determinar la relación clonal con mayor claridad (Giske *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007). Esto puede ejemplificarse en un estudio donde se demostró que la mayoría de cepas pertenecientes a un mismo complejo clonal (CC235), mostraron diferentes PT por PFGE y en algunos casos la similitud estaba por debajo del 80%, la diversidad de patrones en ST235 sugiere la presencia de microevolución dentro de esta secuencia tipo (Maatallah *et al.*, 2011). Es por ello que PFGE es una herramienta útil, sin embargo debe estar respaldada por otros datos de tipificación (Carriço *et al.*, 2005) para su uso en vigilancia epidemiológica.

En cuanto a los 25 aislados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla, se realizó la amplificación del gen *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>GES</sub>*, debido a que el 100% presentaron resistencia ya sea a IMP, MEM o a ambos, y tanto *bla<sub>IMP</sub>* y variantes de *bla<sub>GES</sub>* se han reportado como involucrados en la resistencia a carbapenémicos. También se amplificó el gen *bla<sub>PSE</sub>* pues el 88% de los aislados fue resistente a carbenicilina y este gen se ha asociado con la resistencia a este antibiótico. Con los resultados de esta amplificación y la genotipificación por PFGE, se seleccionaron 7 aislados de este hospital, cuyo fenotipo de resistencia ya se conocía, para el estudio de mecanismos que pudieran explicar su multiresistencia; 6 de estos aislados fueron recolectados de los mismos pacientes, cuyas muestras fueron tomadas en fechas diferentes o provenían de diferente sitio anatómico y no estaban genéticamente relacionados de acuerdo a PFGE (PE02 y PE20; PE06 y PE52; PE26 y PE30); y además el aislado PE21 que amplificó para los genes *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>GES</sub>* pues la coexistencia de estos genes no ha sido reportada en México, solo existe un estudio realizado en Brasil, en donde se encontró esta ocurrencia en un aislado clínico de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (Polotto *et al.*, 2012).

A los 7 aislados se les determinó la CMI, observando que algunos antibióticos presentaron el fenotipo de sensibilidad mediante la prueba de difusión en disco, mientras que por CMI fueron resistentes, y en el caso de colistina todos los aislados fueron sensibles a pesar de que algunos aislados presentaron resistencia mediante Kirby Baüer. Por lo anterior, para la evaluación de este antibiótico se requiere la aplicación de un método de dilución, pues la sensibilidad obtenida por difusión en disco tiene el inconveniente de que un porcentaje de los aislados con CMI elevadas caerán dentro de los puntos de corte de susceptibilidad (Fica *et al.*, 2007), debido a que las polimixinas se difunden muy poco en el agar (Polotto *et al.*, 2012) de ahí la importancia de realizar esta prueba para la confirmación de la resistencia.

Las CMI para carbapenémicos en general en estas cepas están por arriba de 512 µg/ml, lo que puede ser el reflejo de una combinación de mecanismos de resistencia que contribuyen a ella, por esta razón es necesario el estudio de los mecanismos de resistencia presentes en estos aislados.

Debido a que los aislados en estudio, presentan una alta resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos se realizó la amplificación y secuenciación de los genes codificantes de metalo beta-lactamasas, serin beta-lactamasas y, beta-lactamasas del tipo Oxa, así como enzimas modificadoras de aminoglucósidos, debido a que son los genes que se han reportado presentes en *P. aeruginosa* en otros estudios (Fournier *et al.*, 2013; Garza-Ramos *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2012; Livermore, 2002; Polotto *et al.*, 2012; Poole, 2005; Rojo-Bezares *et al.*, 2014; Zhao & Hu, 2010).

Los 7 aislados fueron positivos para *bla*<sub>OXA-50</sub>, la cual es una oxacilinasas que se ha identificado en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 y se expresa de manera constitutiva en todas las *P. aeruginosa*, mostrando un perfil de hidrólisis de espectro reducido que incluye ampicilina, bencilpenicilina, cefaloridina, cefalotina, nitrocefina, piperacilina (Girlich *et al.*, 2004). Su capacidad para hidrolizar beta-

lactámicos es muy baja y juega un papel menor en el fenotipo de resistencia natural a beta-lactámicos en *P. aeruginosa* (Poirel *et al.*, 2010).

OXA-2 es otra oxacilinasas que está mediada por plásmidos (Dale *et al.*, 1985), y que determina la resistencia a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (mezlocilina, azlocilina, piperacilina) y oxacilina (Dale *et al.*, 1985; Strateva & Yordanov, 2009), el gen que codifica para esta enzima fue amplificado en todos los aislados, excepto en PE02. La prevalencia de esta enzima difiere encontrándose entre 0-70% en aislados de *P. aeruginosa* de acuerdo a varios estudios realizados (Ktari *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2005; Vatcheva-Dobrevska *et al.*, 2013; Zafer *et al.*, 2014). El gen *bla*<sub>OXA-2</sub> se ha encontrado en México formando parte de cassettes génicos en integrones de clase 1 (Barrios *et al.*, 2012; Castillo-Vera *et al.*, 2012; Garza-Ramos *et al.*, 2008, 2010, 2014; Sánchez-Martínez *et al.*, 2010)

Los aislados PE20, PE06 y PE52 fueron positivos para el gen *bla*<sub>IMP-18</sub>; mientras que PE21 fue positiva para *bla*<sub>IMP-15</sub>; estas enzimas han sido reportadas en elementos genéticos móviles como los integrones (Rojo-Bezales *et al.*, 2014). En México, *bla*<sub>IMP-18</sub> se ha encontrado en integrones de clase 1 en el Hospital Civil de Guadalajara (No. de integrón registrado en Integrall: In96) y en el Centro Médico Nacional la Raza (In169) (Garza-Ramos *et al.*, 2008a; Sánchez-Martínez *et al.*, 2010); *bla*<sub>IMP-15</sub> se ha reportado también en integrones de clase 1, en el Hospital Civil de Guadalajara (In95) y en el Hospital Infantil de Morelia se encontraron 3 integrones con estructura similar a In95 (In95-1 like, In95-2 like, In95-3 like) y en otros 2 integrones (In204, In205) (Garza-Ramos *et al.*, 2008, 2010). Estas enzimas confieren resistencia a la mayoría de antibióticos beta-lactámicos excepto aztreonam, incluyendo combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas, oximinocefalosporinas y carbapenémicos. En el caso de la variante IMP-18 se ha reportado que no confiere resistencia completa a carbapenémicos, pero da lugar a un incremento en los valores de CMI de hasta siete veces más al punto de corte. Esta variante fue identificada en *P. aeruginosa* por vez primera en

Estados Unidos y después en México, y más recientemente en Puerto Rico, formando parte de la estructura de integrones de clase I (Borgianni *et al.*, 2011). IMP-15 que también es una carbapenemasa, fue originalmente detectada en *P. aeruginosa* en Tailandia, y ha sido reportada también en Europa, México, Tailandia, y en un paciente admitido en un hospital en Estados Unidos después de una cirugía en un Centro Hospitalario de México (Al-Bayssari *et al.*, 2014; Gilarranz *et al.*, 2013); otros reportes han documentado la presencia endémica en México de cepas de *P. aeruginosa* que albergan el gen *bla*<sub>IMP-15</sub> (Garza-Ramos *et al.*, 2008, 2010; Gilarranz *et al.*, 2013). Los aislados portadores de estas carbapenemasas tienen CMI >512 para IMP y MEM, lo que nos hace pensar que tienen otros genes o mecanismos asociados a la resistencia a carbapenémicos, por lo que es necesario su estudio.

GES-2, es una beta-lactamasa de espectro extendido de clase A (BLEE), se ha reportado que confiere resistencia a cefalosporinas y contribuye a la disminución de la susceptibilidad a imipenem. Los genes codificantes de BBLE de clase A, se encuentran formando partes de cassettes génicos de integrones de clase 1, los cuales están integrados en plásmidos de conjugación en bacterias Gram negativas (Poirel *et al.*, 2001), el gen que codifica para esta enzima, *bla*<sub>GES-2</sub>, fue encontrada en los aislados PE26 y PE30, y es importante la búsqueda de integrones en estos aislados para determinar su importancia en la diseminación de resistencia. Además PE21 portó el gen *bla*<sub>GES</sub>, sin embargo en este trabajo no pudo ser determinada su variante, lo que debe ser realizado en estudios posteriores para poder conocer su implicación en la resistencia de este aislado, pues algunas variantes de este gen, tienen acción carbapenemasa, que en asociación a la presencia de *bla*<sub>IMP-15</sub> en este aislado, podría estar explicando las altas CMI para IMP y MEM.

PE20, PE06, PE26, PE30 y PE21 amplificaron para *aac-6'-lb*, estos genes han sido encontrados en cromosoma o en plásmidos, y frecuentemente forman parte de elementos genéticos móviles (Ramirez & Tolmasky, 2010), proveen

resistencia a tobramicina, netilmicina, kanamicina y amikacina (Poole, 2005), y algunas de sus variantes muestran un espectro extendido de resistencia a gentamicina (Ramirez & Tolmasky, 2010). Lo que explicaría la resistencia de estos aislados a los antibióticos probados netilmicina, amikacina y gentamicina. En este trabajo sólo se secuenció *aac6'-lb* en el aislado PE06, se buscaron las mutaciones Trp102Arg y Asp179Tyr en la enzima, que es codificada por la variante *aac6'-lb-cr*, que codifica una aminoglucósido acetil transferasa que confiere resistencia a ciprofloxacino (Park *et. al.*, 2006), sin embargo en este caso no estuvo presente, pero se tiene que realizar la secuenciación de este gen en los otros aislados.

Los genes encontrados en estos aislados, como se ha descrito anteriormente, les confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos que fueron estudiados, sin embargo actualmente se continúan incorporando resultados que muestran la presencia de nuevas variantes de BLEE del tipo OXA en cepas de *P. aeruginosa* como *bla<sub>OXA-161</sub>*, que le confiere resistencia a ceftazidima (González-Villa *et al.*, 2012); así mismo se ha reportado la presencia de variantes de espectro extendido de *bla<sub>OXA-2</sub>*, como *bla<sub>OXA-141</sub>* (González-Villa *et al.*, 2012) y *bla<sub>OXA-15</sub>* la cual está relacionada con un relativo incremento en los rangos de hidrólisis para cefaloridina, cefalotina y más dramáticamente para ceftazidima (Danel *et al.*, 1997).

También se ha descrito el hallazgo de la MBL *bla<sub>FIM-1</sub>* en aislados clínicos de *P. aeruginosa* en Italia (Pollini *et al.*, 2013) y que tiene una amplia especificidad de sustrato, especialmente para penicilinas y carbapenémicos (Hong *et al.*, 2015). Además hay otros tipos de MBL adquiridas, que han sido reportadas en este microorganismo (*bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>KHM</sub>*, *bla<sub>AIM</sub>*, *bla<sub>DIM</sub>*, *bla<sub>SMB</sub>*, *bla<sub>TMB</sub>*) (Hong *et al.*, 2015). Es por ello que es de suma importancia el diseño de oligonucleótidos y la búsqueda de otros genes que pudieran estar implicados con las altas CMI para un mejor entendimiento de la multiresistencia.

Por otro lado *P. aeruginosa* cuenta también con bombas de expulsión que contribuyen considerablemente a la resistencia a los antibióticos y que podrían explicar los valores altos para CMI de algunos antibióticos. MexAB-OprM juega un papel relevante en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a los antibióticos. La expresión de las otras bombas de expulsión bajo condiciones estándar de cultivo es demasiado baja para alcanzar la resistencia, sin embargo estas bombas pueden ser sobre-expresadas y provocar resistencia, debido a mutaciones en sus elementos reguladores (Olivares *et al.*, 2013).

Las fluroroquinolonas y aminoglucósidos son dos clases importantes de antibióticos usados en el tratamiento de las infecciones causadas por *Pseudomonas*. Sin embargo *P. aeruginosa* es capaz de desarrollar resistencia a estos agentes, reduciendo su utilidad. La bomba MexAB-OprM contribuye a la resistencia de la bacteria a fluoroquinolonas, beta-lactámicos e inhibidores de beta-lactamasas, mientras que MexXY-OprM contribuye a la resistencia a aminoglucósidos. La sobre-expresión de estas bombas pueden conferir altos niveles de resistencia a aislados clínicos como resultado de mutaciones que ocurren en sus genes reguladores *mexR* y *mexZ* (Gorgania *et al.*, 2010).

Los aislados PE06 y PE52 presentaron la mutación Val126Glu en MexR, esta mutación se ha reportado que por sí sola no puede cambiar la susceptibilidad de la bacteria, pero causa resistencia cuando ocurre de manera paralela una mutación en el gen *gyrA* (Gorgania *et al.*, 2010), otro estudio reporta que esta mutación no tiene efecto significativo en la resistencia a ciprofloxacino (Kobayashi *et al.*, 2013), sin embargo Tada *et al.*, 2013 reporta que a este cambio aminoacídico, se le atribuye la sobre-expresión de la bomba MexAB-OprM; por lo tanto es necesario hacer estudios de la expresión de la bomba realizando mutaciones sitio dirigidas de este tipo.

En cuanto a MexZ PE06 y PE52 presentaron la mutación Glu81Asp, y PE21 Gly62Glu, sin embargo estas mutaciones no han sido reportadas al momento, por

lo tanto se desconoce si contribuyen o no a la resistencia en aislados de *P. aeruginosa*. Debido a las discrepancias en los reportes de la mutación Val126Glu en MexR y a que no se han estudiado las mutaciones encontradas en MexZ (Glu81Asp y Gly62Glu) es fundamental el análisis de la expresión las bombas en los aislados, para conocer si contribuye o no la resistencia.

Otro regulador importante es MexT, que es un regulador transcripcional positivo de la bomba de flujo MexEF-OprN (Luong *et al.*, 2014), este gen muestra una baja expresión, casi indetectable en cepas *wild type*, debido a que estas cepas tienen un gen *mexT* no funcional (Maseda *et al.*, 2010) y por lo tanto no contribuye significativamente a la resistencia de *P. aeruginosa* (Llanes *et al.*, 2011), sin embargo, existen mutaciones en este gen que lo vuelven activo, permitiendo la sobre-expresión de esta bomba (Delden *et al.*, 2001; Maseda *et al.*, 2000) y que se asocian a la alta resistencia a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim y carbapenémicos (Llanes *et al.*, 2011). PE20, PE06, PE52, PE30 y PE21 presentaron una delección de 8 pb de la base 235-242, y por lo tanto un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 80 en el regulador MexT, lo que sugiere que no se estaría produciendo la proteína y por lo tanto no habría sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN, sin embargo es importante el estudio de la expresión de esta bomba en los aislados para conocer el impacto de esta delección.

Los carbapenémicos son antibióticos de amplio espectro utilizados para el tratamiento de infecciones nosocomiales ocasionadas por *P. aeruginosa*. La resistencia a carbapenémicos es atribuída a la producción de metalo beta-lactamasas, al incremento de la expresión de bombas de expulsión activas (MexAB-OprD) (Ochoa *et al.*, 2013), mecanismos que ya habían sido estudiados en este trabajo, y al no encontrar ninguna relación con los niveles de resistencia presentados por estas cepas, fue necesario realizar el estudio de la pérdida de permeabilidad de la porina OprD, por lo que se procedió a la búsqueda de cambios en esta proteína.

Es importante mencionar, que los *loops* 2 y 3 han sido señalados como el sitio de entrada para aminoácidos básicos; el *loop* 2 se determinó como sitio de unión para imipenem y el *loop* 3 funciona como un canal de paso para este antibiótico, así que cualquier sustitución o deleción en ellos que cambien su conformación pueden causar resistencia a imipenem (Li *et al.*, 2012). Por lo tanto se necesita la presencia de los *loops* 2 y 3 intactos (Fernández & Hancock, 2012) y de acuerdo a nuestros resultados, ningún aislado presentó mutaciones en estos *loops* por lo que no se estaría afectando mediante este mecanismo el paso de imipenem al interior de la bacteria.

