



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTENCIA Y DETECCIÓN DE
GENES QUE CODIFICAN PARA METALO- β -LACTAMASAS:
VIM, IMP Y GIM DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER
EL TÍTULO DE: LICENCIATURA EN
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

ANGÉLICA MORALES LUNA

DIRECTORA DE TESIS:

D. C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

ASESORA DE TESIS:

M.C. ALMA LÓPEZ GARCÍA

PUEBLA, PUE. OCTUBRE 2015

La soledad es necesaria para gozar de nuestro propio corazón y para amar, pero para triunfar en la vida es preciso dar algo de nuestra vida al mayor número de personas.

Stendhal (Beyle, Henri)

A Dios

A mis padres

A mis hermanos

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme la oportunidad de realizar este estudio.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Intrahospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, bajo la dirección de la D. C. Patricia Lozano Zarain.

Este proyecto fue apoyado con recursos del Programa Institucional del Fomento al Desarrollo de la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos, otorgado por la VIEP con el proyecto número LOZP-NAT15-G, convocatoria 2015.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) bajo la asignación de la D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia con CB-2012-01-178942 Fondo SEP-CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, por sus consejos, dirección, apoyo y la confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto.

A la **M.C. Alma López García**, por su ayuda como asesora de tesis, por sus enseñanzas, consejos y su apoyo incondicional en la realización de éste trabajo científico.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por permitirme trabajar y aprender con ustedes. A **Clau**, quien estuvo conmigo durante todas las etapas de este proyecto, por haber compartido conmigo sus conocimientos, infinitas gracias por brindarme tu amistad. **Emilio**, compañero inseparable, gracias por escucharme en buenos y malos momentos. A **Caro, Enrique, Omar, Gerardo, Isa, Aime, Elena y Taty**, por ayudarme y por los consejos que recibí de cada uno de ustedes, les deseo éxito en sus próximos proyectos.

Agradezco a mi jurado; la **M.C. Laura Martínez Pérez**, el **M.C. Alejandro C. Ruíz Tagle** y la **M.C. Patricia G. Suárez Albores**, por dedicarme tiempo para la revisión de esta tesis y sus observaciones sobre la misma.

A la **BUAP**, por ser mi segunda casa y darme todas las facilidades para crecer profesionalmente.

A mis amigos, por confiar y creer en mí, por todos los momentos y experiencias que vivimos juntos. Por todas las veces que recibí su apoyo.

A **Isha, Pame, Lau, Lupita y Lore**, mis compañeras de trabajo, por su comprensión, por su apoyo y sobre todo por su amistad. Las quiero mucho.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Infecciones nosocomiales.....	2
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.3 Multirresistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.4 β -Lactamasas.....	6
2.5 β -Lactamasas con actividad carbapememasa.....	6
2.6 Metallo- β -lactamasas.....	8
3. ANTECEDENTES	10
3.1 Antecedentes generales.....	10
3.2 Antecedentes específicos.....	11
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
5. JUSTIFICACIÓN	14
6. OBJETIVOS	15
6.1 Objetivo general.....	15
6.2 Objetivos específicos.....	15
7. METODOLOGÍA	16
7.1 Tipo de estudio.....	16
7.2 Universo de estudio.....	16
7.3 Criterios de exclusión.....	16
7.4 Criterios de inclusión.....	16
8. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	17
9. MATERIAL Y MÉTODOS	18
9.1 Cepas de estudio y ratificación.....	18
9.2 Fenotipo de resistencia por el método de disco (Kirby Baüer).....	18
9.3 Extracción de DNA.....	20
9.3.1 Medición de la concentración de DNA.....	20
9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	21

9.5 Electroforesis.....	23
9.6 Secuenciación de los productos de PCR.....	24
9.6.1 Análisis de las secuencias.....	24
10. RESULTADOS.....	25
10.1 Datos de las cepas.....	25
10.2 Susceptibilidad antimicrobiana.....	27
10.3 Amplificación de genes de resistencia.....	29
10.4 Secuenciación y análisis de resultados.....	31
11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
12. CONCLUSIONES.....	39
13. PERSPECTIVAS.....	40
14. BIBLIOGRAFÍA.....	41
15. ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Puntos de corte del CLSI, 2015 para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2	Componentes de la PCR	21
3	Cepas control positivo para la realización de PCR	22
4	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes de resistencia	22
5	Condiciones de trabajo de la PCR empleadas para amplificar los diferentes genes de resistencia	23
6	Patrones de susceptibilidad a diversos antibióticos en cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de febrero a junio de 2014 en el HNP	27
7	Fenotipo y genotipo parcial de resistencia de las cepas de resistentes a carbapenémicos aisladas en el HNP	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Origen de las 32 cepas aisladas de febrero a junio de 2014 en el HNP de la ciudad de Puebla	26
2	Áreas hospitalarias de donde provienen las 32 cepas aisladas de febrero a junio de 2014 en el HNP de la ciudad de Puebla	26
3	Porcentajes de resistencia para cada antibiótico utilizado, de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> provenientes del HNP	28
4	Porcentajes de resistencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> por grupos de antibióticos	28
5	Foto del gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos GES-F y GES-R Análisis de la secuencias nucleotídicas del gen <i>ges-2</i> , y el encontrado en la cepa NPa11	29
6	Alineamiento de la secuencias nucleotídicas del gen <i>ges-2</i> , y el encontrado en la cepa NPa11	32
7	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína GES-2 y de la cepa NPa11	33

ABREVIATURAS

AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BLEEs	β -Lactamasas de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CL	Colistin
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
HNP	Hospital para el Niño Poblano
IPM	Imipenem
M β L	Metalo- β -lactamasas
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
NET	Netilmicina
NOR	Norfloxacin
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIP	Piperacilina
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
TE	Tetraciclina
TIC	Ticarcilina
TSA	Agar Soya Tripticasa
TZP	Piperacilina/Tazobactam
UFC	Unidad Formadora de Colonia
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud de extrema importancia en el mundo, que afecta la calidad y la eficiencia de los servicios médicos. Entre las infecciones más relevantes de este tipo se encuentran aquellas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ya que cuenta con diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos, a través de adquisición y diseminación de genes de resistencia mediante plásmidos e integrones, como la resistencia a carbapenémicos por metalo- β -lactamasas (M β L). El objetivo de este trabajo fue realizar el perfil fenotípico de resistencia y buscar genes que codifican para las M β L: VIM, IMP y GIM. Para lo cual se obtuvieron 32 cepas de *P. aeruginosa* procedentes del Hospital para el Niño Poblano (HNP), aisladas de pacientes con infección nosocomial, durante el periodo febrero-junio de 2014. Se determinó su susceptibilidad a antibióticos obteniendo el 27% de resistencia para β -lactámicos (40% para imipenem y meropenem), 39% para aminoglucósidos, 25% para fluoroquinolonas y 28% para colistina, antimicrobiano de último recurso terapéutico. En este trabajo no se encontraron los genes *vim*, *imp* y *gim* que codifican para las metalo- β -lactamasas VIM, IMP y GIM-1. Sin embargo, 31% de las cepas resistentes a carbapenémicos portó el gen de resistencia *ges*. El amplificado de 755pb obtenido de la cepa NPa11 presentó 96% de similitud con el gen que codifica para la β -lactamasa con actividad carbapemenasa (contra imipenem) tipo GES-2. Sin embargo, es necesario realizar nuevamente la secuenciación porque es posible que corresponda a otra variante, lo cual es necesario determinar, debido a que el hallazgo de esta probable nueva variante *ges*, evidenciaría uno de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos que tendría un alto impacto epidemiológico. Por lo tanto, es muy importante seguir realizando este tipo de estudios, a fin de lograr la aplicación de un programa hospitalario adecuado para contener y reducir la difusión de resistencia a antibióticos, lo cual actualmente limita las opciones terapéuticas en el ámbito hospitalario.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, β -lactamasas, metalo- β -lactamasas.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales son contraídas durante una estadía en el hospital que no se habían manifestado ni estaban en periodo de incubación en el momento del internado del paciente; se presentan en un 5 a 10 % de pacientes que ingresan al hospital y su desarrollo está en función de la edad, siendo más frecuentes en los extremos de la vida.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo aerobio estricto, un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno, puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crece a temperaturas de hasta 42°C, además tiene la capacidad de adherirse y sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias, favoreciendo el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos.

Las infecciones por *P. aeruginosa* son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a múltiples grupos de antibióticos. *P. aeruginosa* posee diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como la expresión de β -lactamasas de amplio espectro, metalo- β -lactamasas (M β L), mutación de porinas y bombas de expulsión activas.

Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa*, la resistencia específica a estos antibióticos es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina (OprD), a un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activas (MexAB-OprD), a la producción de β -lactamasas y/o a la producción de M β L.

De esta manera la presencia de una *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos está asociada con la producción de metaloenzimas teniendo la capacidad de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos como imipenem y meropenem, excepto el aztreonam. En los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos a nivel mundial, debido a la presencia de M β L de los tipos; IMP, VIM, SPM y GIM.

Las M β L han sido reportadas en casi todas las regiones del mundo, encontrándose las cuatro mayores familias IMP, VIM, SPM y GIM en aislamientos de *P. aeruginosa*, la mayoría de ellas han sido reportadas en Europa, Asia y Norteamérica. En México, se han hallado M β L en muestras de hospitales de los estados de Durango, México y Guadalajara, durante los últimos diez años.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales son aquellas contraídas durante una estadía en el hospital que no se habían manifestado ni estaban en período de incubación en el momento del internado del paciente. Las infecciones que ocurren después de 48 horas del internamiento suelen considerarse nosocomiales. Comprenden a las infecciones contraídas en el hospital, pero que se manifiestan después del alta hospitalaria y también a las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento (**WHO/CDS/CSR/EPH**, 2002).

Las infecciones nosocomiales se presentan en un 5 a 10 % de pacientes que se internan en el hospital, el desarrollo de las mismas está en función de: la edad, siendo más frecuentes en los extremos de la vida; el estado inmunitario, ya que los inmunodeprimidos de diferente etiología son los más susceptibles y la patología de base, la cual determina el destino de internación del paciente, de donde se parte que los servicios de Unidad de Terapia Intensiva (UTI), quemados y salas quirúrgicas son las dependencias hospitalarias donde más frecuentemente se presentan estas infecciones (**Pérez et al.**, 2010; **López et al.**, 2011).

La etiología de las infecciones intrahospitalarias ha presentado variaciones a través del tiempo. En el inicio, los patógenos predominantes fueron grampositivos, pero con la introducción de los antibióticos se llevó a cabo una disminución de las infecciones causadas por estos microorganismos y pasaron a ser producidas fundamentalmente por bacterias gramnegativas. A finales del milenio pasado, los microorganismos grampositivos reaparecieron como patógenos predominantes en algunas partes del mundo. Y se le suma el incremento de casos causados por hongos. A pesar de ello, las bacterias gramnegativas todavía se encuentran entre los principales agentes nosocomiales a nivel mundial (**Lebeque et al.**, 2006; **Pérez et al.**, 2010).

En las infecciones nosocomiales los agentes infecciosos más importantes son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella*, entre otros. Se ha demostrado que las infecciones adquiridas en las UTI, tienen una mayor probabilidad de ser causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, ésta resistencia incrementa a su vez la estancia hospitalaria, mortalidad, morbilidad, y los costos económicos asociados (**Lister et al.**, 2009).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria gramnegativa, aerobia estricta, ubicua, no fermentadora, que pocas veces forma parte de la microbiota normal del ser humano (**Díaz et al.**, 2009; **Kung et al.**, 2010). Posee un genoma con 6.3 millones de pares de bases, las cuales codifican 5570 genes siendo rica en factores de virulencia (**Stover et al.**, 2000). Su capacidad de sobrevivir en medios con mínimos nutrientes y tolerar una variedad de condiciones físicas le ha permitido persistir tanto en la comunidad como en los hospitales causando morbilidad y mortalidad significativa en seres humanos inmunocomprometidos. La clave para la supervivencia de *P. aeruginosa* en entornos que van desde el suelo hasta varios organismos hospederos, es su versatilidad metabólica.