Por otro lado, algunos aislados presentaron mutaciones en el *loop* 1 (PE20, PE06, PE52, PE26, PE30 y PE21), *loop* 5 (PE06, PE52, PE26, PE30 y PE21), *loop* 6 y *loop* 7 (PE06, PE52 y PE21), sin embargo estudios sugieren estos *loops* no están involucrados en el paso de imipenem por la porina OprD (Li *et al.*, 2012). En cuanto al *loop* 7, se ha descrito que sustituciones aminoacídicas en este *loop*, ocasionan un incremento en la susceptibilidad a meropenem, con una disminución de 4 veces en la CMI (Epp *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012), esta sustitución consiste en el reemplazo de 12 aminoácidos en la región del 372 al 383 (MSDNNVGYKKNYG) por una secuencia divergente de 10 aminoácidos (VDSSSSYAGL) formando el llamado *loop* 7 corto (L7-short) (Epp *et al.*, 2001; Rojo-Bezares *et al.*, 2014). Esta secuencia L7-short estuvo presente en los aislados PE06, PE52 y PE21, pero esta disminución de la CMI a meropenem no se observó debido a la presencia de metalo beta-lactamasas del tipo IMP que hidrolizan carbapenémicos.

Además PE06, PE52 y PE21 presentan codones de paro tempranos en el *loop* 8, la presencia de codones de paro se ha reportado que resultan en la pérdida de la porina o la reducción en la expresión (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009), que han sido clasificadas en otros trabajos como OprD "*deficient types*" (Ocampo-Sosa *et al.*, 2012); estos codones de paro, junto con la presencia de carbapenemasas de tipo IMP que portan estos aislados pueden estar explicando

las altas CMI's a imipenem, sin embargo se necesitan estudios que demuestren la pérdida o disminución en la expresión de la porina.

Otro dato interesante, es que en el aislado PE20, la secuencia de la porina OprD en la posición aminoacídica 246, se encontró truncada debido a la presencia de una secuencia de inserción IS1394, que es una secuencia de 1,100 pb que codifica para una trasposasa. Las secuencias de inserción, al igual que las sustituciones o deleciones en el gen *oprD* o su región promotora pueden disminuir o causar la pérdida de la producción de OprD, dando como resultado una reducción significativa en la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los antibióticos carbapenémicos (Fowler & Hanson, 2014). En *P. aeruginosa* el primer reporte de inactivación insercional de OprD en aislados clínicos por secuencias de inserción que conducen a la resistencia a carbapenémicos ocurrió en 2004 (Wolter *et al.*, 2004), y a la fecha existen varios reportes acerca de la presencia de secuencias de inserción que inactivan a esta porina (Al-Bayssari *et al.*, 2014; Al-Bayssari *et al.*, 2015; Diene *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2014; Wolter *et al.*, 2004). La secuencia de inserción IS1394 localizada en este estudio en el aislado PE20, fue detectada por primera vez formando parte del genoma de *P. alcaligenes* en Singapur (GenBank: U37284.1) y se ha encontrado también en *P. putida* (Yeo & Poh, 1996). En *P. aeruginosa* IS1394 se ha reportado en Alemania insertada en cassettes génicos de los integrones In77 (Castanheira *et al.*, 2004; Wendel *et al.*, 2013) y In77b (Wendel *et al.*, 2013); y en Puerto Rico y Polonia se ha descrito que esta secuencia está insertada en la porina *oprD* de *P. aeruginosa* (GenBank: KF682463.1) (Wolkowicz *et al.*, 2013; Wolter *et al.*, 2009), además es importante mencionar que en México hasta el momento no existen reportes de esta IS, siendo este trabajo el primer reporte de esta IS en la porina OprD en el país.

En lo que respecta a la porina de los aislados PE26 y PE30, no se encontraron mutaciones en los *loops* 2 y 3 de OprD, sin embargo no se logró secuenciar el gen completo, lo que sugiere la existencia de mutaciones en los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos que se tienen en el laboratorio,

pues en la secuencia obtenida no existen codones de paro tempranos que puedan explicar el por qué no se haya obtenido el amplificado de todo el gen, por lo que se sugiere el diseño de oligonucleótidos fuera de la región codificante, que permitan la búsqueda de mutaciones en los *loops* que no se obtuvieron en este trabajo.

*P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, como se mostró en este estudio, está asociada a la producción de MBL, la diseminación de estos genes pueden ser responsables de brotes nosocomiales en centros hospitalarios, por lo que es importante identificar genes de carbapenemasas transmitidos mediante elementos genéticos móviles que puedan promover la diseminación de la resistencia a estos antibióticos, los cuales son los principalmente usados en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones causadas por este agente (Rizek *et al.*, 2014). Para la determinación de la estructura de integrones de clase 1, fueron seleccionados los aislados PE06, PE52 y PE21.

PE06 y PE52, fueron obtenidos del mismo paciente, de urocultivos recolectados en diferentes fechas (10/05/13 y 14/01/14, respectivamente), tienen un perfil de resistencia idéntico, comprobado por CMI para algunos antibióticos, perfil genotípico similar (solo difiriendo en que PE06 amplificó para el gen *aac6'-Ib* y PE52 no), y también presentan las mismas mutaciones en reguladores de bombas de expulsión y en los *loops* de la porina OprD, sin embargo no están relacionados genéticamente de acuerdo a PFGE, además de que ambos aislados portan el gen *bla<sub>IMP-18</sub>*, siendo este el primer reporte de esta enzima en aislados de este Hospital y en el Estado de Puebla.

Se hizo la amplificación de las regiones conservadas en integrones de clase 1 y de la región variable de ambos aislados y se observaron las mismas bandas. En cuanto a PE52 se tienen 2 integrones completamente caracterizados, uno de ellos conformado por los genes cassette *imp-18*, *aadA1* y *oxa-2*; y el otro con *imp-18 like*, *aadA1* y *oxa-2*. En el caso del aislado PE06 se tienen secuenciados parcialmente 2 integrones, uno de ellos de RV ~3000 pb con los genes cassette: *aac-6'-Ib*, un gen que por el peso del gen faltante (~741 pb) presumiblemente sea

*imp-18*, *oxa-2* y *aadA1*; y otro de RV ~2300 pb el cual tiene una estructura inicial parecida a los encontrados en PE52, sin embargo sólo se tiene secuenciada una parte del gen de la integrasa y adyacente a este el gen *bla<sub>IMP-18</sub>*. Estos resultados y la amplificación de la región variable de los aislados sugiere que portan los mismos integrones, es por ello que se continuará con la búsqueda del integrón de RV ~3000 pb en el aislado PE52 y la caracterización completa del integrón de RV ~2300 pb de PE06 para comprobar esta teoría. Los genes *aadA* encontrados les confieren a estos aislados, resistencia específica a espectinomicina y estreptomycin, estos genes existen como genes cassettes y forman parte de un gran número de integrones, plásmidos y transposones (Ramirez & Tolmasky, 2010), como se demostró en este trabajo.

Con las estructuras completas de los integrones de PE52, se realizó la búsqueda de integrones de clase 1 con la carbapenemasa IMP-18, y solo existen seis integrones de *P. aeruginosa* (registrados en Integrall con los números de integrón: In133, In706, In707, In98, In96, In169) con esta metalo beta-lactamasa que han sido reportados en Estados Unidos, Puerto Rico y México (Borgianni *et al.*, 2011; Garza-Ramos *et al.*, 2008a; Martínez *et al.*, 2012; Sánchez-Martinez *et al.*, 2010), sin embargo ninguno de ellos coincide con las estructuras encontradas en este estudio, siendo también el primer reporte de esta conformación de integrones de clase 1 con *bla<sub>IMP-18</sub>*, por lo que a los integrones de PE52 ya les fueron asignados números de integrón en Integrall (In1215 y In1218) y las secuencias están por subirse a The Integron Database <http://integrall.bio.ua.pt/> y GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

Por otro lado, los dos integrones de PE21, se secuenciaron parcialmente. Uno de ellos de RV ~3000 pb con los genes cassette *aacA7* y *imp-15* en la región 5', y *orfD* adyacente a la región 3'-CS, y aunque se desconoce qué otros genes están conformando la región variable, es importante mencionar que tiene una estructura similar al integrón In95, que ha sido encontrado en aislados del Hospital Civil de Guadalajara y en Estados Unidos (University of Kentucky HealthCare) y en

el Hospital Infantil de Morelia se presentaron integrones con estructuras altamente relacionadas con In95 (In95 like) (Garza-Ramos *et al.*, 2008, 2010), por lo que la caracterización completa es necesaria en estudios posteriores para la comparación con estos integrones reportados; el gen *aacA7* encontrado en este integrón le confiere al aislado resistencia a gentamicina (con CMI >512 µg/ml), tobramicina y netilmicina (resistente por Kirby Baüer) (Poole, 2005). Además el integrón de ~1300 pb está conformado por *aadA6* que como se mencionó anteriormente, este tipo de enzimas confieren resistencia a espectinomicina y estreptomycinina.

Por último para confirmar que los aislados PE06 y PE52 no tenían relación genética a pesar de haber sido recolectados del mismo paciente, y de que contaban con mecanismos de resistencia muy parecidos, se realizó su genotipificación por MLST, obteniendo que PE06 pertenece a la secuencia tipo ST308, la cual ha sido reportada en Francia (Cholley *et al.*, 2011; Larché *et al.*, 2012) y Colombia (Correa *et al.*, 2015; Cuzon *et al.*, 2011), portando genes *bla<sub>KPC-2</sub>*, *bla<sub>IMP-13</sub>*; mientras que PE52 fue ST385, y ha sido reportada en Australia en muestras de origen ambiental, animal y pacientes sin fibrosis quística (Kidd *et al.*, 2012).

Con toda la información reunida, en forma general podemos decir que las altas CMIs, están explicadas por los mecanismos de resistencia encontrados en cada uno de los 7 aislados seleccionados:

- a) PE02 portó *bla<sub>OXA-50</sub>* que le confiere resistencia ampicilina, bencilpenicilina (antibióticos no probados) y cefalotina (resistente por Kirby Baüer). La resistencia a imipenem (CMI 128µg/ml) puede deberse a que no presenta la porina OprD implicada en la entrada de este antibiótico, además podría presentar otros mecanismos no estudiados en este trabajo que justifiquen su resistencia para el resto de los antibióticos.
- b) PE20 portó *bla<sub>IMP-18</sub>*, dando resistencia a IMP, MEM y FEP (CMI >512 µg/ml) y a la mayoría de los beta-lactámicos; *bla<sub>OXA-50</sub>* relacionada con

resistencia a ampicilina, bencilpenicilina (no probados) y cefalotina (resistente por Kirby Baüer); *bla*<sub>OXA-2</sub> que confiere resistencia a carbenicilina, piperacilina, ticarcilina (resistentes por Kirby Baüer), mezlocilina, azlocilina y oxacilina (no probados); y *aac-6'-Ib*, que estaría explicando las altas CMI (>512 µg/ml) para GM y AN. La presencia de la secuencia de inserción IS394 truncando la porina OprD, podría estar involucrada en la disminución o la pérdida de producción de la bomba y por lo tanto contribuir a la alta resistencia a imipenem y meropenem.

- c) Para PE06 y PE52, todos los antibióticos probados, excepto colistina, mostraron altas CMI. Los dos aislados portaron: *bla*<sub>IMP-18</sub> implicado en la resistencia a IMP, MEM y FEP (CMI >512 µg/ml) y la mayoría de los beta-lactámicos; *bla*<sub>OXA-2</sub> que confiere resistencia a carbenicilina, piperacilina, ticarcilina (resistentes por Kirby Baüer), mezlocilina, azlocilina y oxacilina (no probados); *bla*<sub>OXA-50</sub> relacionada con resistencia a ampicilina, bencilpenicilina (no probados) y cefalotina (resistente por Kirby Baüer); *aadA1* que brinda resistencia específica a espectinomicina y estreptomomicina (antibióticos no sugeridos por CLSI para *P. aeruginosa*); ambos aislados presentan resistencia a GM y AN, que en PE06 se relaciona con la presencia del gen *aac-6'-Ib* y en PE52 podría estar involucrado otro mecanismo no estudiado en el presente trabajo.
- d) PE26 y PE30 portaron los genes: *bla*<sub>GES-2</sub> que se relaciona con la resistencia a cefalosporinas e imipenem, y podría explicar las CMI altas para este antibiótico y para FEP, y CAZ (>512 µg/ml); *bla*<sub>OXA-2</sub> que confiere resistencia a carbenicilina, piperacilina, ticarcilina (resistentes por Kirby Baüer), mezlocilina, azlocilina y oxacilina (no probados); *bla*<sub>OXA-50</sub> relacionada con resistencia a ampicilina, bencilpenicilina (no probados) y cefalotina (resistente por Kirby Baüer); *aac-6'-Ib*, que justifica las altas CMI (>512 µg/ml) para GM y AN. Además portan integrones de clase 1 que podrían tener cassettes génicos que estén contribuyendo a la resistencia, sin embargo las estructuras de esos integrones no fueron determinadas en este trabajo.

- e) PE21 portó los genes *bla*<sub>IMP-15</sub> (insertado en un integrón de clase 1) que le confiere resistencia a IMP, MEM y FEP (>512 µg/ml) y la mayoría de los beta-lactámicos; *bla*<sub>OXA-2</sub> que confiere resistencia a carbenicilina, piperacilina, ticarcilina (resistentes por Kirby Baüer), mezlocilina, azlocilina y oxacilina (no probados); *bla*<sub>OXA-50</sub> relacionada con resistencia a ampicilina, bencilpenicilina (no probados) y cefalotina (resistente por Kirby Baüer); *aac6'-Ib* que puede explicar las altas CMI para AN, GM (>512 µg/ml), además de que porta *aacA7* (formando parte de un integrón) y que le confiere resistencia también a gentamicina. La determinación en trabajos posteriores de la variante del gen *bla*<sub>GES</sub>, podrá indicarnos su asociación a la resistencia a algún antibiótico en este aislado, pues existen variantes que tienen actividad carbapenemasa. Los dos integrones que porta fueron caracterizados parcialmente, uno de ellos porta *aadA6*, relacionada con la resistencia a espectinomicina y estreptomycinina (antibióticos no sugeridos por CLSI para *P. aeruginosa*).

Las mutaciones presentadas en los *loops* de la porina OprD de los aislados, no contribuyen en la resistencia a imipenem, y aunque en PE06, PE52 y PE21 se presenta el *loop 7* corto que está relacionado con un aumento en la sensibilidad a meropenem este aumento no se observó, lo que puede ser debido a que presentan codones de paro tempranos en el *loop 8* que podrían provocar la pérdida de la porina o la reducción en su expresión y por lo tanto, asociado a la presencia de MBL del tipo IMP en estos aislados, estaría aumentando la resistencia a carbapenémicos. Las altas CMIs para CIP pueden estar relacionadas con la presencia de la mutación Val126Glu en el regulador MexR, sin embargo hace falta la búsqueda de mutaciones en *gyrA* y *parC*.

Como podemos observar en este trabajo el estudio de la relación genética entre aislados y de los mecanismos de resistencia presentes en *P. aeruginosa* es de suma importancia a nivel epidemiológico, debido a que su gran versatilidad puede favorecer la generación no controlada de bacterias multidrogoresistentes,

que aunado a la ausencia de nuevos fármacos, genera problemas tanto epidemiológicos como terapéuticos de acuerdo a las características fenotípicas y genotípicas de las cepas circulantes en cada unidad hospitalaria.

## 10. CONCLUSIONES

- Existe una amplia diversidad genética entre los aislados de ambas Unidades Hospitalarias, no prevaleciendo grupos genéticamente relacionados, por lo tanto estos aislados no formaron parte de un brote.
- Se estudiaron los mecanismos de resistencia presentes en 7 aislados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla, pertenecientes a 4 pacientes con fenotipo de resistencia similar; 100% de los aislados portaron *bla*<sub>OXA-50</sub>; 85.7% portó *bla*<sub>OXA-2</sub>; el 42.8% de los aislados portó *bla*<sub>IMP-18</sub>, mientras que 14.2% portó *bla*<sub>IMP-15</sub>; 42.8% amplificaron para *bla*<sub>GES</sub>, de los cuales 2 aislados portaron *bla*<sub>GES-2</sub> y uno presenta una variante aún no determinada; por último 71.4% amplificó para *aac-6'-Ib*.
- Las mutaciones encontradas en los reguladores de bombas de expulsión de los 7 aislados, no se han relacionado con la resistencia a los antibióticos.
- Ningún aislado presentó mutaciones en los *loops* 2 y 3 de la porina OprD, relacionados con la resistencia a imipenem.
- PE06, PE52 y PE21 tuvieron codones de paro temprano en el *loop* 8 que pueden desencadenar la pérdida o disminución de la expresión de la porina OprD y estar relacionados con el aumento en la resistencia a imipenem.
- La porina OprD en PE20 está truncada por la secuencia de inserción IS1394, lo que puede relacionarse con el aumento en la resistencia a carbapenémicos.
- De acuerdo a la amplificación de la RV de PE06 y PE52, ambos portan los mismos integrones.
- Los 2 integrones de PE06 permanecen parcialmente secuenciados. Los integrones de PE52 portadores de *bla*<sub>IMP-18</sub> y *bla*<sub>IMP-18</sub> like, fueron asignados con los números In1215 y In1218 respectivamente.
- PE21 tiene 2 integrones parcialmente secuenciados. Uno de ellos porta los genes *aacA7* y *bla*<sub>IMP-15</sub> cuya estructura está relacionada con In95 encontrado en Guadalajara y Morelia, y el otro integrón porta una *aadA6*.

- Los aislados pertenecientes a mismos pacientes, a pesar de contar con mecanismos de resistencia similares, no tienen relación genética de acuerdo a PFGE.
- PE06 y PE52, no tienen relación genética por PFGE, ni relación clonal pues tienen diferente secuencia tipo, ST308 y ST385, a pesar de tener CMI, genotipo, y cambios en reguladores de bombas de expulsión y porina OprD idénticos.

## 11. PERSPECTIVAS

- Estudiar los mecanismos de resistencia presentes en los aislados genéticamente relacionados y en los clasificados como posiblemente relacionados de los aislados del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.
- Estandarizar una metodología para la medición de la expresión de las bombas de expulsión y la porina OprD, que permita conocer si las mutaciones encontradas están involucradas en la resistencia.
- Diseñar oligonucleótidos para la secuenciación completa de la porina OprD de los aislados PE26 y PE30.
- Determinar si el aislado PE21 porta una nueva variante del gen *bla<sub>GES</sub>*.
- Terminar la caracterización de los integrones de PE06, para llevar a cabo la asignación de número en Integrall, y buscar el integrón de ~3000 pb en PE52.
- Continuar con la caracterización de los 2 integrones de PE21 y determinar qué tipo de variante es *bla<sub>GES</sub>* y si forma parte de la estructura de alguno de los integrones encontrados.
- Determinar si los integrones portadores de carbapenemasas estudiados se encuentran en plásmidos o en cromosoma.
- Realizar la búsqueda de mutaciones en la cefalosporinasa AmpC que puede estar involucrada con la resistencia a carbapenémicos.
- Buscar mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, relacionados con la resistencia a quinolonas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Bayssari, C., Diene, S. M., Loucif, L., Gupta, S. K., Dabboussi, F., Mallat, H., ... Rolain, J.-M. (2014). Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of *oprD* Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4966–4970.
- Al-Bayssari, C., Valentini, C., Gomez, C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J.-M. (2015). First detection of insertion sequence element ISPa1328 in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from an idiopathic pulmonary fibrosis patient in Marseille, France. *New Microbes and New Infections*, 7, 26–27.
- Ayala, A. C. (2013). Tesis de Maestría. Identificación de genes involucrados en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* causante de Infecciones Nosocomiales. *Centro de Investigaciones En Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Ochoa-Sanchez, L. E., Reyna-Flores, F., Rojas-Moreno, T., Morfin-Otero, R., ... Silva-Sanchez, J. (2012). A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 4032–4.
- Bauernfeind, A., Stemmlinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., & Casellas, J. M. (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 509–13.
- Bello López, M. E. (2014). Tesis de Maestría. Estudio molecular de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales. *Centro de Investigaciones En Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Biswas, S., Mohammad, M. M., Patel, D. R., Movileanu, L., & van den Berg, B. (2007). Structural insight into OprD substrate specificity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(11), 1108–1109. <http://doi.org/10.1038/nsmb1304>
- Borgianni, L., Prandi, S., Salden, L., Santella, G., Hanson, N. D., Rossolini, G. M., & Docquier, J. D. (2011). Genetic context and biochemical characterization of the IMP-18 metallo- $\beta$ -lactamase identified in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1),

140–145.

- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., ... Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *48*(1), 1–12. <http://doi.org/10.1086/595011>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 969–976. <http://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, *32*(3-4), 243–259. <http://doi.org/10.1051/vetres:2001122>
- Cariço, J. a, Pinto, F. R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N. G., Frazão, N., ... Almeida, J. S. (2005). Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5483–90. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5483-5490.2005>
- Castanheira, M., Toleman, M. a, Jones, R. N., Schmidt, F. J., & Walsh, T. R. (2004). Molecular Characterization of a  $\beta$  -Lactamase Gene , bla GIM-1 , Encoding a New Subclass of Metallo-  $\beta$  -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*(12), 4654–4661. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4654>
- Castillo-Vera, J., Ribas-Aparicio, R., Nicolau, C., Oliver, A., Osorio-Carranza, L., & Aparicio-Ozores, G. (2012). Unusual Diversity of Acquired  $\beta$ -lactamases in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Mexican Hospital. *Microbial Drug Resistance*, *18*(5), 471–478.
- Cholley, P., Thouverez, M., Hocquet, D., Van Der Mee-Marquet, N., Talon, D., & Bertrand, X. (2011). Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in Eastern France belong to a few clonal types. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(7), 2578–2583. <http://doi.org/10.1128/JCM.00102-11>
- CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, *35*(3).
- Coll, P., Coque, M., Dominguez, M., & Vázquez, J. (2005). *Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Métodos+mol>

eculares+de+tipificación+epidemiológica+en+bacteriología#0

- Corona-Nakamura, a L., Miranda-Navales, M. G., Leños-Miranda, B., Portillo-Gómez, L., Hernández-Chávez, a, Anthor-Rendón, J., & Aguilar-Benavides, S. (2001). Epidemiologic Study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Archives of Medical Research*, 32(3), 238–42. [http://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00267-3](http://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00267-3)
- Correa, A., Del Campo, R., Perenguez, M., Blanco, V. M., Rodríguez-Baños, M., Perez, F., ... Villegas, M. V. (2015). Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2421–5. <http://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., & Dowson, C. G. (2004). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5644–5649. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644>
- Cuzon, G., Naas, T., Villegas, M.-V., Correa, A., Quinn, J. P., & Nordmann, P. (2011). Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing  $\beta$ -Lactamase blaKPC-2 Gene in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5350–5353. <http://doi.org/10.1128/AAC.00297-11>
- Dale, J. W., Godwin, D., Mossakowska, D., Stephenson, P., & Wall, S. (1985). Sequence of the OXA2 beta-lactamase: comparison with other penicillin-reactive enzymes. *FEBS Letters*, 191(1), 39–44. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80989-3](http://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80989-3)
- Danel, F., Hall, L. M. C., Gur, D., Akalin, H. E., & Livermore, D. M. (1995). Transferable production of PER-1  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(2), 281–294. <http://doi.org/10.1093/jac/35.2.281>
- Danel, F., Hall, L. M. C., Gur, D., & Livermore, D. M. (1997). OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2  $\beta$ -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(4), 785–790.
- Delden, C. V. A. N., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M., & Pechere, J. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN Multidrug Efflux System Affects Cell-to-Cell Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5213–5222. <http://doi.org/10.1128/JB.183.18.5213>
- Deplano, A., Denis, O., Poirel, L., Hocquet, D., Nonhoff, C., Nordmann, P., ... Byl,

- B. (2005). Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1198–1204. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1198>
- Di Conza, J. a., & Gutkind, G. O. (2010). Integrones: Los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 63–78.
- Díaz, M. A., Buelvas, F. A., & Tovar, C. (2009). Multiresistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: un arsenal de mecanismos moleculares a su disposición. *Revista Medicina*, 8(2), 12–23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=273274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Diene, S. M., L'Homme, T., Bellulo, S., Stremier, N., Dubus, J. C., Mely, L., ... Rolain, J. M. (2013). ISPa46, a novel insertion sequence in the oprD porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(3), 268–271. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.001>
- Domingues, S., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements*, 2(5), 211–223. <http://doi.org/10.4161/mge.22967>
- Ducel, G., Fabry, J., & Nicolle, L. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía práctica. *Who.int*, 2, 70. <http://doi.org/10.1590/S0036-36341999000700012>
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10), 569–574. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- Epp, S. F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamzehpour, M., Frey, J., & Pechère, J. C. (2001). C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1780–7. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1780-1787.2001>
- Fang, Z. L., Zhang, L. Y., Huang, Y. M., Qing, Y., Cao, K. Y., Tian, G. B., & Huang, X. (2014). OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 124–128. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.027>
- Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores.

- Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409.  
<http://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661–81. <http://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
- Fica C, A., Céspedes J, I., Gompertz G, M., Jalón V, M., Sakurada Z, A., & Sáez L, E. (2007). Colistín en infecciones nosocomiales por bacilos Gramnegativos pan-resistentes. *Revista Chilena de Infectología*, 24(5), 360–367. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182007000500002>
- Fournier, D., Richardot, C., Müller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plésiat, P., & Jeannot, K. (2013). Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(April), 1772–1780. <http://doi.org/10.1093/jac/dkt098>
- Fowler, R. C., & Hanson, N. D. (2014). Emergence of carbapenem resistance due to the novel insertion sequence *Pa8* in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 9(3), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091299>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., & Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 47(3), 315–329. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x>
- Garau, G., Di Guilmi, a. M., & Hall, B. G. (2005). Structure-Based Phylogeny of the Metallo- $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2778–2784. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2778>
- Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Tamayo-Legorreta, E., Catalan-Najera, J. C., Morfin-Otero, R., ... Silva-Sanchez, J. (2014). Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 81(2), 135–7. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.029>
- Garza-Ramos, U., Morfin-Otero, R., Sader, H. S., Jones, R. N., Hernández, E., Rodríguez-Noriega, E., ... Silva-Sanchez, J. (2008). Metallo-beta-lactamase gene *bla*(IMP-15) in a class 1 integron, *In95*, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2943–6. <http://doi.org/10.1128/AAC.00679-07>

- Garza-Ramos, U., Sanchez-Martinez, G., Barajas, J. M., Suarez, S., Sanchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., ... Silva-Sanchez, J. (2010). Variability of the bla(IMP-15)-containing integrons, highly related to In95, on an endemic clone of *Pseudomonas aeruginosa* in Mexico. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 16(3), 191–5. <http://doi.org/10.1089/mdr.2010.0017>
- Garza-Ramos, U., Tinoco, P., Silva-Sanchez, J., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Leon-Garnica, G., ... Jones, R. N. (2008a). Metallo  $\beta$ -lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(1), 78–80. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.07.031>
- Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F. J., Artilles, F., Álamo, I., & Oliver, A. (2013). First detection in Europe of the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), E424–7. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12248>
- Gilpin, B., Robson, B., Lin, S., Scholes, P., & On, S. (2012). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of more than one clinical isolate of *Campylobacter* spp. from each of 49 patients in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 457–9. <http://doi.org/10.1128/JCM.05928-11>
- Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2004). Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2043–2048. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043>
- Giske, C. G., Libisch, B., Colinon, C., Scoulica, E., Pagani, L., Fuzi, M., ... Rossolini, G. M. (2006). Establishing Clonal Relationships between VIM-1-Like Metallo-beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Four European Countries by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4309–4315. <http://doi.org/10.1128/JCM.00817-06>
- Gomila, M., Del Carmen Gallegos, M., Fernández-Baca, V., Pareja, A., Pascual, M., Díaz-Antolín, P., ... Lalucat, J. (2013). Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiology*, 13, 138. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-13-138>
- González-Villa, M., Ribas-Aparicio, R. M., Coria-Jiménez, R., Donis-Rocandio, J. E., & Aparicio-Ozores, G. (2012). Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase OXA-141 in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(9), 535–

41. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.008>
- Gorgania, N., Ahlbrandc, S., Patterson, A., & Pourmand, N. (2010). Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal*, 34(5), 414–418. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.05.013>.Detection
- Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., Repressor, A., & Subtilis, B. (2002). Regulation of Bacterial Drug Export Systems, 66(4), 671–701. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.671>
- Grundmann, H., Schneider, C., Hartung, D., Daschner, F. D., & Pitt, T. L. (1995). Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 528–534. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227985/>
- Guevara, A., Aranque, M., & Sierra, C. (2012). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en *Pseudomonas aeruginosa*. Impermeabilidad de membrana y bombas de eflujo. *Rev Fac Farm*, 54(2), 21–27. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Guevara, A., Sierra R., C. I., & De Waard, J. (2012). Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales en Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*, 29(6), 614–621.
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., ... Oliver, A. (2007). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4329–35. <http://doi.org/10.1128/AAC.00810-07>
- Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A. H., & Sørensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3332–7. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3332-3337.2004>
- Häußler, S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 6(6), 546–551. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00618.x>
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., & Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

- 51(11), 4062–4070. <http://doi.org/10.1128/AAC.00148-07>
- Ho, J., Cira, N., Crooks, J., Baeza, J., & Weibel, D. (2012). Rapid identification of ESKAPE bacterial strains using an autonomous microfluidic device. *PloS One*, 7(7), e41245. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0041245>
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I., Jeong, S. H., Kang, H., Lee, K., ... Asia, N. (2015). Epidemiology and characteristics of Metallo-  $\beta$  - Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*, 47(2), 81–97. <http://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>
- Huang, H., & Hancock, R. E. (1996). The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(11), 3085–90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=178056&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Huang, H., Jeanteur, D., Pattus, F., & Hancock, R. E. (1995). Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Molecular Microbiology*, 16(5), 931–41. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02319.x>
- Huang, Y. T., Chang, S. C., Lauderdale, T. L., Yang, A. J., & Wang, J. T. (2007). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(2), 211–216. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.009>
- Johnson, J. K., Arduino, S. M., Stine, O. C., Johnson, J. A., & Harris, A. D. (2007). Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3707–3712. <http://doi.org/10.1128/JCM.00560-07>
- Kaufmann, M. E. (1998). Pulsed-field gel electrophoresis. In N. Woodford & P. Johnson (Eds.), *Methods in Molecular Medicine* (Vol. 15, pp. 33–50). <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.94>
- Kidd, T. J., Grimwood, K., Ramsay, K. A., Rainey, P. B., & Bell, S. C. (2011). Comparison of Three Molecular Techniques for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 263–268. <http://doi.org/10.1128/JCM.01421-10>

- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., & Rainey, P. B. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PloS One*, 7(9), e44199. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044199>
- Kobayashi, H., Isozaki, M., Fukuda, T., Anzai, Y., & Kato, F. (2013). Surveillance of Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, 2013(June), 144–150.
- Ktari, S., Mnif, B., Znazen, A., Rekik, M., Mezghani, S., Mahjoubi-Rhimi, F., & Hammami, A. (2011). Diversity of  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo- $\beta$ -lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb Drug Resist.*, 17(1), 25–30.
- Lambert, P. A. (2002). Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 95(41), S22–26.
- Larché, J., Pouillot, F., Essoh, C., Libisch, B., Straut, M., Lee, J. C., ... Pourcel, C. (2012). Rapid identification of international multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis and investigation of their susceptibility to lytic bacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6175–80. <http://doi.org/10.1128/AAC.01233-12>
- Lee, S., Park, Y.-J., Kim, M., Lee, H. K., Han, K., Kang, C. S., & Kang, M. W. (2005). Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 122–127. <http://doi.org/10.1093/jac/dki160>
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 185–191. <http://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185.Updated>
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(2), 63–68. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- Lin, S.-P., Liu, M.-F., Lin, C.-F., & Shi, Z.-Y. (2012). Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 45(3), 200–7. <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.11.015>

- Linares, J. F., López, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F., & Martínez, J. L. (2005). Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1384–91. <http://doi.org/10.1128/JB.187.4.1384-1391.2005>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <http://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Livermore, D. M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?, 34, 634–640.
- Llaca-Díaz, J. M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., & Garza-González, E. (2012). One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy*, 58(6), 475–481. <http://doi.org/10.1159/000346352>
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Van Delden, C., & Plésiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5676–5684. <http://doi.org/10.1128/AAC.00101-11>
- Luong, P. M., Shogan, B. D., Zaborin, A., Belogortseva, N., Shrout, J. D., Zaborina, O., & Alverdy, J. C. (2014). Emergence of the P2 phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains involves various mutations in mexT or mexF. *Journal of Bacteriology*, 196(2), 504–513. <http://doi.org/10.1128/JB.01050-13>
- Maâtallah, M., Bakhrouf, A., Habeeb, M. A., Turlej-Rogacka, A., Iversen, A., Pourcel, C., ... Giske, C. G. (2013). Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with multi-locus sequence typing. *PloS One*, 8(12), e82069. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082069>
- Maatallah, M., Cheriaa, J., Bakhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., ... Giske, C. G. (2011). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PloS One*, 6(10), e25617. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025617>

- Martínez Pérez, L. (2011). Tesis de Maestría. Detección de los genes que codifican para bombas de expulsión y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de Infecciones Nosocomiales. *Centro de Investigaciones En Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Martínez, T., Vazquez, G. J., Aquino, E. E., Goering, R. V., & Robledo, I. E. (2012). Two novel class I integron arrays containing IMP-18 metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2119–21. <http://doi.org/10.1128/AAC.05758-11>
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., & Nakae, T. (2000). Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in *wild-type* strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1), 107–112. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00419-5](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00419-5)
- Maseda, H., Uwate, M., & Nakae, T. (2010). Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in nfxC-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 311(1), 36–43. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02063.x>
- Mercier, J., & Levesque, R. C. (1990). Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8), 1577–1583. <http://doi.org/10.1128/AAC.34.8.1577>
- Naenna, P., Noisumdaeng, P., Pongpech, P., & Tribuddharat, C. (2010). Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(3), 614–624.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R., & Jung, R. (2005). Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*, 25(10), 1353–1364. <http://doi.org/10.1592/phco.2005.25.10.1353>
- Ocampo-Sosa, A. A., Cabot, G., Rodríguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M. D., ... Martínez-Martínez, L. (2012). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1703–13.