P. aeruginosa puede subsistir en una variedad de diferentes fuentes de carbono, es capaz de utilizar nitrógeno como un aceptor terminal de electrones respirando bajo condiciones anaeróbicas, tiene un mínimo de requerimientos nutricionales, y crece a temperaturas de hasta 42°C. Debido a su diversidad metabólica, *P. aeruginosa* puede incluso multiplicarse en ciertos desinfectantes y metabolizar muchos antibióticos (**Pier et al.**, 2007; **Kung et al.**, 2010), siendo considerado uno de los patógenos oportunistas más importantes en UTI, asociado frecuentemente a infecciones de tejidos blandos, neumonías, bacteremia y meningitis (**Pérez et al.**, 2008; **Díaz et al.**, 2009). Con frecuencia las infecciones producidas por este microorganismo son difíciles de tratar debido

a la resistencia intrínseca y adquirida que posee a múltiples grupos de antibióticos (**Pérez et al.**, 2008; **Casellas**, 2011; **Rojo et al.**, 2014).

2.3 Multirresistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

La multirresistencia en *P. aeruginosa* resulta de su notable resistencia a los antibióticos, además de su capacidad para adquirir y albergar diversos determinantes de resistencia (**Tam et al.**, 2010; **Hirsch y Tam**, 2010). Se conoce que la resistencia intrínseca en *P. aeruginosa* está determinada por varios mecanismos; como la baja permeabilidad en la membrana externa, la producción inducida de β -lactamasas tipo AmpC, la expresión constitutiva de bombas de expulsión como MexAB-OprM (**Livermore**, 2002; **Slama**, 2008; **Díaz et al.**, 2009) y la inactivación endógena de fármacos (**Poole**, 2011; **Morita et al.**, 2014). Por su parte, la resistencia adquirida se basa en la capacidad de esta bacteria de intercambiar material genético a través de plásmidos, integrones y transposones (**Walsh**, 2008). A menudo estos mecanismos existen de forma simultánea, lo que confiere a *P. aeruginosa* resistencia combinada a muchos grupos de antibióticos (**Strateva y Yordanov**, 2009; **Kung et al.**, 2010).

En los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos a nivel mundial, debido a la expresión de M β L de varios tipos; IMP, VIM, SPM y GIM (**Casellas**, 2011; **Rizek et al.**, 2014; **Saavedra et al.**, 2014), estas cepas a su vez, presentan resistencia múltiple a otros antibióticos como los betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (**Pérez et al.**, 2008; **Strateva y Yordanov**, 2009), puesto que, la resistencia a carbapenémicos por M β L se encuentra asociada a integrones de localización plasmídica; los más frecuentes son los de clase 1 (donde se encuentran genes que codifican para enzimas como: VIM, IMP y GIM), aunque también se han hallado en integrones de clase 3 (genes codificantes para IMP); por otra parte, no se han encontrado genes de M β L asociados a integrones de clase 2 (**Queenan y Bush**, 2007; **Ramírez et al.**, 2010). Estos integrones contienen a su vez, genes que codifican para la

resistencia a aminoglucósidos como: *aacA4*, *aac(69)-29a* y *aac(69)-29b*, y fluoroquinolonas como: *qnrA*, *qnrVC1*; que han sido identificados en diferentes integrones hallados en cepas de *P. aeruginosa* (**Strateva y Yordanov, 2009; Belotti et al., 2015**).

La resistencia de *P. aeruginosa* a carbapenémicos puede ser explicada por diversos mecanismos:

1. Producción de MβL (**Pérez et al., 2008; Tafur et al., 2008; Lister et al., 2009**).
2. Expulsión del antibiótico mediante sobreexpresión de bombas de eflujo. Por ejemplo: MexAB-OprM, comprometiéndose en este caso, la sensibilidad a meropenem más que a imipenem y la de otros antibióticos no carbapenémicos (fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos) (**Gutiérrez et al., 2007; Pérez et al., 2008; Tafur et al., 2008; Lister et al., 2009; Saavedra et al., 2014**).
3. Producción de β-lactamasas con actividad carbapenemasa, principalmente de las familias GES, KPC y OXA (**Maseda et al., 2013; Saavedra et al., 2014**).
4. Alteraciones de la porina OprD que confiere impermeabilidad a carbapenémicos, generando resistencia a imipenem y susceptibilidad disminuida a meropenem (**Lister et al., 2009; Obritsch et al., 2005; Pérez et al., 2008; Rizek et al., 2014; Tafur et al., 2008**).

Sin embargo, la producción de MβL es uno de los mecanismos de resistencia bacteriana que tienen un alto impacto epidemiológico, debido a su capacidad de diseminación horizontal (**Gonzales et al., 2013; Livermore, 2002; Gutiérrez et al., 2007; Sacha et al., 2008**).

2.4 β -Lactamasas

Los antibióticos β -lactámicos tienen en común en su estructura molecular un anillo β -lactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana. Las β -lactamasas son enzimas capaces de romper este anillo e inactivar a estos antibióticos, son ubicuas de bacterias gramnegativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias. Las β -lactamasas se agrupan en cuatro clases moleculares A, B, C, y D (**Tafur *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2015**).

2.5 β -Lactamasas con actividad carbapememasa

La producción de β -lactamasas con actividad carbapememasa es un mecanismo de resistencia de gran importancia en bacilos gramnegativos, observándose que en general los aislados productores resultan resistentes no sólo a imipenem y meropenem, sino también a otros antibióticos β -lactámicos que se utilizan para el tratamiento antimicrobiano (**Gonzales, 2012**). Las carbapememasas representan la familia más versátil de las β -lactamasas y se clasifican en dos grupos: serin-carbapememasas que pertenecen a la clase molecular A, C y D de Ambler y M β L que corresponden a la clase B de Ambler (**Moreno, 2013**).

Las β -lactamasas clases A, C, y D son enzimas a base de serina en las que se forma un intermediario covalente acil-enzima, cuando hidrolizan a un antibiótico β -lactámico. Una serina se conserva en el sitio activo, la cual actúa como nucleófilo para atacar el enlace C-N del anillo β -lactámico, el intermediario formado acil-enzima por la reacción de acilación, se hidroliza por un desacilante (agua), luego el producto hidrolizado se libera del sitio activo. Sin embargo, las

β -lactamasas clase B se basan en una molécula de agua coordinada a un catión divalente (Zn^{2+}) para activar y romper el anillo de los antibióticos β -lactámicos (carbapenémicos). En estas enzimas, el intermediario covalente acil-enzima no se forma (**Ho et al.**, 2015).

En *P. aeruginosa* se han descrito diversas β -lactamasas de clase A, como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) de los tipos; TEM, SHV, PER, VEB, CTX-M, PSE, CARB siendo TEM, SHV y CTX-M las más prevalentes; β -lactamasas de tipo GES con y sin actividad carbapememasa (**Vila y Francesc**, 2010); y carbapememasas del tipo KPC (KPC-2 y KPC-5). También se han hallado β -lactamasas de clase D conocidas como OXA, cuyo espectro de hidrólisis es variable, pero normalmente afecta cefalosporinas de tercera generación, existiendo un grupo que hidroliza carbapenémicos: OXA-23, OXA-48, OXA-40 y OXA-58 del cual solo OXA-40 ha sido detectada en *P. aeruginosa* (**Nicolau y Oliver**, 2010; **Ho et al.**, 2015).

Las carbapememasas tipo GES se describieron por primera vez en el año 2000, casi en paralelo en una cepa de *K. pneumoniae* y en otra de *E. cloacae*, se han descrito 27 variantes, de las que sólo GES-2 y GES-5 se han identificado en *P. Aeruginosa*, hasta el momento. En general, las GES poseen hasta un 36% de identidad en aminoácidos con respecto a KPC-2, y un 35% con respecto a SME-1. Las variantes GES-2, -4, -5, -6, -11, -12, -18 y -20 tienen actividad carbapememasa y se ha propuesto que la presencia de asparagina o serina en la posición 170 es clave para esta actividad (**Nicolau y Oliver**, 2010; **Garza et al.**, 2014).

2.6 Metalo- β -lactamasas

Las M β L son enzimas que pertenecen a la clase molecular B de la clasificación de Ambler, están presentes de forma natural en algunas especies de bacilos gramnegativos ambientales (**Tafur et al.**, 2008) y tienen la capacidad de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos como imipenem y meropenem, pero no al aztreonam (**Queenan y Bush**, 2007; **Strateva y Yordanov**, 2009; **Lister et al.**, 2009). Estas enzimas requieren zinc como cofactor para ejercer su actividad catalítica, su actividad no es inhibida por el ácido clavulánico ni el tazobactam, pero es suprimida por quelantes como el EDTA o el mercapto-acetato de sodio (**Diaz et al.**, 2009; **Strateva y Yordanov**, 2009; **Gonzales et al.**, 2013).

Las M β L han sido reportadas en casi todas las regiones del mundo, encontrándose las cuatro mayores familias IMP, VIM, SPM y GIM en aislamientos de *P. aeruginosa* (**Guevara et al.**, 2009; **Poole**, 2011), la mayoría de ellas han sido reportadas en Europa, Asia y Norteamérica. Las variantes de IMP y VIM, poseen el mismo espectro extendido de hidrólisis hacia las ureidopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación (**Pérez et al.**, 2008; **Partridge et al.**, 2009).

En *P. aeruginosa* VIM-2 es la M β L más diseminada y asociada a elementos móviles como casetes, los cuales están insertados en integrones de clase I (**Pérez et al.**, 2008; **Partridge et al.**, 2009). Este tipo de M β L fue primeramente descubierto en Europa para luego extenderse a todo el mundo, existen más de 20 variantes con una distribución geográfica definida. Asimismo, las enzimas tipo VIM se destacan dentro de las M β L debido a su gran afinidad por los carbapenémicos y a que presentan una especificidad de sustrato más amplia que las de tipo IMP, ya que abarcan también las 6-alfa-metoxipenicilinas (**Cornaglia et al.**, 2011).

La M β L tipo GIM-1, fue encontrada por primera vez en un brote intrahospitalario causado por *P. aeruginosa* en un hospital de Alemania. Esta familia presenta una relación estrecha con la variante IMP-1, mostrando un 40% de identidad con la secuencia de aminoácidos de IMP-1. GIM-1 al igual que IMP-1, hidroliza preferentemente ampicilina y penicilina, comparado con carbencilinas y ticarcilina; sin embargo, a diferencia de IMP-1, GIM-1 presenta una actividad enzimática mayor en presencia de los sustratos cefoxitina y cefalotina, además de mostrar una elevada afinidad catalítica para imipenem y meropenem, una diferencia más del resto de las familias de M β L, las cuales presentan mayor afinidad para imipenem (**Castanheria et al., 2004**). Por su parte, el gen codificante de GIM-1 se ha encontrado en un plásmido de 22 Kb y un integrón de clase I In77 (**Sacha et al., 2008; Díaz et al., 2009**).

Por otra parte, el tipo SPM fue descubierto en cepas de *P. aeruginosa* en Brasil. Hasta el momento, esta enzima se encuentra confinada principalmente a ese país y a ese microorganismo, por lo que tendría una baja propensión a la diseminación. SPM-1 posee una masa molecular mayor que las otras metaloenzimas (VIM e IMP) y generalmente se une más fuertemente a cefalosporinas que a penicilinas (**Díaz et al., 2009; Cornaglia et al., 2011**).