<http://doi.org/10.1128/AAC.05451-11>

- Ochoa, S., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., ... Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Bol Med Hosp Infant Mex*, *70*(2), 133–144.
- Ochs, M. M., Bains, M., & Hancock, R. E. (2000). Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(7), 1983–5. <http://doi.org/10.1128/aac.44.7.1983-1985.2000>
- Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., B. Sanchez, M., & Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *4*(April), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00103>
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. a., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(11), 3953–3955. <http://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(4), 657–686. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical Relevance of the ESCAPE Pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, *11*, 297–308.
- Pérez, A., García, P., Poggi, H., Braun, S., Castillo, C., Román, J. C., ... González, G. (2008). Presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. *Rev Méd Chile*, (136), 423–432.
- Peterson, L. R. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(6), 992. <http://doi.org/10.1086/605540>
- Pitout, J. D. D., Gregson, D. B., Poirel, L., McClure, J., Le, P., & Church, D. L. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- $\beta$ -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(7), 3129–3135. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129>
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(1), 24–38. <http://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
- Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M. G., & Nordmann,

- P. (2001). GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2598–603. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2598>
- Pollini, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo, G., Luzzaro, F., Docquier, J. D., & Rossolini, G. M. (2013). FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 410–416. <http://doi.org/10.1128/AAC.01953-12>
- Polotto, M., Casella, T., de Lucca Oliveira, M., Rúbio, F. G., Nogueira, M. L., de Almeida, M. T., & Nogueira, M. C. (2012). Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 176. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-176>
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2), 479–487. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479>
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*, 2(April), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat.*, 13(6), 151–171. <http://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>.Aminoglycoside
- Ramos Méndez, I. (2014). Tesis de Licenciatura. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones nosocomiales del Hospital Regional ISSSTE-Puebla y búsqueda del gen vim. *Centro de Investigaciones En Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Rice, L. B. (2010). Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(S1), S7–S10. <http://doi.org/10.1086/655995>
- Rizek, C., Fu, L., Dos Santos, L. C., Leite, G., Ramos, J., Rossi, F., ... Costa, S. F. (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), 43. <http://doi.org/10.1186/s12941-014-0043-3>
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas*

- aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4783–4788. <http://doi.org/10.1128/AAC.00574-09>
- Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Cebollada, R., Toro(de), M., Somalo, S., Seral, C., ... Saenz, Y. (2014). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4), 405–414. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.01.001>
- Rojo-Bezares, B., Estepa, V., de Toro, M., Undabeitia, E., Olarte, I., Torres, C., & Sáenz, Y. (2011). A novel class 1 integron array carrying blaVIM-2 genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 7), 1053–4. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.030973-0>
- Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11 Suppl 4, 17–32. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x>
- Sabaté, M., & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 20(7), 341–345. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(02\)72813-9](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(02)72813-9)
- Sánchez-Martínez, G., Garza-Ramos, U. J., Reyna-Flores, F. L., Gaytán-Martínez, J., Lorenzo-Bautista, I. G., & Silva-Sánchez, J. (2010). In169, a new class 1 integron that encoded bla(IMP-18) in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Mexico. *Archives of Medical Research*, 41(4), 235–9. <http://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.05.006>
- Sandiumenge, A. (2011). Effect of Antibiotic Diversity on Ventilator-Associated Pneumonia Caused by ESKAPE Organisms. *CHEST Journal*, 140(3), 643. <http://doi.org/10.1378/chest.11-0462>
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*, 2(1), 48–62. <http://doi.org/S01> [pii]
- Spencer, F. B., Haupt, S., Claros, M. C., Walter, S., Lietz, T., Schille, R., & Rodloff, A. C. (2000). Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6, 600–607. <http://doi.org/clm171> [pii]

- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M.-C. (2012). Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3(April), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Shimada, K., Shimojima, M., & Kirikae, T. (2013). IMP-43 and IMP-44 metallo- $\beta$ -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4427–4432. <http://doi.org/10.1128/AAC.00716-13>
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), 217–226.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), S3–S10. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. a., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239. <http://doi.org/0095-1137/>
- Urwin, R., & Maiden, M. C. J. (2003). Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, 11(10), 479–487. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
- Valerio Calleja, E. (2012). Tesis de Maestría. Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de Infecciones Nosocomiales. *Centro de Investigaciones En Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Vatcheva-Dobrevska, R., Mulet, X., Ivanov, I., Zamorano, L., Dobрева, E., Velinov, T., ... Oliver, A. (2013). Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist.*, 19(5), 355–61.
- Vílchez, G., & Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos Scope

- and limitations of molecular methods applied to epidemiological studies. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 6–12.
- Wendel, A. F., Brodner, A. H. B., Wydra, S., Ressina, S., Henrich, B., Pfeffer, K., ... MacKenzie, C. R. (2013). Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae during a long-term outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 5162–5165. <http://doi.org/10.1128/AAC.00118-13>
- Wolkowicz, T., Patzer, J. A., & Kaminska, W. (2013). Inactivation of oprD gene in several clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains by different insertion sequences. *Unpublished. Department of Bacteriology, National Institute of Public Health - National Institute of Hygiene, Poland.* <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Wolter, D. J., Hanson, N. D., & Lister, P. D. (2004). Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1), 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.039>
- Wolter, D. J., Khalaf, N., Robledo, I. E., Vázquez, G. J., Santé, M. I., Aquino, E. E., ... Hanson, N. D. (2009). Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1660–4. <http://doi.org/10.1128/AAC.01172-08>
- Yeo, C. C., & Poh, C. L. (1996). IS1394 from *Pseudomonas alcaligenes* N.C.I.B. 9867: identification and characterization of a member of the IS30 family of insertion elements. *Gene*, 175, 109–113.
- Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C., & Durmaz, R. (2006). Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *American Journal of Infection Control*, 34(4), 188–92. <http://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.11.010>
- Zafer, M. M., Al-Agamy, M. H., El-Mahallawy, H. A., Amin, M. A., & Ashour, M. S. E.-D. (2014). Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cancer Patients. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <http://doi.org/10.1155/2014/101635>
- Zhao, W.-H., & Hu, Z.-Q. (2010). Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 245–258. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2010.481763>

## ANEXOS

### Anexo 1. Antecedentes de los 21 aislados de *P. aeruginosa* del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE de la Ciudad de México.

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA			INTEGRON CLASE I
					b-Lactamicos	Aminoglucósidos	Quinolonas	Int1/Su1/Qac
Ps 24	NEFROUCIA	Cultivo de Sonda	04/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 25	UCIA	Secreción Bronquial	26/02/2009	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, CIP, OFX, C, SXT.	oxa-50	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 33	NEUROCIRUGIA	Punta de Cateter	feb-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 35	UCIA/CCV	Cultivo de Sonda	19/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps36	UCIA	Punta de Cateter	17/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-11, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 39	UCIA/CIR. GRAL	Secreción Bronquial	23/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-1, oxa-2, oxa-50	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 47	UCIA/NC	Secreción Bronquial	26/02/2009	CB, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, OFX, C, SXT.	oxa-50	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 48	TPQ	Herida Quirúrgica	03/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 49	TPQ	Secreción Bronquial	03/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 52	UCIA	Secreción Bronquial	23/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-11, oxa-2	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 62(3)A	TRANSPLANTE	Hemocultivo	feb-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-1, oxa-2, oxa-50	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 65	UCIA	Hemocultivo	09/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 74	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, ATM, GM, NET, C, SXT.	oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 78	CCV	Herida	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 94	UROLOGIA	Urocultivo	30/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 81	TPQ	Secreción Bronquial	12/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 84	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 87	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 89	UCIA	Secreción Bronquial	02/04/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 91	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	oxa-2, ges-1, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)
Ps 95	TPQ/NC	Secreción Bronquial	05/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)

(Ayala, 2013; Martínez Pérez, 2011; Valerio Calleja, 2012)

## Anexo 2. Antecedentes de los 25 aislados de *P. aeruginosa* del HR ISSSTE de la Ciudad de Puebla.

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA
PsE02	UCI-5	Lavado bronquial	18-abr-13	CF, CTX, FEP, MEM, OFX, C, SXT
PsE06	Urología	Urocultivo	10-may-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL
PsE09	MI-512	Urocultivo	18-may-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE10	Hematología	Expectoración	20-may-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE15	MI-533	Secreción Bronquial	24-jun-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL
PsE16	MI-619	Urocultivo	24-jun-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL
PsE18	MI-506	Lavado bronquioalveolar	18-jun-13	PIP, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, C, CL
PsE19	C-627	Hemocultivo/CVC	04-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL
PsE20	C-529-MIH	Expectoración	19-ago-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL
PsE21	C-512-MIH	Expectoración	20-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE22	C-507-MIH	Urocultivo	26-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL
PsE23	UCI-MI	Cateter Venoso Central	25-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE24	C-534-MIH	Aspirado Bronquial	24-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, OFX, C, SXT
PsE25	C-522	Expectoración	19-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE26	CIR-425	Expectoración	17-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE27	MI-505	Expectoración	19-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE28	UCI-1	Expectoración	18-sep-13	TIM, CF, IMP, MEM, C, SXT
PsE29	Angiología	Secreción de pie derecho	07-oct-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE30	CIR-425	Urocultivo	17-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE45	MI	Urocultivo	03-dic-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE46	C-521-MI	Lavado Broncoalveolar	29-dic-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE47	C-515-MI	Lavado Broncoalveolar	09-dic-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE48	C-720	Aspirado bronquial	29-oct-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE50	Nefrología	Urocultivo	16-oct-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, FEP, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT
PsE52	C.E. MI	Urocultivo	14-ene-14	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, CIP, OFX, NOR, C, SXT

(Ramos, 2014)

### Anexo 3. Características fenotípicas y genotípicas de los 21 aislados del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE de la Cd. de México sometidos a PFGE.

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	RESISTOTIPO	GENOTIPO DE RESISTENCIA			INTEGRON CLASE I Int1/Sul/Qac	PFGE TIPO/GRUPO
						b-Lactámicos	Aminoglucósidos	Quinolonas		
Ps 52	UCIA	Secreción Bronquial	23/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	1	ges-11, oxa-2	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT1
Ps 74	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, ATM, GM, NET, C, SXT.	2	oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT2
Ps 78	CCV	Herida	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	3	oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT3
Ps36	UCIA	Punta de Cateter	17/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	4	ges-11, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT4
Ps 94	UROLOGIA	Urocultivo	30/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	5	oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT5
Ps 39	UCIA/CIR. GRAL	Secreción Bronquial	23/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	1	ges-1, oxa-2, oxa-50	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT6/D
Ps 49	TPQ	Secreción Bronquial	03/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	6	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT7/D
Ps 65	UCIA	Hemocultivo	09/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	6	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT8/D
Ps 47	UCIA/NC	Secreción Bronquial	26/02/2009	CB, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, OFX, C, SXT.	7	oxa-50	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT9
Ps 24	NEFRO/UCIA	Cultivo de Sonda	04/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	1	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT10
Ps 33	NEUROCIRUGIA	Punta de Cateter	feb-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	1	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT11/B
Ps 35	UCIA/CCV	Cultivo de Sonda	19/02/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	1	ges-1, oxa-2, oxa-50	aac-3'-IIa, aac-6'-Ib	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT12/B

### Anexo 3 continuación...

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	RESISTOTIPO	GENOTIPO DE RESISTENCIA			INTEGRON CLASE I Int1/SuI/Qac	PFGE TIPO/GRUPO
						b-Lactamicos	Aminoglucósidos	Quinolonas		
Ps 48	TPQ	Herida Quirúrgica	03/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	6	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	<i>aac-6<sup>-Ib</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT13/ C
Ps 62(3)A	TRANSPLANTE	Hemocultivo	feb-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, <b>ATM</b> , GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	1	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT14/ C
Ps 25	UCIA	Secreción Bronquial	26/02/2009	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, CIP, OFX, C, SXT.	8	<i>oxa-50</i>	Negativo	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT15
Ps 81	TPQ	Secreción Bronquial	12/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	9	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	<i>aac-3<sup>-IIa</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT16
Ps 95	TPQ/NC	Secreción Bronquial	05/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT.	10	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	<i>aac-3<sup>-IIa</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT17
Ps 91	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	3	<i>oxa-2, ges-1, oxa-50</i>	<i>aac-6<sup>-Ib</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT18
Ps 87	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	1	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	<i>aac-3<sup>-IIa</sup>, aac-6<sup>-Ib</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT19/ A
Ps 89	UCIA	Secreción Bronquial	02/04/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, <b>CL</b> .	3	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	<i>aac-3<sup>-IIa</sup>, aac-6<sup>-Ib</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT20/ A
Ps 84	UCIA	Secreción Bronquial	17/03/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL.	3	<i>ges-1, oxa-2, oxa-50</i>	<i>aac-3<sup>-IIa</sup>, aac-6<sup>-Ib</sup></i>	Negativo	(+)/(+)/(+)	PT21

**NOTA:** Los aislados marcados con un mismo color pertenecen a grupos en PFGE. Las diferencias entre aislados de los grupos se resaltan en color rojo. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona, **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina.

#### Anexo 4. Características fenotípicas y genotípicas de los 21 aislados del HR ISSSTE de la Cd. de Puebla sometidos a PFGE.

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	RESISTOTIPO	PFGE TIPO/GRUPO
PsE02	UCI-5	Lavado bronquial	18-abr-13	CF, CTX, FEP, MEM, OFX, C, SXT	1	PT1
PsE09	MI-512	Urocultivo	18-may-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	2	PT2/ B
PsE16	MI-619	Urocultivo	24-jun-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, <b>CL</b>	3	PT3/ B
PsE15	MI-533	Secreción Bronquial	24-jun-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	3	PT4
PsE10	Hematología	Expectoración	20-may-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	4	PT5
PsE19	C-627	Hemocultivo/CVC	04-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	3	PT6
PsE23	UCI-MI	Cateter Venoso Central	25-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	5	PT7
PsE22	C-507-MIH	Urocultivo	26-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	3	PT8
PsE47	C-515-MI	Lavado Broncoalveolar	09-dic-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	6	PT9
PsE20	C-529-MIH	Expectoración	19-ago-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, <b>CL</b>	7	PT10
PsE26	CIR-425	Expectoración	17-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, <b>ATM</b> , GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	4	PT11
PsE30	CIR-425	Urocultivo	17-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	5	PT12
PsE25	C-522	Expectoración	19-sep-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	8	PT13/ A
PsE45	MI	Urocultivo	03-dic-13	PIP, TIC, CB, <b>TZP</b> , TIM, CF, CTX, CRO, <b>IMP</b> , MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	9	PT14/ A
PsE48	C-720	Aspirado bronquial	29-oct-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, <b>IMP</b> , MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	10	PT15/ A

## Anexo 4 continuación...

AISLADO	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FENOTIPO DE RESISTENCIA	RESISTOTIPO	PFGE TIPO/GRUPO
PsE46	C-521-MI	Lavado Broncoalveolar	29-dic-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	2	PT16
PsE21	C-512-MIH	Expectoración	20-ago-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	2	PT17
PsE28	UCI-1	Expectoración	18-sep-13	TIM, CF, IMP, MEM, C, SXT	11	PT18
PsE18	MI-506	Lavado bronquioalveolar	18-jun-13	PIP, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, C, CL	12	PT19
PsE06	Urología	Urocultivo	10-may-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	13	PT20
PsE52	C.E. MI	Urocultivo	14-ene-14	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, CIP, OFX, NOR, C, SXT	14	PT21
PsE24	C-534-MIH	Aspirado Bronquial	24-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, OFX, C, SXT	15	PT22
PsE27	MI-505	Expectoración	19-sep-13	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	2	PT23
PsE29	Angiología	Secreción de pie derecho	07-oct-13	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	6	PT24
PsE50	Nefrología	Urocultivo	16-oct-13	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, FEP, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	16	PT25

**Nota:** Los aislados marcados con un mismo color pertenecen a grupos en PFGE. Las diferencias entre aislados de los grupos se resaltan en color rojo. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina.

## Anexo 5. Alineamientos en Clustal Omega de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes encontrados en los aislados en estudio del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla

### Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia nucleotídica de *imp-18* (GenBank: AY780674.2) con el aislado PE20.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
imp-18      ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCCTTTGCAACATTGCTGCTGCAGATGAT
PE20imp     -----

imp-18      TCTTTGCCTGATTTAAAAAATTGAGAAGCTTGAAAAAGGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTT
PE20imp     TCTTTGCCTGATTTAAAAAATTGAGAAGCTTGAAAAAGGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTT
*****

imp-18      GAAGAAGTTAAAGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGGTTTAGTGTTCTTGTAAGAAT
PE20imp     GAAGAAGTTAAAGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGGTTTAGTGTTCTTGTAAGAAT
*****

imp-18      GATGCTTATCTGATAGATACTCCAATTACCGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTTAATTGG
PE20imp     GATGCTTATCTGATAGATACTCCAATTACCGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTTAATTGG
*****

imp-18      TTTATTGAGCACGGCTATAGAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGCGACAGT
PE20imp     TTTATTGAGCACGGCTATAGAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGCGACAGT
*****

imp-18      ACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAATTAACA
PE20imp     ACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAATTAACA
*****

imp-18      AATGAACTTCTAAAAAAGACAATAAGGTGCAAGCTACAAATTCCTTTTAGTGGAGTTAGT
PE20imp     AATGAACTTCTAAAAAAGACAATAAGGTGCAAGCTACAAATTCCTTTTAGTGGAGTTAGT
*****

imp-18      TATTCACCTATCAAAAACAAAATTGAAGTTTTCTATCCAGGTCCAGGACACACTCAAGAT
PE20imp     TATTCACCTATCAAAAACAAAATTGAAGTTTTCTATCCAGGTCCAGGACACACTCAAGAT
*****

imp-18      AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
PE20imp     AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
*****

imp-18      GACGGTCTTGAAATTTAGGGGATGCAAATTTAGAAGCTTGCCAAAGTCCGCTAAAATA
PE20imp     GACGGTCTTGAAATTTA-----
*****

imp-18      TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAACACTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAATTTGGAAAC
PE20imp     -----
```

```
imp-18      GCATCACTCTTGCAGCGCACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGTTAAATGAAAGTAAAAAA
PE20imp     -----
```

```
imp-18      CCGTTACAGCCAAGTAGCTAA
PE20imp     -----
```

Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia aminoacídica de *imp-18* (GenBank: AY780674.2) con el aislado PE20.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
imp-18      MKKLFVLCVFFLCNIAAADSLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN
PE20imp     -----SLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN
                *****
```

```
imp-18      DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT
PE20imp     DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT
                *****
```

```
imp-18      NELLKKNKQVQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP
PE20imp     NELLKKNKQVQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP
                *****
```

```
imp-18      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK
PE20imp     DGLGNL-----
                *****
```

```
imp-18      PLQPSS
PE20imp     -----
```

Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia nucleotídica de *imp-15* (GenBank: KC310496.1) con el aislado PE21.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE21imp     -----AGAG
imp-15      ATGAACAAGTTATCTGTATTCTTTATGTTTATGTTTGTAGCATTACTGCCGCAGGAGAG
                *****
```

```
PE21imp     TCTTTGCCAGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGACGAAGGTGTTTATGTTTCATACTTCGTTT
imp-15      TCTTTGCCAGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGACGAAGGTGTTTATGTTTCATACTTCGTTT
                *****
```

```
PE21imp     GAAGAAGTTAACGGTTGGGGTGTGTTCCCTAAACACGGCTTGTTGGTTCCTTGTAATACT
imp-15      GAAGAAGTTAACGGTTGGGGTGTGTTCCCTAAACACGGCTTGTTGGTTCCTTGTAATACT
                *****
```

```
PE21imp     GAGGCCTATCTGATTGACACTCCATTTACGGCAAAAAGATACTGAAAAGTTAGTCACTTGG
imp-15      GAGGCCTATCTGATTGACACTCCATTTACGGCAAAAAGATACTGAAAAGTTAGTCACTTGG
                *****
```

```

PE21imp      TTTGTGGAGCGCGGCTATAAAATAAAAAGGCAGTATTTCTCTCATTTTCATAGCGACAGC
imp-15      TTTGTGGAGCGCGGCTATAAAATAAAAAGGCAGTATTTCTCTCATTTTCATAGCGACAGC
*****

PE21imp      ACGGGCGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACGTATGCATCTGAATTAACA
imp-15      ACGGGCGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACGTATGCATCTGAATTAACA
*****

PE21imp      AATGAACTTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTACAAGCTAAAAATTCATTTAGCGGAGGTAGC
imp-15      AATGAACTTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTACAAGCTAAAAATTCATTTAGCGGAGGTAGC
*****

PE21imp      TATTGGCTAGTTAATAATAAGATTGAAGTTTTTTTATCCTGGTCCAGGGCACACTCCAGAT
imp-15      TATTGGCTAGTTAATAATAAGATTGAAGTTTTTTTATCCTGGTCCAGGGCACACTCCAGAT
*****

PE21imp      AACGTAGTGGTTTTGGCTACCTGAAAATAGAGTTTTGTTTCGGTGGTTGTTTTGTTAAACCG
imp-15      AACGTAGTGGTTTTGGCTACCTGAAAATAGAGTTTTGTTTCGGTGGTTGTTTTGTTAAACCG
*****

PE21imp      TACGGTCTTGGTAATTTGGGTGACGCAAAT-----
imp-15      TACGGTCTTGGTAATTTGGGTGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCCAAAATA
*****

PE21imp      -----
imp-15      TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAGTTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAAACTGGGAAC

PE21imp      -----
imp-15      GCATCACTCTTGAAACTTACTTGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTAAAAGAAAGTAAAAAA

PE21imp      -----
imp-15      CCATCACTGCCAAGTAACTAA
    
```

**Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia aminoacídica de imp-15 (GenBank: KC310496.1) con el aislado PE21.**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

imp-15      MNKLSVFFMFMFCSITAAGESLPLDKIEKLDGQVYVHTSFEEVNGWGVVPHKGLVVLVNT
PE21imp      -----ESLPLDKIEKLDGQVYVHTSFEEVNGWGVVPHKGLVVLVNT
*****

imp-15      EAYLIDTPFTAQDTEKLVTFVVERGYKIKGSISSHFHSDSTGGIEWLNSQSIPTYASELT
PE21imp      EAYLIDTPFTAQDTEKLVTFVVERGYKIKGSISSHFHSDSTGGIEWLNSQSIPTYASELT
*****

imp-15      NELLKKGDKVQAKNSFSGGSYWLNNKIEVFYPPGHTPDNVVVWLPENRVLFGGCFVKP
PE21imp      NELLKKGDKVQAKNSFSGGSYWLNNKIEVFYPPGHTPDNVVVWLPENRVLFGGCFVKP
*****
    
```

```
imp-15      YGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSETGNASLLKLTWEQAVKGLKESKK
PE21imp     YGLGNLGDAN-----
*****
```

```
imp-15      PSLPSN
PE21imp     -----
```

Comparación en Clustal Omega de las secuencias nucleotídicas de variantes del gen *ges* (*ges-1*, *ges-2*, *ges-3*, *ges-4*, *ges-5*, *ges-6*, *ges-7*, *ges-11*, *ges-13*, *ges-16*, *ges-26*) y el encontrado en el aislado PE21.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE21ges     -----CACGCACTATTCTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATCTGCGTCGGAA
ges-4       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCATCGGAA
ges-13      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-6       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-3       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-16      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-2       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-11      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-5       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-7       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-26      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-1       ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
*****
```

```
PE21ges     AACTTAACCTTCAGGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAGAAAGCAGCTGAGATCGGT
ges-4       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-13      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-6       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-3       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-16      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTGAGATCGGT
ges-2       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-11      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-5       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-7       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-26      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-1       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
** *****
```

```
PE21ges     GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGACAGATCGTCGCGGGCCACCGAATCGAGCAGCGTTTT
ges-4       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-13      GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-6       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-3       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAACGGCGCAGCGTTTT
ges-16      GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-2       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-11      GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-5       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-7       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-26      GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-1       GTTGCATCGTTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
*****
```

PE21ges GCAATGTGCTCTACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-4 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-13 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-6 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-3 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-16 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-2 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-11 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-5 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-7 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-26 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 ges-1 GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA  
 \*\*\*\*\*

PE21ges GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCGTACGGGC GGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-4 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-13 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-6 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-3 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-16 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-2 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-11 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-5 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-7 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-26 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 ges-1 GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCAAATGGTCT  
 \*\*\*\*\*

PE21ges CCTGCCCGGAGCGGTTTCTCGCATCGGGACATATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCG  
 ges-4 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-13 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-6 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-3 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-16 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-2 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-11 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-5 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-7 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-26 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 ges-1 CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT  
 \*\*\*\*\*

PE21ges GCGGTGCAGCTCAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-4 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-13 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-6 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-3 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-16 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-2 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-11 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-5 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-7 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-26 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 ges-1 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT  
 \*\*\*\*\*

PE21ges GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-4 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-13 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-6 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-3 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-16 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-2 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-11 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-5 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-7 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-26 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 ges-1 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCCGGAAA  
 \*\*\*\*\*

PE21ges GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-4 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-13 GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-6 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-3 GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-16 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-2 GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-11 GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-5 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-7 GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-26 GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 ges-1 GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACACGCCTATTGCT  
 \*\*\*\*\*

PE21ges ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGCCACCTCGACCCAC  
 ges-4 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-13 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-6 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-3 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-16 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-2 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-11 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-5 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-7 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-26 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 ges-1 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC  
 \*\*\*\*\*

PE21ges ACAATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACAATTACGAGCGGGTTTT  
 ges-4 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-13 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-6 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-3 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-16 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-2 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-11 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-5 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-7 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-26 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 ges-1 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT  
 \*\* \*\*\*\*\*

PE21ges CCTAAAGATTGGGTTAATTGGAGAGAAAACCGGCACCTGCGCCAACGGGGCCGGAACGAC

```

ges-4      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-13     CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-6      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-3      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-16     CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-2      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-11     CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-5      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-7      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-26     CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-1      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
*****
    
```

```

PE21ges    ATTGGGTTTTTTTAAAGCCCAGGACAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-4      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-13     ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-6      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-3      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-16     ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-2      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-11     ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-5      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-7      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-26     ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-1      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
*****
    
```

```

PE21ges    AAACATCGGCCGTAACACAGTACGAAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACGCAA
ges-4      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-13     AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-6      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-3      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-16     AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-2      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-11     AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-5      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-7      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-26     AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-1      AAACATCGGCCGTAAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
*****
    
```

```

PE21ges    CTCATCCTGAGCACGG-----
ges-4      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-13     CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-6      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-3      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-16     CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-2      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-11     CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-5      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-7      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-26     CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-1      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
*****
    
```

Comparación en Clustal Omega de las secuencias aminoacídicas de variantes del gen *ges* (*ges-1*, *ges-2*, *ges-3*, *ges-4*, *ges-5*, *ges-6*, *ges-7*, *ges-11*, *ges-13*, *ges-16*, *ges-26*) y el encontrado en el aislado PE21.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE21ges      ----HALFLAGIAHSASASENLTFRDLEKLEREKAAEIGVAIVDPQGEIVAGHRIEQR
ges-2        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-3        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-4        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-6        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-13       MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-16       MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAEIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-11       MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-5        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-7        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-26       MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
ges-1        MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
              ***:*.*.*****  ***:***:*****:*****:*****  ***
    
```

```

PE21ges      AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGRDMIVKWSPAERFLASGHMTVLEAAQA
ges-2        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-3        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-4        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-6        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-13       AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-16       AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-11       AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-5        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-7        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-26       AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
ges-1        AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVKWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
              *****:*****:*****
    
```

```

PE21ges      AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-2        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMNDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-3        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-4        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMSDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-6        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMSDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-13       AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMNDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-16       AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMSDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-11       AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-5        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMSDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-7        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-26       AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTTPIA
ges-1        AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTTPIA
              *****:*****
    
```

```

PE21ges      MARTVAKVLYGGALTPTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVIGKGTGTCANGGRND
ges-2        MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-3        MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-4        MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-6        MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-13       MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
    
```

```

ges-16      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-11      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGARND
ges-5       MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-7       MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-26      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
ges-1       MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
*****
PE21ges     IGFFKAQDRDYAVAVYTTAPKLSAEQRDELVASVGVITQLILST--
ges-2       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-3       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-4       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-6       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-13      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-16      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-11      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-5       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-7       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-26      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
ges-1       IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGVITQLILSTDK
*****

```

Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia nucleotídica de ges-2 (GenBank: AF326355.1 ) con el aislado PE26

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE26ges     -----TCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges2        ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
*****

PE26ges     AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges2        AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
*****

PE26ges     GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges2        GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
*****

PE26ges     GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges2        GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
*****

PE26ges     GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges2        GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
*****

PE26ges     CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges2        CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
*****

PE26ges     GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges2        GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT

```

```

*****
PE26ges      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges2         GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
*****

PE26ges      GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
ges2         GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
*****

PE26ges      ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges2         ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
*****

PE26ges      ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges2         ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
*****

PE26ges      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges2         CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
*****

PE26ges      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATAACAACGGCCCCG
ges2         ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATAACAACGGCCCCG
*****

PE26ges      AAACATATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTC-----
ges2         AAACATATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTGCGGTCAAGTTATTACACAA
*****

PE26ges      -----
ges2         CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG

```

**Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia aminoacídica de ges-2 (GenBank: AF326355.1 ) con el aislado PE26**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

ges-2      MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
PE26ges    ----HALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
*****

ges-2      AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
PE26ges    AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
*****

ges-2      AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMNDNTPGDLRDTTTPIA
PE26ges    AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLDRKEPEMNDNTPGDLRDTTTPIA
*****

ges-2      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIQNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
PE26ges    MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIQNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
*****

```

```
ges-2      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK
PE26ges    IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVA-----
          *****
```

Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia nucleotídica de *ges-2* (GenBank: AF326355.1 ) con el aislado PE30

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE30ges    -----CACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges2       ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
          *****

PE30ges    AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges2       AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
          *****

PE30ges    GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges2       GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
          *****

PE30ges    GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges2       GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
          *****

PE30ges    GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges2       GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
          *****

PE30ges    CCTGCCACGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges2       CCTGCCACGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
          *****

PE30ges    GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges2       GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
          *****

PE30ges    GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges2       GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
          *****

PE30ges    GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCTATTGCT
ges2       GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCTATTGCT
          *****

PE30ges    ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges2       ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
          *****

PE30ges    ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges2       ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
          *****
```

```

PE30ges      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges2         CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
*****

PE30ges      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATAACAACGGCCCCG
ges2         ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATAACAACGGCCCCG
*****

PE30ges      AAActATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGT-----
ges2         AAActATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCGGTCAAGTTATTACACAA
*****

PE30ges      -----
ges2         CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
    
```

**Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia aminoacídica de ges-2 (GenBank: AF326355.1 ) con el aislado PE30**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

ges-2      MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
PE30ges    ---HALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
*****

ges-2      AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
PE30ges    AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
*****

ges-2      AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRDLRKEPEMNDNTPGDLRDTTTPIA
PE30ges    AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRDLRKEPEMNDNTPGDLRDTTTPIA
*****

ges-2      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIQNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
PE30ges    MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIQNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
*****

ges-2      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK
PE30ges    IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDEL-----
*****
    
```

## Anexo 6. Análisis de las secuencias aminoacídicas de los reguladores de bombas de expulsión de los aislados en estudio del Hospital Regional ISSSTE de la Ciudad de Puebla.