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

En México, los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* se han venido describiendo desde 1986; haciéndose estudios en los cuales se han encontrado diferentes perfiles de resistencia a carbapenémicos, así como genes que codifican para las MβL como: IMP y VIM (Rodríguez *et al.*, 2014).

En 2012 Morfin y colaboradores, realizaron un análisis de la tendencia de la resistencia a los antimicrobianos en microorganismos patógenos gramnegativos aislados de infecciones adquiridas en dos hospitales; Hospital General de Durango y el Hospital Fray Antonio Alcalde de Guadalajara, entre los años 2005 y 2010. Analizando un total de 2132 aislamientos, de los cuales, 404 cepas correspondieron a *P. aeruginosa*, observándose que el 17,8% de éstas fueron resistentes a imipemen y el 12,8% a meropenem.

En un estudio realizado por Garza y colaboradores en 2007, se encontró a IMP-18 en una cepa de *P. aeruginosa* que se aisló de la infección de un pie en el Hospital Fray Antonio Alcalde de Guadalajara, Jalisco; un año después, se estudiaron 255 cepas de *P. aeruginosa* recuperadas de muestras clínicas de este mismo hospital. A estas cepas se les determinó su susceptibilidad a antibióticos carbapenémicos por el método de microdilución en caldo, el 22% (56 cepas) fueron resistentes. Posteriormente se eligieron 40 cepas para determinar su susceptibilidad a diferentes antimicrobianos por el método de dilución en agar. Sus perfiles de resistencia fueron: imipenem, 100%; meropenem, 87%; ceftazidima, 61%; aztreonam, 24%; piperacilina, 19%; piperacilina-tazobactam, 14%; amikacina, 51%; gentamicina, 54% y ciprofloxacino, 56%; a éstas, se les realizó la búsqueda de los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*, 12 cepas fueron positivas para *bla_{IMP-15}*.

Por su parte, Quinones y colaboradores, en 2009 estudiaron 431 cepas de *P. aeruginosa* provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Ciudad de México y encontraron que el 19.9% fue resistente a imipenem y meropenem. A estas estas cepas se les determinó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de genes de resistencia; *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{SPM-1}, estando presente el gen *bla*_{IMP-15} en una de las cepas y el gen *bla*_{VIM-2} en dos de ellas.

Posteriormente, en 2010, Sánchez y colaboradores examinaron 26 cepas de *P. aeruginosa* que fueron recuperadas de un estudio de vigilancia que se realizó en el Centro Médico Nacional La Raza (CMNR) de la Ciudad de México, entre junio y diciembre de 2004. De ellas el 34.6% fueron resistentes a imipenem y una fue positiva para el gen *bla*_{IMP-18} mediante amplificación por PCR.

3.2 Antecedentes específicos

En el estado de Puebla, el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (LMHC-CICM), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ha realizado algunos trabajos relacionados con los mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *P. aeruginosa*, en los que se han estudiado 21 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con infección nosocomial del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre de la Ciudad de México” obtenidos durante 2007-2009, las cuales presentaron el siguiente perfil de resistencia: cefalosporinas 76%, carbapenémicos 91%, monobactam 63%, aminoglucósidos 94%, fluoroquinolonas 88% y colistina 24%. Se les determinó por PCR la presencia de diversos genes de resistencia, estando presentes los genes: *ges-1* (67%), *ges-19/ges-20* (7%), *oxa-1* (4%), *oxa-2* (90%), *oxa-50* (100%), *aac-(3)-IIa* (59%), *acc-(6)-Ib* (48%) y estuvieron ausentes los genes; *pse-1*, *veb-1*, *kpc-2*, *oxa-10*, *oxa-11*, *oxa-13*, *oxa-40*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *ctx-m*, *shv*, *tem*, *per*, *bel*, *gim-1*, *spm-1* y algunas variantes de *imp*, *vim* y *ndm* (Martínez, 2011; Valerio, 2012; Ayala, 2013; Bello, 2015).

En 2014, Ramos estudio 36 cepas de *P. aeruginosa* provenientes del Hospital Regional ISSSTE Puebla, recolectadas durante el periodo de abril de 2013 a febrero de 2014. Al obtener su perfil de resistencia, por el método de Kirby-Baüer, la frecuencia de resistencia fue de 51% para β -lactámicos (incluyendo penicilinas, β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas, cefalosporinas, carbapenémicos, y monobactámicos), 62% para aminoglucósidos, 67% para fluoroquinolonas y 28% para colistina. Posteriormente, se seleccionaron 25 cepas por presentar éstas el fenotipo de multirresistencia, para detectarles el gen *vim*, el cual estuvo ausente en todas ellas.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana es uno de los problemas más importantes en la actualidad a nivel mundial, la cual tiene importancia significativa en la morbilidad y mortalidad en hospitales. *P. aeruginosa* es uno de los principales agentes infecciosos causante de infecciones nosocomiales y sus diferentes mecanismos de resistencia se han convertido en un problema terapéutico. Los carbapenémicos son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por *P. aeruginosa*, no obstante, el uso indiscriminado de estos compuestos ha resultado en el desarrollo de resistencia en *P. aeruginosa*. La resistencia específica a carbapenémicos en *P. aeruginosa* es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina (OprD), a un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activas (MexAB-OprD), a la producción de β -lactamasas y a la producción de M β L. Por lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿La presencia de M β L en cepas de *P. aeruginosa* provenientes del HNP, es responsable de su resistencia a antibióticos carbapenémicos?

5. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos; antibióticos de última generación utilizados para tratar las infecciones causadas por este agente, se han convertido en un problema a nivel mundial, debido a que empeora el pronóstico de los pacientes, aumentando las estancias y costos hospitalarios; por lo que en el presente trabajo, se estudiará la presencia de M β L en cepas de *P. aeruginosa* del HNP lo que llevará a aportar mayor información acerca de los mecanismos implicados en la multirresistencia, con lo que se podrá tener un mejor control y seguimiento epidemiológico a nivel hospitalario.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el perfil fenotípico de resistencia y detectar genes que codifican para M β L del tipo: VIM, IMP y GIM en cepas de *P. aeruginosa* procedentes del HNP.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos por el método de Kirby Baüer a cepas de *P. aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales en el HNP.
- Detectar por PCR la presencia de genes que codifican para M β L del tipo VIM, IPM y GIM.
- Secuenciar algunos de los productos amplificados.

7. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio: transversal, observacional, descriptivo.

7.2 Universo de estudio

Se trabajó con 32 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de 25 pacientes con infección nosocomial del HNP de la Ciudad de Puebla, durante el periodo febrero-junio de 2014.

Los aislados de estudio fueron donados por el HNP de la Ciudad de Puebla. Estos aislados fueron obtenidos de manera rutinaria y se conservan en el cepario del LMHC-CICM a -70°C.

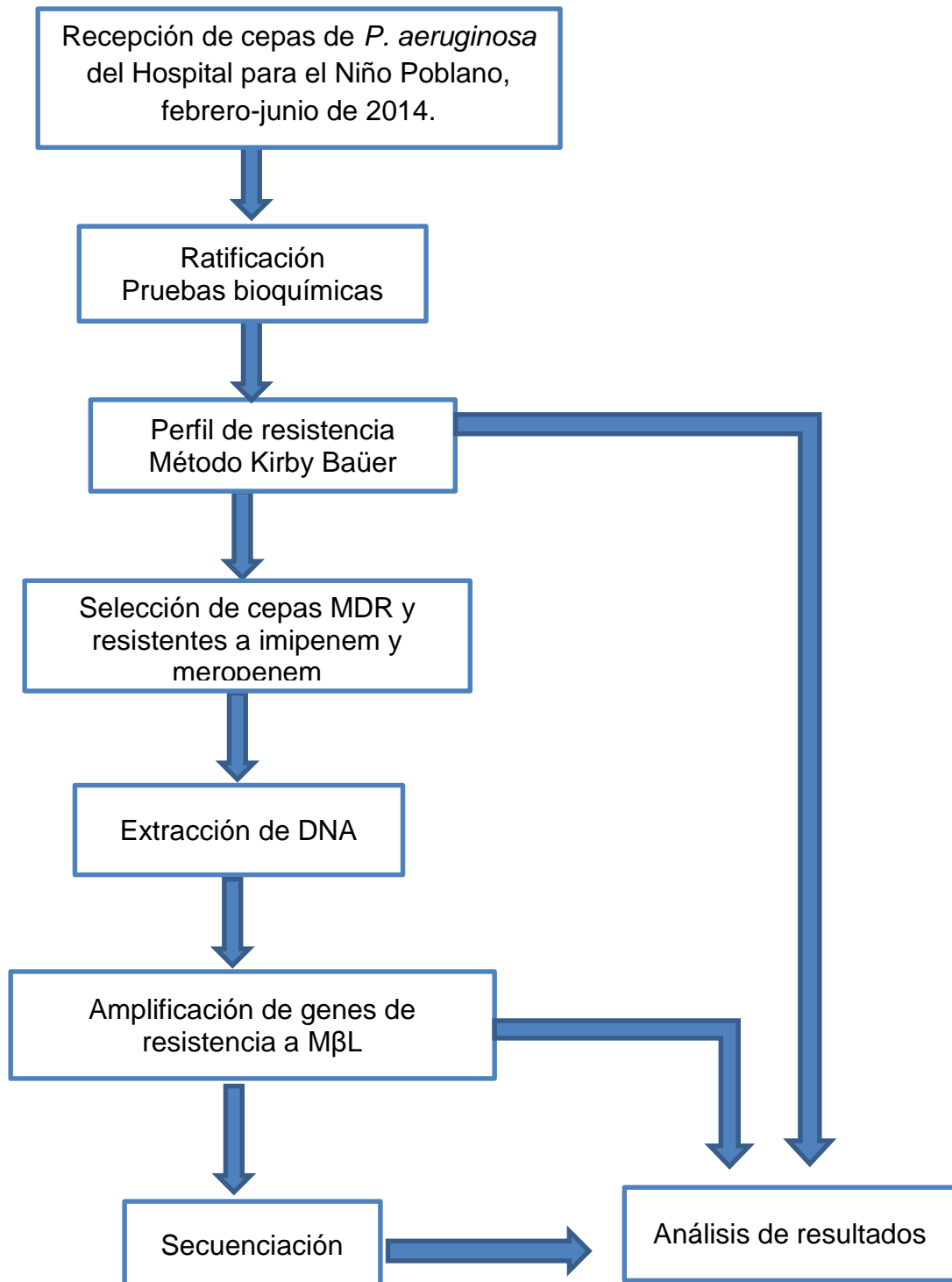
7.3 Criterios de inclusión

Aislados de *P. aeruginosa* procedentes de cualquier muestra biológica, de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial del HNP de la Ciudad de Puebla.

7.4 Criterios de exclusión

Otras especies bacterianas que causaron infecciones nosocomiales en el HNP de la Ciudad de Puebla, fueron excluidas de participar en este estudio.

8. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Recepción y ratificación de cepas

Se estudiaron 32 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de distintos sitios anatómicos de pacientes diagnosticados con infección nosocomial del HNP de la Ciudad de Puebla, durante el periodo febrero-junio de 2014. Estas cepas ya habían sido identificadas previamente como *P. aeruginosa* mediante el equipo semiautomatizado Vitek2, de las cuales, a ocho se les realizó su ratificación mediante pruebas bioquímicas como citrato, MIO y O/F, puesto que las demás ya habían sido caracterizadas por el grupo de trabajo del del LMHC-CICM y se encontraban preservadas en crioviales con caldo BHI/Glicerol (10%v) e identificadas con número secuencial de acuerdo al cepario interno del mismo laboratorio. Estas 24 cepas, se descongelaron y se sembraron, en placas de agar TSA incubandoce durante 24 horas a 37°C, con la finalidad de confirmar su pureza.