### Análisis de la secuencia aminoacídica de los reguladores de bombas de expulsión del aislado PE20.

#### **PE02 *mexR* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE02mexR      MNYPVNPDLM PALMAV FQHVRTRIQSELD CQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
PA01mexR      MNYPVNPDLM PALMAV FQHVRTRIQSELD CQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
*****

PE02mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
PA01mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
*****

PE02mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
PA01mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****
```

### Análisis de la secuencia aminoacídica de los reguladores de bombas de expulsión del aislado PE20.

#### **PE20 *mexR* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE20mexR      MNYPVNPDLM PALMAV FQHVRTRIQSELD CQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
PA01mexR      MNYPVNPDLM PALMAV FQHVRTRIQSELD CQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
*****

PE20mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
PA01mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
*****

PE20mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
PA01mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****
```

### PE20 *mexT* Cambio del marco de lectura a partir del aminoácido 80

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE20mexT -----PAPRRSEPADRVDRP
PA01mexT MPVSDPMPLRHLARPRPVSHARLDGEPRLQPLAPGNEERHEPKRPAPRRSEPADRVDRP
*****

PE20mexT DARTQRDPRRRETVPRPAGHQRRAVAPAHAVRRPAVRPYRTQHGAHRAS-----PGNL
PA01mexT DARTQRDPRRRETVPRPAGQPAISAALSRL-RTLFDDPLFVRTGRSMEPTARAQEIFAHL
*****: :.* :: * * .: * ..*

PE20mexT RPPVAGAGFHLRHE-----SRQVR---SGDQHRGVPHRPFRRRV-----
PA01mexT SPALDSISTAMSRASEFDPATSTAVFRIGLSDDVEFGLLPPLLRRLRAEAPGFVLVVRRA
* : . . : * . * . * * . * : : ** * .

PE20mexT RPVAAPA-----PPPARGGAGDRPRRAPRQLSIDAEPAGLGGDLGGRQLH
PA01mexT NYLLMPNLLASGEISVGVSYTDELPANAKRKTVRRSKPKILRADSAPGQLTL-----
. : * **.. * * : * * : * . *

PE20mexT RRTAGQRQAQDRAPQQAEDPPRRLRARPADPRLLRAT-ARAGVLRRRPQRLRR-----
PA01mexT -----DDYCARPHALVSFAGDLSGFVDEELEKFGKRKRVVL
* * : * : : * : . . : : *

PE20mexT -----RGAGKIR-----PQAQGGP GGA VQRPRHPPGRHRHHRHRARLRRPG
PA01mexT AVPQFNGLGTL LAGTDI IATVPDYAAQALIAAGGLRAE---DPPFETRAFELS--MAW--
.* *.: ** . ** .: .** . * .. :

PE20mexT ADRRRRPTRRGPTVRDPRLRRTVDGLARRPGQRSGRTLAAALADQHVHRRSGQSL
PA01mexT -----RGAQNDPAERWLR-----RISMFIGD-----PDSL
** .** * : . * :.* :**
    
```

### PE20 *mexZ* Silvestre

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE20mexZ MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
PA01mexZ MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
*****

PE20mexZ RQCCEPGSVQRVLEIILYKICERSDENEPLLRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
PA01mexZ RQCCEPGSVQRVLEIILYKICERSDENEPLLRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
*****

PE20mexZ LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLRSPPYLLLADA
PA01mexZ LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLRSPPYLLLADA
*****
    
```

**PE20 *nfxB* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE20nfxB      MTLISHDERLIKALAVAIIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHG
PA01nfxB      MTLISHDERLIKALAVAIIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHG
*****

PE20nfxB      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPFDFDPHGEGARWQSY
PA01nfxB      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPFDFDPHGEGARWQSY
*****

PE20nfxB      ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTLFTITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFL
PA01nfxB      ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTLFTITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFL
*****

PE20nfxB      ASNPARS
PA01nfxB      ASNPARS
*****
    
```

Análisis de la secuencia aminoacídica de los reguladores de bombas de expulsión del aislado PE06.

**PE06 *mexR* Val126Glu**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

MEXRPA01      MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
MEXRPE06      MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
*****

MEXRPA01      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDEL
MEXRPE06      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDEL
*****

MEXRPA01      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
MEXRPE06      APLTPEEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****
    
```

**PE06 *mexT* cambio del marco de lectura a partir del aminoácido 80**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE06mexT      -----APRRSEPADRVDRP
PA01mexT      MPVSDPMPRLRHLARPRPVSHARLDGEPRLQPLAPGNEERHEPKRPAPRRSEPADRVDRP
*****

PE06mexT      DARTQRDPRRRETVP RPAGHQCRAVAPAHAVRRPAVRPYRTQHGAHRAS-----PGNL
PA01mexT      DARTQRDPRRRETVP RPAGQPAISAALSRL-RTLFDDPLFVRTGRSMEPTARAQEIFAHL
*****: . :.* :: * * .: * ..*
    
```

```

PE06mexT      RPPVAGAGLHLHRHE-----SRQVRVS---GDQHRGVPHRPFRRRRV-----
PA01mexT      SPALDSISTAMSRASEFDPATSTAVFRIGLSDDEVEFGLLPPLLRRLRAEAPGFVLVVRRA
               * : . . : * . * . * : : ** * .

PE06mexT      RPVAAPA-----PPPARGGAGDRPRRAPRQLSIDAEPAGLGGDLGGRQLH
PA01mexT      NYLLMPNLLASGEISVGVSYTDELPANAKRKTVRRSKPKILRADSAFGQLTL-----
               . : * ** . . * * : * * : * . *

PE06mexT      RRTAGQRQAQDRAPQQAEDPPRRLRARPADPRLLRAT-ARAGVLRRRPQRLRR-----
PA01mexT      -----DDYCARPHALVSFAGDLSGFVDEEELKFKGRKRKVVIL
               * * : * : : * . : . : : *

PE06mexT      -----RGAGKIR-----PQAQGGPGGAAVQRPRHPPRRHRHHRHRARLRRPG
PA01mexT      AVPQFNGLGTLLAGTDIIATVPDYAAQALIAAGGLRAE---DPPFETRAFELS--MAWRG
               . * * . : ** . ** . : . ** . * . . : *

PE06mexT      ADRRR-----RPTRRGPAVRDPRLRTVDGLARRPGQRPGGTLAALADQHVHRRSGQSL
PA01mexT      AQDNDPAERWLRSRISMFIGDP-----DSL-----
               * : . : * . : ** * . *
    
```

**PE06 mexZ Glu81Asp**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE06mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
PA01mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
               *****

PE06mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYLKCDRSDENEP LLRRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
PA01mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYLKCDRSDENEP LLRRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
               *****

PE06mexZ      LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLRS SPYLLLLADA
PA01mexZ      LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLRS SPYLLLLADA
               *****
    
```

**PE06 nfxB Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

nfxB-PE06     MTLISHDERLIKALAVAI VDRPRATLKE LAEAAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
nfxB-PA01     MTLISHDERLIKALAVAI VDRPRATLKE LAEAAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
               *****

nfxB-PE06     VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPDFLDPHGEGARWQSYLE
nfxB-PA01     VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPDFLDPHGEGARWQSYLE
               *****

nfxB-PE06     ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
nfxB-PA01     ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
               *****
    
```

nfxB-PE06 ASNPARS  
 nfxB-PA01 ASNPARS  
 \*\*\*\*\*

**Análisis de la secuencia aminoacídica de los reguladores de bombas de expulsión del aislado PE52.**

**PE52 *mexR* Val126Glu**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
mexR-PE52      MNYPVNPDLM PALMAVFQHV RTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
mexR-PA01      MNYPVNPDLM PALMAVFQHV RTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLI DEQRGLNLQDLGRQ
                *****

mexR-PE52      MCRDKALITRK IRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDEL F
mexR-PA01      MCRDKALITRK IRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDEL F
                *****

mexR-PE52      APLTPEEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
mexR-PA01      APLTPEEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
                *****
```

**PE52 *mexT* cambio del marco de lectura a partir del aminoácido 80**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE52mexT      -----APRRSEPADRVRDP
PA01mexT      MPVSDPMP LRLH LARPRPVSHARLDGEP PRLQPLAPGNEERHEPKRPAPRRSEPADRVRDP
                *****

PE52mexT      DARTQRDPRRRET VPRPAGHQCRAVAPAHAVRRPAVRPYRTQHGAHRAS-----PGNL
PA01mexT      DARTQRDPRRRET VPRPAGQPAISAALSRL-RTLFDDPLFVRTGRSMEPTARAQEIFAHL
                *****: . :.* :: * * .: * ..*

PE52mexT      RPPVAGAGLHLHRHE-----SRQVRVS---GDQHRGVPHRPFRRRRV-----
PA01mexT      SPALDSISTAMSRASEFDPATSTAVFRIGLSDDVEFGLLPPLLRLRAEAPGFVLVVRRA
                * : . . : * . * . * * : : ** *.

PE52mexT      RPVAAPA-----PPPARGGAGDRPRRAPRQLSIDAEPAGLGDLGGRQLH
PA01mexT      NYLLMPNLLASGEISVGVSYTDEL PANAKRKTVRRSKPKILRADSAPGQLTL-----
                . : * **.. * * : * * : * .

PE52mexT      RRTAGQRQAQDRAPQQAEDPPRRLRARPADPRRLLRAT-ARAGVLRRRPQRLRR-----
PA01mexT      -----DDYCARPHALVSFAGDLSGFVDEELEKFGKRKRVVL
                * * : * : : : * . : . : : *

PE52mexT      -----RGAGKIR-----PQAQGGPGGA AVQRPRHPPRRHRHRRARLRPPG
PA01mexT      AVPQFNGLGTL LAGTDI IATVPDYAAQALIAAGGLRAE---DPPFETRAFELS--MAWRG
                . * * . : ** . ** . : . ** . * . . : *
```

```

PE52mexT      ADRRR-----RPTRRGPAVRDPRLRTVDGLARRPGQRPGGTLAALADQHVHRRSGQSL
PAO1mexT      AQDNDPAERWLRSRISMFIGDP-----DSL-----
* : .           : * . : **      * . *
    
```

**PE52 mexZ Glu81Asp**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE52mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
PAO1mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
*****

PE52mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYLKCDRSDENEP LLRRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
PAO1mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYLKCDRSDENEP LLRRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
*****

PE52mexZ      LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLSSPYLLLADA
PAO1mexZ      LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLSSPYLLLADA
*****
    
```

**PE52 nfxB Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

nfxB-PE52     MTLISHDERLIKALAVAIIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
nfxB-PAO1     MTLISHDERLIKALAVAIIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
*****

nfxB-PE52     VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPDFLDPHGEGARWQSYLE
nfxB-PAO1     VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPDFLDPHGEGARWQSYLE
*****

nfxB-PE52     ALDAFFLRGQQKGVFRIDITA AVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
nfxB-PAO1     ALDAFFLRGQQKGVFRIDITA AVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
*****

nfxB-PE52     ASNPARS
nfxB-PAO1     ASNPARS
*****
    
```

## Análisis de la secuencia aminoacídica de los reguladores de bombas de expulsión del aislado PE26.

### **PE26 *mexR* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE26mexR      MNYPVNPDLMPALMAVFQHVRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIIDEQRGLNLQDLGRQ
PAO1mexR      MNYPVNPDLMPALMAVFQHVRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIIDEQRGLNLQDLGRQ
*****

PE26mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERPNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDEL
PAO1mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERPNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDEL
*****

PE26mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
PAO1mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****
    
```

### **PE26 *mexZ* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE26mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
PAO1mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
*****

PE26mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYKLCERSDENEPLLRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
PAO1mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYKLCERSDENEPLLRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
*****

PE26mexZ      LDVELASIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLSSPYLLLLADA
PAO1mexZ      LDVELASIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLSSPYLLLLADA
*****
    
```

### **PE26 *nfxB* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE26nfxB      MTLISHDERLIKALAVAIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
PAO1nfxB      MTLISHDERLIKALAVAIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
*****

PE26nfxB      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPFDFDPHGEGARWQSYLE
PAO1nfxB      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPFDFDPHGEGARWQSYLE
*****

PE26nfxB      ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
PAO1nfxB      ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
*****
    
```

PE26nfxB ASNPARS  
 PA01nfxB ASNPARS  
 \*\*\*\*\*

**Análisis de la secuencia aminoacídica de los reguladores de bombas de expulsión del aislado PE30.**

**PE30 *mexR* Silvestre**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE30mexR      MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIIDEQRGLNLQDLGRQ
PA01mexR      MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIIDEQRGLNLQDLGRQ
*****

PE30mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
PA01mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
*****

PE30mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
PA01mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****
    
```

**PE30 *mexT* cambio del marco de lectura a partir del aminoácido 80**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE30mexT      -----APRRSEPADRVRDP
PA01mexT      MPVSDPMPRLRHLARPRPVSHARLDGEPRLQPLAPGNEERHEPKRPAPRRSEPADRVRDP
*****

PE30mexT      DARTQRDPRRRETVPRPAGHQRRVAVAPAHAVRRPAVRPYRTQHGAHRAS-----PGNL
PA01mexT      DARTQRDPRRRETVPRPAGQPAISAALSRL-RTLFDDPLFVRTGRSMEPTARAQEIFAHL
*****:  .:*  ::  *      *      .:  *      ..*

PE30mexT      RPPVAGAGFHLHRHE-----SRQVRV---SGDQHRGVPHRPFRRRRVRPVAAPAPPPAR
PA01mexT      SPALDSISTAMSRASEFDPATSTAVFRIGLSDDVEFGLLPPLLRLRA-----EAPG---
*  :  .  .  :  *  .      *  .*  *  *  .  *:  :  **  *  .      **

PE30mexT      GGAGDRPRRAPRQLSIDAEPAGL-GGDLGGRQLHRRTAGQRQAQDRAPQQAEDPPRRLRA
PA01mexT      --FVLVVRANYLLM----PNLLASGEIS-----VGVS-YTDEL PANAK----RKTV
***      *      *      *      .:  :  .      .      *      *      *  :  :  *      .

PE30mexT      RPADPRLLRATARAGVLRPRRQRLCRRGAGKIR-----
PA01mexT      RRSKP-KILRADSAPGQLT--LDDYCARPHALVSFAGDLSGFVDEELEKFGKRKVVLA
*  :  .*  :  :  ***  :  *  *      :  *  *      .  :

PE30mexT      P-----QAQGGPGGAAVQRPRHPPGRHRHHRHRARLRRPGAD
PA01mexT      PQFNGLGTLLAGTDIIATVPDYAAQALIAAGGLRAE---DPPFETRAFELS--MAW----
*      *      **      .  **      .:  .**  .  *      .  .      :

PE30mexT      RRRRPTRRGPTVRDPRLRTVDGLARRPGQRSGRTLAALADQHVHRRSGQSL
    
```



```
PE21mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERPNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
PA01mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERPNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
*****
```

```
PE21mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
PA01mexR      APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****
```

### PE21 *mexT* cambio del marco de lectura a partir del aminoácido 80

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE21mexT      -----APRRSEPADRVRS
PA01mexT      MPVSDPMPRLRHLARPRVSHARLDGEPRLQPLAPGNEERHEPKRPAPRRSEPADRVRS
*****

PE21mexT      DARTQRDPRRRETVPRPAGHQRRVA PAHAVRRPAVRPHRTQHGT-----RA--SPGNL
PA01mexT      DARTQRDPRRRETVPRPAGQPAISAALSRL-RTLFDDPLFVRTGRSMEPTARAQEIFAHL
*****:      :.* :: * * .: * ** ..*

PE21mexT      RPPVAGAGFHLHRHE-----SRQ--RVR--SGDQHRGVPHRPFRRRRV-----
PA01mexT      SPALDSISTAMSRASEFDPATSTAVFRIGLSDVEFGLLPPLLRLRAEAPGFVLVVRRA
* : . . : * . * * : * * . * : : * * .