9.2 Fenotipo de resistencia por el método de disco (Kirby Baüer)

La sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos se realizó utilizando el principio de difusión en agar Mueller Hinton mediante el método de Kirby Baüer, siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), probándose 14 antibióticos (ver tabla 1). Para la preparación del inóculo se tomaron de 2-4 colonias aisladas en agar soya tripticasa (TSA) y se depositaron en 5 mL de solución salina isotónica al 0.85% (SSI). Se preparó una suspensión bacteriana y se ajustó a una turbidez de 0.5 de MCFarland que equivale aproximadamente a 10^8 UFC/mL. Con un hisopo estéril se inocularon las placas de agar Mueller Hinton por estriado masivo en tres direcciones. A continuación se colocaron los discos de antibióticos sobre la

superficie del agar inoculada. Las placas se incubaron invertidas a 37 °C durante 24 horas en atmósfera aeróbica.

Después de 24 horas de incubación se examinó cada placa y se procedió a medir los diámetros de las zonas de inhibición. Los tamaños de las zonas de inhibición fueron interpretados con los puntos de corte especificados por el CLSI, 2015 (tabla 1).

Tabla 1. Puntos de corte del CLSI, 2015 para *Pseudomonas aeruginosa*

Familia química de antibiótico	Antibiótico		Concentración (µg)	Diámetro de los halos de inhibición (mm)		
				R	I	S
Penicilinas	Piperacilina	PIP	100	≤14	15-20	≥21
	Ticarcilina	TIC	75	≤15	16-23	≥24
Combinación β-lactámico/Inhibidor de β-lactamasas	Piperacilina/Tazobactam	TZP	100/10	≤14	15-20	≥21
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ	30	≤14	15-17	≥18
	Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
Monobactámicos	Aztreonam	ATM	30	≤15	16-21	≥22
Carbapenémicos	Imipenem	IPM	10	≤15	16-18	≥19
	Meropenem	MEM	10	≤15	16-18	≥19
Aminoglucósidos	Gentamicina	GM	10	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	AN	30	≤14	15-16	≥17
	Netilmicina	NET	30	≤12	13-14	≥15
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	CIP	5	≤15	16-20	≥21
	Norfloxacino	NOR	10	≤12	13-16	≥17
Otros	Colistina	CL	10	≤10	-	≥11

R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

9.3 Extracción de DNA

Se realizó la obtención de DNA mediante lisis bacteriana a partir de microorganismos aislados en agar soya tripticasa (TSA), por el método de hervido. Para lo cual se sembró una colonia aislada de *P. aeruginosa* en placas de TSA, se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas, del cultivo anterior se recogieron de 2 a 3 asadas y se depositaron en un tubo Eppendorf con 800 µL de SSI estéril, esta mezcla se homogeneizó en un vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 800 µL de SSI, (se realizaron 3 lavados más con 800 µL de SSI), la última pastilla se resuspendió con 800 µL de solución inyectable estéril y se colocó en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos, transcurrido ese tiempo se sacó el tubo, se agitó y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se separó el sobrenadante en un tubo Eppendorf estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

9.3.1 Medición de la concentración de DNA

A todos los lisados se les realizó la medición de la concentración de DNA y se ajustaron a 250 µg/µL en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para este procedimiento se usó la aplicación del instrumento, seleccionando la opción de ácidos nucleicos, inicialmente el equipo realiza una verificación automática. Posteriormente se limpió el lector del equipo con agua y papel, y se procedió a hacer un blanco con 2 µL de agua inyectable estéril, luego se realizó la medición de la concentración de ADN de los lisados utilizando 2 µL de cada uno, se fue limpiando el lector óptico entre muestra y muestra para evitar contaminaciones. Los lisados que tenían una concentración mayor a 250 µg/µL se diluyeron con agua inyectable estéril hasta que se llegó a la concentración deseada.

9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de genes se utilizó la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific). En la tabla 2, se muestran los componentes para la PCR.

Tabla 2. Componentes de la PCR

Componentes	Concentración Inicial	Volumen añadido por tubo (μL)	Concentración final de la reacción
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)	5 U/ μL	0.08	0.4 U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl ₂	25 mM	1	1.5 mM
dNTPs	10 mM	0.3	0.2 mM
Primer Forward	25 μM	0.5	0.75 mM
Primer Reverse	25 μM	0.5	0.75 mM
DNA	---	1	---
Agua libre de nucleasas	---	Hasta 10 μL	---
Volumen final		10 μL	

Las cepas que se utilizaron como control positivo para la técnica de PCR portan genes que ya están secuenciados. Estas cepas se conservan en el cepario del LMHC-CICM y se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas control positivo para la realización de PCR

Microorganismo	Denominación de la cepa	Genes secuenciados	Donada por:
<i>P. aeruginosa</i>	PsIMP-15	<i>imp-15</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
<i>P. aeruginosa</i>	PsVIM-2	<i>bla-vim-2</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
<i>P. aeruginosa</i>	PsE36	<i>ges19/20</i>	M.C. María Elena Bello López

En la tabla 4 se muestran los oligonucleótidos que se utilizaron para la búsqueda de genes de resistencia.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes de resistencia

Gen	Producto	ON	Secuencia (5' → 3')	nb	%GC	TA (pb)	Tm (°C)	Referencia																																												
<i>imp</i>	IMP (1, 7, 13, 15, 22, 35)	IMPdF	CTCCGCAGWAGMGKCTTTG	20	57.5	~515	57.4	Diseñados por la M.C. María Elena Bello López.																																												
		IMPdR	GCCADGCTACDANATTTGCGTC	22	50.7				57.1	<i>gim-1</i>	GIM-1	GIM-F	AGAACCTTGACCGAACGCAG	20	55	748	62	Castanheira <i>et al.</i> , 2004.	GIM-R	ACTCATGACTCCTCACGAGG	20	55	62	<i>vim</i>	VIM (1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 17, 31, 35, 36, 37)	VIMd1F	GATGGYGTGGTTCGCATATC	21	50	~400	53.3	Diseñados por la M.C. María Elena Bello López.	VIMd2R	GAATGCGCAGCACCRGGA	18	63.8	60.1	VIMd3R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA	21	45.2	~600	54.9	<i>ges</i>	GES	GES-F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	19	53	~864	58	Dubois <i>et al.</i> , 2002.
<i>gim-1</i>	GIM-1	GIM-F	AGAACCTTGACCGAACGCAG	20	55	748	62	Castanheira <i>et al.</i> , 2004.																																												
		GIM-R	ACTCATGACTCCTCACGAGG	20	55				62	<i>vim</i>	VIM (1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 17, 31, 35, 36, 37)	VIMd1F	GATGGYGTGGTTCGCATATC	21	50	~400	53.3	Diseñados por la M.C. María Elena Bello López.	VIMd2R	GAATGCGCAGCACCRGGA	18	63.8	60.1			VIMd3R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA	21	45.2				~600	54.9	<i>ges</i>	GES	GES-F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	19	53	~864	58	Dubois <i>et al.</i> , 2002.	GES-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	19	53	58				
<i>vim</i>	VIM (1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 17, 31, 35, 36, 37)	VIMd1F	GATGGYGTGGTTCGCATATC	21	50	~400	53.3	Diseñados por la M.C. María Elena Bello López.																																												
		VIMd2R	GAATGCGCAGCACCRGGA	18	63.8				60.1																																											
		VIMd3R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA	21	45.2				~600	54.9																																										
<i>ges</i>	GES	GES-F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	19	53	~864	58	Dubois <i>et al.</i> , 2002.																																												
		GES-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	19	53				58																																											

ON: oligonucleótidos, **nb:** número de bases, **Tm:** Temperatura de fusión de oligonucleótidos, **TA:** tamaño del amplicon.

Las condiciones de trabajo para la amplificación de cada gen de resistencia fueron las que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de trabajo de la PCR empleadas para amplificar los diferentes genes de resistencia

Gen	ON	DI	30 ciclos			Extensión final	CF
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
<i>imp</i>	IMPdF IMPdR	94°C/5min	94°C/1min	56°C/1min	72°C/ 1min	72°C/10min	∞4°C
<i>gim</i>	GIM-F GIM-R	95°C/5min	95°C/1min	57°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	∞4°C
<i>vim</i>	VIMd1F VIMd2R	94°C/5min	94°C/1min	54°C/1min	72°C/ 1min	72°C/10min	∞10°C
	VIMd1F VIMd3R	94°C/5min	94°C/1min	50°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	∞10°C
<i>ges</i>	GES-F GES-R	94°C/5min	95°C/1min	55°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	∞4°C

ON: oligonucleótidos, **DI:** desnaturalización inicial, **CF:** conservación final.

9.5 Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1%. Antes de cargar el gel se añadió a cada muestra de ADN bacteriano amplificado, 1 µL de azul de bromofenol como tampón de carga. Se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. El buffer de electroforesis que se utilizó fue una solución 1X de Tris Ácido acético, EDTA (TAE) y se aplicó una tensión de 90 V por 60 minutos.

Los geles fueron teñidos en una solución acuosa de 200 mL de bromuro de etidio (10 µL/ 200 mL) durante 60 segundos y se destiñeron en agua destilada por 5 minutos. Los geles se fotografiaron en el digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

9.6 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados se purificaron con ayuda del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit™, siguiendo instrucciones de fabricante, y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca Morelos, México.

9.6.1 Análisis de las secuencias

Las secuencias se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza. 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/). Mientras que los alineamientos se realizaron con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Por su parte, la conversión de la secuencia nucleotídica a aminoacídica se realizó en ExPASy-Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>).

10.RESULTADOS

10.1 Datos de las cepas

El HNP es una institución de tercer nivel de atención pediátrica. Para el presente estudio se obtuvieron 32 cepas de *P. aeruginosa*, durante el periodo febrero-junio de 2014. Estas cepas fueron identificadas previamente por el método semiautomatizado Vitek2 y se realizó su ratificación mediante pruebas bioquímicas en el LMHC-CICM. La edad promedio de los pacientes fue de 4.91 años, el 76% eran hombres y el 24% mujeres. Los orígenes de las muestras fueron: liquido peritoneal 8%, secreción de herida quirúrgica abdominal 32%, secreción de herida quirúrgica de mielomeningocele 12%, materia fecal 8%, secreción de herida en cráneo 8% y otros 32% (secreción de rodilla, absceso en lumbar, secreción de torax, secreción de úlcera, secreción de herida en una pierna, secreción de amputación de orjejo) (figura 1). La distribución de la procedencia de las cepas por servicio hospitalario fue: Cirugía (CX) 28%, Medicina Interna (MI) 8%, Oncohematología (OH) 12%, Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) 4%, Unidad de Quemados (CE) 12%, Urología (U) 36% (figura 2). En el anexo 1, se puede apreciar la información general de cada cepa, en cuanto a número, tipo de muestra, servicio de procedencia, edad y sexo del paciente.

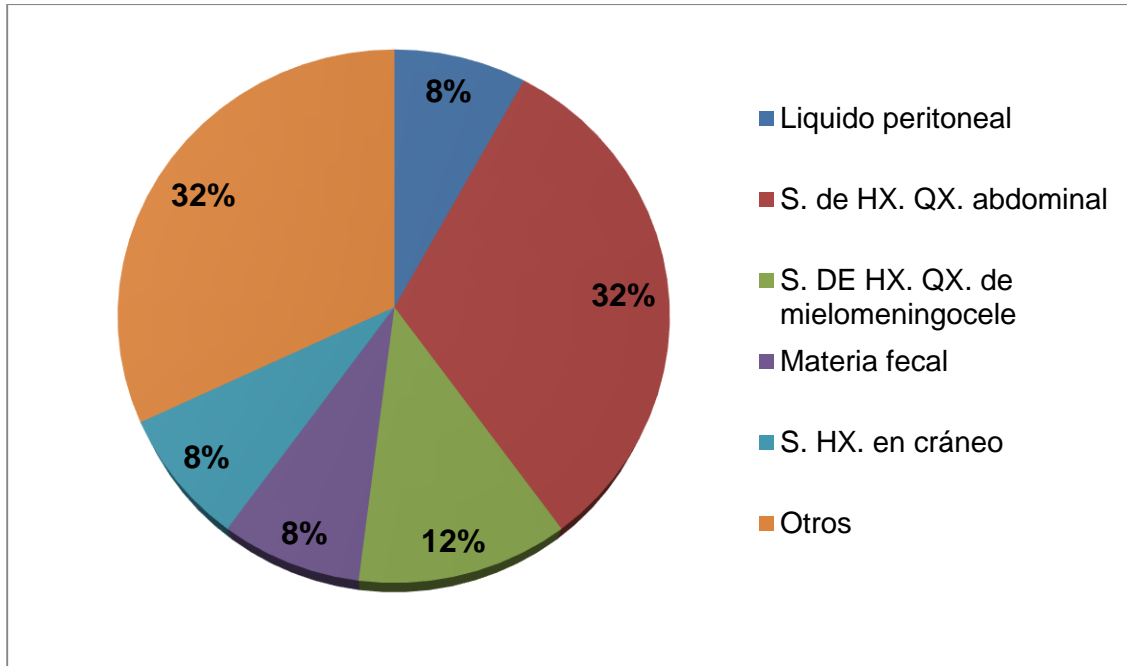


Figura 1. Origen de las 32 cepas aisladas de febrero a junio de 2014 en el HNP de la ciudad de Puebla. S: Secreción, HX. QX.: Herida quirúrgica.

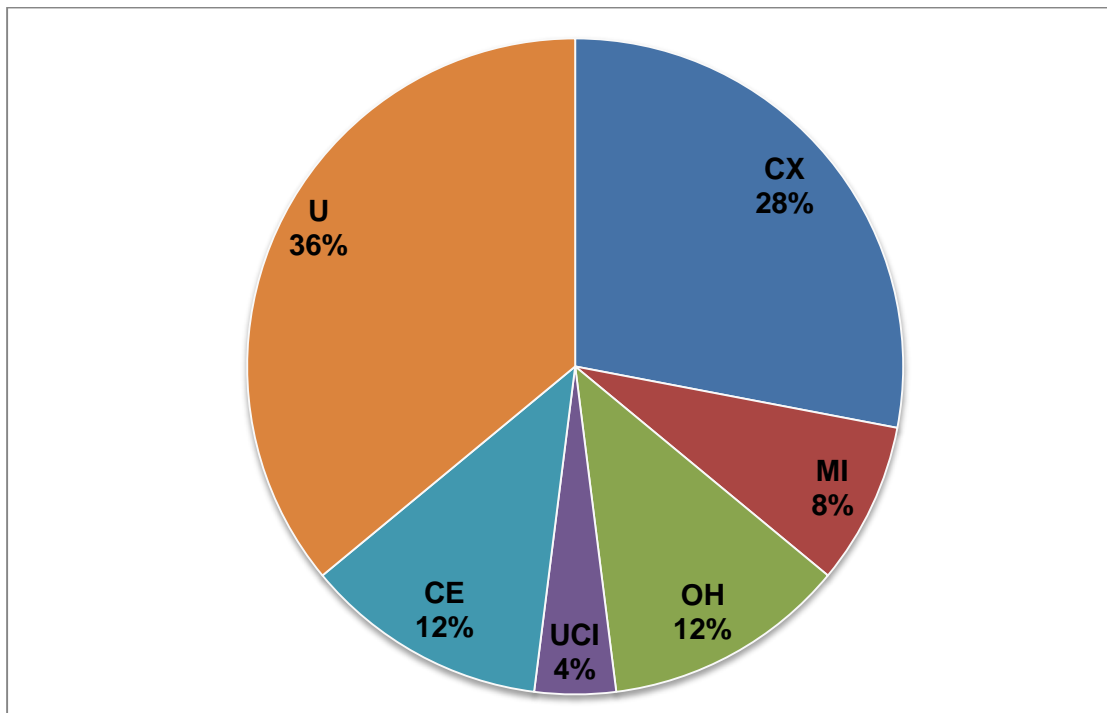


Figura 2. Áreas hospitalarias de donde provienen las 32 cepas aisladas de febrero a junio de 2014 en el HNP de la ciudad de Puebla. U: Urología, CX: Cirugía, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, OH: Oncohematología, CE: Unidad de Quemados, MI: Medicina Interna.

10.2 Susceptibilidad antimicrobiana

Los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en forma global se muestran en la tabla 6. De los 32 aislamientos el 38% (12) fue resistente a imipenem, el 41% (13) a meropenem, el 44% (14) a ticarcilina, el 44% (14) a gentamicina y el 38% (12) a amikacina, entre los porcentajes de resistencia más altos. En figura 3, se pueden observar los porcentajes de resistencia para cada antibiótico, resaltando aquí los porcentajes de resistencia a carbapenémicos.

Los porcentajes de resistencia para cada grupo de antibióticos fueron los siguientes: β -lactámicos 27%, aminoglucósidos 39%, fluoroquinolonas 25% y lipopéptidos 28%, mismos que se representan en la figura 4.

Tabla 6. Patrones de susceptibilidad a diversos antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de febrero a junio de 2014 en el HNP.

Familia química de antibiótico	Antibiótico	Resistente (%)	Intermedio (%)	Sensible (%)
Penicilinas	Piperacilina	19	25	56
	Ticarcilina	44	31	25
Combinación β-lactámico/Inhibidor de β-lactamasas	Piperacilina/Tazobactam	13	19	68
Cefalosporinas	Ceftazidima	19	0	81
	Cefepime	22	9	69
Monobactams	Aztreonam	19	16	65
Carbapenémicos	Imipenem	38	3	59
	Meropenem	41	0	59
Aminoglucósidos	Gentamicina	44	9	47
	Amikacina	38	0	62
	Netilmicina	34	6	60
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	25	9	66
	Norfloxacino	25	3	72
Otros	Colistina	28	0	72

*En color verde se muestran los porcentajes de susceptibilidad a antibióticos carbapenémicos.

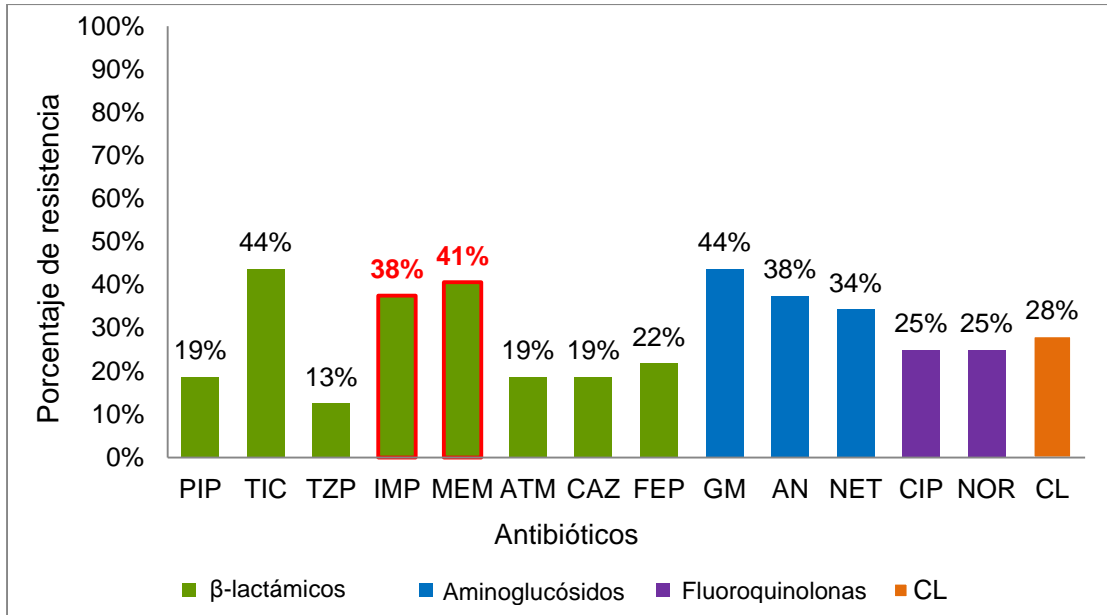


Figura 3. Porcentajes de resistencia para cada antibiótico utilizado, de las cepas de *P. aeruginosa* provenientes del HNP. PIP: piperacilina, TIC: ticarcilina, TZP: piperacilina/tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MEM: meropenem, ATM: aztreonam, GM: gentamicina, AN: amikacina, NET: netilmicina, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina y CL: colistina. En color rojo se muestran los porcentajes de susceptibilidad a antibióticos carbapenémicos.

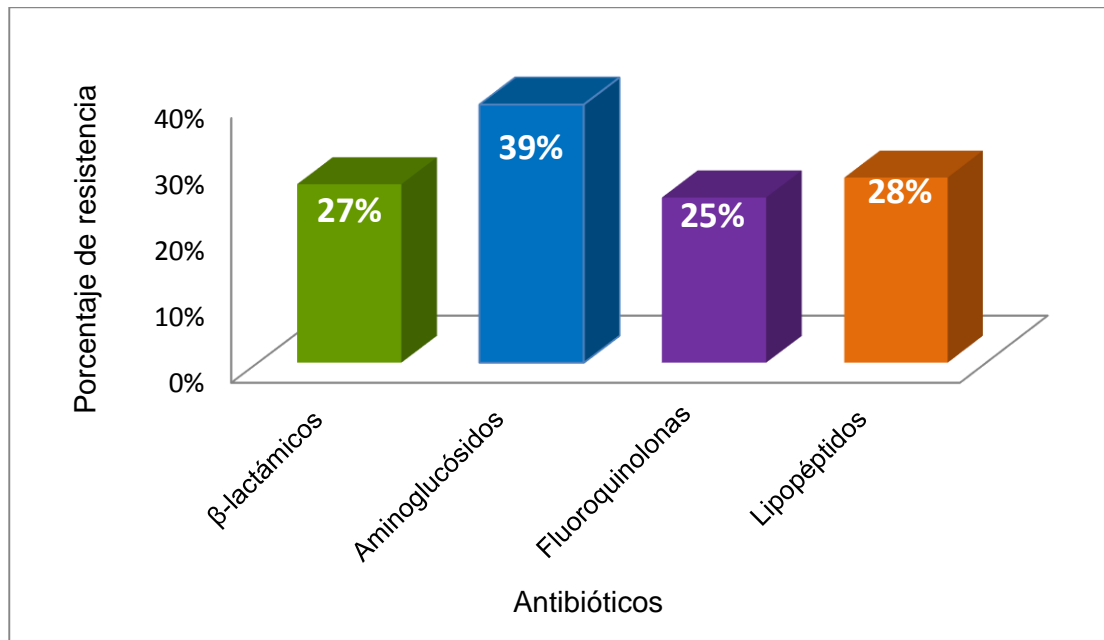


Figura 4. Porcentajes de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* por grupos de antibióticos.