PE21mexT      RPVAAPA-----PPPARGGAGDRPRRAPRQLSIDAEPAGLGGDLGGRQLH
PA01mexT      NYLLMPNLLASGEISVGVSYTDELPANAKRKTVRRSKPKILRADSAPGQLTL-----
. : * **.. * * : * * : * . *

PE21mexT      RRTAGQRQAQDRAPQQAEDPPRRLRARPADPRLLRAT-ARAGVLRRRPQRLRR-----
PA01mexT      -----DDYCARPHALVSFAGDLSGFVDEELEKFGKRKVVVL
* * : * : : * . : : : *

PE21mexT      -----RGAGKIR-----PQAQGGPGGAAVQRPRHPPGRHRHHRHRARLRRPG
PA01mexT      AVPQFNGLGTLTAGTDI IATVPDYAAQALIAAGGLRAE---DPPFETRAFELS--MAW--
. * * . : ** . ** . : . ** . * .. :

PE21mexT      ADRRRRPTRRGPTVRDPRLRTVDGLARRPGQRSGGTLAALADQHVHRRSGQSL
PA01mexT      -----RGAQNDPAERWLR---RISMF-----IGD-----PDSL
* * . ** * : . * . : . * : **
```

### PE21 *mexZ* Gly162Glu

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE21mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
PA01mexZ      MADLADAAGVSRGAVYGHYKNKIEVCLAMCDRAFGQIEVPDENARVPALDILLRAGMGFL
*****

PE21mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYKICERSDENEPLLRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
PA01mexZ      RQCCEPGSVQRVLEIILYKICERSDENEPLLRRELLEKQGQRFGLRQIRRAVERGELPAR
*****
```

```
PE21mexZ      LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLRSPPYLLLADA
PA01mexZ      LDVELASIIYLQSLWDGICGTLAWTERLRDDPWNRAERMFRAGLDSLRSPPYLLLADA
*****
```

### PE21 *nfxB* Silvestre

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE21nfxB      MTLISHDERLIKALAVAIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
PA01nfxB      MTLISHDERLIKALAVAIVDRPRATLKELAEAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET
*****

PE21nfxB      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPFDFDPHGEGARWQSYLE
PA01nfxB      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPFDFDPHGEGARWQSYLE
*****

PE21nfxB      ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
PA01nfxB      ALDAFFLRGQQKGVFRIDITAAVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG
*****

PE21nfxB      ASNPARS
PA01nfxB      ASNPARS
*****
```

## Anexo 7. Análisis de las secuencias de la porina oprD de los aislados en estudio del Hospital Regional ISSSTE de la Cd. de Puebla.

### Análisis de la secuencia de nucleotídica de la porina OprD del aislado PE20.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
PE20-2R -----
PE20-2F ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTC
PAOoprD ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTC

PE20-2R -----
PE20-2F GCCGTGGCCGACGCATTCGTTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGGTTTCATCGAAGACAGC
PAOoprD GCCGTGGCCGACGCATTCGTTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGGTTTCATCGAAGACAGC

PE20-2R -----
PE20-2F AGCCTGAACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGGAAGGTCGGGGT
PAOoprD AGCCTCGACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGG

PE20-2R -----
PE20-2F GATCGCGTCGATTGGACCCAGGGCTTCCTCACCACCTACGAATCCGGCTTCACTCAAGGC
PAOoprD GACCGCGTCGACTGGACCCAAGGCTTCCTCACCACCTATGAATCCGGCTTCAACCAAGGC

PE20-2R -----
PE20-2F ACCGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTGGGCCTGAAGCTCGACGGCACCTCC
PAOoprD ACTGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTGGGCCTGAAGCTCGACGGCACCTCC

PE20-2R -----
PE20-2F GACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAAGCCGCGCATGACTAC
PAOoprD GACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAAGCCGCGCATGACTAC

PE20-2R -----
PE20-2F AGCCGCGCCGGCGGCGCCGTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAG
PAOoprD AGCCGCGCCGGCGGCGCCGTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAG

PE20-2R -----
PE20-2F ATGCAACCGACCGCCCCGGTCTTCGC -----
PAOoprD ATGCAACCGACCGCCCCGGTCTTCGCCTGGCGGCAGCCGCTGTTCCCGCAGACCGCG

PE20-2R -----
PE20-2F -----
PAOoprD ACCGGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAATTGGAAGGGCTCGACCTCGAGGCAGGCCACTTC

PE20-2R -----
PE20-2F -----
PAOoprD ACCGAGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCGTGGCGAACTCTATGCCACCTACGCA
```

PE20-2R -----  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD GCGGAGACCGCCAAGAGCGCCGATTTTCATTGGGGGCCGCTACGCAATCACCGATAACCTC

PE20-2R -----CATCGCCAGTTCTACCTGAACACC  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD AGCGCCTCCCTGTACGGCGCCGAACCTCGAAGACATCTATCGCCAGTATTACCTGAACAGC

PE20-2R AACTACTCCATTCCGCTGGCCTCCGATCAATCGCTGGGCTTCGACTTCAACATTTACCGC  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD AACTACACCATCCCCTGGCATCCGACCAATCGCTGGGCTTCGATTTCAACATCTACCGC

PE20-2R ACCACCGACGAAGGCAAGTCCAAGGCTGGCGACATCAGCAACACCACCTGGTCCCTGGCG  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD ACAAACGATGAAGGCAAGGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCACCTGGTCCCTGGCG

PE20-2R GGCGCGTATACCCTGGACCCCCACACCTTCACCCTGGCCTACCAGCAGGTGCATGGCGAC  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD GCAGCCTACACTCTGGATGCGCACACTTTCACCTTGGCCTACCAGAAGGTCCATGGCGAT

PE20-2R GAGCCGTTTCGACTACATCGGCTTCGGCGGCAACGGTTCGGCGCCGGCGGCGACTCGATC  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD CAGCCGTTTGATTATATATCGGCTTCGGCCGCAACGGCTCTGGCGCAGGTGGCGACTCGATT

PE20-2R TTCCCTCGCCAACTCCGTCCAGTACTCCGACTTCAACGGTCTGGCGAGAAATCCTGGCAG  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD TTCCCTCGCCAACTCTGTCCAGTACTCCGACTTCAACGGCCCTGGCGAGAAATCCTGGCAG

PE20-2R GCCCGCTACGACCTGAACCTGGCCTCCTACGGCGTTTCCCTGGCCTGACCTTCATGCTGCGT  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD GCTCGCTACGACCTGAACCTAGCCTCCTATGGCGTTCCCGGCCTGACTTTCATGGTCCGC

PE20-2R TACATCAATGGTAAGGACATCGACGGTACCAAGGTCGATTCCAGCTCC-----TCCTAT  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD TATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCCGCTATAAG

PE20-2R GCAGGCCTGTACGGCGAGGATGGCAAGCACACCACGAAACCAACCTCGAAGCCAAGTACGTG  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD AACTACGGCTACGGCGAGGATGGCAAGCACACCACGAAACCAACCTCGAAGCCAAGTACGTG

PE20-2R GTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTCGTTCCGCATCCGCCAGGCCTGGCACCGTGCC  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD GTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTCGTTCCGCATCCGCCAGGCCTGGCACCGTGCC

PE20-2R AACGCCGACCAGGGCGAAGGGCGACCAGAACGAGTTCCGCCTGATCGTCGACTATCCGCTG  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD AACGCCGACCAGGGCGAAGGGCGACCAGAACGAGTTCCGCCTGATCGTCGACTATCCGCTG

PE20-2R TCGATCCTGTAA  
 PE20-2F -----  
 PAOoprD TCGATCCTGTAA

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

PE20-F TCGCGTCGATTGGACCCAGGGCTTCTCACCACCTACGAATCCGGCTTCACTCAAGGCAC  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTGGGCCTGAAGCTCGACGGCACCTCCGA  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAAGCCGCGGATGACTACAG  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CCGCGCCGGCGGGCGCCGTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAGAT  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F GCAACCGACCGCCCCGGTCTTCGCCGCTGGCGGCAGCCGCCTGTTCCCGCAGACCGCGAC  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CGGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAATTCGAAGGGCTCGACCTCGAGGCAGGCCACTTCAC  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CGAGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCGCGGTGAGCTCTACGCCACCTACGCCGG  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CCAGACAGCCAAGAGCGCCGACTTCGCTGGCGGCCGCTACGCGATCACCAGAACCTCAG  
 PE20-R -----  
 IS1394 -----

PE20-F CGCCTCCCTCTATGGCGCAGAGCTGAAAGACATGGCGGCCGCAAAAAGTGAAGTGCAACAC  
 PE20-R -----  
 IS1394 ----- GGCGGCCGCAAAAAGTGAAGTGCAACAC

PE20-F CCGACCATTTTCGGTAAGGTGTTGCCCATGTCTATCACGAACTCAGCGCCACAGAGCGC  
PE20-R -----  
IS1394 CCGACCATTTTCGGTAAGGTGTTGCCCATGTCTATCACGAACTCAGCGCCACAGAGCGC

PE20-F GTCACGATCCAGATCGGCCTGTGCAATGGCTTCAGCCAGCGCAGGCTTGCCCGGCTGATG  
PE20-R -----  
IS1394 GTCACGATCCAGATCGGCCTGTGCAATGGCTTCAGCCAGCGCAGGCTTGCCCGGCTGATG

PE20-F AACCGCAGCCCCTCGACGGTCAGCCGTGAGATCCGGCGCAACCGGAATGCTCAAGGCGAG  
PE20-R -----  
IS1394 AACCGCAGCCCCTCGACGGTCAGCCGTGAGATCCGGCGCAACCGGAATGCTCAAGGCGAG

PE20-F TACGTTGCAGACGATGCCAGCGCTTGATGCATACACGCCGCGTGGTCTGTGACCCGCA  
PE20-R -----  
IS1394 TACGTTGCAGACGATGCCAGCGCTTGATGCATACACGCCGCGTGGTCTGTGACCCGCA

PE20-F AAACGGCTGGTGCCCGGCAACGAGTTGTTTCGAGCTGGTCGCCACCTGCTGCGACAGCGC  
PE20-R -----  
IS1394 AAACGGCTGGTGCCCGGCAACGAGTTGTTTCGAGCTGGTCGCCACCTGCTGCGACAGCGC

PE20-F TTTTCTCCCGAGCAGATTGCCGGCAAGCTGCGAACCATGAAATCCCCAAGCTTCG-----  
PE20-R -----  
IS1394 TTTTCTCCCGAGCAGATTGCCGGCAAGCTGCGAACCATGAAATCCCCAAGCTTCGAAGAC

PE20-F -----  
PE20-R -----  
IS1394 GCCTACGTCTGCCGCGAGACAATCTACAACGCGATCTATGCCCTGCCGGTCGGCGAGCTG

PE20-F -----  
PE20-R -----  
IS1394 CGCAAGGAGCTGATCATCTGTCTGCGGCAGGGCAAGACTACCCGCCGGCCGCGCTCCGGC

PE20-F -----  
PE20-R -----  
IS1394 GGGGTGGATCGACGTGGCCAGATCCCCGACATGGTCAGCATCCACGTACGCCACCCGGAG

PE20-F -----  
PE20-R -----  
IS1394 ATCGAAGACCGCCTGATGCCCGGTCACTGGGAGGGCGATCTGATCAAGGGCAAGGCCAAC

PE20-F -----  
PE20-R -----  
IS1394 GCCTCGGCGGTAGCCACCCTGGTCGAGCGCACCCAGCGGCTACCTGATCCTGGCGAAGATG

```

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 AACGATGCGACGGCGACCTCGGCGGTGGAGGGCTTCAGCGCGGCGCTGAACCGCATGCCG

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 CTGGCTGTACGCAAGAGCATGACCTACGACCAGGGGCGAGAGATGGCGCGGCACGCGGAA

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 ATCACCCAGAAGACCGGTGTGGCGATCTACTTCTGCGACCCACACAGCCCCTGGCAGCGC

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 GGCAGCAACGAGAACATCAACGGCCTGATCCGCCAGTACCTGCCCAAGGGCACGGACTTG
CAGTACCTGCCCAAGGGCACGGACTTG

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 TCGGTGTACAGCCAGGAGCAGTTGGATGCCATTGCCTACGAACTGAACATCCGACCGCGC
TCGGTGTACAGCCAGGAGCAGTTGGATGCCATTGCCTACGAACTGAACATCCGACCGCGC

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 AAGCGCTTCAATTGGAAATGCCCGATTGAGGTCATGACAGAGGTAGTGGCGTTGCAGCAT
AAGCGCTTCAATTGGAAATGCCCGATTGAGGTCATGACAGAAGTAGTGGCGTTGCAGCAT

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 GATGCACCTGCTTCAATCCAGTAACCGTGTGGACTCAGCTTCTGCAACCGCCCATCTAT
GATGCACCTGCTTCAATCCAGTAACCGTGTGGACTCAGCTTCTGCAACCGCC-----

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 CGCCAGTACTACCTGAACACCAACTACACCATCCCGCTGGCCTCCGATCAATCGCTGGGC

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 TTAGACTTCAACATTTTCTCGCCACCGACGAAGGCAAGTCCAAGGCTGGCGACATCAGC

PE20-F -----
PE20-R -----
IS1394 AACACCACC

```

OprD; IS1394

## Análisis de la secuencia de aminoacídica de la porina OprD del aislado PE20.

### PE20 oprD- amplicón 2F-F

**Met** KV **Met** KWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRGDRVDWTQGFLLTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSKDTGTGNL **Met** NDGKPRDDYSRAGGAVKVRISK**Met** LKWGE **Met** QPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHFTEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAE **Met** AAKTECNTRPFR **Stop** GVAPCPITNSAPQASASRSR**Met** ASASAGLPG **Stop Stop** TAAPRRSAVRS **Met** LKASTLQT **Met** PSACIHAAWSVDPQNGWCPATSCSSWSPTCCDSAFLPSRLPASCEP **Stop** NPQAS

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE20oprD      MKVMMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG
PA01oprD      MKVMMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
*****
PE20oprD      DRVDWTQGFLLTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSKDTGTGNL PVMNDGKPRDDY
PA01oprD      DRVDWTQGFLLTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSKDTGTGNL PVMNDGKPRDDY
*****
PE20oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
PA01oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
*****
PE20oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAE LKDMAAAKTECN
PA01oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFIGGRYAITDNLSASLYGAE LKDRQYYLNS
*****
PE20oprD      TRPFR-GVAPCPITNSAPQSA----SRSR-----SACAMASASAGLPG--TA-----
PA01oprD      NYT-----IPLASDQSLGDFDNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLA
.      *      *::..      *::      .*      ::::      .*      *
PE20oprD      -----AP-----RRSAVRS GATGMLKASTLQTMPSA-CIHAAWSVDPQNGWCPATSC
PA01oprD      YQKVHGDQPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYS-----DFNGPGEKSWQARYDL
      *      *..      :*      .::      *:::*      *      :.      ::*      .
PE20oprD      SWSPTCCDSAFLPSRLPASCEP-NPQAS-----
PA01oprD      NLASYGVPGLTFMVRYING-KDIDGTKMSDNNVGYKNGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSG
.      *      :*      :.      :      :      *
PE20oprD      -----
PA01oprD      PAKDLSFRIRQAWHRANADQGEDQNEFRLIVDYPLSIL
    
```

### LOOPS

**L1; L2; L3; L4; L5; L6; L7; L8**

## Análisis de la secuencia aminoacídica de la porina OprD del aislado PE06.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE06oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG
PA01oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
*****:*****.*

PE06oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
PA01oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
*****

PE06oprD      SRAGGAVKVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
PA01oprD      SRAGGAVKVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
*****

PE06oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNL SASLYGAELKDIYRQYYLNT
PA01oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADF IGGRYAITDNL SASLYGAEL EDIYRQYYLNS
*****:***** *****:*****:

PE06oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTTDEGKSKAGDISNTTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQQVHGD
PA01oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
*****.****:*****.******:****

PE06oprD      EPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMLR
PA01oprD      QPFDYIGFRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR
:***** *****:

PE06oprD      YINGKIDIGTKVDSSES--YAGLYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDL SFRIRQAWHRA
PA01oprD      YINGKIDIGTKMSDNNVGYKNGYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDL SFRIRQAWHRA
*****:..... *****

PE06oprD      NADQG-GDQNE-----
PA01oprD      NADQGEGDQNEFRLIVDYPLSIL
***** *****
    
```

### LOOPS

L1; L2; L3; L4; L5; L6; L7; L8

## Análisis de la secuencia aminoacídica de la porina OprD del aislado PE52.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE52oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG
PA01oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
*****:*****.*

PE52oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
PA01oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
*****

PE52oprD      SRAGGAVKVRISKTMKKGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
PA01oprD      SRAGGAVKVRISKTMKKGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
*****

PE52oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLASLYGAELKDIYRQYYLNT
PA01oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFIAGGRYAITDNLASLYGAELEDIYRQYYLNS
*****:*****:*****:*****:

PE52oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTTDEGKSKAGDISNTTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQQVHGD
PA01oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
*****.*:*****.*:*****.*:*****.*

PE52oprD      EPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMLR
PA01oprD      QPFDYIGFRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR
:*****:*****:*****:*****:

PE52oprD      YINGKIDIGTKVDSSES--YAGLYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLFRIRQAWHRA
PA01oprD      YINGKIDIGTKMSDNNVGYKNGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLFRIRQAWHRA
*****:.....*****