10.3 Amplificación de genes de resistencia

De las 32 cepas, se seleccionaron 13 por presentar fenotipo de multirresistencia y ser resistentes a antibióticos carbapenémicos, y se les realizó la búsqueda de los siguientes genes que codifican para M β L; *imp*, *vim* y *gim*, donde se obtuvo la ausencia de todos ellos. Debido a esto y como un complemento a este estudio, se decidió hacer la determinación de genes de resistencia tipo *ges*, dado que también están asociados con la resistencia a carbapenémicos, encontrándose presente en cuatro de las cepas seleccionadas; NPa11, NPa13, NPa15 y NPa17 (figura 5).

Los datos de los resultados del fenotipo y el genotipo parcial de resistencia encontrado en estas cepas se muestran en la tabla 7, se marcan en color rojo las cepas sensibles a aztreonam, puesto que las M β L hidrolizan a todos los β -lactámicos, excepto el éste antibiótico, sin embargo, ninguna cepa portó los genes buscados en este trabajo.

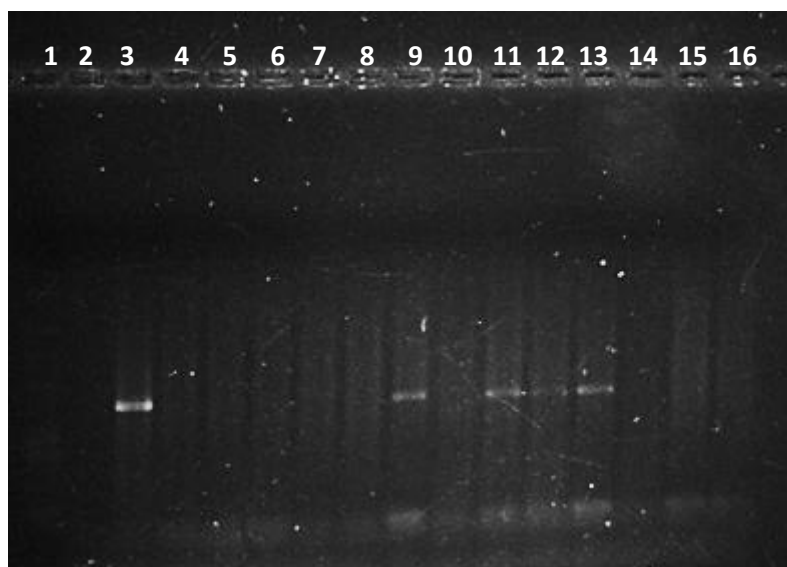


Figura 5. Foto del gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos GES-F y GES-R. Carril 1: MPM, carril 2: Blanco, carril 3: cepa control positivo (PsE36), carril 4: NPa03, carril 5: NPa02, carril 6: NPa06, carril 7: NPa08, carril 8: NPa09, carril 9: NPa11, carril 10: NPa12, carril 11: NPa13, carril 12: NPa15, carril 13: NPa17, carril 14: NPa21, carril 15: NPa32, carril 16: NPa33.

Tabla 7. Fenotipo y genotipo parcial de resistencia de las cepas de resistentes a carbapenémicos aisladas en el HNP

Cepa	Servicio	Origen	Fenotipo de resistencia	Genotipo parcial de resistencia a carbapenémicos
NPa02	CX	S. DE HX.QX. DE MIELOMENINGOCELE	IMP, MEM, GM, AN, NET	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa03	CX	S. DE HX.QX. DE MIELOMENINGOCELE	IMP, MEM, GM, AN, NET	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa06	CE	S. HX.QX. DESPUÉS DEL ASEO	TIC, IMP, MEM, GM, AN, NET, CL	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa08	CX	S. HX.QX. ABDOMINAL	TIC, IMP, MEM, GM	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa09	CX	S. HX.QX. ABDOMINAL	TIC, FEP, IMP*, MEM, ATM, GM	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa11	U	S. HX.QX ABDOMINAL	PIP, TIC, CAZ, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, NOR	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges⁺</i>
NPa12	U	LÍQUIDO PERITONEAL	PIP, TIC, TZP, CAZ, CTX, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, NOR, CL	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa13	UCI	LÍQUIDO PERITONEAL	PIP, TIC, CAZ, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, NOR	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges⁺</i>
NPa15	UCI	LÍQUIDO PERITONEAL	PIP, TIC, TZP, CAZ, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, NOR, CL	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges⁺</i>
NPa17	CX	LÍQUIDO PERITONEAL	PIP, TIC, TZP, CAZ, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, NOR, CL	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges⁺</i>
NPa21	CX	SECRECIÓN DE ABDOMEN	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, NOR, CL	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa32	UCI	S. DE HX.QX ABDOMINAL	TIC, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, NOR	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>
NPa33	UCI	S. DE HX.QX ABDOMINAL	TIC, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, NOR	<i>imp^r, vim^r, gim^r, ges^r</i>

U: Urología, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, CE: Unidad de Quemados, CX: Cirugía, S: Secreción, HX. QX.: Herida quirúrgica, PIP: piperacilina, TIC: ticarcilina, TZP: piperacilina/tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MEM: meropenem, ATM: aztreonam, GM: gentamicina, AN: amikacina, NET: netilmicina, CIP: ciprofloxacino, NOR: norfloxacin y CL: colistina. *: Susceptibilidad intermedia. Las cepas sensibles a ATM están marcadas en color **rojo**.

10.4 Secuenciación y análisis

Se realizó la secuenciación del producto de PCR (*ges*) de la cepa NPa11. Las secuencias obtenidas se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza. El análisis comparativo de la secuencia se realizó con el programa BLAST 2.0 del National Center for Biotechnology Information, utilizando 755 pb en lugar del fragmento total amplificado de 830 pb, reportado por el IBT-UNAM, debido a que la calidad de los cromatogramas resultó ser baja en las secuencias de los extremos.

Las secuencias obtenidas correspondieron con un 96% de similitud con *ges-2* y con un 97% de similitud específicamente con la secuencia aminoacídica de la proteína GES-2 de acuerdo al análisis realizado con el empleo de la herramienta bioinformática BLASTn y BLASTp (NCBI, 2015), respectivamente. Por lo que es necesario realizar una nueva secuenciación de todo el gen para determinar exactamente la variante a la que corresponde. Los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados para *ges* se muestran en el anexo 2.

Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se elaboraron con el programa Clustal Omega y se muestran en las figuras 6 y 7, respectivamente.

```

GES-2      ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
NPa11      -----TGCATCTGCGTCGG
                                         ** *

GES-2      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
NPa11      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAGAAAAGCAGCTGAGATCGGT
*****

GES-2      GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
NPa11      GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGACAGATCGTCGCGGGCCACCGAATCGAGCAGCGTTTT
*****

GES-2      GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
NPa11      GCAATGTGCTCTACGTTCAAGTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
*****

GES-2      GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
NPa11      GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCGTACGGCGGGACATGATCGTCGAATGGTCT
*****

GES-2      CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCCTCGAGGCAGCGCAAGCT
NPa11      CCTGCCGCGAGCGGTTTCTCGCATCGGGACATATGACGGTTCCTCGAGGCAGCGCAAGCG
*****

GES-2      GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
NPa11      GCGGTGCAGCTCAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
*****

GES-2      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
NPa11      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
*****

GES-2      GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCATTGCT
NPa11      GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCCACGCCATTGCT
*****

GES-2      ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
NPa11      ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCTCTATGGCGGCGCACTGACGCCACCTCGACCCAC
*****

GES-2      ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
NPa11      ACAATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACATTACGAGCGGGTTTT
** *****

GES-2      CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
NPa11      CCTAAAGATTGGGTTATTGGAGAGAAAACCGGCACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
*****

GES-2      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
NPa11      ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGACAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
*****

GES-2      AACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCCGGTCAAGTTATTACACAA
NPa11      AACTATCGGCCGAACAACGT-----
***** * *****

```

Figura 6. Alineamiento de la secuencias nucleotídicas del gen *ges-2*, y el encontrado en la cepa NPa11.

```

NPa11 -----MCSTFKFPLAALVFERI
GES-2 SEKLTfKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRFAMCSTFKFPLAALVFERI
          *****

NPa11 DSGTERGDRKLSYGRDMIVEWSPAAERFLASGHMTVLEAAQAAVQLSDNGATNLLLREIG
GES-2 DSGTERGDRKLSYGFDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQAAVQLSDNGATNLLLREIG
          *****:*****

NPa11 GPAAMTQYFRKIGDSVSRDLRKEPEMNDNTPGDLRDTTTPIAMARTVAKVLYGGALTPS
GES-2 GPAAMTQYFRKIGDSVSRDLRKEPEMNDNTPGDLRDTTTPIAMARTVAKVLYGGALSTS
          ***** **

NPa11 THTIERWLIQNQTGDATLRAGFPKDWVIGKGTGTCANGGRNDIGFFKAQDRDYAVAVYTT
GES-2 THTIERWLIQNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRNDIGFFKAQERDYAVAVYTT
          *****:*****:*****

NPa11 APKLSAEQR-----
GES-2 APKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK
          ***** :*

```

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína GES-2 y de la cepa NPa11. En **amarillo** se muestran los aminoácidos diferentes que existen entre GES-2 y los encontrados en la cepa NPa11.

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

P. aeruginosa, es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas*, caracterizado por su alta virulencia y morbimortalidad. El índice de mortalidad asociado a este microorganismo oscila entre el 33 - 61%, y los pacientes inmunocomprometidos son los más susceptibles a contraerla (**Pitout et al.**, 2008.) Adicionalmente, existe una alta incidencia de cepas multiresistentes frente a los antibióticos β -lactámicos comúnmente empleados, lo cual dificulta el tratamiento de este tipo de infecciones (**Fariñas y Martínez**, 2013). Las infecciones nosocomiales causadas por este microorganismo tienen una alta prevalencia en centros de tercer nivel (**Pitout et al.**, 2008; **Rizek et al.**, 2014). En el presente trabajo se estudiaron cepas de *P. aeruginosa* procedentes del HPN, un hospital de tercer nivel, que es susceptible de tener una alta tasa de prevalencia para infección nosocomial por *P. aeruginosa* y otros microorganismos, como ocurre en otros hospitales pediátricos de tercer nivel en México (**Lombardo et al.**, 2012).

P. aeruginosa logra sobrevivir en ambientes y temperaturas propias del entorno clínico y crece fácilmente en medios de cultivo habituales, pues sus requerimientos nutritivos son escasos. Las infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* generalmente incluyen neumonías, bacteremias, infección de herida quirúrgica e infecciones de vías urinarias, en UTI y en unidades oncohematológicas (**Kerr y Snelling**, 2009; **Sordé et al.**, 2011). Los resultados obtenidos con este estudio mostraron que las cepas aisladas en el HNP proceden en mayor cantidad del servicio de urología (36%), estos datos guardan una correlación directa con la presencia de *P. aeruginosa* como uno de los principales agentes etiológicos en infección de vías urinarias, sitio donde se disemina para producir infecciones sistémicas (**Gales et al.**, 2002). Además, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con otros estudios realizados en diferentes hospitales de México (**Quinones et al.**, 2009; **Morfin et al.**, 2012; **Ochoa et al.**, 2013).

Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que los aislados de *P. aeruginosa* presenta un porcentaje de resistencia del 27% para β -lactámicos y el 28% de las cepas mostraron multirresistencia. Es motivo de gran preocupación que estos aislamientos presenten un perfil de multirresistencia, especialmente aquellos resistentes a todos los antimicrobianos evaluados y los resistentes a colistina, pues aunque este viejo antimicrobiano con actividad contra *Pseudomonas* se había dejado de usar por su toxicidad, ante el surgimiento de aislamientos multirresistentes hoy se le considera una de las opciones de tratamiento contra estas cepas (**Driscoll et al.**, 2007; **Page y Heim**, 2009). Sin embargo, el fenotipo de resistencia por el método de disco frecuentemente es poco recomendado para el ensayo de colistina en *P. aeruginosa*, debido a su mala correlación comparada con concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar y Etest (**Gómez et al.**, 2009), por lo que es necesario confirmar el perfil de resistencia a colistina en las cepas resistentes a este antibiótico por CMI por el método de dilución en agar, puesto que es un método mas sensible para la prueba de susceptibilidad a éste antibiótico (**Tan et al.**, 2007).

La primera *P. aeruginosa* productora de M β L fue reportada en Japón en 1991, posteriormente otras cepas han sido descritas en todo el mundo. Las M β L hidrolizan una amplia variedad de agentes β -lactámicos exceptuando aztreonam (**Queenan y Bush**, 2007; **Pérez et al.**, 2008; **Strateva y Yordanov**, 2009; **Lister et al.**, 2009). En este estudio se obtuvieron 13 cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos de las cuales tres presentaron fenotipo de multirresistencia y además fueron sensibles a aztreonam, sin embargo, no presentaron genes que codifican para las M β L buscadas, como se muestra en la tabla 7. No obstante, es necesario realizar la búsqueda de los genes; *spm* y *ndm* que también codifican para M β L, puesto que en Monterrey, México ya se encontró la primera NDM-1 en una cepa de *Providencia rettgeri* (**Rodriguez et al.**, 2014).

P. aeruginosa es un microorganismo que utiliza varios mecanismos de resistencia, para poder adaptarse y sobrevivir, en este estudio la resistencia a

antibióticos carbapenémicos no se debió a metaloenzimas de tipo IMP, VIM y GIM (ya que no se encontraron). Sin embargo, existen otros grupos de β -lactamasas con actividad carbapememasa que han sido descritos: las de clase A que son dependientes de serina e inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico e inducibles (GES, KPC), las de clase B; dependientes de zinc e inhibidas por el EDTA, son inducibles o asociadas a plásmidos conjugativos (M β L) y las de clase D (oxacilinasas), que han sido identificadas en aislados clínicos en China, Sudáfrica, Brasil y Colombia (**Lister et al.**, 2009; **Zavascki et al.**, 2010), que podrían estar presentes en éstas cepas, por lo que se recomienda buscarlos.

La presencia de GES, KPC y OXA en *P. aeruginosa* es ocasional (**Villegas et al.**, 2007; **Sevillano et al.**, 2009; **Viedma et al.**, 2009), ya que las carbapememasas más frecuentemente detectadas y diseminadas en esta especie son VIM e IMP (**Cornaglia et al.**, 2011; **Diene y Rolain**, 2014). Sin embargo, en este trabajo se encontró a *ges* en el 31% de las cepas resistentes a carbapenémicos, no obstante, éstas proceden del mismo paciente y no tienen el mismo perfil fenotípico de resistencia, por lo que es necesario realizar su tipificación molecular para determinar si es la misma cepa.

Las enzimas de tipo GES han sido encontradas en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, generalmente los genes que las codifican son acarreados por integrones aunque también se ha visto que pueden estar presentes en el cromosoma; se encuentran registradas 27 variantes de *ges*, que típicamente codifican para BLEEs que hidrolizan cefalosporinas y aztreonam, sin embargo, las variantes 2, 4, 5, 6, 11, 12, 18 y 20 presentan actividad carbapememasa y se han reportado en varios países de Europa, Asia, América y África (**Poirel et al.**, 2001; **Bogaerts et al.**, 2010; **Barrios et al.**, 2012; **Bebrone et al.**, 2013; **Garza et al.**, 2014). En este estudio, se detectó un gen que codifica para la β -lactamasa con actividad carbapememasa tipo GES-2, con un 96% de similitud con *ges-2*. Esta enzima fue descrita por primera vez por Poirel y colaboradores en 2001.

La β -lactamasa GES-2, tiene un cambio de aminoácido de glicina por asparagina en la posición 170 y tres cambios de aminoácidos en comparación con GES-1, su actividad carbapememasa se debe a esta mutación, que aumenta su eficiencia catalítica frente a imipenem. Esta sustitución se encuentra en el lazo omega de la enzima β -lactamasa de clase A, que es de primordial importancia en la actividad catalítica de estas enzimas (**Vila y Francesc, 2010**). La capacidad de hidrólisis de esta enzima también se ve favorecida por la interacción entre las cisteínas de las posiciones 69 y 238, ya que forman un puente disulfuro que puede permitir que el sitio catalítico de la enzima se una a imipenem (**Raquet et al., 1997**). Por otra parte, algunos residuos de aminoácidos son propensos a estar involucrados en el aumento de la eficiencia catalítica de GES-2 (**Poirel et al., 2001**); por ejemplo, las interacciones químicas entre GES-2 y ertapenem ocurren en el sitio catalítico conformado por los residuos de aminoácidos: ácido glutámico en la posición 166, asparagina 170, 132 y serina 70, mismos que tienen un efecto crucial en la mejora de la actividad carbapememasa (**Stewart et al., 2015; Ho et al., 2015**).

El hallazgo del gen que porta la cepa NPa11 con un 96% de similitud con *ges-2*, sugiere que la difusión de resistencia a antibióticos carbapenémicos en el HNP en *P. aeruginosa* podría ser a través de cassetts genéticos dentro de integrones (**Piersigilli et al., 2009**). Por lo tanto, es muy importante entender la epidemiología de estas cepas, a fin de lograr la aplicación de un programa hospitalario adecuado para contener y reducir su difusión. Dado que, *P. aeruginosa* puede adquirir este mecanismo de resistencia y ser una fuente de propagación de *ges* a otros géneros y especies de bacterias. Sin embargo, la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* se puede deber a la expresión de otros genes, por lo que se sugiere continuar con el estudio de estas cepas.

Por otro lado, a pesar de que el gen que se encontró en la cepa NPa11 tiene un 96% de similitud con *ges-2*, podría tratarse de una nueva variante de *ges*, puesto que la secuencia de aminoácidos hallada en la cepa NPa11 presentan siete aminoácidos diferentes, con respecto a la secuencia de

aminoácidos de GES-2 (figura 6). Además, el gen *ges* encontrado en la cepa NPa11 tiene un 95% de similitud con *ges-13*, *ges-16* y *ges-20*, de acuerdo con el análisis de las secuencias realizado en BLASTn, BLASTp y Clustal Omega. Por lo que se recomienda realizar una nueva secuenciación de todo el gen, con la finalidad de determinar su secuencia completa; realizar su análisis teniendo un mayor número de nucleótidos y establecer a qué variante *ges* es similar en mayor porcentaje o proponer que efectivamente se trata de una nueva variante de *ges*.

Dentro de las limitaciones de este estudio se pueden mencionar que no hay estudios anteriores de este tipo en este hospital, por lo que se recomienda continuar haciendo análisis para la detección de β -lactamasas, sobre todo de aquellas con actividad carbapememasa, en el HNP, con la finalidad de tener una vigilancia epidemiológica.

12. CONCLUSIONES

- Urología fue el servicio del HPN donde se obtuvo el mayor número de aislamientos de *P. aeruginosa*.
- El 40% de las cepas de estudio presentaron resistencia a imipenem y meropenem.
- Las 13 cepas resistentes a carbapenémicos no portan genes de resistencia *imp*, *vim* y *gim-1*.
- Las cepas de estudio no portan MβL del tipo: GIM, IMP y VIM, como mecanismo de resistencia a los antibióticos carbapenémicos.
- El 31% de las cepas resistentes a carbapenémicos portan a *ges*.
- La cepa NPa11 porta un gen que tiene un 96% de similitud con *ges-2*.

13. PERSPECTIVAS

- Determinar la CMI de las 13 cepas resistentes IMP y MEM y continuar con el estudio de la resistencia a nivel molecular de estas cepas.
- Secuenciar los productos de las demás cepas que portan *ges*.
- Examinar si las MβL de tipo NDM y SPM están presentes en las cepas resistentes a IMP y MEM.
- Continuar con el estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos en las cepas resistentes a éstos.
- Realizar la búsqueda de carbapememasas de clase A (KPC) y clase D (OXA), en las cepas resistentes a carbapenémicos.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Ayala A. C.**, 2013. Identificación de genes involucrados en la resistencia a β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* causante de infecciones nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de maestría.
- Barrios H., Garza U., Ochoa L. E., Reyna F., Rojas T., Morfin R., Rodríguez E., Garza E., González G., Volkow P., Cornejo P., Silva J.**, 2012. A plasmid-encoded class 1 Integron contains GES-type extended spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in México. *Antimicrob Agents Chemother.* 56 (7): 4032– 4034
- Bebrone C., Bogaerts P., Delbrück H., Bennink S., Kupper M. B., Castro R., Glupczynski Y. y Hoffmann K.**, 2013. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother.* 57 (1): 396–40.
- Bello L. M E.**, 2015. 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. Tesis de maestría.
- Belotti P. T., Thabet L., Laffargue A., André C., Coulange M. L., Arpin C., Messadi A., M'Zali F., Quentin C. y Dubois V.**, 2015. Description of an original integron encompassing *bla_{VIM-2}*, *qnrVC1* and genes encoding bacterial group II intron proteins in *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrob Agents Chemother* 70 (8): 2237-2240.
- Bogaerts P., Naas T., El Garch F., Cuzon G., Deplano A., Delaire T., Huang T., Lissou B., Nordmann P., Glupczynski Y.**, 2010. GES extended-spectrum β -Lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(11): 4872–4878
- Casellas J. M.**, 2011. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública.* 30(6):519–28

- Castanheria M., Toleman M., Jones R., Schmidt F., Walsh T.,** 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 4654-4661
- Clinical and Laboratory Standards Institute,** 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. 34(1):58-62
- Cornaglia G., Giamarellou H., y Rossolini G. M.,** 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?. *Lancet Infect Dis.* 11:381–93
- Diaz M. A., Buelvas F. A. y Tovar C.,** 2009. Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an armory of molecular mechanisms in order to use. *Rev Med.* 8(2):1-2.
- Diene S. M. y Rolain J. M.,** 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 20 (9): 831–838
- Driscoll J. A., Brody S. L., Kollef M. H.,** 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.*67: 351-68.
- Fariñas M. C., y Martínez L.,** 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(6):402–409
- Gales A. C., Sader H. S. y Jones R.N.,** 2002. SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect.* 44:289-299.
- Garza R. U., Barrios H., Reyna F., Tamayo E., Catalan J. C., Morfin R., Rodríguez E., Volkow P., Cornejo P., González A., Gaytan J. González M. R., Vázquez M., Silva J.,** 2014. Widespread of ESBL- and carbapenemase *GES-type* genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagn Micr Infec Dis.* 81: 135-137
- Garza R. U., Tinoco P., Silva S. J., Morfín O. R., Rodríguez N. E. y León G. G.,** 2007. Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int J Antimicrob Agents.* 31:78-80.