PE52oprD      NADQG-GDQNEFRLIVDYPLSIL
PA01oprD      NADQGEQDQNEFRLIVDYPLSIL
*****
    
```

### LOOPS

L1; L2; L3; L4; L5; L6; L7; L8

## Análisis de la secuencia aminoacídica de la porina OprD del aislado PE26.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE26oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG
PA01oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
*****:*****.*

PE26oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
PA01oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
*****

PE26oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
PA01oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
*****

PE26oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLASLYGAELKDIYRQYYLNT
PA01oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFAGGRYAITDNLASLYGAELEDIYRQYYLNS
*****:*****:*****:*****:

PE26oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTDEGKSKAGDISNTT-----
PA01oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
*****.*.*.*:*****

PE26oprD      -----
PA01oprD      QPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNPGPEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR

PE26oprD      -----
PA01oprD      YINGKIDIDGTMKSDNNVGYKNYGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLFRIRQAWHRA

PE26oprD      -----
PA01oprD      NADQEGGDQNEFRLIVDYPLSIL
    
```

### LOOPS

L1; L2; L3; L4; L5; L6; L7; L8

## Análisis de la secuencia aminoacídica de la porina OprD del aislado PE30.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE30oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG
PA01oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
*****:*****.*

PE30oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
PA01oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
*****

PE30oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
PA01oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLOSSEFEGLDLEAGHF
*****

PE30oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLASLYGAELKDIYRQYYLNT
PA01oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFAGGRYAITDNLASLYGAELEDIYRQYYLNS
*****:*****:*****:*****:

PE30oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTDEGKSKAGDISNTT-----
PA01oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
*****.*.*.*:*****

PE30oprD      -----
PA01oprD      QPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNPGPEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR

PE30oprD      -----
PA01oprD      YINGKIDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLRFIRQAWHRA

PE30oprD      -----
PA01oprD      NADQEGGDQNEFRLIVDYPLSIL
    
```

### LOOPS

L1; L2; L3; L4; L5; L6; L7; L8

## Análisis de la secuencia aminoacídica de la porina OprD del aislado PE21.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

PE21oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEGRG
PA01oprD      MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
*****:*****.*

PE21oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
PA01oprD      DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
*****

PE21oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
PA01oprD      SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
*****

PE21oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAELKDIYRQYYLNT
PA01oprD      TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAELDIYRQYYLNS
*****:*****:*****:*****:

PE21oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTDEGKSKAGDISNTTWSLGAAYTLDAHTFTLAYQQVHGD
PA01oprD      NYTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
*****:*****:*****:*****:

PE21oprD      EPFDYIGFGNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNPGPEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMLR
PA01oprD      QPFDYIGFGNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNPGPEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR
:*****:*****:*****:

PE21oprD      YINGKIDIGTKVDSSS--YAGLYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDL SFRIRQA-HRA
PA01oprD      YINGKIDIGTKMSDNNVGYKNGYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDL SFRIRQAWHRA
*****:.....*****

PE21oprD      NADQEGEQNEFRLIVDYPLSIL
PA01oprD      NADQEGEQNEFRLIVDYPLSIL
*****
    
```

### LOOPS

L1; L2; L3; L4; L5; L6; L7; L8

## Anexo 8. Secuencia completa de los integrones de clase 1 del aislado PE52.

CTACCTCTACTAGTGAGGGGCGGCAGCGCATCAAGCGGTGAGCGCACTCCGGCACCGCCAACCTTCAGCACATGCGT  
GTAAATCATCGTCGTAGAGACGTCGGAATGGCCGAGCAGATCCTGCACGGTTCGAATGTCGTAACCGCTGCGGAGCAA  
GGCCGTCGCGAACGAGTGGCGGAGGGTGTGCGGTGTGGCGGGCTTCGTGATGCCTGCTTGTCTACGGCACGTTTGA  
AGGCGCGCTGAAAGGTCTGGTCATACATGTGATGGCGACGCACGACACCGCTCCGTGGATCGGTGCAATGCGTGTGCT  
GCGCAAAAACCCAGAACACCGCCAGGAATGCCCGGCGCGGATACTCCGCTCAAGGGCGTCGGGAAGCGCAACG  
CCGCTGCGGCCCTCGGCCTGGTCCTTCAGCCACCATGCCCGTGCACGCGACAGCTGCTCGCGCAGGCTGGGTGCCAAG  
CTCTCGGGTAACATCAAGGCCGATCCTTGAGCCCTTGCCCTCCCGCACGATGATCGTCCGTGATCGAAATCCAGAT  
CCTTGACCCGAGTTGCAAACCTCACTGATCCGCATGCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCC  
TTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTACAGCACCGGCAAGCGCCGACGGCCGAGGTCTTCC  
GATCTCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCTGACGATG  
CGTGGAGACCGAAACCTTGCCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGG  
GTGACGCACACCGTGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACA TAAGCCTGTTGCGTTCGTAACCTGTAATGCAA  
GTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTAT  
GGCTGTATGACTGTTTTTTG TACAGTCTATGCCTCGGCATCCAAG CAGCAA GCGCGTTACGCCGTGGGTGATGT  
TTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAGTTAGAAAAGGGTAAGTATGA  
AAAAATTATTTGTTTTATGTGATTTCTTCTTTGCAACATTGCTGCTGCAGATGATTCTTGCCTGATTTAAAAATTGAGA  
AGCTTAAAAAGGCGTTTATGTTCACTTCTGTTGAAGAAGTTAAAGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGGTTTAGT  
GGTCTGTAAAGAATGATGCTTATCTGATAGATACTCCAATTACCCTAAAGATACTGAAAAATTAGTTAATTGGTTA  
TTGAGCACGGCTATAGAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGCGACAGTACGGCTGGAATAGAGTGGCTTA  
ATTCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAATTAACAAATGAACCTTCTAAAAAAGACAATAAGGTGCAAGCTACAAAT  
TCTTTAGTGGAGTTAGTTATTCATTATCAAAAACAAAATTGAAGTTTTCTATCCAGGTCCAGGACACACTCAAGATAA  
CGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTGTAAACCGGACGGTCTTGAAAATTTAGGG  
GATGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCTAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAACTGTTGTTTCA  
**A/G** GTCATAGTGAAATTGAAACGCATCACTCTTGCAGCGCACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGTTAAATGAAAGT  
AAAAAACCGTTACAGCCAAGTAGCTAAATTTCTAACAAGTCGTTGCAGCATCGTTCCGCTTTGCTCCACTGGACGGGTT  
TTAAGTCGCATTTTTGTGGCTCGCTGGCGCTCACTTATCACAAAATACAACCTTAAAACCCGCGCTGAACTCGGCGTT  
AAACATC ATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCT  
CGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTT  
GCTGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGTGAAACAACCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGAAACGTCGGCTTC  
CCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCA  
GCTAAGCGCAACTGCAGTTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATTGAC  
ATTGATCTGGCTATCTTGTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTTT  
GATCCGTTCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGAACTCGCCGCCGACTGGGCT  
GGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGCCGATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAGAATCGCGCCGAAGGAT  
GTCGCTGCCACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTT  
GGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGT TCACTACGTGAAAGGCGAGATCAC  
CAAGGTAGTCGGCAATAA TGTCTAACAATTCGTTCAAGCCGACGCGCTTCGCGGCGCGGCTTACCTTGGCCGTTGG  
GCATTAAGGAAAAGTTA ATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTCTTGTCCACTTTCGCGCATGCGC  
AAGAAGGCACGCTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAG  
ACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTGATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATT  
CAAGATACCTCATACTTTTTGCACTTGTGACAGGCGCTGTTGATGAGTTCAGATTTTTGATGGGACGGCGTTA  
ACAGGGGCTTTGACAGCCACAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATCTACTGTTGGGTGTATGAGC  
TATTTGCAAAGGAAAATTGGTGTGACAAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCCTTCGA  
CAAGTAATGGCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTCATTCTCAGGAAGCTCT

ATCGTAACGAGCTGCCCTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTGTGGAAGCCGGTCGCAACT  
GGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGTTGGTGGGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTGGCTC  
CGTATTCTTCGCACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGCAAT  
CCTTCGCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCGCGATAA AACCGCGCAGCGCCGGTT  
ACTTCAACGTTAGATGACTAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAATATCAGGTCAAGTCTGCTTTTATTATTTTAAAGC  
GTGCATAATAAGCCCTACACAAATTGGGAGATATATCATGAAAGGCTGGCTTTTCTTGTATCGCAATAGTTGGCGAA  
GTAATCGCAACATCCGCATTAATACTAGCGAGGGCTTACTAAGCTTCCCCTTCGCCGTTGTCATAATCGGTTATGG  
CATCGCATTTTATTTTCTTCTCTGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGT  
CGTCATAATTACAGCCATTGCTGTTGCTTCATGGGCAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATA  
ATTGCTGCCTTTTGTCTGCCCGATCCCATCGTGAAGTCGCTGCGGAGGCCGACGCCATGGTGA CGGTGTTCGGCAT  
TCTGAATCTCACCGAGGACTCCTTCTTCGATGAGAGCCGGCGGCTAGACCCCGCCGGCGCTGTCACCGCGGCGATCGA  
AATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTCGGACCGGCCAGCCATCCGGACGCGAGGCCTGTATCGCCGG  
CCGATGAGATCAGACGTATTGCGCCGCTTTAGACGCCCTGTCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTCCA  
ACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGGCTGGGCTACCTGAACGATATCCAAGGATTTCTGACCCTGCGCT  
CTATCCCATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTTATGACTCAGCGCAGCGGGATGGCATCGCCACCCGCAC  
CGGTCACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAGATTGTGCGTTCTTCGAGGCGGGTTTCCGCCTTGCACGGAG  
CGGGGTCGCTGCCGACCGGCTCATCCTCGATCCGGGGATGGGATTTTCTTGAGCCCCGCACCGGAAACATCGCTGCA  
CGTGCTGTGAACCTTAAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGGCTCCGCTATTGGTCTCGGTGTCGCGGAAATCCTTCTTG  
GGCGCCACCGTTGCCTTCTGTAAGGATCTGGGTCCAGCGAGCCTTGCGGCGGAACTTACGCGATCGGCAATGGC  
GCTGACTACGTCCGACCCACGCGCTGGAGATCTGC 5AAGCGCAATCACCTTCTCGGAAACCTCGCGAAATTCGCA  
GTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTTAGATCATGCCTAG

**Pares de bases secuenciadas** (Solo los nucleótidos escritos con color negro se encuentran secuenciados)

**5'-CS**

**Int1:** 773 pb

**TGGACA** /regulatory\_class="minus\_35\_signal"  
 /note=" PcH1 promoter "

**TAAACT** /regulatory\_class="minus\_10\_signal"  
 /note=" PcH1 promoter "

**TGTGTA** /regulatory\_class="minus\_35\_signal"  
 /note="inactive P2 promoter"

**TACAGT** /regulatory\_class="minus\_10\_signal"  
 /note=" inactive P2 promoter"

**AGTCTA** COMPLEMENT  
 /regulatory\_class="minus\_10\_signal"  
 /note="Pint promoter"

**CAGCAA** COMPLEMENT  
 /regulatory\_class="minus\_35\_signal"  
 /note="Pint promoter"

**att1:** 56pb

**imp-18:** 741pb; **A/G: A (imp-18) In1215 ; G (imp-18 like) In1218**

**aadA1:** 792pb

**oxa2:** 828pb

**qacE-delta-1:** 341pb

**sul1:** 760pb

## Anexo 9. Secuencia parcial del integrón de clase 1 del aislado PE06 (RV ~2300pb).

```
ACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGAAAAGGGTAAGTATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCCTTTGCAACATTGCTGCTGCAGATGATTCTTTCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAAAAGGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTTGAAGAAGTTAAAGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGTTTAGTGGTTCTTGTAAGAATGATGCTTATCTGATAGATACTC
```

### Pares de bases secuenciadas

5'-CS

*intl1*: 182pb

*attI*: 56pb

*imp-18*: 218pb

## Anexo 10. Secuencia parcial de la probable estructura de los integrones de clase 1 del aislado PE21.

### Integrón RV ~1300pb.

```
GATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGACATCATGAGTA  
ACGCAGTACCCGCCGAGATTTGGTACAGCTATCACTGGCTCTCAACGCCATCGAGCGTCATCTGGAATCAA  
CGTTGCTGGCCGTGCATTTGTACGGCTCTGCACTGGACGGTGGCCTGAAGCCATACAGTGATATTGATTTGC  
TGGTTACTGTGGCTGCACGGCTCGATGAGACTGTCCGACAAGCCCTGGTCGTAGATCTCTTGAAATTTCTG  
CCTCCCCTGGCCAAAGTGAAGCTCTCCGCGCCTTGGAAAGTTACCATCGTCGTGCATGGTGATGTTGTCCCTT  
GGCGTTATCCGGCCAGACGGGAACTGCAATTCGGGGAGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTT  
CGAGCCCGCCACAACCGATGTTGATCTGGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTTGCATTGGC  
AGGTTCCGGCCGCA
```

### Pares de bases secuenciadas

5'-CS

*int1*: 55pb

*aadA6*: 450pb

## Integrón RV ~3000pb.

TTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGTGACGCACACCGTGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACA  
 TAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAGTGAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACC  
 GAACGCAGCGGTGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTATGACTGTTTTTTGTACAGTCTATG  
 CCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGGGTGCATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGT  
 TACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGCACCAATGGATAGTTTCGCCGCTCGTCAGGCCTGTT  
 GAAACTACCGATTCGCCAGTTGGCTAAGCATGCGCTGTGAGCTGTGGCCAGATGGCACATGTCAAGAGC  
 ACCAGTCAGAGATCGCAGAATTTCTGTCCGAAAAGTCGCCCGGCTGCTGCTGTCTCATTGCTGTAGCAC  
 CCGACGGAGAAGCACTAGGGTTTGCCGAGCTTCGATCCGCCGTATGCGGAGGAGTGCTACTCCGGCAAC  
 GTTTCGTTCTTGAGGGTTGGTACGTTGTCCAAGTGCAGGGCGTCAGGGCGTAGGTGTAGCTCTGGTAA  
 AAGCCGCCGAGCATTGGGCTCGTGGTCGCGGATGCACCGAATTCGCTCCGACACTCACTTACCAACAGC  
 GCAAGCACCTCGGCGCACCTGGCGGCTGGATTCACGGAGGTTGCTCAAGTACGCTGCTTCGGAAACCGTT  
 GTGA

Unión *aacA7-imp-15*

ATGAACAAGTTATCTGTATTCTTTATGTTTATGTTTGTAGCATTACTGCCGCAGGAGAGTCTTTGCCAGATT  
 TAAAAATTGAGAAGCTTGACGAAGGTGTTTATGTTTCATACTCGTTTGAAGAAGTTAACGGTTGGGGTGT  
 GTTCCTAAACACGGCTTGGTGGTCTTGTAAATACTGAGGCCTATCTGATTGACACTCCATTTACGGCAAAA  
 GATACTGAAAAGTTAGTCACTTGGTTTGTGGAGCGCGCTATAAAATAAAAGGCAGTATTTCTCTCATTTT  
 CATAGCGACAGCACGGGCGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACGTATGCATCTGAATTAACA  
 AATGAACTTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTACAAGCTAAAAATTCATTTAGCGGAGGTAGCTATTGGCTAGT  
 TAATAATAAGATTGAAGTTTTTATCCTGGTCCAGGGCACACTCCAGATAACGTAGTGGTTTGGCTACCTGA  
 AAATAGAGTTTTGTTCCGGTGGTTGTTTGTAAACCGTACGGTCTTGGAATTTGGGTGACGCAAATTTAGA  
 AGCTTGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAGTTGGTTGTTCAAGTCATAG  
 TGAAACTGGGAACGCATCACTCTTGAACCTACTTGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTAAAAGAAAGTAAAA  
 AACCATCACTGCCAAGTAACTAA

¿? ~1500-1800pb

ATGTTTATTCAAACGGCATTGAGTTTCTCAAACGCTGTGCAGCGCTGGGTTTGCCGTTTCTCTGGGCTTCGCC  
 TGGTGGCGTTACGCTGGTTTGTGGTCTTTTGGCCTCTGGCCCTTGTGTAGCAAGCGCGAGCAGCTATTTT  
 TTCGTAGTGCTGTGCCGCTCGGTGGCACCGTGCCTTTTCGCAGTTAGCGCCCGTCGCCAAGTTACGGTTAT  
 CCGTTTTGGCTTCTGGCTCTAACATTTCCGGTCAAGCCGACCCGCATTCTGCGGTGCGCTTAACTCGCCCGTTA  
 GATGCACTAAGCACA

**Pares de bases secuenciadas** (Solo los nucleótidos escritos con color negro se encuentran secuenciados)

5'-CS

*intl1*: 180pb

*att1*: 56pb

*aacA7*: 146pb

*imp-15*: 418pb

*orfD*: 70pb

Region conservada 3': 26pb