- Gómez J. L., Aracil B. y Gil Y.,** 2009. [Comparison between agar dilution and three other methods for determining the susceptibility of 228 clinical isolates of non-fermenting gram-negative rods]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 27(6): 331-7
- Gonzales E. E.,** 2012. Metallo- β -lactamases: the end of β -lactams? *Rev. Peru. Epidemiol.*, ISSN: 1609-7211
- Gonzales E. E., Vicente T. W., Champi M. R., Soto P. J., Flores P. W. y Lovera G. M.,** 2013. Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 30(2):241-45.
- Guevara A., Waard J. y Araque M.,** 2009. *bla*_{VIM-2} gene detection in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in an intensive care unit in Bolívar city, Venezuela. *Rev Chil Infect.* 26(4):336-341
- Gutiérrez O., Juan C., Cercenado E., Navarro F., Bouza E., Coll P., Perez J. L. y Oliver A.,** 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemoter.* 51(12):4329–35.
- Hirsch E. y Tam V.,** 2010. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert. Rev. Ltd.* 10(4):441–51
- Ho J. J., Hun L. J., Jin L. J., Seung P. K., Mustafa K. A., Lee C., Chul J. B., y Hee L. S.,** 2015. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 9654-9692
- Kerr K.G. y Snelling A.M.,** 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect.*73: 338–44.
- Kung V. L., Ozer E. A. y Hauser A. R.,** 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(4):621-41.
- Lebeque P. Y., Morris Q. H. J., y Calás V. N.,** 2006. Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Cuba Med.* 45(1):1-7
- Lister P. D., Wolter D.J. y Hanson N. D.,** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 22 (4):582–610

- Livermore D. M.**, 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 34:634–40
- López P. M. J., Barcenilla G. F., Amaya V. R. y Garnacho M. J.**, 2011. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. Med Intensiva. 35(1):41—53
- Lombardo A. E., Hernández O. H., Pérez V. M., Orozco H., Soto E., Haro A. y Caniza M.**, 2012. Estudio de prevalencia puntual en un hospital pediátrico de tercer nivel. Acta Pediatr Mex. 33(2):76-79
- Martínez P. L.**, 2011. Tesis de Maestría. Detección de los genes que codifican para bombas de expulsión y β -lactamasas de espectro extendido en *Pseudomonas aeruginosa* causante de infecciones nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Maseda E., Mensa J., Valía J. C. Gomez J. I., Ramasco F., Samsó E., Chiveli M. A., Pereira J., González R., Aguilar G., Tamayo G., Ojeda N., Rico J., Giménez M. J., y Aguilar I.**, 2013. Bugs, hosts and ICU environment: countering pan-resistance in nosocomial microbiota and treating bacterial infections in the critical care setting. Rev Esp Quimioter. 26(4):312-331
- Moreno K. M.**, 2013. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. Rev Méd Costa Rica Centroamérica. 608: 599 – 605
- Morfin O. R., Tinoco F. J. C., Sader H, Salcido G. L., Pérez G. H. R., González D. E., Petersen L. y Rodríguez N. E.**, 2012. Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. BMC Research Notes. 5:277
- Morita J., Tomida J., y Kawamura Y.**, 2014. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. Front Microbiol. 4: 422
- Nicolau J. C. y Oliver A.**, 2010. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 28(1):19-28.
- Obritsch M., Fish D., MacLaren R. y Jung R.**, 2005. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. Pharmacotherapy. 25(10):1353-1364.
- Ochoa S., A., López M. F., Escalona G., Cruz C. A., Dávila L., López M. B., Jiménez T. Y., Giono Silvia, Eslava C., Hernández C., R., Xicohtencatl C. J.**, 2013. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas

con la formación de biopelículas. Bol Med Hosp Infant Mex. 70: 138-150

- Page M. G. P. y Heim J.**, 2009. Prospects for the next anti-*Pseudomonas* drug. Curr. Opin. Pharmacol. 9: 558–565
- Partridge S. R., Tsafnat G., Coiera E. y Iredell J.R.**, 2009. Gene cassettes and cassettearrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev. 33:757–784.
- Pérez A., García P., Poggi H., Braun S., Castillo C., Román J.C., Lagos M., Romeo E., Porte L., Labarca J. y González G.** 2008. Presencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. Rev Med Chile. 136: 423-432
- Pérez M. L. H., Zurita V. I. M., Pérez R. N., Patiño C. N. y Rafael C. O.**, 2010. Nosocomial infections: agents, current management and prevention. Rev Cient Cienc Med. 13(2):94-99
- Pier G. B.**, 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. Int J Med Microbiol. 297:277–295
- Piersigilli A., Enrico M. C., Bongiovanni M. E., Bilbao L. E., Martínez G., y Ledesma E.**, 2009. Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producers of extended spectrum β -lactamases at a private institution in Cordoba. Rev Chil Infect. 26 (4): 331-335
- Pitout J. D., Revathi G., Chow B. L., Kabera B., Kariuki B., y Nordmann P.**, 2008. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect. 14:755-759.
- Poirel L., Weldhagen G. F., Naas T., Champs C., Dove M. G., y Nordmann P.**, 2001. GES-2, a class A b-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents chemother. 45 (9): 2598–2603
- Poole K.**, 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol. 2(65):1-13
- Queenan A. M., y Bush K.**, 2007. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 20(3):440-458
- Quinones F. F., Galicia V. M., Marchiaro P., Mussi M. A., Ballerini V., y Vila A. J.**, 2009. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains

producing metallo-beta-lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. Clin Microbiol Infect. 16:126-31.

- Ramírez M. S., Piñeiro S., Centrón D.**, 2010. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob Agents Chemoter. 54(2): 699-706.
- Ramos I.**, 2014. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones nosocomiales del hospital ISSSTE-Puebla y búsqueda del gen *vim*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de licenciatura.
- Raquet X., Lamotte B. J., Bouillenne F. y Frère J. M.**, 1997. A disulfide bridge near the active site of carbapenem-hydrolyzing class A b-lactamases might explain their unusual substrate profile. Proteins 27:47–58
- Rizek C., Fu L., Cavalcanti L., Leite G., Ramos J., Rossi F., Guimaraes T., Levin A.S., y Figueiredo C. S.**, 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. Ann Microbiol Antimicrob. 13:43
- Rodríguez N. E., León G. G., Petersen M. S., Pérez H. R., González D. E., Morfín O. R.**, 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. Biomédica. 34(1):181-90
- Rojo B. B., Estepa V., Cebollada R., Toro M. Somalo S., Seral C., Castillo F. J., Torres C. y Sáenz Y.**, 2014. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. Int J Med Microbiol. 304: 405–414
- Saavedra S. Y., Duarte C., González M. N. y Realpe M. E.**, 2014. Characterization of isolates of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from seven Colombian provinces. Bioméd. 34(1): 217-23
- Sacha P., Wieczorek P., Hauschild T., Zórawski M., Olszańska D., Tryniszewska E.**, 2008. Metallo-β-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* - a novel mechanism resistance to β-lactam antibiotics. Folia Histochem Cytochem. 46(2):137-142
- Sánchez M. G. Garza R. U. J., Reyna F. F. L., Gaytán M. J., Lorenzo B. I. G. y Silva S. J.**, 2010. In 169, A new class 1 integron that encoded *bla*_{IMP-18}

- in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Mexico. *Arc Med R.* 41:235-239
- Sevillano E., Gallego L., y Garcia J. M.,** 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol.* 57: 493-495.
- Slama T. G.,** 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care.* 12(4):S4
- Sordé R., Pahissa A. y Rello J.,** 2011. Management of refractory *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Infec Drug Resist.* 4:31–41.
- Stewart N. K., Smith C. A., Frase H., Black D. J. y Vakulenko S. B.,** 2015 Kinetic and structural requirements for carbapenemase activity in GES-type β - Lactamases. *Biochem.* 54: 588–597
- Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S. y Olson M. V.,** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406: 959–64.
- Strateva T. y Yordanov D.,** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 58: 1133–1148
- Tafur J. D., Torres J. A. y Villegas M. V.,** 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Rev ACIN.* 12(3):217-26
- Tan T. Y. y Ng S. Y.,** 2007. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect.* 13: 541–544
- Tam V. H., Chang K. T. y Abdelraouf K.,** 2010. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):1160–1164
- Valerio, C. E.,** 2012. Tesis de maestría. Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Viedma E., Juan C., Acosta J., Zamorano L., Otero J. R., Sanz F., Chaves F., y Oliver A.,** 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive

sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 4930-4933

Vila J., y Francesc M., 2010. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28(10):726- 736.

Villegas M. V., Lolans K., Correa A., Kattan J. N., Lopez J. A. y Quinn J. P., 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 1553-1555

Walsh T. R., 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin. Infect Dis.* 21: 367–371.

WHO/CDS/CSR/EPH.,2002. Prevención de las infecciones nosocomiales. Práctica. 2ª edición.

Zavascki A. P., Carvalhaes C. G., Picão R. C. y Gales A.C., 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect.* 8:71–93

15. ANEXOS

Anexo 1. Información de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recopilados en el HPN de la ciudad de Puebla

Cepa	Origen de muestra	Edad	Sexo	Servicio
NPa01	S. DE HX.QX. DE MIELOMENINGOCELE	12A	F	U
NPa02	S. DE HX.QX. DE MIELOMENINGOCELE	9D	M	CX
NPa03	S. DE HX.QX. DE MIELOMENINGOCELE	9D	M	CX
NPa04	S. DE TÓRAX DESPUÉS DEL ASEO QUIRÚRGICO	3A	M	CE
NPa05	S. HX.QX. ABDOMINAL	2M	M	CX
NPa06	S. HX.QX. DESPUÉS DEL ASEO	3A	M	CE
NPa07	S. HX.QX. ABDOMINAL	10A	F	U
NPa08	S. HX.QX. ABDOMINAL	11A	M	CX
NPa09	S. HX.QX. ABDOMINAL	11A	M	CX
NPa10	S. DE RODILLA IZQUIERDA	17A	M	U
NPa11	S. HX.QX. ABDOMINAL	10M	M	U
NPa12	S. HX.QX. ABDOMINAL	10M	M	U
NPa13	S. HX.QX. ABDOMINAL	10M	M	UCI
NPa14	ABSCESO EN HX. ABDOMINAL	4M	F	U
NPa15	S. HX.QX. ABDOMINAL	10M	M	UCI
NPa16	S. DE HX.QX. DE MIELOMENINGOCELE	8M	F	U
NPa17	S. HX.QX. ABDOMINAL	10M	M	CX
NPa18	S. HX EN CRÁNEO	2M	M	CX
NPa19	LÍQUIDO PERITONEAL	18A	M	MI
NPa20	ABSCESO LUMBAR DERECHO	3M	F	MI
NPa21	S. HX.QX. ABDOMINAL	11M	M	CX
NPa22	S. HX.QX. ABDOMINAL	10M	M	CX
NPa23	S. HX. EN CRÁNEO	2M	M	CX
NPa25	S. DE AMPUTACIÓN DE ORTEJO IZQUIERDO	12A	M	U
NPa26	LÍQUIDO PERITONEAL	13A	F	U
NPa27	S. DE ULCERA SACROLUMBAR	11A	M	U
NPa28	MATERIA FECAL	9M	M	OH
NPa29	MATERIA FECAL	9M	M	OH
NPa30	MATERIA FECAL	9M	M	OH
NPa31	S. DE HERIDA EN PIERNA DERECHA	6A	M	CE
NPa32	S. DE HX.QX. ABDOMINAL	1M	M	UCI
NPs33	S. DE HX.QX. ABDOMINAL	1M	M	UCI

A: años, D: días, M: meses, F: femenino, M: masculino, U: Urología, MI: Medicina Interna, OH: Oncohematología, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, CE: Unidad de Quemados, CX: Cirugía, S: Secreción, HX. QX.: Herida quirúrgica.

Anexo 2. Sitios de unión de los oligonucleótidos GES-F y GES-R con *ges-2*

ges-2

```
ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCATTTGCT
ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACGGTACCTGCGCCAACGGGGCCGGAACGAC
ATTGGTTTTTTTTAAAGCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTGCGTCAAGTTATTACACAA
CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
```

Tamaño del gen: 864pb

Tamaño del amplicon: ~864pb

Sitio de unión de GES-F: 1-18pb

Sitio de unión de GES-R: 845-864pb

Se marcan en color **amarillo** los sitios de unión de los oligonucleótidos.